

Optimización en la producción de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal

Optimization in the production of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in a helical tubular photobioreactor

María del Milagro Carvajal-Oses¹, Jonathan Chacón-Guzmán²,
Ángel Herrera-Ulloa³

Fecha de recepción: 26 de agosto de 2017
Fecha de aprobación: 6 de noviembre de 2017

Carvajal-Oses, M; Chacón-Guzmán, J; Herrera-Ulloa, A. Optimización en la producción de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal. *Tecnología en Marcha*. Vol. 31-2. Abril-Junio 2018. Pág 117-126.

DOI: 10.18845/tm.v31i2.3629



- 1 Bióloga. Universidad Nacional de Costa Rica, Parque Marino del Pacífico. Puntarenas, Costa Rica. Correo electrónico: milagro.carvajal.oses@una.cr
- 2 Biólogo. Universidad Nacional de Costa Rica, Parque Marino del Pacífico. Puntarenas, Costa Rica. Correo electrónico: jonathan.chacon.guzman@una.cr
- 3 Biólogo. Universidad Nacional de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: angel.herrera.ulloa@una.cr

Palabras clave

Microalga; *Nannochloropsis oculata*; fotobiorreactor; densidad algal.

Resumen

La producción de microalgas ha tomado importancia en los últimos años, debido a sus diversos usos en la producción de biocombustibles, alimentación tanto humana como animal, y en biorremediación; es por ello que la optimización de las tecnologías destinadas a su producción resultan necesarias. En el presente trabajo se implementó y comparó un fotobiorreactor tubular helicoidal con un sistema abierto tradicional para la producción de *Nannochloropsis oculata* en el Parque Marino del Pacífico, Puntarenas, Costa Rica. En la construcción del fotobiorreactor se utilizó 100 metros de manguera transparente de 1" con un volumen total de 55 L, una estructura cilíndrica metálica (diámetro 0,67 m y 1,90 m de altura), un colector (0,12 m diámetro y 1,25 m de altura) de 15 L de volumen, un desgasificador para eliminar los excedentes de oxígeno, se instaló un aireador para la mezcla del medio de cultivo y finalmente se colocaron ocho lámparas de 32 W alrededor de la estructura metálica. Mientras que el sistema abierto estaba conformado por tanques de fibra de vidrio de 2 m³ de volumen y una manguera para la aireación. Se obtuvo como resultado que con el fotobiorreactor tubular se logró aumentar la densidad algal de 7,5 a 134x 10⁶ cel/mL, la microalga logró permanecer en este sistema hasta 20 días mientras que con el sistema abierto común solamente de 4 a 5 días, redujo el área requerida para la producción de la microalga en un 91% y al reducir las horas hombre necesarias para su funcionamiento logró reducir en un 18% los costos económicos.

Keywords

Microalgae; *Nannochloropsis oculata*; photobioreactor; algal density.

Abstract

Microalgae production has become important in recent years due to its diverse uses in the industry (biofuels, human and animal feeding, and bioremediation), because is important the optimization of the technologies destined to its production is necessary. A tubular photobioreactor with a traditional open system for production of *Nannochloropsis oculata* in the Parque Marino del Pacífico, Puntarenas, Costa Rica, was compared. In the construction of the photobioreactor was used 100 meters of transparent hose 1 "with a total volume of 55 L, a cylindrical structure (diameter 0, 67 m and 1, 90 m height), a manifold (0, 12 m diameter and 1, 25 m height) of 15 L of volume, a degasser to remove excess oxygen, an aerator was installed for the corresponding mixing of the culture medium and finally eight lamps of 32 W were placed around the metallic structure. While the open system consisted of glass fiber tanks 2 m³ and a hose for aeration. Results showed with tubular photobioreactor it was possible to increase the algal density from 7, 5 to 134 x 10⁶ cells / mL, the microalga managed to remain in the system for up to 20 days while with the common open system only 4 to 5 days, the new equipment reduced the area required for microalgae production by 91% and by reducing the man hours required for its operation managed to reduce economic costs by 18%.

