

# Aislamiento de dos especies de diatomeas con potencial acuícola (Bacillariophyceae) en el Pacífico de Costa Rica

Karen Rodríguez-Núñez<sup>1,2</sup>, Pedro Toledo<sup>3,4</sup> y Sidey Arias<sup>2</sup>

1. Programa de Magíster en Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile. Autor de correspondencia; krodriqueznunez@gmail.com
2. Estación de Biología Marina, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Costa Rica, Avenida 1 Calle 1, Heredia 86-3000, Costa Rica; sarias@una.ac.cr
3. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile; ptoledo@ucn.cl
4. Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile.

Recibido 30-VII-2015 • Corregido 15-IX-2015 • Aceptado 20-XI-2015

**ABSTRACT: Isolation of two diatom species with aquaculture potential (Bacillariophyceae) from the Pacific of Costa Rica.** Due to the importance of primary production in the trophic network, most aquatic ecosystems rely on microalgae. However, there are fewer studies on phytoplankton in the Central American region, specifically on marine diatoms, in part because it is difficult to isolate and cultivate local species in tropical climates. The objective of this study is the isolation of two local diatoms of *Chaetoceros* and *Nitzschia*, potential food for aquatic organisms. Water samples were taken from the Nicoya Gulf, located in the Central Pacific coast of Costa Rica. The samples were successively filtered first through a 35µm pore size filter and then through one of 20µm. They were repeatedly isolated using modified Pasteur pipettes, and serial dilutions were done until a monoalgal culture was obtained. Two Bacillariophyceae were isolated: NGN1, genus *Nitzschia*; and CGN2, genus *Chaetoceros*. This study is a step toward reducing the importation of phytoplankton on feeding aquatic organisms by providing technical and scientific information to develop a microalgal culture from this region.

**Key words:** isolation, local microalgae, Bacillariophyceae, Costa Rica.

**RESUMEN:** La mayoría de los ecosistemas acuáticos dependen de las microalgas para su funcionamiento, debido a su importancia en la producción primaria en la trama trófica. Sin embargo, los estudios en fitoplancton, específicamente en diatomeas marinas, en la región Centroamericana son escasos, debido en parte a la dificultad de aislar y cultivar cepas locales. Por lo anterior, el objetivo de este estudio es aislar dos especies de diatomeas locales, pertenecientes a los géneros *Nitzschia* y *Chaetoceros*, para su posible uso en la alimentación de organismos acuáticos. Se obtuvieron muestras de agua de mar del Golfo de Nicoya, costa del Pacífico Central de Costa Rica. Las muestras fueron filtradas sucesivamente primero por tamices de 35µm de poro y luego a través de tamices de 20µm, se aislaron con pipetas Pasteur modificadas y diluciones seriadas hasta obtener soluciones monoalgales. Se identificaron dos especies de microalgas pertenecientes a la clase Bacillariophyceae: NGN1 del género *Nitzschia* y CGN2 del género *Chaetoceros*. Este estudio constituyó un ensayo pionero en el aislamiento y cultivo de diatomeas marinas locales en Centro América, proveyendo información técnica y científica para desarrollar cultivos regionales y no depender del fitoplancton importado para la alimentación de organismos acuáticos.

**Palabras claves:** aislamiento, microalgas locales, Bacillariophyceae, Costa Rica.

La mayoría de los ecosistemas acuáticos dependen de organismos como las microalgas para su funcionamiento. Durante décadas estos microorganismos han sido utilizadas como modelo biológico en la investigación, por su flexibilidad metabólica, características fisiológicas (Band, 2007; Gómez, 2007) y potenciales aplicaciones que se extienden en las áreas ambientales, biológicas y económicas (Richmond, 2004; Simon, Foulon & Lemée, 2009).

Una de sus principales aplicaciones es en la acuicultura, las microalgas son relevantes como fuente de alimento

vivo de diversas especies de organismos acuáticos (Coll, 1983; Brown, 2002; Richmond, 2004; Spolaore, Joannis-Cassan, Duran & Isambert, 2006; Conceição *et al.*, 2010), más aun considerando que las dietas artificiales no han logrado ser del todo exitosas (Robert & Trintignac, 1997; Mallo & Fenucci, 2004; Neori, 2011). Se requieren microalgas en cada etapa de crecimiento de moluscos bivalvos filtradores, en los estadios larvales de crustáceos y peces, y para producir zooplancton (Brown, Jeffrey, Volkman & Dunstan, 1997; Muller-Feuga, 2000; Conceição *et al.* 2010; Huerlimann, de Nys & Heimann, 2010).

