

*Artículo original de investigación*

## **Evaluación de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina**

María Marta Pérsico, Mariano Moris, Enzo Damián Tranier, Aldo Nahuel Zanazzi, Alejandro Arturo Saubidet y María Verónica Beligni<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Tecnológica Nacional, sede Mar del Plata  
Buque Pesquero Dorrego N° 281, 7600, Mar del Plata, Argentina.

\* Autor de correspondencia: mbeligni@mdp.utn.edu.ar

### **Resumen**

La Universidad Tecnológica Nacional (UTN) Mar del Plata posee un programa interdisciplinario destinado al desarrollo de procesos ambiental y económicamente sustentables para el cultivo masivo de microalgas para biodiesel. El mismo implica un reemplazo de insumos costosos por el aprovechamiento de pasivos ambientales y la utilización de microalgas marinas para minimizar el consumo de agua potable. Con dicho propósito, se implementó un sistema de abastecimiento y tratamiento de agua marina proveniente del sistema de refrigeración de una central termoeléctrica cercana. En una primera etapa, se evaluó el cultivo masivo de *Nannochloropsis oculata*, microalga seleccionada por su elevado contenido de aceites. En un módulo de producción sencillo y de bajo costo, con luz solar y temperaturas impuestas por el ambiente, se realizaron cultivos en el exterior y bajo invernadero en las cuatro estaciones del año. Durante un año, se monitorearon parámetros ambientales (temperatura y flujo de luz) y de los cultivos (pH, salinidad y temperatura). El pH fue corregido regularmente a valores entre 7.5 y 8.0 y la salinidad en el rango 28-30 ‰. A su vez, se determinaron a diario parámetros relacionados con la productividad, como densidades celulares promedio y máximas mensuales y velocidades de duplicación. Los valores máximos para dichos parámetros se produjeron en primavera, seguidos por el invierno y el otoño, mientras que las temperaturas elevadas del verano produjeron los menores valores. El invernadero protegió a los cultivos de los fríos extremos, pero ocasionó una filtración considerable de los rayos solares en los meses de menor flujo luminoso, lo cual probablemente fue la causa de la disminución de las densidades celulares bajo invernadero en el invierno. Por último, al comparar cultivos de igual volumen (1,500 litros), se evidenció que los tanques rectangulares produjeron densidades celulares máximas entre 15 y 20% mayores que los tanques circulares. Como resultado, se ganó información invaluable que permitió establecer un procedimiento básico de cultivo masivo de *N. oculata* con productividades aptas para la producción de biodiesel. Se proponen y discuten posibles mejoras y futuras líneas de investigación.

**Palabras clave:** *acuicultura, biodiesel, cultivo masivo, microalgas, Nannochloropsis*

## Evaluation of an outdoor mass culture system of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*, in a temperate oceanic region of Argentina

### Abstract

The National Technological University of Mar del Plata (UTN) has undertaken a scientific interdisciplinary program focused on the development of processes, environmentally and economically sustainable, for the mass culture of microalgae for biodiesel generation. This program involves a replacement of high cost consumables by making use of environmental liabilities, such as industrial waste and sewage sludge. In addition, it is focused on the use of marine microalgae with the idea of conserving drinking water. For this purpose, we have established a system for the provision and treatment of marine water coming from the refrigeration of a nearby thermoelectric power plant. At a first stage, we evaluated the culture of *Nannochloropsis oculata*, selected by its high oil content, at a production facility made with simple, low cost materials. With light and temperature imposed by the environmental conditions, we have cultured *N. oculata* in the four seasons. For a whole year, we have monitored environmental (temperature, irradiance) and culture (pH, salinity, temperature) parameters. The pH was regularly controlled to values between 7.5 and 8.0 and the salinity within the range of 28-30 ‰. In addition, maximum and average cell densities and duplication rates were determined. Both parameters reached their maximum values in spring, followed by winter and autumn, whereas the high temperatures of the summertime produced the lowest values. The greenhouse was useful at protecting the cultures from extremely low temperatures, but produced a significant filtration of the solar rays during the months with the lowest light fluxes. This was probably the reason for the reduced cell densities in the greenhouse during the wintertime. When comparing cultures of identical volumes (1,500 liters), it was found that rectangular tanks (raceway) produced maximum cell densities 15 to 20 % higher than circular tanks. In summary, highly valuable information was gained in order to establish basic processes for the mass culture of *N. oculata* that yield productivities suitable for biodiesel generation. Possible improvements and future lines of research are proposed.

**Keywords:** *aquaculture, biodiesel, mass culture, microalgae, Nannochloropsis*

### 1. Introducción

El mercado creciente de producción de biodiesel a partir de aceites vegetales comestibles origina situaciones poco sustentables a mediano y largo plazo, como la deforestación, el uso de agua dulce para riego, los monocultivos y el empobrecimiento de tierras fértiles. Por ello, es fundamental el desarrollo de materias primas alternativas que puedan suplir en parte esta demanda creciente (Liu & Zhao, 2007; Chisti, 2008). La obtención de aceites

a partir de microalgas se presenta como una opción con gran perspectiva a nivel local y mundial. Esto es debido a que estos organismos no requieren de tierra fértil para su crecimiento y no son utilizadas masivamente como fuente de alimento humano. Además, pueden duplicar su biomasa en un plazo de tiempo relativamente corto (horas o días, dependiendo de las condiciones) y poseen un elevado rendimiento de aceite por hectárea (Raja et al., 2008; Posten & Schaub, 2009). A pesar

de ello, la tecnología para la producción de biodiesel a partir de microalgas está aún en etapa de desarrollo, ya que enfrenta grandes desafíos que hará falta sortear para que pueda lograrse una producción a escala comercial de manera rentable (Loera-Quezada & Olgún, 2010). Entre los retos más importantes podemos mencionar la dificultad para mantener productividades elevadas en el tiempo y el requerimiento de un suministro constante de dióxido de carbono. Las estrategias que se están siguiendo para enfrentar estos desafíos son muchas: desde la biología celular se enfatiza en la selección de cepas salvajes o modificadas genéticamente con mayores productividades de biomasa y de lípidos. Desde el área de los bioprocesos se trata de optimizar los cultivos, utilizar insumos menos costosos o pasivos ambientales y aumentar el rendimiento y la eficiencia energética de los procesos de cosecha y ruptura celular y de extracción de aceites, entre otros (Beckman *et al.*, 2009; Radakovits *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). La productividad de cultivos de microalgas depende de un gran número de factores, no sólo de la especie, sino también de las condiciones fisicoquímicas del cultivo. La temperatura, intensidad y calidad de luz, fotoperíodo, pH, salinidad y nutrientes son factores que afectan marcadamente a los procesos metabólicos de las microalgas (Hu & Gao, 2006; Sandnes *et al.*, 2010). Generalmente, los cultivos masivos de microalgas presentan gran variabilidad en la productividad, principalmente si se encuentran en el exterior, donde existen importantes fluctuaciones de intensidad luminosa y temperatura. Además, existen variaciones que dependen del sistema utilizado. Los sistemas de crecimiento más comunes son los piletos abiertos. Los mismos pueden ser circulares o en forma de rectángulos con extremos redondeados (“raceway”). Ambos diseños comparten

muchas propiedades (Oswald, 1988; Richmond & Qiang, 1997). Sin embargo, la forma afecta muchos de los parámetros hidrodinámicos del cultivo: la velocidad del cultivo a igual agitación, la formación de áreas de turbulencia, la tendencia a la decantación, no son las mismas en tanques circulares y en óvalos (Oswald, 1988).