Introducción

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que utilizan la energía luminosa y el dióxido de carbono para obtener una mayor eficiencia fotosintética, la cual les permite una alta capacidad de producción de biomasa que puede ser destinada a diferentes aplicaciones,

como la producción de biocombustibles, purificación de aguas residuales, extracciones de alimentos de alto valor añadido, productos farmacéuticos y como alimento para la acuicultura [1] [2] [3]. *Nannochloropsis oculata* ha sido una de las principales candidatas para la nutrición de especies animales, debido a su alto contenido en lípidos y que además puede ser utilizada en la fabricación de biodiesel [4] [5] [6].

Sin embargo, la producción masiva de esta especie representa una fracción considerable del costo total de operación en los laboratorios, debido a la necesidad de mano de obra calificada, de infraestructura adecuada y que, en su mayoría, corresponden a sistemas abiertos que no permiten mantener las condiciones físico-químicas controladas [7] [8].

Una alternativa a los métodos tradicionales de producción de microalgas es la utilización de fotobiorreactores; un sistema cerrado, aislado del medio ambiente sin intercambio de gases y fuentes de contaminación externa, diseñado en material transparente; que consta de un receptor de luz (sistema tubular optimizado) y un sistema de impulsión (burbujeo de aire en un desgasificador plano), cuyo diseño es determinado por el uso final de la biomasa así como el requerimiento de su calidad [9]. Su uso ha sido ampliamente reportado en la literatura [10] [11] [12] [13] dada su importancia especialmente para producir biocombustibles.

El siguiente trabajo tiene como objetivo ofrecer ventajas comparativas de un fotobiorreactor tubular helicoidal como una alternativa de optimización en la producción de microalgas para la nutrición de especies marinas, comparado con los sistemas tradicionales de producción en tanques.

Metodología

Sistemas de cultivos microalgales

Fotobiorreactor tubular helicoidal

Una fotocelda fue construida usando una manguera semitransparente (100 m de largo, con un volumen aproximado a los 55 litros) enrollada de forma circular en el exterior de una malla metálica cilíndrica (0,67 m de diámetro y 1,90 m de altura). La manguera se colocó inclinada con una pendiente de dos grados (figura 1). Por medio de un soplador regenerativo se inyectó aire en la parte media superior de la estructura. El aire excedente más el oxígeno producido por las algas fue liberado a través de un desgasificador colocado en la parte superior de la fotocelda. Para captar el medio de cultivo se utilizó un colector en el cual se vertió el medio de cultivo por gravedad, el cilindro contó con 0,12 m de diámetro y una altura aproximada de 1,25 m; y con un volumen aproximado de 15 L. Por medio de un tanque de 2500 libras y mediante un suave burbujeo, se suministró dióxido de carbono para regular el pH. Finalmente, se equipó con una fuente de luz artificial en la estructura de la malla metálica cilíndrica compuesta por 8 tubos de luz fluorescente de 32W cada uno. El fotobiorreactor, se colocó en el área interna del laboratorio (cepario), el cual está temperado a 27 ± 1 °C.

Sistema abierto

Se utilizaron tanques de fibra de vidrio con un volumen de 2 m³ de capacidad y 1,3 m de diámetro; ubicados en una sala externa al cepario y bajo techo cubierto de láminas de policarbonato transparentes, con aireación constante.

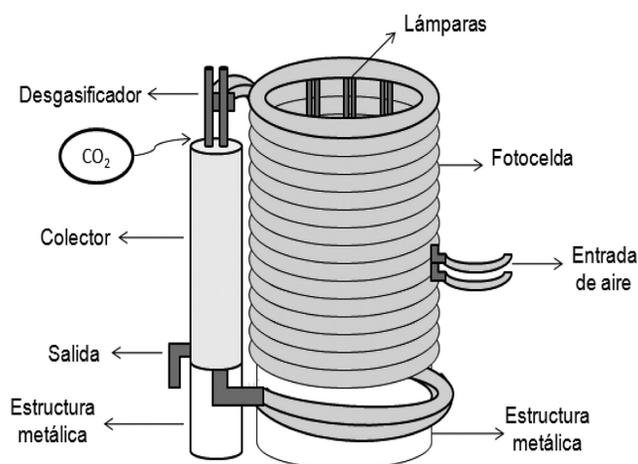


Figura 1. Diseño del fotobiorreactor tubular helicoidal con sus respectivos componentes.

Cultivo de microalgas

Nutrientes para los cultivos intermedios y para el fotobiorreactor tubular helicoidal.