Las microalgas poseen ciertas características para ser usadas como alimento vivo, una de estas es el tamaño celular (Brown, 2002). Las dimensiones del alimento a entregar tienen una relación directa con el tamaño del organismo para el cuál se utilizará, con el propósito de que sea ingerido y digerido adecuadamente. Se ha determinado que un tamaño celular apropiado es entre los 5 a 20µm (Torretera & Tacon 1989, Prieto, Mogollon, Castro & Sierra, 2005).

De las microalgas aisladas, menos de 20 especies se utilizan ampliamente en cultivo (Brown, 2002). Sin embargo, autores como Brown *et al.* (1997) señalan que es importante continuar con el aislamiento y cultivo de cepas locales, ya que se encuentran adaptadas a las condiciones ambientales dominantes (Band, 2007). De esta manera se facilita el cultivo en aguas locales, reduciendo los efectos que conlleva el uso de especies foráneas como contaminación y pérdidas productivas y/o económicas.

Uno de los grupos de microalgas más utilizados en acuicultura son las diatomeas de la clase Bacillariophyceae. Muchas de sus especies son la principal fuente de alimento de moluscos y crustáceos marinos (Wikfors & Onho, 2001). Constituyen un importante componente de las comunidades acuáticas, pueden vivir en una amplia variedad de hábitats, incluso aquellos extremos, desde hielos polares hasta aguas termales (Round Crawford & Mann, 1990).

Diversos grupos de investigación latinoamericanos han aislado diatomeas para su uso en la maricultura (Band, 1997; Almaguer, Alfonso & Leal, 2004). Sin embargo, en países de la región centroamericana se siguen utilizando clones aislados en otras latitudes. En Costa Rica se han aislado cianobacterias y clorofíceas para utilizarlas en biorremediación (León & Chaves, 2010; Silva-Benavides & Torzillo, 2012) y microalgas dulceacuícolas para su uso como indicadores biológicos de contaminación, bioproxies (Silva-Benavides *et al.*, 2008). Pero los estudios en diatomeas para fines de cultivo son escasos. Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio es aislar dos especies de diatomeas locales de la clase Bacillariophyceae, pertenecientes a los géneros *Nitzschia* y *Chaetoceros*, para su potencial uso en la alimentación de organismos acuáticos.

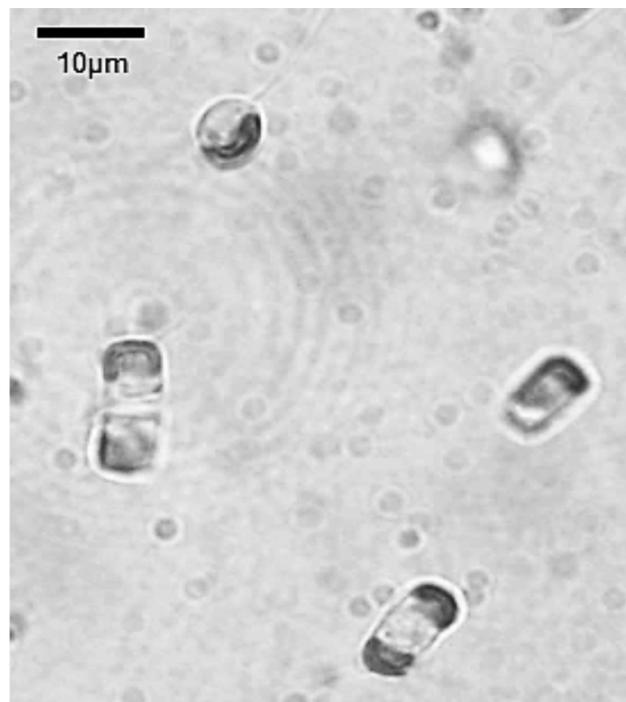
## MÉTODOS

**Sitio y colecta de muestras de agua:** Se colectaron 30 muestras de agua de mar en dos localidades del Golfo de Nicoya en el Pacífico Central de Costa Rica: en la costa de la ciudad de Puntarenas (9°58'025"N y 84°49'769"W) y en Jicaral (10°01'14" N y 85°17'57" W), todas las muestras

de agua fueron tomadas a menos de 1m de profundidad con una red de fitoplancton de 20µm de diámetro de poro (Sea-Gear Corporation).

