

ISSN 2591-6653

Naturalia

Patagónica

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

VOLUMEN 15 (2019)



¿La temperatura y la escala de cultivo son factores determinantes en la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos en microalgas?

Are temperature and culture scale determinant factors in biochemical composition and fatty acid profile in microalgae?

Rojas Quiroga María Laura*^{1,2}, Avaro Marisa³, Gittardi Agustín^{3,5}, Díaz de Vivar María Enriqueta³, Soria Gaspar^{2,4}, Van der Molen Silvina¹

¹Instituto de Biología de Organismos Marinos (IBIOMAR, CCT CONICET-CENPAT), Boulevard Brown 2915, Puerto Madryn, U9120ACD, Chubut, Argentina.

²Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Boulevard Brown 2930, Puerto Madryn, U9120ACQ, Chubut, Argentina

³Laboratorio de Química de Organismos Marinos (LABQUIOM), Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Sede Puerto Madryn, U9120ACQ, Chubut, Argentina

⁴Laboratorio de Oceanografía Biológica (LOBio), Centro para el Estudio de los Sistemas Marinos (CESIMAR, CCT CONICET-CENPAT), Boulevard Brown 2915, Puerto Madryn, U9120ACD, Chubut, Argentina

⁵Facultad Regional Chubut (FRCH). Universidad Tecnológica Nacional (UTN). Sede Puerto Madryn. Av. del Trabajo 1536, Puerto Madryn, U9120QGQ. Argentina.

*E-mail: rojasquiroga@cenpat-conicet.gob.ar

RESUMEN

Se cultivaron tres especies de microlagas -*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp.- en sistema batch en dos condiciones que combinaron la escala de producción y la temperatura: i) pequeña escala y 24 °C, y ii) escala masiva y temperatura variable. Se determinó la composición bioquímica proximal y el contenido de cenizas y se identificaron y cuantificaron los ácidos grasos para cada combinación de especie-tratamiento por triplicado. Ninguna de las especies presentó diferencias significativas para ninguno de sus componentes (lípidos, carbohidratos, proteínas y cenizas) entre tratamientos. Los ácidos grasos no presentaron diferencias significativas cuando se los analizó agrupándolos por grado de saturación (insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados). Los ácidos grasos poliinsaturados agrupados en las familias (n – 3) o (n – 6) y los cocientes -(SFA + MUFA) / PUFA y (n – 3) / (n – 6)- tampoco presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Al realizar análisis más profundos de cada ácido graso en particular, con especial énfasis en aquellos considerados esenciales, se

pudo determinar que aunque los tratamientos aplicados no modificaron significativamente la composición bioquímica de las microalgas estudiadas se observaron diferencias que deben ser tenidas en cuenta a la hora de determinar las dietas óptimas para cada especie de bivalvo en cada etapa de su ciclo de vida.

PALABRAS CLAVES: Composición Bioquímica; Composición de Ácidos grasos; Escala; Microalga; Temperatura

ABSTRACT

Isochrysis galbana, *Chaetoceros* sp. and *Tetraselmis* sp. were cultivated in a batch system at two conditions that combine scale production and temperature: i) small scale and 24°C, and ii) massive scale and variable temperature. Proximal composition and ash were determined and fatty acids were identified and quantified for each species-treatment combination for triplicate. None of the three species presented significant differences for each component (lipid, carbohydrate, protein, and ash) between treatments. Fatty acids did not present significant differences in the analysis performed grouping them by degree of saturation (unsaturated, monounsaturated and polyunsaturated). Polyunsaturated fatty acids did not present significant differences between treatments when they are grouped in (n – 3) or (n – 6) families either. Additionally, the two ratios (SFA + MUFA) / PUFA and (n – 3) / (n – 6) did not show significant differences between treatments: The applied treatments did not significantly modify the proximal composition, however, when individual fatty acids were analyzed, with the main emphasis on those that are considered essential, differences can be observed that deserve to be taken into account when determining the optimal diets for each bivalve species in each life stage.

KEY WORDS: Biochemical composition; Fatty acid composition; Microalgae; Scale; Temperature.

INTRODUCCIÓN

En todas las etapas del cultivo de moluscos bivalvos, desde larvas hasta adultos las microalgas son utilizadas como único alimento (Helm y Bourne, 2006). Los requerimientos nutricionales en bivalvos marinos varían a lo largo de su ciclo de vida, es decir que cada estadio

posee requerimientos energéticos específicos. Así es como por ejemplo, durante la formación de la concha y el crecimiento somático, son necesarias mayores cantidades de proteínas formadoras de tejidos (Kreeger *et al.*, 1995, Darriba *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2011). En cambio, a lo largo de la

gametogénesis, cuando los organismos están desarrollando sus gónadas, son necesarias mayores cantidades de lípidos de buena calidad, y en este caso los carbohidratos juegan un rol importante en la biosíntesis de los mismos (Gatenby *et al.*, 2003). En las hembras además puede observarse que tanto el contenido de lípidos como de proteínas se incrementa durante la gametogénesis. Para alcanzar los requerimientos energéticos necesarios en cada etapa de vida estos compuestos deben ser suministrados mediante el alimento ingerido y/o por reservas previamente almacenadas en gónadas u otros tejidos (Saucedo *et al.*, 2002, Darriba *et al.*, 2005).

El éxito de una producción de bivalvos depende de la disponibilidad de cultivos de microalgas apropiados que posean ciertas características. Entre ellas se incluyen: tamaño, calidad nutricional, ausencia de toxinas y tasas de crecimiento adecuadas para la producción en masa (Whyte, 1987, Polanco *et al.*, 2000, Martínez-Fernández y Southgate, 2007).

Dado que la composición bioquímica de las microalgas depende de diversos factores (especie, condiciones de cultivo, etapa de crecimiento, etc.), el conocer dicha composición bioquímica resulta indispensable en el cultivo de bivalvos

en condiciones controladas. Además, es sabido que las dietas multiespecíficas de microalgas son más efectivas que aquellas mono-específicas ya que mejoran el desarrollo de las larvas y aumentan sus tasas de crecimiento, incrementando la producción general de semillas de bivalvos (Helm y Bourne, 2006). Entre las especies de microalgas algunas de las más utilizadas como alimento para los moluscos bivalvos debido a su buena ingestibilidad y digestibilidad son *Isochrysis galbana* (Filo Haptophyta), *Chaetoceros* sp. (Filo Bacillariophyta) y *Tetraselmis* sp. (Filo Chlorophyta) (Hoff y Snell, 1989, Brown, 2002, Helm y Bourne, 2006, da Costa, 2009).