En la siembra de los cultivos algales intermedios se utilizó una cepa de *Nannochloropsis oculata* en un sistema escalonado, se inició con volúmenes de 250 mL hasta culminar con volúmenes de 100 L. Para estas etapas se utilizó el medio f/2 de Guillard [14] (composición final por litro de los stock de nutrientes: 90 g NaNO_3 ; 5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 27,5 g NH_4Cl ; 4,36 g $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$; 3,150 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,010 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,022 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,010 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,180 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,006 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 mL cianocobalamina cristalina (B12); 0,2 g tiamina clorhídrica; 0,001 mg biotina cristalina). Los medios de cultivo se mantuvieron a una salinidad de 31 ppt y fueron producidos en el cepario en el cual la temperatura se mantuvo aproximadamente en $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Nutrientes para sistema abierto común.

En el caso del sistema abierto de producción de microalgas se utilizó fertilizantes para cultivos masivos, el cual correspondió a 120 g de nitrato de potasio (NO_3K) y 5,5 g de fosfato monoamónico (MAP) por tonelada de agua marina.

Inoculación de algas

El fotobiorreactor tubular helicoidal se inoculó con 30 L de microalga *N. oculata* a una densidad de 17×10^6 cel/mL y el sistema abierto con 80 L de microalga a una densidad de 7×10^6 cel/mL.

Tratamiento de agua de mar

El agua de mar fue filtrada con cartuchos dispuestos en serie, con capacidad de retención de 10, 5 y 1 μm . El agua se desinfectó con hipoclorito de sodio (3%) a razón de 1 mL/L de agua de mar, la que después de 24 horas se eliminaron sus residuos con tiosulfato de sodio (0,06 mg/L).

Medición de parámetros

Para los cultivos microalgales, la salinidad se ajustó a 31 ppt. Además, diariamente se midió el grado de acidez y temperatura con un pHmetro de la marca Hanna Instruments. En el caso del fotobiorreactor, se midió la iluminancia real diariamente con un luxómetro de la marca Aquatic Eco-System.

Determinación de la densidad y biomasa celular

Las densidades celulares se determinaron a diario mediante el recuento de alícuotas con un microscopio óptico binocular Optima, que se fijaron con lugol y posteriormente se contaron utilizando un hematocitómetro con una profundidad de 0,1 mm, expresándolas como número de células por mililitro del cultivo. No se cuantificaron células no pigmentadas o lisadas, consideradas éstas como células muertas. Estos datos fueron utilizados para la confección de curvas de crecimiento. Finalmente, la biomasa celular (g/L) se obtuvo centrifugando tres litros de cultivo de *N. oculata* de cada réplica en cada sistema, para este proceso se utilizó una centrifuga de la marca Thermo Scientific.

Comparación de costos

Los rubros que se definieron como parte de los costos para producir $1,1 \times 10^{13}$ células de *Nannochloropsis oculata*, correspondieron al consumo eléctrico, mano de obra, materiales para la construcción del fotobiorreactor, tanque de fibra del sistema abierto y los reactivos para la formulación de los medios de cultivo. Los costos abarcaron desde el desarrollo de los cultivos intermedios hasta la siembra de cada uno de los sistemas de producción, lo cual correspondió a un mes aproximadamente.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizaron tres replicas para cada sistema de producción de microalgas. El análisis estadístico partió de comprobar la homogeneidad de la varianza y la normalidad de los datos (test de Shapiro-Wilks), si los datos son normales y homocedásticos, para un nivel de significancia de 0,05; se procedió a comparar las medias con ANOVA en caso contrario se aplicará la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos que se compararon correspondieron a las densidades máximas (cel/mL) y la biomasa celular.

Resultados

Para los cultivos algales producidos en el fotobiorreactor la temperatura fue de $26,89 \pm 0,56$ °C y un pH promedio de $7,77 \pm 1,08$. En el caso del sistema abierto se obtuvo una temperatura de $29,2 \pm 0,45$ °C y un pH de $9,1 \pm 0,3$. La sala donde se desarrolló el sistema abierto reportó una iluminancia de 2470 ± 126 Lux. En el caso del fotobiorreactor, al día de la siembra se midió una iluminancia total de 1250 ± 95 Lux y en el día de máxima densidad se reportó $238,33 \pm 83$ Lux.