Tres muestras fueron colectadas en Puntarenas (temperatura 28°C, luminosidad 370µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, salinidad 32‰, oxígeno disuelto 4,71mg l<sup>-1</sup> y turbidez 2,90m) en enero del 2011. 27 muestras se colectaron en Jicaral (temperatura 28°C, luminosidad 370µmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, salinidad 35‰, oxígeno disuelto 5,98mg l<sup>-1</sup> y turbidez 0,03m) (multiparámetros modelo YSI 556 MPS y disco secchi), en marzo de ese mismo año.

**Aislamiento de las microalgas:** Las muestras fueron filtradas en el área de colecta con un tamiz de 35µm de tamaño de poro y fueron trasladadas en contenedor con una temperatura de 10,0±1,0°C, hasta la Estación de Biología Marina de la Universidad Nacional de Costa Rica (EBM-UNA). Posteriormente fueron filtradas nuevamente con un tamiz de 35µm y 20µm de tamaño de poro, colocados 250ml de cada muestra en botellas estériles de 750ml y fueron llevadas a un volumen final de 500ml con agua marina esterilizada, salinidad 32‰ (solución 1) (Fig. 1). Las botellas fueron mantenidas dos días bajo las condiciones naturales prevalecientes en el sitio, a una temperatura entre 22 y 35°C y una luminosidad entre 0 y 370µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Luego se tomaron dos muestras de



**Fig. 1.** Procedimiento de aislamiento de las cepas NGN1 y CGN2 / NGN1 and CGN2 isolation diagram.

100ml de cada botella que fueron colocadas en botellas estériles de 750ml, y llevadas a un volumen final de 500ml con medio de cultivo f/4 (50% de f/2, Guillard, 1975 y 50% agua marina esterilizada) (solución 2), por siete días. Los reactivos utilizados para la confección del medio de cultivo f/2 fueron grado analítico, cumpliendo las especificaciones de la A.C.S. (American Chemical Society).

Después de siete días fueron descartadas las botellas cuyo medio de cultivo se tornó blanco, turbio y con acumulación de detrito. Además, se realizaron conteos celulares por muestra con hematocitómetro (0,1mm de profundidad) del tipo Neubauer, así se comparó la cantidad de células algales y de otros microorganismos. Se descartaron las microalgas con tamaños menores a las  $5\mu\text{m}$  y sobre  $15\mu\text{m}$ . Este criterio de revisión y selección prevaleció en la revisión de las soluciones posteriores. Se seleccionaron los cultivos menos contaminados que fueron filtrados a  $20\mu\text{m}$  (solución 3). El filtrado permitió retener los protozoos de mayor tamaño y detrito acumulado en la solución.

La solución 3 se trasladó al Laboratorio de Plancton (EBM-UNA) donde fueron cultivados 100ml de cada botella, llevados a un volumen final de 500ml con medio de cultivo f/2 (solución 4). En esta etapa las condiciones de luz y temperatura fueron controladas con una unidad de aire acondicionado y lámparas fluorescentes de luz blanca (luminosidad  $11$  a  $14\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 24h luz, pH de  $8,3\pm 0,2$  y  $23\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Cada dos días se revisaron y seleccionaron los cultivos. En cada botella se colectó el sobrenadante filtrando a  $20\mu\text{m}$  (solución 5). La solución 5 se llevó a volúmenes finales de 525ml con medio nutritivo f/2, en una relación 1 a 20 (25ml de solución 5 y 500ml de medio de cultivo) (solución 6).

Con la solución 6 se realizaron diluciones seriadas factor 10, en placas de cultivo celular multipocillo. Se aislaron células, bajo microscopio, utilizando pipeta Pasteur modificada. Estas fueron incubadas en tubos de ensayo de 1ml aforados a 0,5ml con medio nutritivo. Se purificó el cultivo mediante diluciones seriadas y el volumen final de la muestra con la cepa fue conservado en *stock* en el laboratorio (5ml). Posteriormente, se aumentó el volumen y se incorporó aireación.