La composición bioquímica de las microalgas cultivadas varía no solo entre especies de microalgas sino también que la calidad nutricional depende de las condiciones de cultivo de las mismas. Si las condiciones de cultivo se encuentran estandarizadas, los cultivos de microalgas con buenos y altos valores nutricionales tendrán valores similares entre distintos cultivos para cada una de las especies en particular (Helm y Bourne, 2006). Los parámetros físico-químicos de un cultivo como la temperatura, el fotoperiodo, el pH, el medio de cultivo utilizado y la salinidad son de gran relevancia en términos de

tasas de crecimiento y calidad bioquímica de las microalgas (Hoff y Snell, 1989, Brown *et al.*, 1993, Brown *et al.*, 1993). Por otra parte, la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo de microalgas también afecta su composición bioquímica (Whyte *et al.*, 1987, Huerlimann *et al.*, 2010). En organismos cultivados en sistemas tipo batch, la composición bioquímica a menudo varía simultáneamente con la disminución de nutrientes en el medio de cultivo que se produce a lo largo del crecimiento en densidad del cultivo (Morris *et al.*, 1983, Whyte *et al.*, 1987). Generalmente las proteínas disminuyen su cantidad mientras que los lípidos y carbohidratos aumentan cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento (Ogbonna y Tanaka, 1996, Zhu *et al.*, 1997).

Para bivalvos cultivados en condiciones controladas, las microalgas son la principal fuente de micro y macronutrientes (Hoff y Snell, 1989). Es por ello que el conocimiento de la composición bioquímica de las microalgas usadas como alimento de los cultivos *target* resulta esencial a la hora de diseñar las dietas óptimas para cada fase de los mismos (da Costa, 2009). Los carbohidratos y los lípidos son considerados esenciales en las dietas (Enright *et al.*, 1986), y entre los últimos,

en particular los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Helm *et al.*, 1973, Langdon y Waldock, 1981). Los ácidos grasos poliinsaturados (ácidos grasos que contienen más de una insaturación en su cadena hidrocarbonada) pueden ser divididos en dos “familias” dependiendo de la posición del primer doble enlace más cercano al fin de la cadena hidrocarbonada: $(n - 3)$ y $(n - 6)$. Dado que la mayoría de los bivalvos carecen de la capacidad de sintetizar PUFA de ambas familias a partir de precursores saturados (Gatenby *et al.*, 2003) el nivel de estos componentes es determinado principalmente por la ingesta a través de la dieta. Los bivalvos necesitan altas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados, tales como 20:5n-3c (ácido eicosapentanoico, EPA) o 22:6n-3c (ácido docosahexaenoico, DHA), por lo tanto especies de microalgas con alto grado nutricional deben ser incorporadas. En este sentido, las dietas de microalgas que tienen bajas proporciones del cociente $(SFA+MUFA)/PUFA$ y cociente $(n - 3)/(n - 6)$ mayor que 2 son óptimas, por ejemplo en el cultivo de larvas y juveniles de ostras (Mitra *et al.*, 2015). Cuando se realiza el cultivo del ciclo de vida completo de un molusco bivalvo, se requieren distintas cantidades de

alimento para cubrir las diferentes necesidades acordes a cada estadio del cultivo (Helm y Bourne, 2006, da Costa, 2009). Mientras que en proyectos a escalas experimentales y piloto los cultivos de larvas precisan mililitros de microalgas, los tanques de reproductores necesitan varios litros. Es por esta razón que los cultivos de microalgas difieren en escala dependiendo del estadio al que se quiera alimentar: pequeña escala para las larvas (menos de 5 l diarios) y escala masiva para los reproductores (más de 50 l diarios). Por otra parte, los cultivos masivos de microalgas son llevados a cabo en laboratorios con condiciones como la temperatura mucho más variable (invernaderos) que aquellos que se realizan a escala pequeña (laboratorios con temperatura controlada). Por las dimensiones de los cultivos masivos es muy poco probable que sean realizados en laboratorios bajo condiciones estables de temperatura. Asimismo, dado que son los grandes volúmenes de agua los que amortiguan las fluctuaciones térmicas de los cultivos, no es posible desarrollar cultivos a pequeña escala en instalaciones tipo invernadero. Es por esto que para poder determinar las proporciones correctas de cada especie de microalga en la dieta es necesario conocer cómo varía la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos

entre estos dos tipos de cultivos experimentales.

El objetivo de este estudio es determinar si la escala y la temperatura de cultivo actuando en forma conjunta modifican la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas usadas en la mayoría de los criaderos de bivalvos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo de las microalgas

Se realizaron cultivos monoespecíficos en sistemas tipo *batch* de tres especies de microalgas: *Isochrysis galbana* (Iso), *Tetraselmis* sp. (Tetra), y *Chaetoceros* sp. (Chaeto) (*Isochrysis galbana* Parke LMPA 08 origen USA, *Tetraselmis* sp. Stein LMPA 27 origen Alemania, *Chaetoceros* sp. Paulsen LMPA 18 origen Mar del Plata; Laboratorio de Microalgas, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco). Para la realización de los experimentos se utilizó agua de mar filtrada a 1 micra mediante sistema de filtrado con cartuchos de espuma de polipropileno (10, 5 y 1 micra en forma consecutiva). La salinidad del agua fue ajustada a 24 ppm y se fertilizó con medio de cultivo F/2 de Guillard utilizando 1 ml de fertilizante por cada litro de agua de mar. En el caso

específico del cultivo de la diatomea (*Chaetoceros* sp.) se agregó 1 ml de solución de metasilicato de sodio nonahidratado - $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - por cada litro de agua de mar (Guillard y Ryther, 1962). El fotoperiodo se fijó en 24:0 luz-oscuridad.

Las microalgas fueron cultivadas bajo dos condiciones que combinaban la escala de producción y la temperatura: i) pequeña escala y 24°C, y ii) escala masiva y temperatura variable.

En el primer tratamiento las microalgas fueron cultivadas en contenedores de 3 l con 1 l de agua de mar fertilizada a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ que de aquí en más llamaremos cultivos a escala pequeña (P). En el segundo tratamiento las microalgas fueron cultivadas en tanques de 140 l con 100 l de agua de mar fertilizada y sin control térmico (la temperatura fluctuaba en concordancia con la variación térmica de la sala de cultivo), de aquí en más cultivos a escala masiva (M). Cada especie de microalga fue cultivada bajo ambos tratamientos y en total fueron llevados a cabo seis cultivos.

Las tasas de crecimiento de los cultivos fueron estimadas mediante el cálculo de la densidad celular utilizando un microscopio óptico y una cámara de Neubauer. Las microalgas fueron cosechadas cuando alcanzaron la fase estacionaria del crecimiento y

concentradas utilizando una centrífuga de temperatura controlada Sorvall RC5C a una temperatura de entre 15 y 20°C. Mientras que Iso y Chaeto fueron centrifugadas a una velocidad de 7000 RPM, Tetra se centrifugó a 5000 RPM ya que por su mayor tamaño requería menor velocidad para su precipitación. A pesar de que Iso y Tetra eran plausibles de ser concentradas mediante floculación usando hidróxido de sodio para aumentar el pH del medio de cultivo, este método fue descartado debido a que el mismo interferiría con la posterior extracción de lípidos y produciría modificaciones en el perfil de ácidos grasos (Borges *et al.*, 2016).