En cuanto a las curvas de crecimiento microalgal con el fotobiorreactor tubular (figura 2), la máxima densidad se alcanzó al noveno día con $134 \times 10^6 \pm 13,52 \times 10^6$ cel/mL, del día 10 al 15 aproximadamente permaneció constante, sin embargo, a partir del día 16 se presentó un descenso rápido en la densidad microalgal. En cuanto al sistema abierto común, se obtuvo que su máxima densidad se obtuvo al día $4,33 \pm 0,56$ con una densidad máxima promedio de $7,5 \times 10^6 \pm 0,15 \times 10^6$ cel/mL. Los datos de máximas densidades no cumplieron la normalidad y se aplicó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis, dando como resultado la existencia de diferencias significativas entre los datos analizados ($P < 0,05$). Con respecto a la biomasa celular, utilizando el fotobiorreactor se obtuvo $0,28 \pm 0,05$ g/L y con el sistema abierto $0,08 \pm 0,03$ g/L, estos datos al cumplir tanto con la normalidad como con la homocedasticidad de la varianza se le aplicó un ANOVA dando como resultado diferencias significativas entre ambos ($P < 0,05$).

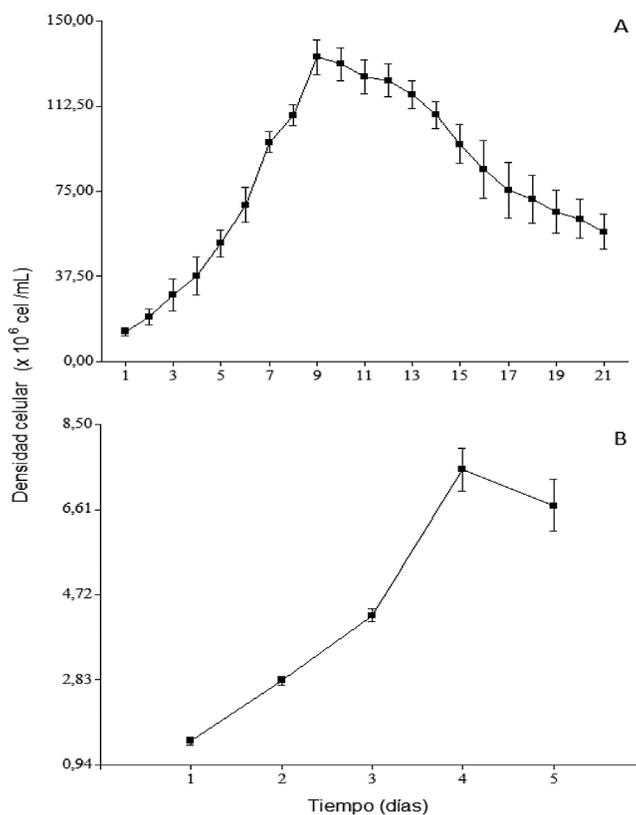


Figura 2. Crecimiento microalgal de *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal (A) y en un sistema abierto tradicional (B).

El cuadro 1 muestra la comparación de costos (US\$) en la producción de *N. oculata* con un fotobiorreactor y con un sistema tradicional, siendo porcentualmente más barato con el fotobiorreactor.

Cuadro 1. Costos (US\$) de la producción de *Nannochloropsis oculata* con cada uno de los sistemas de producción.

Materiales de construcción	Fotobiorreactor	Sistema abierto
Manguera de 1"	310,35	
Manguera de 3/8"	5,30	5,30
Estructura metálica	10,00	
Materiales de PVC	3,54	3,54
Lámparas y conexión eléctrica	420,00	53,06
Dióxido de carbono	265,00	
Tanque de fibra de vidrio		706,71
Nutrientes		
NaNO ₃	1,16	2,49
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,09	0,18

Continúa...

Continuación

Materiales de construcción	Fotobiorreactor		Sistema abierto	
NH ₄ Cl	0,24		0,51	
Metales traza	0,13		0,27	
Vitaminas	0,08		0,17	
KNO ₃			0,25	
MAP			0,03	
Consumo eléctrico	KWh	Costo	KWh	Costo
Balanza semi-analítica	0,12	0,01	0,12	0,01
Microscopio	1,32	0,18	0,66	0,09
Autoclave	57,12	8,07	57,12	8,07
Lámparas	356,4	50,37	237,6	33,58
Bomba agua salada	3,31	0,47	6,62	0,94
Incubadora para cepas algales	641,52	90,67	641,52	90,67
Soplador	296,54	41,91	296,58	41,92
Lámparas ultravioleta (UV)	0,32	0,04	0,64	0,09
Mano de obra con cargas sociales	Costo hora	Total (\$)	Costo hora	Total (\$)
Biólogo	8	380	8	760
Materiales de limpieza	20,00		30,00	
Total (\$)	1417,61		1737,88	

Discusión

El fotobiorreactor tubular helicoidal, ha sido utilizado para la producción de *Spirulina platensis* [15], de *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum* y *Chlorella vulgaris* [16] y por el Parque Marino del Pacífico para *N. oculata*.