Se observó y midió la longitud y ancho de 20 células algales bajo microscopio (Nikon Optiphot-2, serie 139244). La identificación a nivel morfológico se llevó a cabo siguiendo los manuales de Rosen (1990), Tomas (1997) y Horner (2002), y tomando en cuenta el comportamiento planctónico de las cepas durante su cultivo y escalamiento. Las cepas fueron identificadas con una nomenclatura propia del Laboratorio de Plancton y conservadas en el

cepario de la EBM-UNA (luminosidad  $8$  a  $9\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $22\pm 1^\circ\text{C}$ ).

## RESULTADOS

Las dos especies de diatomeas planctónicas aisladas son unicelulares de la clase Bacillariophyceae. De las muestras colectadas en Puntarenas se aisló una diatomea del género *Nitzschia* (NGN1) (Fig. 2) y la otra del género *Chaetoceros* (CGN2) (Fig. 3) aislada de las muestras de agua colectadas en Jicaral.

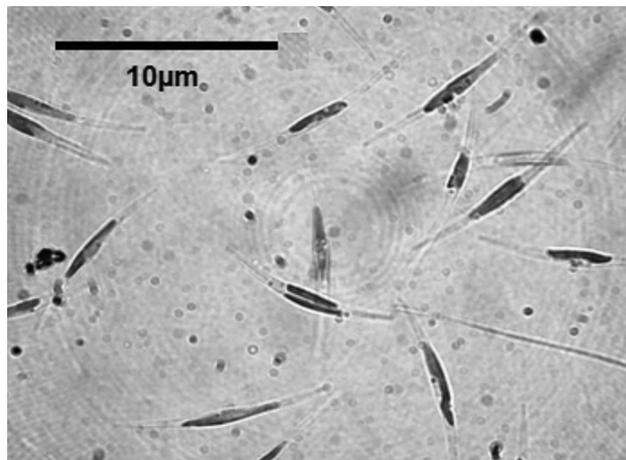


Fig. 2. Células de NGN1 (40x) / NGN1 cells.

El tiempo requerido para la purificación de NGN1 fue 94 días y de 240 días para CGN2. NGN1 tiene una longitud y ancho promedio de  $10,9\pm 0,3\mu\text{m}$  y  $3,1\pm 0,1\mu\text{m}$  respectivamente, presenta simetría bilateral, con valvas alargadas y márgenes abultados en la parte central, rafe excéntrico y su color es café amarillento. Los ápices son alargados y curvos hacia la misma dirección.

CGN2, sin incluir las dimensiones de sus setas, tiene una longitud y ancho promedio de  $7,9\pm 0,5\mu\text{m}$  y  $5,4\pm 0,3\mu\text{m}$  respectivamente. Su simetría es radial y sus valvas son circulares, su eje apical y perivalvar es de similar tamaño y presenta un color café amarillento.

## DISCUSIÓN

Se utilizaron tres metodologías convencionales de aislamiento microalgal en un mismo protocolo: filtrados (He, Li & Liu, 2012), diluciones seriadas (Abou-Shanab, Matter, Kim, Oh, Choid & Jeon, 2011) y pipeta Pasteur modificada (Band, 2007), ajustadas a los recursos y

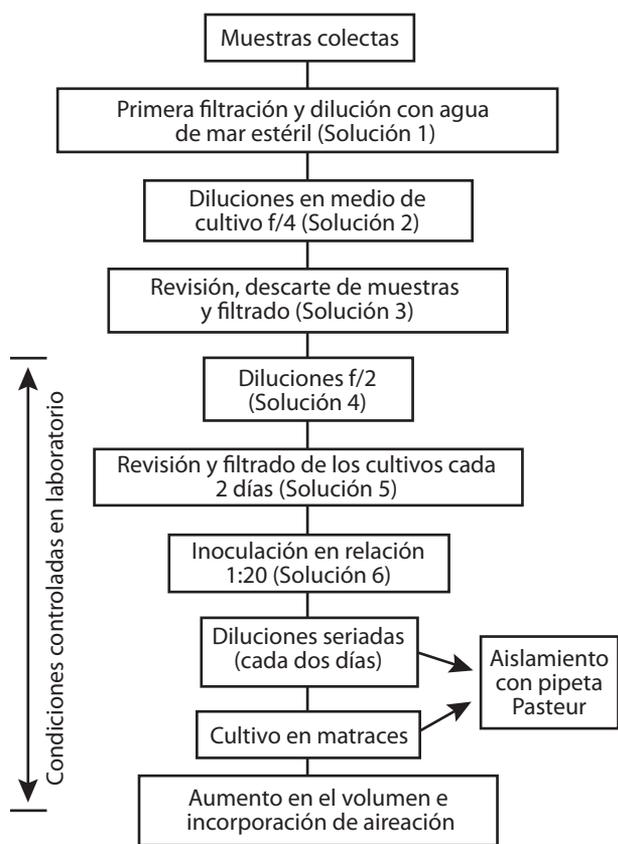


Fig. 3. Células de CGN2 (40x) / CGN2 cells.