Independientemente de los fines de uso de la biomasa microalgal, de la especie y de las condiciones y sistemas de cultivo, gran parte del éxito en el desarrollo de un proceso productivo radica en el establecimiento de un protocolo o rutina de producción que debe ser cumplido de manera rigurosa para obtener resultados reproducibles, que permitan obtener conclusiones y realizar escalamientos exitosos. Sólo de esta manera es posible encontrar patrones de respuesta comunes a las variables ambientales, detectar causas de variaciones y poder modificarlas mediante nuevas operaciones. La experiencia *in situ*, acompañada por un registro exhaustivo, es imprescindible.

El presente trabajo describe y evalúa el sistema de producción masiva de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, seleccionada por su elevado contenido de aceites y su adaptación al cultivo masivo (López *et al.* 2007; Chiu *et al.*, 2009), implementado en la Universidad Tecnológica Nacional (UTN) Mar del Plata, Argentina. Se describe la captación y tratamiento del agua de mar, las condiciones ambientales, las rutinas de cultivo, las experimentaciones referentes al uso de un invernadero y a la forma y tamaño de los recipientes de cultivo y los resultados de productividad de biomasa. Además, se discuten las posibilidades de obtener mejoras en la productividad mediante modificaciones en alguna de las etapas del proceso global.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Cepa de microalgas

Se utilizó la especie marina *Nannochloropsis oculata* (Eustigmaphyta). La misma fue obtenida como gentileza de la Dra. Isabel Albarracín, Universidad Nacional San Juan Bosco, Trelew, Pcia. de Chubut, Argentina.

### 2.2 Encuadramiento espacio-temporal

El cultivo se realizó en la Estación de Cultivo de Microalgas de la UTN Mar del Plata, en la ciudad homónima. La misma está ubicada en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, en la República Argentina. El cultivo fue realizado durante un ciclo anual completo, entre julio de 2009 a junio 2010,

que comprendió cuatro estaciones: invierno (julio, agosto y septiembre 2009); primavera (octubre, noviembre y diciembre 2009); verano (enero, febrero y marzo 2010) y otoño (abril, mayo y junio 2010).

Se evaluó el cultivo masivo de *Nannochloropsis oculata* en la Estación, que consta de un área exterior parqueada con tanques y un invernadero con tanques bajo cubierta (Figura 1A). El cultivo de *N. oculata* se llevó a cabo con temperaturas y luz impuestas por el ambiente, en tanques redondos con 200 y 1500 litros de cultivo y en tanques rectangulares (“raceway”) de 1,500 litros de cultivo.



**Figura 1.**

**Localización de la Estación de cultivo de microalgas de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN), Mar del Plata.**



**(B)** Fotografía satelital de la zona donde se encuentran la UTN Mar del Plata (1), la Central Termoeléctrica 9 de Julio (2) y la Escuela Nacional de Pesca (3). El agua marina para los cultivos se toma de un conducto subterráneo que parte del Puerto de la ciudad y constituye el sistema de refrigeración de la Central Termoeléctrica. Esto se realiza en el punto más cercano a la UTN, donde dicho conducto pasa por debajo de la Escuela de Pesca.

### 2.3 Características del módulo de producción

El módulo de cultivo consiste de un área exterior parquizada y un área cubierta por un invernadero. El invernadero consta de una estructura metálica, es parabólico, de 2.6 m de altura de cumbre, 6 m de ancho en una sola nave y 12 m de longitud construido con tubo de acero galvanizado de 1 pulgada de diámetro. Posee sistema de ventilación cenital superior mediante abertura en laterales opuestos. La cobertura es de polietileno transparente de 200 micrones de espesor para techo y laterales; el piso es de cemento alisado. Los tanques usados en este trabajo consistieron en 4 tanques redondos de PRFV (Plástico Reforzado de Fibra de Vidrio) de 2,500 L de capacidad (2 m de diámetro y 0.80 m de altura), 4 tanques rectangulares con bordes redondeados con tabique central, de PRFV de 3,200 L de capacidad (3.00 m de largo x 1.40 m de ancho x 1.00 m de altura) y 12 tanques redondos de PRFV de 300 L de capacidad (1.0 m de diámetro x 0.70 m de altura).

### 2.4 Obtención y tratamiento del agua

Para los cultivos, se utilizó el agua de mar natural proveniente del sistema de refrigeración de una usina termoeléctrica cercana, la Central 9 de julio, que la capta del puerto de la ciudad a través de una tubería subterránea que transita a unos 200 metros de la UTN. El transporte de esta agua hasta el módulo de producción de microalgas se realizó con una bomba centrífuga de acero inoxidable de 2 HP y una manguera de impulsión de polietileno de 2½ pulgadas de diámetro. El agua fue depositada en un tanque de decantación de 1,000 litros de capacidad, luego reservada en dos tanques de almacenamiento para finalmente ser filtrada por filtros mecánicos de arena y grava a presión y filtros de cartucho de polietileno de 25 y 10 micrones. La

esterilización fue realizada mediante cloración con 20 ppm de hipoclorito de sodio y de cloración con 1 g/g NaClO de tiosulfato de sodio. La ausencia de cloro remanente fue analizada con un kit de cloro total (Hanna Instruments). Para determinar la calidad del agua de mar captada se realizaron análisis sobre la carga bacteriana y la concentración de metales que pudieran resultar tóxicos. Los análisis bacteriológicos realizados incluyeron: determinación de microorganismos aerobios mesófilos por la técnica de recuento en placa, pruebas de aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* por siembra en caldo tripteína soja y repique en medio agar cetrimida, presencia de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples de fermentación (NMP). Estos análisis se repitieron en muestras obtenidas luego del tratamiento de esterilización del agua de mar, para corroborar su efectividad. Los análisis de cobre, zinc, plomo, cadmio, níquel y cromo se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) modo llama aire-acetileno y el de mercurio por EAA técnica de vapor frío, según métodos estándar internacionales para el examen de aguas potables y residuales (AWWA, APHA & WEF, 1998).