El cuadro 2, muestra variables comparativas entre el fotobiorreactor tubular helicoidal con respecto a un sistema abierto común. El fotobiorreactor tiene la capacidad de aprovechar la biomasa microalgal por más cantidad de días y a mayores densidades (figura 2) y resulta más barata a mediano plazo.

La baja eficiencia en la productividad microalgal obtenida en el sistema abierto en comparación con el fotobiorreactor está relacionada con la mayor proporción de volumen de agua que requiere para su siembra y su bajo aprovechamiento de la intensidad luminosa que incide negativamente en su función fotosintética; así mismo, el sistema de mezclado resulta ineficiente, pues la aireación sencilla en tanques circulares no es el sistema más aconsejable, sino en sistemas tipo “raceway” [17] [18].

Los factores de estrés también afectan la producción en sistemas abiertos, como lo son cambios de temperatura y pH elevados [19] [20] [21]. En el caso de la temperatura, el inóculo requerido para la siembra del cultivo masivo se llevó a cabo dentro del cepario donde existe al menos tres grados menos de diferencia con respecto al área externa donde se encuentra el sistema abierto. Este último aspecto, no afectó al cultivo microalgal en el fotobiorreactor pues

al ocupar poca área pudo ser ubicado dentro del cepario bajo las mismas condiciones de temperatura que su respectivo inóculo. El pH, en el fotobiorreactor fue regulado, por medio de la aplicación de CO₂, a valores cercanos a 7 el cual es el recomendado para *N. oculata* [22] [23]; en el sistema abierto el pH fue notablemente superior debido a que el volumen de agua al ser mayor, la aplicación de CO₂ no resulta factible económicamente y según Sánchez-Torres *et al.* [24] la disponibilidad de CO₂ en el agua es el principal limitante en la capacidad de carga en los cultivos algales.

Cuadro 2. Ventajas del uso de un fotobiorreactor tubular helicoidal con respecto a un sistema abierto común en un laboratorio de producción de microalgas.

Característica	Descripción	Porcentaje (%)	Reduce / aumenta
Aprovechamiento algal	En el sistema abierto, del cuarto al quinto día de la curva de crecimiento algal, el cultivo muere. En el fotobiorreactor a partir del día de máxima densidad se puede aprovechar hasta 6 días más.	375	↑
Densidad celular máxima	Con el sistema abierto se obtiene una densidad máxima de 7,5 x 10 ⁶ y con el fotobiorreactor 134 x 10 ⁶ cel/mL.	1787	↑
Área requerida	Para mantener un sistema abierto común se requiere de un área de al menos 45 m ² para mantener cuatro tanques de dos toneladas de volumen. Con el fotobiorreactor en un área de 4 m ² se pueden mantener hasta cuatro fotobiorreactores.	91	↓
Horas hombre	Para mantener un sistema abierto común se requiere al menos un tiempo total de un profesional en Biología, mientras que con el fotobiorreactor con media jornada sería suficiente.	50	↓
Aspectos económicos generales	Debido a que las horas hombres requerida para trabajar el fotobiorreactor son menores que en el sistema abierto, esto abarata los costos.	18	↓

La densidad celular obtenida en el fotobiorreactor se encuentra en el rango de los 100 millones de células por mL similar a otros estudios [18] [25] [26] [27] [28]. Sin embargo, autores como Briassoulis *et al.* [29] reportan densidades muy superiores de hasta 350 millones de células por mL para *Nannochloropsis* sp. en un fotobiorreactor tubular helicoidal.