Debido a que diversos estudios no han podido detectar diferencias en la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos entre métodos de secado de las microalgas (Ryckebosch *et al.*, 2011, Stramarkou *et al.*, 2017) y dependiendo de la disponibilidad del equipamiento necesario, los concentrados de microalgas fueron secados utilizando dos métodos distintos. Algunas de las muestras fueron colocadas en tubos falcon, congeladas en un ultrafreezer a -80°C y luego secadas en liofilizador, y otras fueron colocadas en estufa a 60°C . Ambos conjuntos de muestras fueron removidas cuando las mismas alcanzaron peso constante. Luego cada

muestra fue molida utilizando un mortero de porcelana.

Análisis bioquímicos

Tres muestras secas de cada combinación de especie-tratamiento fueron analizadas para determinar la composición bioquímica y el contenido de cenizas de las mismas. Los resultados fueron expresados como la media (\pm DE) de peso de porcentaje de tejido seco.

Análisis de lípidos totales

Los lípidos totales fueron determinados utilizando el método colorimétrico de Zöllner y Kirsch (1962) utilizando el reactivo vainillin- ácido fosfórico- ácido sulfúrico y colesterol como estándar.

Se pesaron 10 mg de muestra seca y se hirvió durante 10 minutos en ácido sulfúrico concentrado. Luego de enfriada a temperatura ambiente, 50 μ L de la solución recibió 1 ml de reactivo de color (conteniendo 11,9 molL⁻¹ de ácido fosfórico y 8 mmolL⁻¹ de vainillin). La absorbancia fue medida a 530 nm.

Análisis de proteínas

El contenido de proteína soluble fue medido siguiendo la metodología descrita en Lowry et al. (1951) usando serum de albúmina bovina como estándar. Se pesaron 10 mg de muestra seca que fue luego digerida con hidróxido de sodio 1 N durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego una

alícuota del extracto de muestra digerida fue reaccionado con una solución de cobre alcalino (reactivo cobre- tartárico que contenía CuSO₄, tartrato de sodio y potasio y Na₂CO₃) seguido por la adición de Folin-Ciocalteu diluida (1:1 v/v) y la absorbancia fue medida a 750 nm.

Análisis de carbohidratos

El contenido de carbohidratos fue determinado siguiendo la metodología de colorimetría descrita en Dubois et al. (1956). Las muestras fueron procesadas con ácido tricloroacético al 5% y agregado al fenol al 5% y a una alícuota de ácido sulfúrico concentrado. Como estándar fue usado glicógeno y la absorbancia fue medida a 490 nm.

Cuantificación de cenizas

La cantidad de cenizas para cada muestra seca fue determinada por combustión durante 5 horas a 550°C en un horno de mufla (AOAC, 2005).

Análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron determinados por cromatografía gaseosa-líquida en un cromatógrafo gaseoso con detector de espectrometría de masas (Thermo Scientific FOCUS/ISQ). Los metil-ésteres fueron preparados usando el método de transesterificación directa (Lepage y Roy, 1986). El cromatógrafo gaseoso fue calibrado usando una mezcla de estándares de ácidos grasos. Se aplicó un factor de corrección para compensar

la baja respuesta del detector de ionización a los ácidos grasos insaturados relativa a los pesos correspondientes de los ácidos grasos saturados.

Análisis estadísticos

Composición bioquímica y contenido de cenizas

Las diferencias entre tratamientos para cada componente (lípidos, proteínas y carbohidratos) fueron probadas estadísticamente con Kruskal-Wallis. Las comparaciones de a pares fueron hechas usando el test de Dunn. Se aplicó el test de Wilcox para cada componente y especie con el fin de detectar diferencias entre tratamientos.

Ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron agrupados por su grado de saturación para poder realizar un análisis relativo de los porcentajes de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MFA) y los ácidos grasos poliinsaturados esenciales (PUFA, familias (n – 3) y (n – 6)). Las comparaciones entre cada compuesto

para cada combinación especie-tratamiento fue llevado a cabo con un test de Kruskal-Wallis. Las diferencias para cada agrupación de ácidos grasos y los cocientes (SFA+MFA)/PUFA y (n – 3)/(n – 6) entre tratamientos fueron testeados con el test de Wilcox. Además se realizó un test de PERMANOVA y un análisis SIMPER para todos los datos y cada especie entre tratamientos usando el programa PRIMER (Clarke y Gorley, 2001). Todos los valores fueron transformados usando la raíz cuarta.

RESULTADOS

Condiciones de cultivo de las microalgas

Mientras que en los cultivos a escala pequeña (P) los tratamientos fueron realizados en una sala con temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, en los cultivos a escala masiva (M) la temperatura del cultivo fluctuó entre $7,9^\circ\text{C}$ a $30,6^\circ\text{C}$: medida y registrada en forma horaria mediante un *datalogger*. En este último tratamiento la temperatura media fue de $15,8^\circ\text{C}$ con fluctuaciones diarias (Figura 1).

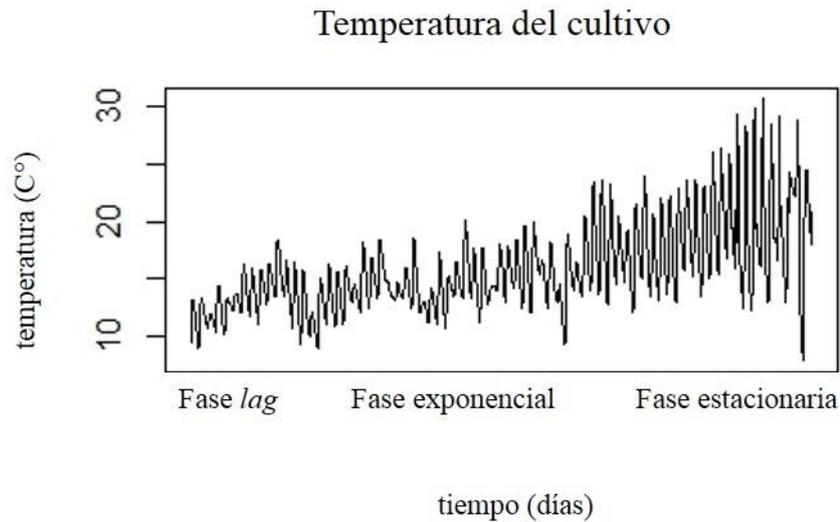


Figura 1. Fluctuación térmica en los cultivos a escala masiva (M). En el eje de las abscisas se grafica el tiempo en días (señalando las distintas fases del crecimiento) y en el eje de las ordenadas la temperatura registrada en grados centígrados.

Figure 1. Thermal fluctuation in massive scale cultures (M). On abscissa axis, time is plotted in days (indicating the different stages of growth) and ordinates axis indicate temperature recorded in degrees centigrade.