### 2.5 Características del cultivo

Se utilizó medio de cultivo Yashima modificado. Brevemente, el agua de mar fue enriquecida con 100 g/tonelada (g/t) de NaNO<sub>3</sub>, 10 g/t de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g/t de urea y 50 g/t de Clewat 32 (mezcla de micronutrientes). La composición en porcentaje de peso en peso (% p/p) de cada componente del Clewat 32 es la siguiente: 0.385% FeCl<sub>2</sub>, 0.166% ZnCl<sub>2</sub>, 0.775% MnCl<sub>2</sub>, 0.017% CoCl<sub>2</sub>, 0.007% CuSO<sub>4</sub>, 0.632% (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 2.470% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.005% EDTA. El cultivo inicial fue llevado a escala de manera gradual. Una vez

adaptado al módulo de producción, fue utilizado como inóculo para iniciar los demás cultivos. Una vez que los cultivos fueron establecidos, se siguió un régimen semi-continuo, en el cual el inóculo inicial correspondía a aproximadamente 20 millones de células por mililitro. Los cultivos fueron aireados constantemente mediante un blower ó bomba de aire trifásica, de 3 HP de 120 m<sup>3</sup>/h de caudal. Los tanques pequeños fueron aireados mediante un tubo de 5 mm de diámetro interior terminado en una piedra difusora; los tanques grandes, tanto circulares como rectangulares fueron aireados mediante dos de estos tubos.

### **2.6 Rutina de cultivo**

Se realizó un programa de trabajo diario de monitoreo y control de los parámetros del cultivo, en la mañana y en la tarde, reportando en planillas todos los datos relevados y observaciones más importantes. La intensidad de luz y la temperatura fueron impuestas por el ambiente. La temperatura en el exterior, en el invernadero y en los cultivos fue medida con un termómetro digital (Delta OHM, Hd 9214). El flujo luminoso (iluminancia) fue medido con un luxómetro digital (V&A instrument, Ms 6610), dentro y fuera del invernadero. Debido a los límites de detección del equipo, los valores mayores a 50,000 lux fueron registrados como > 50,000 y se usó este valor para la determinación de los promedios. Si bien esto tiene sus limitaciones, sirvió para comparar valores de iluminancia promedio entre afuera y adentro del invernadero, sobre todo en los meses con menor flujo de luz solar. El estado del tiempo fue registrado y clasificado en tres amplias categorías: despejado (incluye días con bajo porcentaje de nubosidad), nublado (días de alta nubosidad) y lluvioso (días con cielo encapotado, con llovizna o lluvia). Los registros fueron realizados 3 veces al día; a

cada día fue computada aquella categoría que mejor explicaba el estado climático del mismo. Los datos de temperaturas máximas, mínimas y medias de la ciudad de Mar del Plata, precipitaciones y horas de luz fueron obtenidas de los datos publicados por la Estación Mar del Plata Aeródromo (Servicio Meteorológico Nacional, 2010). La salinidad fue medida cada tres días con un refractómetro (Arcano, Fg-213) y corregida a 28-30 ‰ con agua corriente tratada. El pH fue medido diariamente con un pHmetro digital (Hanna, pHep+) y corregido en el rango entre 7.5 y 8.0 por adición de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Se utilizó CO<sub>2</sub> puro comercial almacenado en cilindros a 60 kg/m<sup>3</sup> de presión. El CO<sub>2</sub> fue suministrado a un flujo de 1 litro/min.

### **2.7 Determinación de densidades celulares y tiempos de duplicación**

Las densidades celulares se determinaron a diario mediante conteo en hemocitómetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad, expresándolas como número de células por mililitro de cultivo. Estos datos fueron utilizados para la confección de curvas de crecimiento. Para la estimación de la productividad de un cultivo, se tomaron dos datos de dichos gráficos: los tiempos de duplicación (días transcurridos para una duplicación celular en la fase lineal) y el número máximo de células (densidad celular en la fase estacionaria de cada cultivo). De este último parámetro surgen dos valores: los promedios estacionales de las densidades celulares en fase estacionaria de todos los cultivos del período seleccionado (utilizado en la Tabla 3) y las densidades celulares máximas alcanzadas en una determinada estación (utilizadas en las Figuras 6 y 7).

### 2.8 Análisis estadísticos

Las pendientes de las curvas de crecimiento fueron determinadas mediante las respectivas ecuaciones de regresión lineal. Para los tiempos de duplicación y densidades celulares máximas se calcularon los valores promedios y las desviaciones estándar (SD). La distribución normal de los tiempos de duplicación y densidades celulares máximas fue determinada mediante el test de Kolmogorv-Smirnov. La igualdad de las varianzas fue analizada mediante el test de Levene. De acuerdo a este test, las muestras resultaron heterocedásticas. Por ende, para determinar si las diferencias entre valores mensuales y/o estacionales eran significativas, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo para las diferencias en las medias aritméticas. Para los análisis

estadísticos, se utilizaron Microsoft Excel® y Sofastat®.

## 3. Resultados

### 3.1 Calidad del agua de mar

Los cultivos se realizaron en agua marina natural tratada proveniente del sistema de refrigeración de una central termoeléctrica cercana (Figura 1B). Para evaluar la calidad del agua utilizada, se realizaron análisis microbiológicos, antes y después de la cloración. Los datos obtenidos demostraron que el tratamiento fue efectivo, ya que redujo 21 veces el número de bacterias aerobias mesófilas (Tabla 1). También se realizaron análisis de metales pesados. Los valores de este grupo de metales se encuentran muy por debajo de las concentraciones letales descriptas para microalgas (Tabla 2).

**Tabla 1.** Análisis bacteriológico del agua de mar utilizada en los cultivos

Ensayo	Antes de clorado	Después de clorado
Bacterias aerobias mesófilas	336 UFC/mL	16 UFC/mL
Coliformes totales	NMP 21/100	NMP 21/100 mL
Coliformes fecales	NMP < 3/100 mL	NMP < 3/100 mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia/100 mL	Ausencia/100 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia/100 mL	Ausencia/100 mL

UFC = Unidades Formadoras de Colonias

NMP = Número Más Probable

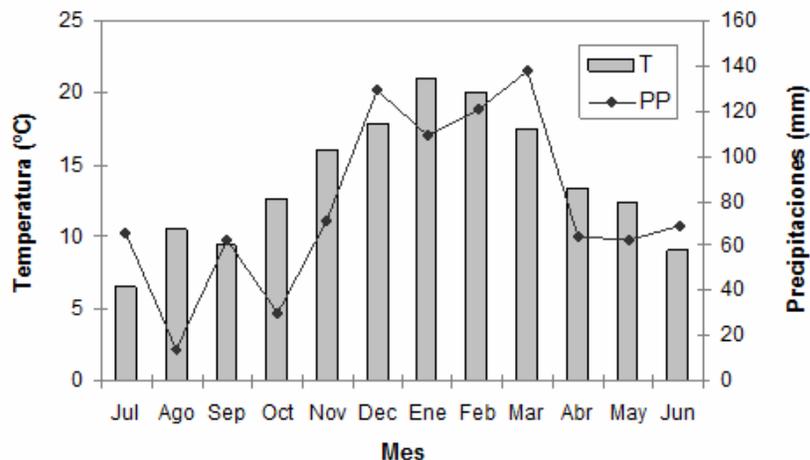
**Tabla 2.** Análisis de Cu, Zn, Cd, Pb, Ni, Cr y Hg del agua de mar utilizada para el cultivo de *N. oculata*.