condiciones de laboratorio. No se realizaron difusiones en agar (Banerjee, Bandopadhyay & Shukla, 2012) por no haber sido exitosas en ensayos previos, probablemente por las elevadas densidades de microorganismos presentes en aguas marinas cálidas (Canosa & Pinilla, 2007), siendo común que las colonias de bacterias crezcan junto con las microalgas en las placas con agar (He et al., 2012).

Durante el proceso de filtración realizado se retuvo el detrito y los protozoos de mayor tamaño, que se alimentan de células algales (He et al., 2012). La técnica de diluciones seriadas suele utilizarse para purificar los cultivos y disminuir la proporción de bacterias en el medio (Richmond, 2004; Band, 2007). En este estudio esta fue la metodología más apropiada para obtener cultivos monoalgales sin utilizar antibióticos o radiación (Almaguer et al., 2004; Band, 2007; Abou-Shanab et al., 2011).

Una contribución importante para el éxito de la técnica de diluciones seriadas fue seleccionar, desde el inicio del bioensayo, soluciones con una densidad de microalgas superior a la de otros microorganismos. La principal razón para lograr obtener cepas de microalgas nativas es la futura alimentación de los organismos acuáticos

endémicos que se cultivan en esa zona, sería más adecuado alimentar animales en cautiverio con microalgas que sirven de alimento natural a las poblaciones silvestres locales. Además, como menciona Band (2007) existen especies de las que hay escasa investigación y estudiarlas podría aportar al desarrollo científico de la región.

Durante los 3 años de duración de esta investigación, no se observaron cambios morfológicos importantes en las células de ambas especies, que se pudieran interpretar como diferentes estadios de vida. Por ejemplo, la especie *Phaeodactylum tricornutum* tiene un estadio fusiforme con características fenotípicas muy similares a la cepa NGN1, pero con el tiempo las células de *P. tricornutum* cambian a formas ovaladas o trirradiadas (De Martino, Meichnin, Shi, Pan, & Bowler, 2007).

Varios investigadores señalan que el primer criterio para seleccionar cepas con potencial acuícola es el tamaño celular (Brown et al., 1989; Brown, 2002; Knuckey, Brown, Barrett & Hallegraef, 2002; Conceição et al., 2010). Díaz et al. (2006) evaluaron el efecto del tamaño de las microalgas *Chaetoceros muelleri* y *Tetraselmis suecica* sobre la tasa de ingestión de larvas de *Artemia franciscana*. Desde el inicio del ensayo observaron diferencias significativas en todas las etapas de desarrollo y los tratamientos evaluados. En los estadios larvales tempranos hubo una tasa de ingestión superior de *C. muelleri*, microalga más pequeña (7 a 9µm) que *Tetraselmis suecica* (10 a 16µm). Mallo & Fenucci (2004) también señalaron la importancia del tamaño adecuado de las diatomeas al alimentar protozoos. En las muestras colectadas se buscaron y escogieron células microalgales que tuvieran un tamaño apropiado (Torretera & Tacon 1989, Prieto et al., 2005) y similar a los utilizados en los centros de cultivo acuícola del país.

Los resultados obtenidos muestran dos microalgas de ambiente tropical con alto potencial para la acuicultura. Este estudio puede ser tomado como base o paso inicial para otros análisis, provee información técnica y científica para desarrollar cultivos regionales y no depender del fitoplancton importado para la alimentación de organismos acuáticos. Las microalgas estudiadas presentaron características morfológicas adecuadas para ser consideradas en los centros de cultivo de la región Centroamericana.

## AGRADECIMIENTOS

A Silvia Ramírez Flores, de la Universidad Nacional de Costa Rica. A la Estación de Biología Marina de la Universidad Nacional de Costa Rica, institución que financió el proyecto.