Composición bioquímica y contenido de cenizas

Todas las especies de microalgas presentaron como principal componente las proteínas solubles. Iso y Chaeto presentaron más de 10% de lípidos solubles. Mientras que los cultivos a pequeña escala de Iso contuvieron más lípidos que los de escala masiva, en Chaeto sucedió lo opuesto. Tetra fue la especie que mostró los menores niveles de lípidos y Chaeto fue la especie con los

valores más bajos para carbohidratos de las tres analizadas. Con respecto al contenido de cenizas, Chaeto fue la especie con mayor contenido, seguida por Iso y Tetra. Chaeto e Iso mostraron los mayores valores en contenido de cenizas en los cultivos a pequeña escala mientras que en Tetra se observó lo opuesto. La composición bioquímica y el contenido de cenizas para cada combinación de especie-tratamiento son presentados en la tabla 1.

Tabla 1. Análisis químico proximal (% peso seco) de las tres especies de microalgas cultivadas bajo dos condiciones diferentes: escala pequeña a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M) (media \pm DE, n=3). CH = carbohidratos. DE = desvío estándar.

Table 1. Proximate chemical analysis (% dry weight) of the three microalgae species cultured under two different conditions: low scale at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) and massive scale with variable temperature (M) (mean \pm SD, n=3). CH = carbohydrate. SD = Standard deviation.

Especie	Tratamiento	Abreviatura	Lípidos (%)	Proteínas (%)	CH (%)	Cenizas (%)
<i>Isochrysis galbana</i> (Iso)	Escala pequeña	Iso (P)	15.16 \pm 0.75	44.12 \pm 2.00	15.95 \pm 0.51	35.69 \pm 1.10
	Escala masiva	Iso (M)	10.37 \pm 1.48	43.64 \pm 1.70	14.13 \pm 0.62	23.17 \pm 1.50
<i>Chaetoceros</i> sp. (Chaeto)	Escala pequeña	Chaeto (P)	12.14 \pm 1.29	55.37 \pm 5.48	4.85 \pm 0.60	40.69 \pm 1.44
	Escala masiva	Chaeto (M)	18.62 \pm 2.00	31.95 \pm 1.94	6.96 \pm 0.58	36.46 \pm 0.19
<i>Tetraselmis</i> sp. (Tetra)	Escala pequeña	Tetra (P)	9.20 \pm 2.50	38.17 \pm 7.17	22.53 \pm 0.87	17.11 \pm 1.79
	Escala masiva	Tetra (M)	5.21 \pm 2.03	38.53 \pm 1.25	14.65 \pm 7.07	19.70 \pm 0.53

Isochrysis galbana cultivada bajo dos tratamientos

En ambos tratamientos las proteínas fueron el compuesto más abundante (44,12% en pequeña escala y 43,64% en escala masiva) con significativamente mayores cantidades que carbohidratos (15,95% en pequeña escala y 14,13% en escala masiva) y lípidos (15,16% en escala pequeña y 10,37% en escala masiva), Kruskal-Wallis, test de Dunn ($\alpha=0,05$). Mientras que en el tratamiento a escala pequeña los lípidos y los carbohidratos no presentaron diferencias

significativas porcentuales entre sí, las proteínas sí diferían en porcentajes con aquellos dos. En el tratamiento a escala masiva todos los componentes presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 2). Ninguno de los compuestos mostraron diferencias significativas entre tratamientos (test de Wilcoxon, lípidos $p=0,1$, proteínas $p=0,7$ y carbohidratos $p=0,1$), y los porcentajes de cenizas fueron similares entre tratamientos no observándose tampoco diferencias significativas (test de Wilcoxon $p=0,1$).

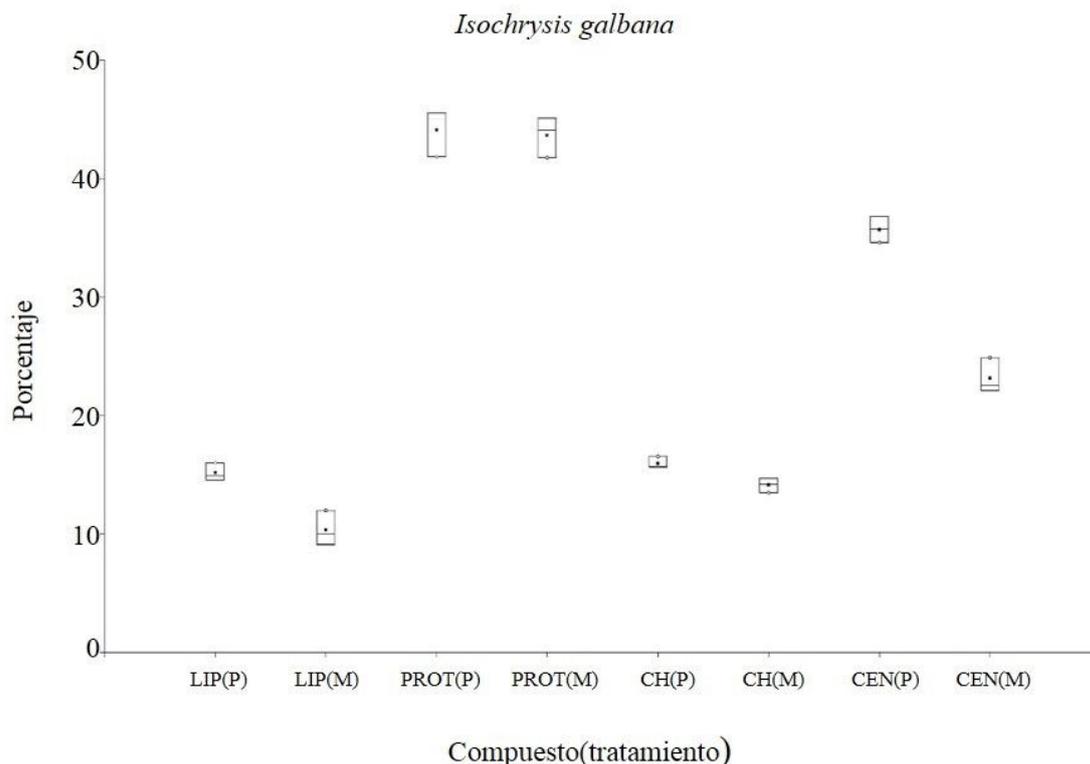


Figura 2. Perfil bioquímico y contenido de cenizas de *Isochrysis galbana*. Media y desvío estándar para cada componente: lípidos (LIP), proteínas (PROT), carbohidratos (CH) y cenizas (CEN) de cultivos de microalgas bajo dos tratamientos distintos, pequeña escala a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M)

Figure 2. *Isochrysis galbana* biochemical profile and ash. Mean and standard deviation of each component: lipid (LIP), protein (PROT), carbohydrate (CH) and ash (CEN) of microalgae cultured under different scale condition, low (P) and massive scale (M).