Metal	Concentración (mg/L)
Cobre	< 0.02
Zinc	< 0.01
Plomo	< 0.10
Cadmio	< 0.01
Niquel	< 0.02
Cromo	< 0.1
Mercurio	< 0.001

### 3.2 Registros ambientales y de los cultivos: temperaturas

El clima de Mar del Plata responde al patrón oceánico, con veranos húmedos y moderados a cálidos e inviernos relativamente fríos, con algunos episodios de masas de aire polar provenientes de la Antártida. La Figura 2 muestra las temperaturas y precipitaciones medias mensuales registradas en la Estación Meteorológica Aeródromo de Mar del Plata entre julio 2009 a junio 2010. Durante dicho

período, se registraron temperaturas medias bastante frías (menores o iguales a 10 °C) durante el invierno (junio a septiembre), con medias entre los 10 y 15 °C en los meses de primavera temprana y otoño tardío (octubre, abril y mayo) y por encima de los 15 °C durante el resto de año. Las máximas precipitaciones se produjeron entre los meses de diciembre y marzo, en pleno verano, y coincidieron con los meses de temperaturas promedio más elevadas.



**Figura 2. Temperaturas y precipitaciones medias en la ciudad de Mar del Plata durante el período de estudio.** Se obtuvieron y graficaron las temperaturas (T) en °C y las precipitaciones (PP) en mm mensuales durante el período comprendido entre julio de 2009 y junio de 2010 a partir de los datos informados por la Estación Meteorológica Aeródromo Mar del Plata.

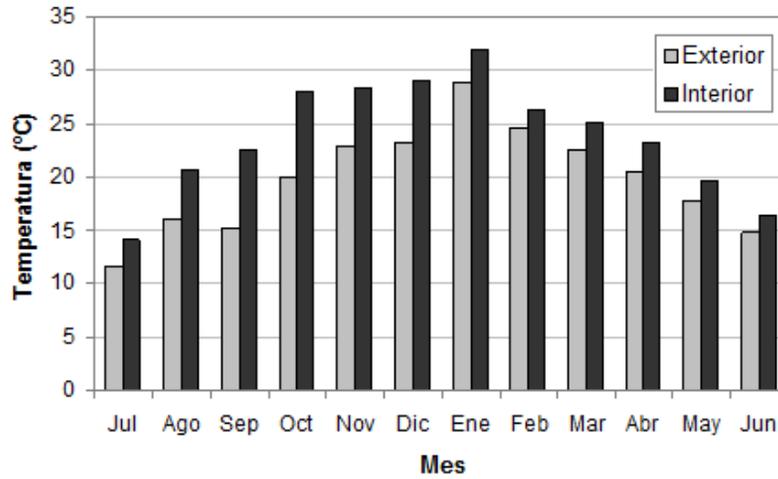
En la Figura 3 se muestran los registros de temperaturas máximas registradas en el exterior y en el interior del invernadero de la Estación de Cultivo de Microalgas. Las temperaturas máximas registradas en el invernadero (Interior) fueron superiores a aquellas del exterior en todas las estaciones del año. También se evidencia que las mayores diferencias de temperatura entre el exterior y el interior se produjeron en el invierno y la primavera. Durante el mes de enero, las temperaturas máximas exteriores fueron cercanas a los 30 °C, y este valor fue superado dentro del invernadero.

Las temperaturas de los cultivos en el exterior y bajo invernadero reflejaron, en general, los valores y tendencias de las

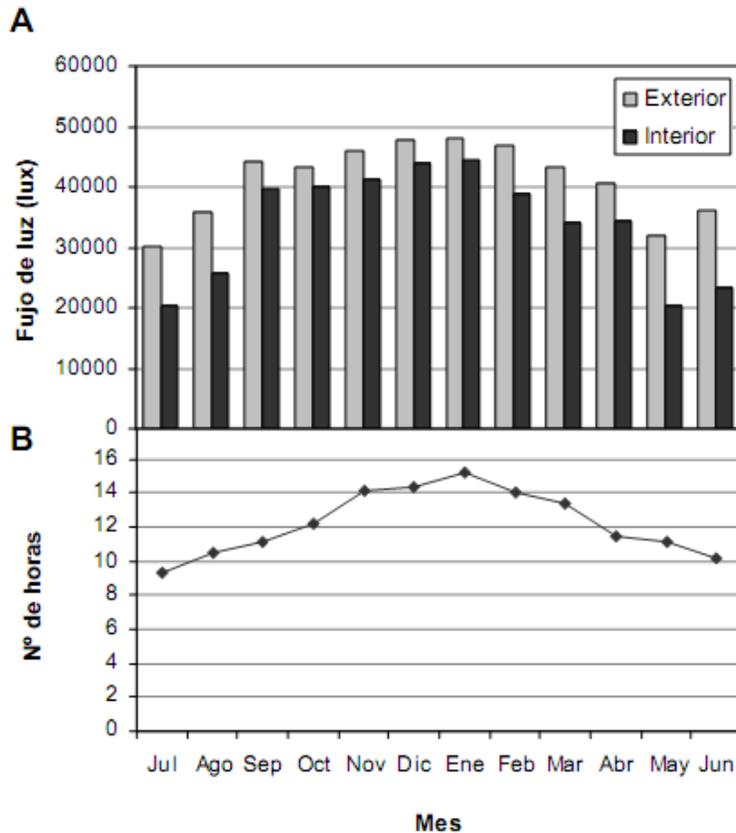
temperaturas ambientales (datos no mostrados).

### 3.3 Registros ambientales: luz solar

La luz presentó variaciones propias de la estacionalidad del período en estudio y del estado del clima. Para tratar de reflejar la complejidad de este parámetro de una manera sencilla, que permita analizar el efecto de la luz sobre la productividad de los cultivos y su interacción con otros parámetros (por ej. las temperaturas) se determinaron los siguientes valores: iluminancia o flujo luminoso (medida en lux) (Figura 4A), horas de luz (Figura 4B) y estado del clima (despejado, nublado, lluvioso) (Figura 5).