Con respecto a la productividad algal, la mayoría de los reportes en la literatura [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] señala para *N. oculata*, utilizando varios tipos de fotobiorreactores, valores entre 0,17 a 0,76 g/L/d, en el cual se encuentra el valor obtenido en el presente estudio, no obstante Briassoulis *et al.* [29] reportó un mayor rango de productividad para esta especie (1,10-3.03 g/L/d). La medición de la productividad algal es relevante, ya que es a partir de ésta que se puede obtener biocombustibles, también se utiliza en la alimentación animal y humana, en la obtención de productos biotecnológicos con uso en medicina, farmacia y/o cosmética [37] [38].

El fotobiorreactor resulta ser una ingeniería menos costosa en comparación a los sistemas abiertos [39] esto debido a que su bioproceso es más eficiente en cuanto a densidad algal, mano de obra y utilización del espacio.

En conclusión, mantener un fotobiorreactor tubular helicoidal en un laboratorio para producción de juveniles de peces, permite un suministro de biomasa algal constante diariamente, lo cual lo hace fácilmente adaptable a los distintos fines comerciales. La tecnología de los fotobiorreactores, corresponde a un campo de investigación en el cual aún se hace necesario nuevos aportes científicos en beneficio de la industria en general.

Referencias

- [1] C. Lee e I. Suh, "Photobioreactor engineering: design and performance", *Biotechnology and bioprocess engineering*, vol. 8, pp. 313-321, 2003.
- [2] Y. Durmaz, "Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (*Eustigmatophyceae*) in nitrogen limitation", *Aquaculture*, vol. 272, pp. 717-722, 2007.
- [3] A. Converti, A. Casazza, E. Ortiz, P. Perego y M. Del Borgui, "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production", *Chemical Engineering and Processing*, vol. 48, pp. 1146-1151, 2009.
- [4] S. Chiu, C. Kao, M. Tsai, S. Ong, C. Chen y C. Lin, "Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration", *Bioresource Technology*, vol. 100, pp. 833-838, 2009.
- [5] E. Selahattin, M. Tuncer y E. Saker, "Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al₂O₃ supported CaO and MgO catalysts", *Bioresource Technology*, vol. 100, n.º. 11, pp. 2828-2831, 2009.
- [6] G. Van Vooren, F. Le Grand, J. Legrand, S. Cuine, G. Peltier y J. Pruvost, "Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application", *Bioresource Technology*, vol. 124, pp. 421-432, 2009.
- [7] M. Nieves, D. Voltolina, J. Ruiz, M. Cisneros y P. Piña, "Cultivo de microalgas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica", *Hidrobiológica*, vol. 10, no. 1, pp. 1-6, 2000.
- [8] M. Greque y J. Vieira, "Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor", *Journal of Biotechnology*, vol. 129, pp. 439-445, 2007.
- [9] C. González, M. Sol y M. Franco, "Estimación de iluminación en un fotobiorreactor productor de biomasa a partir de microalgas", *Conciencia Tecnológica*, vol. 47, pp. 29-35, 2011.
- [10] E. Sierra, F. Acien, J. Fernández, J. García, C. González y E. Molina, "Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae", *Chemical Engineering Journal*, vol. 138, pp. 136-147, 2008.
- [11] S. Pirt, Y. Lee, M. Walach, M. Pirt, H. Balyuzi y M. Bazin, "A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 33, pp. 45-58, 1983.
- [12] J. Burgess, K. Iwamoto, Y. Miura, H. Takano y T. Matsunaga, "An optical-Bber photobioreactor for enhanced production of the marine alga *Isocrysis galvana* T-ISO (UTEX-LB-2307)", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 39, pp. 456-561, 1993.
- [13] P. Schenk, S. Thomas-Hall, E. Stephens, U. Marx, J. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse y B. Hankamer, "Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production" *Bioenergy research*, vol. 1, n.º. 1, pp. 20-43, 2008.
- [14] R. Guillard, "Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates", en *Culture of marine invertebrate animals*, W. Smith y M. Chanley, Eds. Estados Unidos: Plenum Press, 1975, pp. 26-60.
- [15] Y. Watanabe, J. de la Noue y D. Hall, "Photosintetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*", *Biotechnology and bioengineering*, vol. 47, n.º. 2, pp. 261-269, 1995.
- [16] E. Uribe y J. Rangel, "Fotobiorreactor helicoidal vertical para la alimentación de peces marinos" en *Curso Internacional de acuicultura de peces marinos*, A. Silva, Ed. Coquimbo, Chile: Universidad Católica del Norte, 2004, pp. 115-124.
- [17] C. Posten, "Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae", *Engineering in Life Science*, vol. 9, n.º.3, pp. 165-177, 2009.
- [18] M. Koberg, M. Cohen, A. Ben-Amotz y A. Gedanken, "Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation", *Bioresour Technol*, vol. 102, pp. 4265-4269, 2011.