Chaetoceros sp. cultivada bajo dos tratamientos

En ambos tratamientos *Chaetoceros sp.* presentó en orden decreciente de porcentajes: proteínas, lípidos y carbohidratos (todos los componentes presentaron diferencias significativas entre ellos Kruskal-Wallis, test de Dunn, $\alpha=0,05$) (Figura 3). Los cultivos a pequeña escala presentaron un mayor porcentaje de proteínas (55,37%), y en un menor porcentaje lípidos (12,14%) y carbohidratos (4,85%). Por otra parte, los cultivos a escala masiva presentaron un

porcentaje menor de proteínas (31,95%) y un mayor porcentaje de lípidos (18,62%) que el primer tratamiento, y porcentajes similares de carbohidratos (6,96%). A pesar de las variaciones observadas entre componentes en cada tratamiento, no hubo diferencias significativas entre tratamientos para cada componente en particular (test de Wilcox $p=0,1$ para todos los análisis), y el contenido de cenizas tampoco presentó diferencias entre tratamientos (test de Wilcox $p=0,1$).

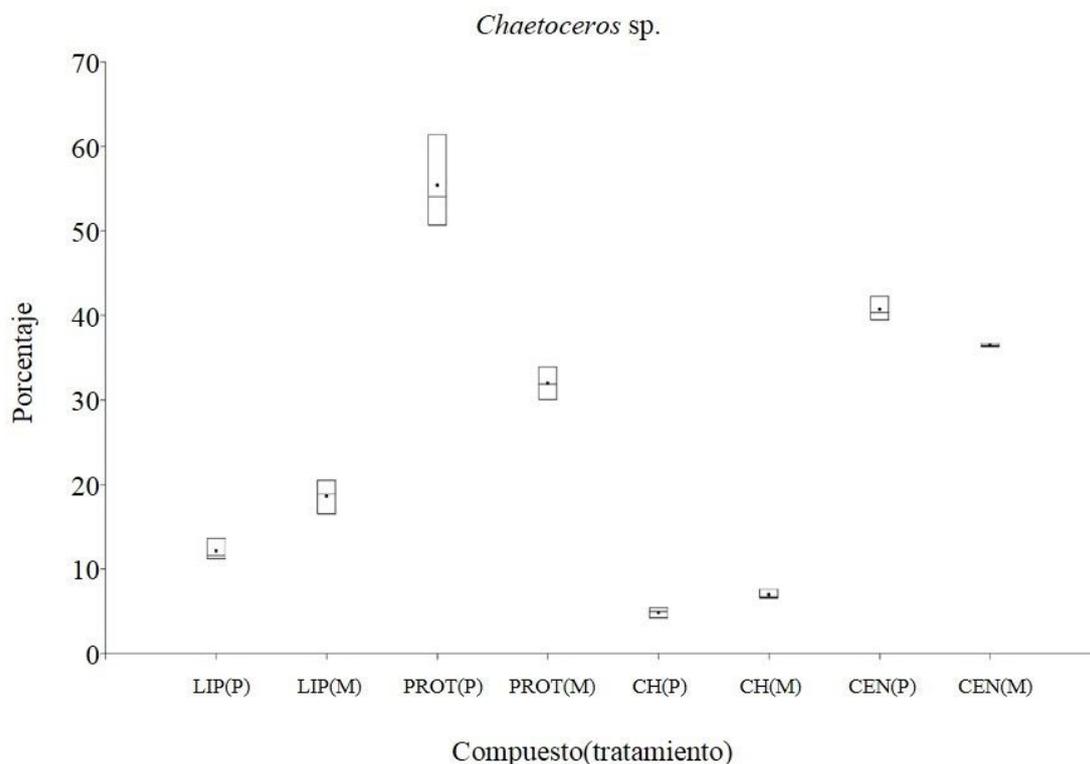


Figura 3. Perfil bioquímico y contenido de cenizas de *Chaetoceros* sp. Media y desvío estándar para cada componente: lípidos (LIP), proteínas (PROT), carbohidratos (CH) y cenizas (CEN) de cultivos de microalgas bajo dos tratamientos distintos, pequeña escala a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M)

Figure 3. *Chaetoceros* sp. biochemical profile and ash. Mean and standard deviation of each component: lipid (LIP), protein (PROT), carbohydrate (CH) and ash (CEN) of microalgae cultured under different scale condition, low (P) and massive scale (M).

Tetraselmis sp. cultivada bajo dos tratamientos

Ambos tratamientos mostraron diferencias significativas entre los distintos componentes (Kruskal-Wallis, test de Dunn, $\alpha=0,05$), y presentaron en orden decreciente de porcentajes: proteínas (38,17% en escala pequeña y 38,53% en escala masiva), carbohidratos

(22,53% en escala pequeña y 14,65% en escala masiva) y lípidos (9,20% en pequeña escala y 5,21% en escala masiva) (Figura 4). Ni los distintos componentes (test de Wilcox $p>0,05$ para todos ellos) ni el contenido de cenizas (test de Wilcox $p=0,1$) presentaron diferencias entre tratamientos.