**Figura 3. Temperaturas máximas mensuales registradas en la Estación de Microalgas UTN Mar del Plata.** Se muestran las temperaturas máximas mensuales en °C en el exterior (barras gris claro) y bajo invernadero (Interior, barras gris oscuro) durante el período en estudio.



**Figura 4. Análisis de la cantidad de luz solar en la Estación de Microalgas UTN Mar del Plata durante el período en estudio.**

(A) Flujos de luz (iluminancias, en lux) mensuales promedio en el área de los tanques exteriores (Exterior) y en el centro del invernadero (Interior) al mediodía (12 pm). Aquellos valores diarios mayores a 50,000 lux fueron computados como 50,000 para los cálculos de los promedios (ver Materiales y Métodos).

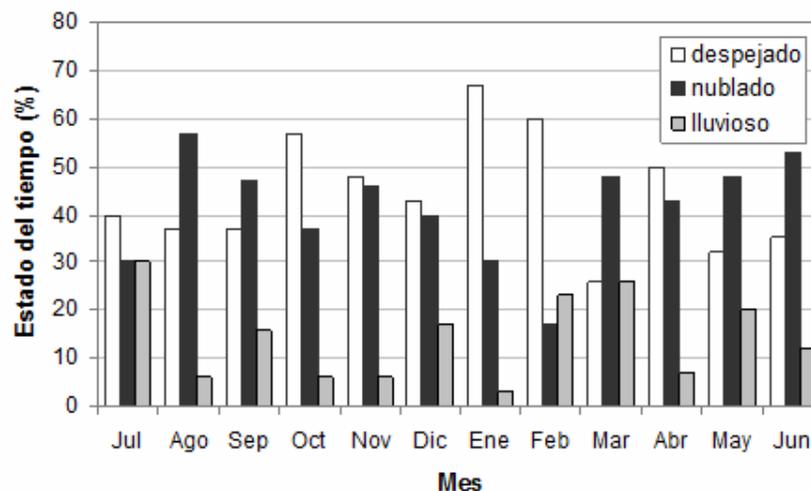
(B) Número de horas de luz promedio mensuales durante el período de estudio en la ciudad de Mar del Plata. Para los cálculos de los promedios, se utilizaron los valores de horas de luz diarios desde la salida hasta la puesta del sol, registrados en la Estación Meteorológica Aeródromo Mar del Plata.

Para la iluminancia, se muestran los valores obtenidos cercanos al mediodía, ya que se espera que a esta hora se produzcan los valores diarios máximos. La Figura 4A muestra las iluminancias mensuales promedio en el interior y el exterior del invernadero. Como era de esperar, los valores obtenidos en el exterior resultaron superiores a los obtenidos en el interior del invernadero en todas las estaciones del año. Las mayores diferencias se observaron en el invierno, sugiriendo que los rayos solares fueron más eficientemente filtrados por la cubierta del invernadero en esta estación.

De enero a marzo, los valores de iluminancia en el interior del invernadero resultaron menores al los del exterior (Figura 5) principalmente debido a la presencia de una mediasombra que se colocó en la cubierta ya que, en su ausencia, los valores de iluminancia eran prácticamente los mismos afuera y adentro (datos no mostrados). Los datos de los promedios mensuales de horas

de luz (Figura 4B) reflejan las características de la región bajo estudio. El mes con mayor número de horas de luz promedio fue enero, coincidente con el hecho de que el 21 de diciembre es el día más largo del año. Por el contrario, el mes con menor número de horas de luz fue julio, siendo el 21 de junio el día más corto del año.

El estado del clima, si bien presenta un rango de variaciones muy complejo, fue arbitrariamente dividido para su simplicidad en: despejado, nublado y lluvioso. Este parámetro también muestra una estacionalidad, reflejada por ejemplo en el hecho de que enero y febrero presentaron el mayor porcentaje de días despejados, mientras que la mayor proporción de días nublados o lluviosos se dieron en invierno (Figura 5). Sin embargo, muchos de los días analizados escaparon a dicha estacionalidad y presentaron características más individuales y acotadas en el tiempo (datos no mostrados).



**Figura 5. Estado general del tiempo en la Estación de Microalgas de la UTN Mar del Plata durante el período de estudio.** El estado del tiempo fue registrado y clasificado en tres amplias categorías: despejado (incluye días con bajo porcentaje de nubosidad), nublado (días de alta nubosidad) y lluvioso (días con cielo encapotado, con llovizna o lluvia). A cada día le fue computada una de las tres categorías dependiendo del estado del clima durante la mayor parte del mismo. El estado del clima mensual es reflejado en el gráfico en porcentajes de días despejados, nublados y lluviosos.

### 3.4 Registros de los cultivos: salinidad

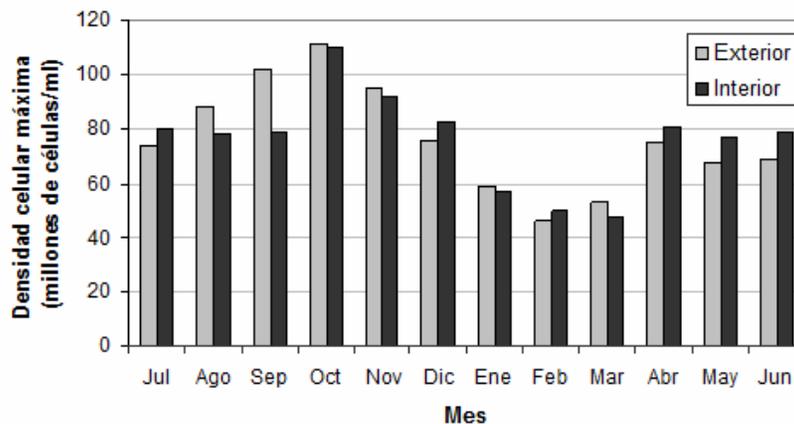
La salinidad del agua de mar utilizada para los cultivos se encontró en el rango de 33-34 ‰ y fue corregida cada tres días dentro de los valores óptimos de *N. oculata*, entre 28-30 ‰. Las mayores fluctuaciones de salinidad de los cultivos se produjeron en la estación estival debido a la evaporación. Lluvias copiosas de larga duración ocasionaron la pérdida de algunos cultivos exteriores, en los cuales se registraron valores de salinidad tan bajos como 11 ‰. En el interior del invernadero, los tanques de 200 litros de cultivo utilizados como inóculo fueron los que estuvieron sujetos a los mayores aumentos de salinidad debido a su menor volumen (datos no mostrados).