- [19] A. Sukenik, J. Beardall, J. Kromkamp, J. Kopeck, J. Masojídek, S. Stef van Bergeijk, S. Gabai, E. Shaham y A. Yamshon, "Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions", *Aquat Microb Ecol*, vol. 56, pp. 297-308, 2009.
- [20] J. Sandnes, J. Källqvist, D. Wenner y H. Gislerød, "Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production", *J Appl Phycol*, vol. 17, n.º. 6, pp. 515-525, 2010.
- [21] M. Pérsico, M. Moris, D. Tranier, A. Zanazzi, A. Saubidet y M. Beligni, "Evaluación de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina", *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, vol. 2, n.º. 1, pp. 30-48, 2011.
- [22] L. Ramírez-Mérida, L. Queiroz-Zepka y E. Jacob-López, "Fotobiorreactor: herramientas para el cultivo de cianobacterias", *Ciencia y Tecnología*, vol. 6, n.º. 2, pp. 9-19, 2013.
- [23] B. Cheirsilp y S. Torpee, "Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation", *Bioresource Technology*, vol. 110, pp. 510-516, 2012.
- [24] M. Sánchez-Torres, J. Juscamaita-Morales, J. Vargas-Cárdenas y R. Oliveros-Ramos, "Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado", *Ecología palicada*, vol. 7 n.º.1, pp. 149-158, 2008.
- [25] M. Ferreira, P. Coutinho, P. Seixas, J. Fábregas y A. Otero, "Enriching rotifers with "premium" microalgae *Nannochloropsis gaditana*", *Mar Biotechnol*, vol. 11, pp. 585-595, 2009.
- [26] P. Das, W. Lei, S. Aziz y J. Obrad, "Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light", *Bioresour Technol*, vol.102, pp. 3883-3887, 2011.
- [27] F. Sayegh y D. Montagnes, "Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition", *Bioresour Technol*, vol. 102, pp. 3007-3013, 2011.
- [28] D. Simionato, E. Sforza, E. Corteggiani-Carpinelli, A. Bertucco, G. Giacometti y T. Morosinotto, "Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation", *Bioresour Technol*, vol. 102, pp. 6026-6032, 2011.
- [29] D. Briassoulis, P. Panagakis, M. Chionidis, D. Tzenos, A. Lalos, C. Tsinos, K. Berberidis y A. Jacobsen, "An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp.", *Bioresource Technology*, vol. 101, n.º. 17, pp. 6768-6777, 2010.
- [30] G. Chini, F. Lavista, A. Bastianini, L. Rodolfi, M. Vincenzini y M. Tredici, "Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in outdoor tubular photobioreactors", *Journal of Biotechnology*, vol. 70, pp. 299-312, 1999.
- [31] N. Zou y A. Richmond, "Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp.", *Journal of Biotechnology*, vol. 70, pp. 351-356, 1999.
- [32] Z. Cheng-Wu, O. Zmora, R. Kopel y A. Richmond, "An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*)", *Aquaculture*, vol. 195, pp. 35-49, 2001.
- [33] G. Chini, R. Pastorelli y M. Tredici, "A Modular Flat Panel Photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination", *Journal of Applied Phycology*, vol. 12, pp. 521-526, 2000.
- [34] J. Fábregas, A. Maseda, A. Domínguez y A. Otero, "The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 20, pp. 31-35, 2004.
- [35] F. Xu, C. Zhao-ling, W. Cong y F. Ouyang, "Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed-batch culture", *Biotechnology Letters*, vol. 26, pp. 1319-1322, 2004.
- [36] L. Rodolfi, G. Chini, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini y M. Tredici, "Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 102, pp. 100-112, 2009.
- [37] L. Gómez, "Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos", *Revista Cubana de Química*, vol. 19, n.º. 2, pp. 3-20, 2007.
- [38] L. Brennan y P. Owende, "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, pp.557-577, 2010.
- [39] Y. Li y J. Huang, "High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis*", *Journal of Phycology*, vol. 45, pp. 635-641, 2009.