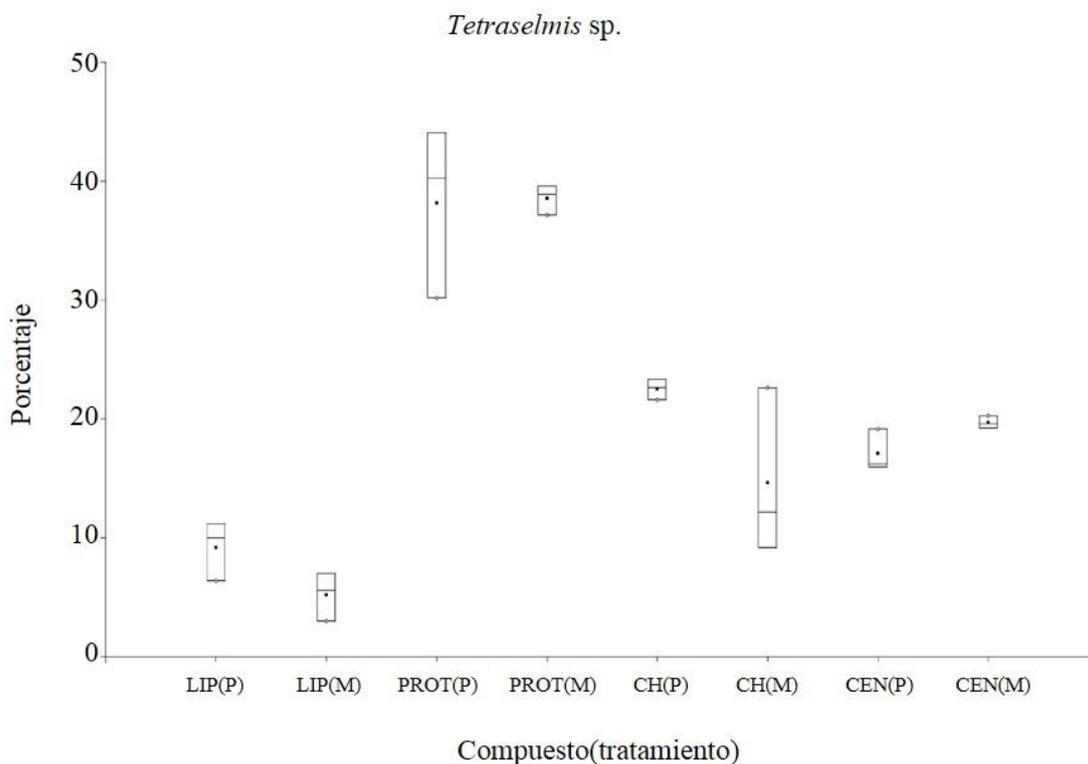


Figura 4. Perfil bioquímico y contenido de cenizas de *Tetraselmis* sp. Media y desvío estándar para cada componente: lípidos (LIP), proteínas (PROT), carbohidratos (CH) y cenizas (CEN) de cultivos de microalgas bajo dos tratamientos distintos, pequeña escala a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M)

Figure 4. *Tetraselmis* sp. biochemical profile and ash. Mean and standard deviation of each component: lipid (LIP), protein (PROT), carbohydrate (CH) and ash (CEN) of microalgae cultured under different scale condition, low (P) and massive scale (M).

Ácidos grasos

Los ácidos grasos (FA) detectados presentaron entre 14 y 24 carbonos en su cadena (Tabla 2). El ácido graso predominante, extraíble por solvente, fue el ácido oléico C18:1n-9c (11,56% a 26,66%), excepto en Chaeto el cual presentó grandes proporciones de ácido palmitoléico C16:1n-7c (24,92% en promedio entre los dos tratamientos) y bajas proporciones de ácido oléico (menos de 1,31%). El segundo en abundancia fue el ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3c)

(13,67% a 23,11%) excepto en Chaeto (menos del 3,11%). El ácido palmítico (C16:0) se halló en grandes proporciones en todas las especies analizadas (9,96% a 18,33%). El ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6 n-3c) se encontró en forma abundante en Iso (en ambos tratamientos) y en bajas proporciones en Chaeto y Tetra (4,62% y 0,12% en promedio respectivamente). El cultivo de Iso a escala masiva presentó 22:5n-6c (7,04%), C16:2n-6c (3,79%) y 16:3n-3c (3,36%) mientras que ni en Iso a pequeña escala ni en las dos restantes especies

fueron detectados. C20:1n-9c no se detectó en Chaeto (en ninguno de los tratamientos) pero sí se detectó en las dos restantes especies (8,66% en Tetra y 0,29% en Iso en promedio entre ambos tratamientos). C16:4n-3c fue detectable solo en Tetra a escala masiva y C20:4n-3c sólo en el cultivo a baja escala de Iso. Chaeto fue la especie que mostró mayores porcentajes de ácido araquidónico (ARA; C20:4n-6c) (6,90% y 3,41% en pequeña escala y escala masiva respectivamente). Mientras que los ácidos γ -linoléico (GLA; C18:3n-6c) y el linoléico (LA; C18:2n-6c) fueron detectables en ambas escalas de cultivo de Chaeto, C18:3n-6c en las restantes dos especies sólo se encontró en la escala masiva y C18:2n-6c sólo en Tetra cultivada a escala masiva pero en muy bajo porcentaje (0,6%).

Ninguna de las agrupaciones por grado de saturación de ácidos grasos mostró diferencias entre tratamientos en ninguna de las especies (Kruskal-Wallis, test de Dunn, $\alpha=0,05$). La agrupación de ácidos grasos que presentó menos diferencias entre tratamientos fue (n – 3) (Kruskal-Wallis, test de Dunn, $p=0,7$

para todas las especies). Tetra fue la especie que presentó menos diferencias para cada agrupación de ácidos grasos entre tratamientos (Kruskal-Wallis, test de Dunn, $p=0,7$ para SFA, MFA y n – 3 y $p=0,4$ para n – 6).

Ninguno de los cocientes analizados (SFA+MUFA)/PUFA y (n – 3)/(n – 6), presentaron diferencias entre tratamientos (test de Wilcox, $p=0,1$ para todos ellos).

Todas las especies mostraron diferencias en la composición de ácidos grasos analizados en forma agrupada por grado de saturación (PERMANOVA, $p=0,0001$). Las diferencias entre tratamientos para cada especie fue no significativa (PERMANOVA, $p=0,1023$; $p=0,0999$ y $p=0,1041$ para Iso, Chaeto y Tetra respectivamente).

Cada especie presentó altos porcentajes de similitud entre sí (SIMPER, 86,73%; 93,82% y 88,32% para Iso, Chaeto y Tetra respectivamente). Asimismo cada especie mostró bajos porcentajes de disimilitud entre tratamientos (SIMPER, 21,13% Iso; 8,69% Chaeto y 17,26% Tetra).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos para *Isochrysis galbana* (Iso), *Chaetoceros* sp. (Chaeto) y *Tetraselmis* sp. (Tetra) cultivadas bajo dos diferentes condiciones: escala pequeña a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M) (valores medios expresados como porcentaje del peso seco en gr, n=3).

Table 2. Fatty acid composition for *Isochrysis galbana* (Iso), *Chaetoceros* sp. (Chaeto) and *Tetraselmis* sp. (Tetra) cultured under two rearing conditions: low scale at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) and massive scale with variable temperature (M) (mean values expressed as percentages of dry weight in gr, n=3).

Ácidos grasos (%)	Iso (P)	Chaeto (P)	Tetra (P)	Iso (M)	Chaeto (M)	Tetra (M)
Saturados (SFA)						
C14:0	7.82	8.64	2.23	6.34	8.79	5.03
C15:0	1.30	1.99	2.62	1.15	2.49	1.65
C16:0	10.12	10.21	18.33	9.96	15.16	16.53
C17:0	0.48	0.46	0.84	0.42	0.40	0.63
C18:0	1.06	5.05	1.85	0.69	2.66	1.42
C20:0	0.45	0.56	0.10	1.28	0.58	0.07
C22:0	1.89	1.69	0.05	0.32	1.01	0.07
C23:0	0.33	0.06	0.01	0.18	0.00	0.03
C24:0	0.02	2.76	0.36	0.08	0.94	0.32
Total SFA	23.48	31.42	26.38	20.42	32.02	25.74
Monoinsaturados (MUFA)						
C14:1n-5c	0.00	0.09	0.16	0.04	1.24	0.77
C15:1n-5c	0.02	0.21	0.02	0.01	0.26	0.03
C16:1n-7c	4.61	23.09	4.21	4.48	26.76	14.27
C17:1n-7c	1.16	0.13	0.31	0.50	0.39	0.25
C18:1n-9c	21.59	0.71	26.66	11.56	1.31	17.92
C18:1n-9t	1.33	2.26	3.73	2.52	2.54	3.54
C20:1n-9c	0.32	0.00	9.41	0.26	0.00	7.92
C22:1n-9c	1.76	0.07	0.09	0.80	0.07	0.06
C24:1n-9c	0.06	0.16	0.01	0.05	0.16	0.01
Total MFA	30.85	26.74	44.59	20.22	32.74	44.77
Polinsaturados (PUFA) (n - 3)						
C16:4n-3c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.88
C16:3n-3c	0.00	0.00	0.00	3.36	0.00	0.00
C18:4n-3c	0.00	0.08	4.97	4.45	0.60	0.72
C20:4n-3c	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:5n-3c	3.11	23.11	20.92	2.37	22.76	13.67
C22:6n-3c	41.19	4.99	0.18	32.89	4.26	0.06
Total (n - 3)	44.35	28.17	26.07	43.06	27.62	27.32