### 3.5 Registros de los cultivos: densidad celular en el exterior y bajo invernadero

El sistema semi-continuo de *N. oculata* produjo en general densidades celulares

máximas compatibles con la producción masiva, en las cuatro estaciones del año. Las excepciones ocurrieron en cultivos contaminados o al cabo de lluvias copiosas, en cuyos casos los cultivos fueron eliminados e iniciados nuevamente. Para descartar posibles efectos del diseño y tamaño de los tanques sobre el crecimiento, las comparaciones entre tanques en el exterior y el interior fueron hechas sólo para los tanques rectangulares (raceway), con una capacidad de 2,500 litros y un promedio de 1,500 litros de cultivo.

Con el objeto de determinar las densidades celulares máximas de cada estación, se realizaron comparaciones mensuales. Las densidades celulares máximas del invierno, la primavera y el otoño fueron superiores a los 70 millones de células/mL, tanto en el interior como en el exterior (Figura 6).



**Figura 6. Densidades celulares máximas mensuales alcanzadas en el exterior y bajo invernadero en la Estación de Microalgas de la UTN Mar del Plata.** Con los datos de densidad celular diaria de los cultivos de *N. oculata*, se determinaron las densidades celulares máximas alcanzadas en cada mes del período en estudio. Los valores, en millones de células por mililitro de cultivo, correspondientes a tanques ubicados en la zona exterior (Exterior) fueron comparados con aquellos provenientes de tanques bajo invernadero (Interior).

Durante los meses de enero, febrero y marzo (verano) se registraron los valores más bajos, tanto en el exterior como en el invernadero, entre 46 y 60 millones de células/mL. Durante los meses de abril, mayo y junio

(otoño) y julio (inicio del invierno) los valores más altos fueron cercanos a los 80 millones de células/mL en cultivos bajo invernadero, y de 70 millones/mL en cultivos en el exterior. Por el contrario,

durante el resto del invierno (meses de agosto y septiembre), las mayores densidades celulares se observaron en tanques en el exterior, llegando a valores de 100 millones de células/mL. Durante la primavera, las densidades celulares máximas fueron similares entre tanques interiores y exteriores, llegando al máximo en el mes de octubre (Figura 6), con 115 millones de células/mL.

También se compararon los valores promedio estacionales de tiempos de duplicación y de densidades celulares finales (en fase estacionaria) para tanques ubicados bajo invernadero. Los resultados, volcados en la Tabla 3, mostraron que durante el verano, no sólo se llegó a densidades finales promedio menores que en el resto de las estaciones (53 millones de células/mL), sino

que la velocidad de duplicación promedio fue considerablemente menor (6 días por duplicación celular). La primavera fue la estación que dio los mejores resultados: el tiempo de duplicación promedio fue de 3 días, y la densidad celular final promedio fue de 93 millones de células/mL. Por otra parte, durante el invierno y el otoño, los tiempos de duplicación fueron similares (3,5 y 3,9 días, respectivamente) y las densidades celulares finales promedio de 75 y 66 millones de células/mL, respectivamente). Si bien las densidades celulares máximas obtenidas bajo invernadero fueron similares entre el otoño y el invierno (Figura 6, 80 millones de células/mL), los promedios fueron diferentes (Tabla 3, 66 y 75 millones de células/mL) debido a que, en otoño, hubo más tanques con densidades finales menores.

**Tabla 3.** Tiempos de duplicación y densidades finales estacionales de cultivos de *N. oculata* bajo invernadero

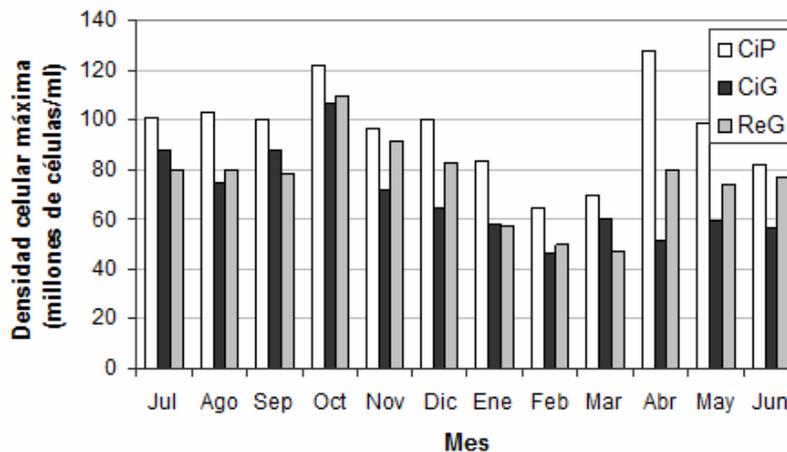
Estación	Tiempo de duplicación (días)	Densidad final (millones de células/mL)
Invierno	3.5 ± 0.7	75 ± 7.5*
Primavera	3 ± 0.4	93 ± 12*
Verano	6 ± 0.2*	53 ± 4*
Otoño	3.9 ± 0.6	66 ± 9*

Los valores corresponden a los promedios ± las desviaciones estándar (SD) de al menos tres cultivos ( $n \geq 3$ ). Los asteriscos corresponden a aquellas muestras que resultaron ser significativamente diferentes del resto de acuerdo al test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

### 3.6 Registros de los cultivos: densidad celular vs. forma de tanques

Con el objeto de analizar posibles efectos del tamaño y la forma de los tanques sobre las densidades celulares, los cultivos de *N. oculata* fueron llevados a cabo en tres tipos de tanques diferentes: circulares pequeños, con un volumen promedio de 200 litros,

circulares grandes, con un volumen promedio de 1,500 litros y rectangulares grandes (en forma de “raceway”), con un volumen promedio de 1,500 litros. Los resultados de la comparación del crecimiento bajo invernadero en los distintos recipientes se observan en la Figura 7.



**Figura 7. Densidades celulares máximas mensuales en tanques de distinto diseño y tamaño bajo invernadero en la Estación de Microalgas de la UTN Mar del Plata.** Los cultivos de *N. oculata* bajo invernadero fueron realizados en tanques circulares pequeños con 200 litros de medio (CiP), en tanques circulares grandes con 1,500 litros de medio (CiG) y en tanques rectangulares (raceway) con 1,500 litros de medio (ReG). Con los datos diarios de densidad celular se determinaron las densidades celulares máximas alcanzadas en cada mes del período en estudio, expresados en millones de células por mililitro de cultivo.