## REFERENCIAS

- Abou-Shanab, R., Matter, I., Kim, S., Oh, Y., Choid, J. & Jeon, B. (2011). Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3079-3085.
- Almaguer, Y., Alfonso, E & Leal, S. (2004). Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Revista de Investigaciones Marinas*, 25(1), 57-64.
- Band, C. (1997). Generación biotecnológica para la producción de microalgas. *Ciencia y Mar*, 1, 23-30.
- Band, C. (2007). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. En: B.O. Arredondo & D. Voltolina (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (1-11). México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Banerjee, C., Bandopadhyay, R. & Shukla, P. (2012). A simple novel agar diffusion method for isolation of indigenous microalgae *Chlamydomonas* sp. CRP7 and *Chlorella* sp. CB4 from operational swampy top soil. *Indian Journal of Microbiology*, 52(4), 710-712.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. & Garland, C.D. (1989). *Nutritional aspect of microalgae used in mariculture; a literature review*. Australia: CSIRO Marine Laboratories.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315-331.
- Brown, M.R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, MG. Gaxiola-Cortés & N. Simoes (Eds). *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola* (281-292). Cancún.
- Canosa, A. & Pinilla, G. (2007). Relaciones entre las abundancias del bacterioplancton y del fitoplancton en tres ecosistemas lénticos de los Andes Colombianos. *Revista de Biología Tropical*, 55(1), 135-146.
- Coll, M. J. (1983). *Acuicultura marina animal*. (2ª Ed.). Madrid: Mundi-Prensa.
- Conceição, L., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S. & Dinos, M.T. (2010). Lie feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41, 613-640.
- De Martino, A., Meichnin, A., Shi, J., Pan, K. & Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, 43(5), 992-1009.
- Díaz, A., Ramírez, A., Godínez, D. & Gallo, G. (2006). Efecto del tamaño de las microalgas sobre la tasa de ingestión en larvas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Zootecnia Tropical*, 24(2), 193-203.
- Gómez, L. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19, 3-20.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith & M.H. Chanley (Eds.), *Culture of marine invertebrate animals* (pp 26-60). New York: Plenum Press.
- He, M., Li, L. & Liu, J. (2012). Isolation of wild microalgae from natural water bodies for high hydrogen producing strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 4046-4056.
- Horner, R. (2002). *A taxonomic guide to some common marine phytoplankton*. Great Britain: Biopress.
- Huerlimann, R., de Nys, R & Heimann, K. (2010). Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-Up Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 245-257.
- Knuckey, R., Brown, M., Barrett, S. & Hallegraeff, G. (2002). Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 211(1-4), 253-274.
- León, C. & Chaves, D. (2010). Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1(2), 155-177.
- Mallo, J. & Fenucci, J. (2004). Alimentación de protozoos del langostino *Pleoticus muelleri* Bate utilizando diferentes microencapsulados y especies de microalgas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 39(1), 13-19.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 527-534.
- Neori, A. (2011). "Green water" microalgae: the leading sector in world aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 143-149.
- Prieto, M., Mogollon, M., Castro, A. & Sierra, L. (2005). Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuicola. *MVZ-Córdoba*, 10(1), 544-554.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Malden Massachusetts: Blacwell Publishing Company.
- Robert, R. & Trintignac, P. (1997). Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resources*, 10, 315-327.
- Rosen, B. (1990). *Microalgae identification for aquaculture*. Florida: Florida Aqua Farms.
- Round, F.E., Crawford, R.M. & Mann, D.G. (1990). *The diatoms: biology & morphology of the genera*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Silva-Benavides, A.M., Sili, C. & Torzillo, G. (2008). Cyanoprocaryota y microalgas (Chlorophyceae y Bacillariophyceae) bentónicas dominantes en ríos de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56, 221-235.

- Silva-Benavides, A.M. & Torzillo, G. (2012). Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24, 267-276.
- Simon, N., Cras, A., Foulon, E. & Lemée, R. (2009). Diversity and evolution of marine phytoplankton. *Comptes Rendus Biologies*, 332, 159-170.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Torrentera, L. y Tacon, A. (1989). *La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura, una diagnosis*. Documento técnico n° 12 preparado para el Proyecto GCP/RLA/075/ITA. Brasilia: Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia.
- Tomas, C. (1997). *Identifying marine phytoplankton*. San Diego, California: Academic Press.
- Wikfors, G. & Onho, M. (2001). Minireview: Impact of algal research in aquaculture. *Journal of Phycology*, 37(6), 968-974.