(n – 6)						
C16:2n-6c	0.00	0.00	0.00	3.79	0.00	0.00
C18:3n-6c	0.00	5.35	0.00	4.60	2.72	0.06
C18:2n-6c	0.00	1.04	0.00	0.00	1.20	0.59
C20:4n-6c	0.47	6.90	1.97	0.41	3.41	1.24
C20:3n-6c	0.42	0.36	0.98	0.10	0.25	0.21
C20:2n-6c	0.32	0.00	0.00	0.28	0.00	0.07
C22:5n-6c	0.00	0.00	0.00	7.04	0.00	0.00
C22:2n-6c	0.12	0.00	0.01	0.08	0.04	0.00
Total (n – 6)	1.32	13.66	2.95	16.30	7.62	2.17
(SFA+MFA)/ PUFA	1.19	1.39	2.45	0.68	1.84	2.39
(n – 3)/(n – 6)	33.66	2.06	8.84	2.64	3.63	12.60

DISCUSIÓN

La alimentación de los bivalvos criados en condiciones de cultivo requiere de las cantidades apropiadas de alimento con las adecuadas proporciones de componentes químicos para satisfacer sus requerimientos alimenticios. Para alcanzar los requerimientos nutricionales óptimos es necesaria la elección cuidadosa de la combinación de especies de microalgas teniendo en cuenta las condiciones en que estas han sido cultivadas. Las especies de microalgas analizadas en este experimento son frecuentemente utilizadas para alimentar organismos marinos en condiciones de cultivo. Estas especies de microalgas cumplen los requerimientos necesarios para ser cultivadas como alimento en criaderos de bivalvos desde la escala experimental hasta la producción a

escala comercial (Helm y Bourne, 2006, da Costa, 2009).

Cuando los cultivos de microalgas monoespecíficos y axénicos son llevados a cabo para alimentar diferentes cultivos experimentales, a menudo la producción de las distintas escalas se desarrolla en salas diferentes. Las diferentes escalas de producción poseen características distintivas: usualmente las producciones a pequeña escala se realizan en salas con temperatura controlada mientras que la escala de producción masiva se realiza en invernaderos (de mayor tamaño que los laboratorios de temperatura controlada) con temperatura más variable. Considerando que bajo condiciones no controladas de temperatura solo los cultivos masivos de microalgas pueden ser llevados a cabo debido a su capacidad de amortizar las fluctuaciones térmicas, debe ser tenido

en cuenta también que otros efectos además del térmico pueden estar actuando. Por ejemplo, la escala como tratamiento puede estar enmascarando la irradiancia que cada microalga recibe (efecto sombra) y es necesario tener en cuenta que la irradiancia es un factor determinante en la composición bioquímica de las microalgas (Sukenik y Wahnou, 1991, Carvalho *et al.*, 2009). Asimismo, más frecuentemente de lo deseado sucede que los cultivos de microalgas se contaminan, ya sea con otras especies de microalgas, por bacterias o por otros organismos. Dado que las distintas escalas de cultivo se realizan en salas separadas es poco probable que ambas escalas de producción se contaminen al mismo tiempo. Cuando los cultivos se contaminan es necesario usar la otra escala de producción de microalgas para continuar alimentando los organismos de la experiencia. Es por esto que en cultivos experimentales la información acerca de la composición bioquímica y sus modificaciones relacionadas con las condiciones de cultivo en las que se desarrollen resulta vital en la experimentación en criadero (Volkman *et al.*, 1989).

Nuestros resultados muestran que las diferentes condiciones de cultivo, como la escala y las fluctuaciones térmicas, no

modifican significativamente la composición bioquímica de estas tres especies de microalgas en las diferentes experiencias realizadas en condiciones de laboratorio. De acuerdo con Brown *et al.* (1997) y Renaud *et al.* (1999), los lípidos y las proteínas siguen los mismos patrones de abundancia que nuestros experimentos a pequeña escala en términos de las especies analizadas. Sin embargo, los cultivos a escala masiva no presentaron el mismo patrón reportado por los autores antes mencionados. En cuanto a los carbohidratos, ambos tratamientos presentaron abundancias consistentes con lo reportado por Brown *et al.* (1997), pero es diferente a lo reportado por Renaud *et al.* (1999) para las mismas especies. Debido a que las diferencias en los distintos compuestos analizados en nuestros experimentos (lípidos, proteínas, carbohidratos y cenizas) fueron estadísticamente no significativas para todas las especies entre tratamientos, se puede pensar que el diseño de una dieta basada en la composición bioquímica de microalgas es dependiente de la especie, entre otras cosas, y es independiente de la escala y la estabilidad de la temperatura de cultivo.

Como con la composición bioquímica, el perfil de ácidos grasos (cuando estos se encuentran agrupados considerando el

grado de saturación y se tiene en cuenta si pertenecen a la familia (n – 3) o (n – 6)) de las tres especies de microalgas analizadas no presenta diferencias significativas entre tratamientos (escala y estabilidad térmica en forma conjunta). Además ambos cocientes analizados - (SFA+MFA)/PUFA y (n – 3)/(n – 6)- no difieren estadísticamente entre tratamientos. Valores bajos del cociente (SFA+MFA) /PUFA y mayores que dos del cociente (n – 3)/(n – 6) son óptimos para la alimentación de larvas de bivalvos como por ejemplo ostras (Mitra *et al.*, 2015), por lo que todas las especies y todos los tratamientos estudiados son potencialmente buenos para ser utilizados como alimento de bivalvos. Sin embargo, el perfil de ácidos grasos mostró diferencias en las cantidades para cada agrupación de ácidos grasos por grado de saturación para cada especie-tratamiento analizado. Por otra parte, se observan sutiles diferencias entre tratamientos en dos de los más importantes ácidos grasos esenciales (EPA y DHA). Mientras que EPA permanece prácticamente constante entre tratamientos en *I. galbana* y *Chaetoceros* sp., decrece su porcentaje en la escala masiva de *Tetraselmis* sp. Más aún, los niveles de DHA son elevados en *I. galbana* pero la escala masiva tiene menores porcentajes que la

escala pequeña. Algunos ácidos grasos son considerados esenciales debido a que los organismos marinos parecen tener limitaciones para sintetizar PUFA a partir de ácidos grasos menos insaturados como precursores como el ácido linoléico (Kanazawa *et al.*, 1979), y aún sin tener un absoluto requerimiento dietario estricto, los mismos aumentan las tasas de crecimiento y la supervivencia larval cuando son incluidos en la dieta (Rodgers y Barlow, 1987). Es por esto que las sutiles diferencias en los contenidos de ácidos grasos considerados esenciales deben ser consideradas a la hora de determinar las dietas óptimas para cada estadio del cultivo de los bivalvos.