En general, los cultivos realizados en tanques rectangulares (ReG) alcanzaron densidades celulares máximas iguales o mayores que en los circulares de similar tamaño (CiG) en las cuatro estaciones del año. Los tanques circulares de 200 litros de cultivo (CiP) fueron utilizados como inóculo y produjeron densidades celulares mayores en relación a recipientes de mayor volumen de igual o distinta forma en todo el período de estudio (Figura 7). Los tiempos de duplicación siguieron un patrón similar a las densidades celulares máximas, siendo menores en tanques pequeños respecto de grandes y en tanques rectangulares con respecto a los circulares de igual capacidad (datos no mostrados).

#### 4. Discusión

Los resultados de los análisis microbiológicos mostraron que la cloración fue eficaz para reducir considerablemente la carga de microorganismos. Esto es importante ya que, si bien los cultivos no son axénicos, es conveniente limitar el crecimiento de otros organismos que podrían

competir con las microalgas. Salvo contadas excepciones, no se registraron problemas de contaminación con predadores y con otras microalgas.

A concentraciones bajas, muchos metales juegan un papel esencial en el metabolismo de las microalgas, tal es el caso de los metales Zn y Cu (Tadros *et al.*, 1990). Sin embargo, cuando las concentraciones son altas, dan origen a condiciones de toxicidad (Visviki & Rachlin, 1994a & 1994b; Romero, 1999). En experiencias con *Tetraselmis chuii* se determinó que concentraciones superiores a 0,1 mg/L de plomo y mercurio produjeron una disminución del crecimiento apreciable. A su vez, el nivel de toxicidad de los metales siguió el orden Pb > Hg > Cd > Cu, siendo la concentración letal 50 (CL50) del Pb (0.4 mg/L) casi 3 veces menor que la del Hg (1.1 mg/L) y más de 13 veces menor que la del Cd (5.4 mg/L) y el Cu (6.4 mg/L) (Cordero *et al.*, 2005). Los resultados de los análisis de metales realizados en el agua marina utilizada en este trabajo muestra que la concentración de los mismos se encontró para todos ellos bien por debajo de sus CL50

y aún por debajo del límite de toxicidad descrito para el Pb y el Hg (0.1 mg/L).

Las condiciones naturales de luz y temperatura permitieron cultivar *N. oculata* durante todo el año tanto en el exterior como bajo invernadero y se obtuvieron, en general, productividades adecuadas para procesos industriales y acordes a la ausencia de suministro constante de CO<sub>2</sub>. Rodolfi et al. (2009) determinaron que tres especies del género *Nannochloropsis* presentaron las mejores productividades de biomasa y lípidos de entre varias cepas pertenecientes a diversos géneros de microalgas de agua dulce y marina, en condiciones exteriores en Italia. Dichos autores mencionaron que, parte de los buenos resultados en experiencias con miembros de este género, se debe a su tolerancia y capacidad de crecer por largos períodos de tiempo en cultivos exteriores.

Si bien la mayoría de los estudios recientes con esta microalga fueron realizados en condiciones controladas de laboratorio, las densidades celulares y tiempos de duplicación obtenidos en este trabajo se encuentran en el rango observado por otros investigadores (Chiu et al., 2009; Ferreira et al., 2009; Das et al., 2011; Koberg et al., 2011; Sayegh et al., 2011; Simionato et al., 2011). En uno de los reportes recientes, cultivos semi-continuos controlados de *N. gaditana* (luz elevada y 21°C, con medio de cultivo enriquecido con vitaminas) se obtuvieron densidades máximas que rondan los 100 millones de células por mL de cultivo, y sólo se obtuvieron densidades cercanas a los 200 millones cuando se cosechaba y reemplazaba el 10-20% del medio de cultivo a diario (Ferreira et al., 2009). En otro trabajo, se estudió el efecto de la aclimatación de *Nannochloropsis* sp. a diferentes regímenes de luz sobre la biomasa y la acumulación de lípidos, en condiciones controladas. Las curvas de crecimiento obtenidas mostraron que, en condiciones

lumínicas óptimas, las células se duplicaron cada 3-4 días y se alcanzaron densidades celulares máximas de alrededor de 35 millones de células por mililitro en aproximadamente 15 días (Simionato et al., 2011).

Los menores valores de densidad celular máxima y las menores tasas de crecimiento fueron obtenidos en verano. Se ha demostrado que las altas temperaturas y los pHs elevados, combinados con la alta irradiancia, constituyen los principales factores de estrés que disminuyen la capacidad fotosintética y, por ende, el crecimiento de *Nannochloropsis* sp. (Rocha et al., 2003; Sukenik et al. 2009; Sandnes et al., 2010). En este trabajo, los pHs fueron controlados diariamente. Por otra parte, si bien las irradiancias en días soleados fueron elevadas, no se espera que tengan un efecto muy marcado en sistemas semi-continuos, donde los cultivos son relativamente densos aún en su inicio (alrededor de 20 millones de células/mL). Debido a esto, se puede sugerir que el principal factor que afectó negativamente al crecimiento de *N. oculata* en la estación estival fueron las altas temperaturas.

Uno de los objetivos de este trabajo consistió en comparar cultivos en el exterior y bajo invernadero y determinar si la presencia de dicha estructura poseía alguna ventaja importante. La determinación de las temperaturas interiores y exteriores mostró que el invernadero produjo un aumento de la temperatura con respecto al exterior. Las diferencias más significativas se dieron entre los meses de agosto y diciembre (Figura 3). Un análisis de los datos de estado del clima, iluminancia y horas de luz mostró que el “calentamiento” del invernadero dependió principalmente de factores estacionales. Por ejemplo, si se comparan las diferencias de temperatura afuera-adentro entre los meses de septiembre y junio, cuyas temperaturas ambientales son similares (15 °C), se

evidencia que en el mes de septiembre la temperatura interna fue en promedio 6 °C mayor que en junio (Figura 3, 23 °C versus 16 °C, respectivamente). Al analizar los factores anteriormente mencionados, se evidenció que septiembre tuvo, en promedio, una hora más de luz al día y apenas un porcentaje mayor de días soleados. En este caso, los datos de iluminancia mostraron que la iluminancia exterior promedio fue menor en junio que en septiembre y que el invernadero actuó como filtro de los rayos solares más eficientemente durante el mes de transición otoño-invernal. Esto no es de sorprender, ya que en invierno los rayos solares inciden con un ángulo menor y poseen, por ende, menor energía (Pidwirny, 2006). Cabe destacar que la determinación de iluminancia difiere de la de irradiancia: la primera expresa la intensidad lumínica sin tener en cuenta la energía de la luz; la irradiancia, por el contrario, toma en consideración la longitud de onda y, por ende, la energía de los rayos. En este trabajo no se determinaron valores de irradiancia. Sin embargo, los valores aproximados de irradiancia de la ciudad son conocidos y responden a patrones típicos de la latitud (Schatten, 1993).