CONCLUSIONES

La composición bioquímica de cada especie de microalga no cambia en forma significativa con las dos condiciones de cultivo probadas. Los perfiles de ácidos grasos presentan sutiles pero evidentes diferencias entre sí, especialmente en aquellos ácidos grasos considerados esenciales. Con la información obtenida se pueden diseñar las dietas más apropiadas para cada estadio del cultivo en moluscos bivalvos.

AGRADECIMIENTOS

A Nancy Verdecchia del CRIAR (Las Grutas, Río Negro) y a Walter Helbling de la Estación de Fotobiología de Playa Unión por aportar las cepas de las microalgas utilizadas en estos

experimentos. A la Red de Fortalecimiento de la Maricultura Costera Patagónica (RFMCP) cuyas ayudas económicas han permitido en parte solventar este experimento.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 2005. Official method of Analysis (18th Edition). Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, 2590 pp.

Borges, L., S. Caldas, M.G.M. D'Oca & P.C. Abreu. 2016. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture Reports*, **4**: 164-168.

Brown, M., C. Garland, S. Jeffrey, I. Jameson & J. Leroi. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.*, **5** (3): 285-296.

Brown, M., S. Jeffrey, J. Volkman & G. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, **151** (1-4): 315-331.

Brown, M.R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. **3**: 281-292.

Brown, M.R., G.A. Dunstan, S. Jeffrey, J.K. Volkman, S.M. Barrett & J.M. LeRoi. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the Prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (Clone T ISO). *J. Phycol.*, **29** (5): 601-612.

Carvalho, A.P., C.M. Monteiro & F.X. Malcata. 2009. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J. Appl. Phycol.*, **21** (5): 543-552.

Clarke, K.R. & R.N. Gorley. 2001. Primer V5 (Plymouth routines in multivariate ecological research): user manual/tutorial, Primer-E.

da Costa, F. 2009. Optimización del cultivo en criadero de navaja ("*Ensis arcuatus*" Jeffreys, 1865), longueirón ("*E. siliqua*" Linneo, 1758) y longueirón vello ("*Solen marginatus*" Pennant, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios, Universidade de Santiago de Compostela.

Darriba, S., F. San Juan & A. Guerra. 2005. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *ICES J. Mar. Sci.*, **62** (5): 886-896.

Enright, C., G. Newkirk, J. Craigie & J. Castell. 1986. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **96** (1): 15-26.

Gatenby, C.M., D.M. Orcutt, D.A. Kreeger, B.C. Parker, V.A. Jones & R.J. Neves. 2003. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *J. Appl. Phycol.*, **15** (1): 1-11.

Guillard, R.R.L. & J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8** (2): 229-239.

Helm, M., D. Holland & R. Stephenson. 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on

- larval vigour. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **53** (3): 673-684.
- Helm, M.M. & N. Bourne. 2006. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. Roma, Italia, 184 pp.
- Hoff, F.H. & T.W. Snell. 1989. Plankton culture manual. 186 pp.
- Huerlimann, R., R. De Nys & K. Heimann. 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale up production. *Biotechnol. Bioeng.*, **107** (2): 245-257.
- Kanazawa, A., S. Teshima & K. Ono. 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, **63** (3): 295-298.
- Kreeger, D., A. Hawkins, B. Bayne & D. Lowe. 1995. Seasonal variation in the relative utilization of dietary protein for energy and biosynthesis by the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*: 177-184.
- Langdon, C. & M. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **61** (2): 431-448.
- Lepage, G. & C.C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, **27** (1): 114-120.
- Li, Q., L. Yang, Q. Ke & L. Kong. 2011. Gametogenic cycle and biochemical composition of the clam *Macra chinensis* (Mollusca: Bivalvia): Implications for aquaculture and wild stock management. *Mar. Biol. Res.*, **7** (4): 407-415.
- Martínez-Fernández, E. & P.C. Southgate. 2007. Use of tropical microalgae as food for larvae of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture*, **263** (1): 220-226.
- Mitra, M., S.K. Patidar, B. George, F. Shah & S. Mishra. 2015. A euryhaline *Nannochloropsis gaditana* with potential for nutraceutical (EPA) and biodiesel production. *Algal Res.*, **8**: 161-167.
- Morris, R., M. McCartney & G. Robinson. 1983. Studies of a spring phytoplankton bloom in an enclosed experimental ecosystem. I. Biochemical changes in relation to the nutrient chemistry of water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **70** (3): 249-262.
- Ogbonna, J.C. & H. Tanaka. 1996. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Ferment. Bioeng.*, **82** (6): 558-564.
- Polanco, E., J.F. Polanco & S.M.R. Benito. 2000. La Acuicultura: biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial. Fundación Alfonso Martín Escudero, 246 pp.
- Renaud, S.M., L.-V. Thinh & D.L. Parry. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, **170** (2): 147-159.
- Rodgers, L. & C. Barlow. 1987. Better nutrition enhances survival of barramundi larvae. *Aust. Fish.*, **46** (7): 30-32.
- Ryckebosch, E., K. Muylaert, M. Eeckhout, T. Ruysen & I. Foubert. 2011. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Agric. Food Chem.*, **59** (20): 11063-11069.
- Saucedo, P., I. Racotta, H. Villarreal & M. Monteforte. 2002. Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland, and muscle of the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*

- (Hanley, 1856) associated with gametogenesis. *J. Shellfish Res.*, **21** (1): 127-136.
- Stramarkou, M., S. Papadaki, K. Kyriakopoulou & M. Krokida. 2017. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.*, **29** (6): 2947-2960.
- Sukenik, A. & R. Wahnnon. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, **97** (1): 61-72.
- Volkman, J., S. Jeffrey, P. Nichols, G. Rogers & C. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **128** (3): 219-240.
- Whyte, J.N. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, **60** (3-4): 231-241.
- Whyte, J.N.C., N. Bourne & C.A. Hodgson. 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **113** (2): 113-124.
- Zhu, C., Y. Lee & T. Chao. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J. Appl. Phycol.*, **9** (5): 451-457.
- Zöllner, N. & K. Kirsch. 1962. Colorimetric method for determination of total lipids. *J. Exp. Med.*, **135**: 545-550.