Varios factores hacen que el estado del clima sea demasiado complejo como para poder ser englobado en categorías amplias. El estado “soleado” no contempla las iluminancias e irradiancias de cada estación. El estado “nublado” incluye días con nubosidad muy variada; a su vez este porcentaje se va modificando a lo largo del día. Algo similar ocurre con los días catalogados como “lluviosos”, ya que la duración de las lluvias es muy variable y la iluminancia también varía considerablemente entre diferentes días. El estado del clima es útil principalmente para establecer comparaciones puntuales entre días comprendidos en una misma estación, pero

no para establecer comparaciones inter-estacionales.

El invernadero también produjo su efecto sobre las densidades celulares estacionales, tanto máximas como promedio y sobre los tiempos de duplicación. Si bien bajo invernadero se obtuvieron densidades máximas muy similares en invierno y otoño (alrededor de 80 millones de células/mL), en otoño hubo un mayor número de tanques con densidades finales menores, lo que originó para esta estación densidades finales promedio menores que en invierno (66 y 75 millones de células/mL, respectivamente). Además, en invierno se obtuvieron densidades mayores en el exterior, mientras que en otoño, los mejores resultados se obtuvieron bajo cubierta. Este fenómeno puede estar basado en el hecho de que en invierno las iluminancias fueron menores y más fácilmente filtrables por la cubierta del invernadero (Figura 4; 3,1600 lux de promedio en el exterior y 21,000 adentro). Esto puede haber producido en el interior intensidades lumínicas sub-óptimas para el crecimiento celular. Por el contrario, la iluminancia promedio bajo invernadero en otoño (Figura 4, 34000 lux) llegó a valores cercanos al promedio exterior en invierno, no siendo quizás tan limitante para el crecimiento. De manera similar, Rodolfi *et al.* (2009) observaron que la productividad de biomasa de *Nannochloropsis* sp. en fotobiorreactores tubulares en condiciones exteriores naturales de Livorno, Italia, disminuía marcadamente en días de muy baja irradiancia (menores a 10 MJ m<sup>2</sup> día<sup>-1</sup>). Por otra parte, la importante filtración de los rayos de luz en días invernales encapotados es un fenómeno conocido por todos aquellos que cultivan especies fotosintéticas bajo invernadero (Badgery-Parker, 1999).

Intuitivamente, se tendería a pensar que las densidades máximas en el exterior deberían haber sido mayores en otoño que en invierno, debido a que las temperaturas

fueron más templadas en la primera estación y los flujos de luz en el exterior fueron similares para ambas estaciones. Sin embargo, en este trabajo se observó durante el período de estudio que las densidades celulares en el exterior fueron significativamente más elevadas en el invierno. Nuestra experiencia nos sugiere que las células no alcanzaron su pleno potencial en los cultivos de otoño, debido a que fueron iniciados con células que venían de una adaptación previa a las condiciones estresantes de temperatura de la temporada estival.

El diseño de tanques que arrojó mejores resultados fue el de tipo raceway. Los valores de densidad celular máxima y de velocidad de duplicación en estos tanques en el invernadero fueron similares o mayores que en los tanques circulares. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores: los piletones de tipo “raceway” poseen un diseño optimizado en lo que se refiere a circulación del cultivo, lo que permite una mejor aireación y mezcla que minimiza la sedimentación y optimiza el aporte de nutrientes y la eliminación de toxinas (Oswald, 1988; Koberg et al., 2011). Los tanques circulares pequeños también presentaron mayores productividades que los tanques más grandes con el mismo diseño. Esto es en parte debido a que, a igual aireación, ésta resultó más efectiva en tanques de menor volumen y menor área superficial. Al llevar al cultivo a una escala piloto, será fundamental utilizar cantidades de aire óptimas, dadas por el tipo de aireación y el número de estaciones de aireación por metro lineal. Otro factor que puede explicar la mayor productividad de tanques pequeños es que, debido a su menor volumen, las células reciben en promedio más luz de los lados que en los tanques grandes. Esto podría ser compensado disminuyendo la altura de la columna de líquido en tanques grandes.

La administración continua de CO<sub>2</sub> puro genera altos costos que afectan la viabilidad económica del proceso. En una segunda etapa, se evaluarán formas de administración que garanticen productividades óptimas y se experimentarán con fuentes residuales de CO<sub>2</sub>. Se planea también continuar con el uso de barros cloacales (Pérsico et al., 2010). Por último, un enfoque a futuro se centrará en la optimización de los procesos de cosecha, ruptura celular y extracción de aceites.

## 5. Conclusiones

La evaluación del sistema de cultivo masivo de *N. oculata* en la UTN Mar del Plata permitió establecer un proceso básico adecuado para la zona templada oceánica del sur de la provincia de Buenos Aires, con densidades celulares máximas aptas para procesos productivos. Sobre esta rutina básica se procederá a la optimización de las distintas etapas que componen el proceso global. El diseño de tanques que dio mejores resultados fue el rectangular. Las tasas de crecimiento resultaron acordes a la falta de suministro continuo de CO<sub>2</sub> y éste será uno de los aspectos sobre los cuales se focalizará la siguiente etapa.

La estación más desfavorable fue el verano. Una opción para subsanar el problema de las altas temperaturas a escala productiva podría ser el uso de fuentes sustentables de refrigeración, como la recirculación de agua. Los mejores resultados se obtuvieron en meses de alto flujo de luz y temperaturas templadas a frescas, como la primavera. Sin embargo, la adaptación previa de los cultivos a condiciones estresantes, como las altas temperaturas del verano, puede afectar el comportamiento de los cultivos en estaciones propicias, como ocurrió en el otoño.

El invernadero resultó útil en la protección de los cultivos de la lluvia, el polvo y el frío extremo. Sin embargo, en invierno esta

estructura ocasionó una filtración parcial de los rayos solares que produjo una disminución de las densidades celulares. Una alternativa consiste en el recambio más frecuente de la cubierta o el uso de cubiertas corredizas que se puedan quitar dependiendo de las condiciones.

## Reconocimientos

Los autores agradecen el apoyo brindado por la Directora de la UTN Mar del Plata, Lic. Juana Bau para el desarrollo de este proyecto y al Laboratorio de Servicios de la misma institución por los análisis químicos y microbiológicos. Este trabajo ha sido llevado a cabo gracias a un subsidio a Proyectos de Investigación y Desarrollo de la Universidad Tecnológica Nacional (PID-UTN1007).

## Referencias

- American Water Works Association, American Public Health Association & Water Environment Federation. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (Eds.) 20th Edition. American Publisher Health Association, Washington. 1325p.
- Badgery-Parker, J. 1999. Light in the greenhouse. James G (Ed.). *In: NSW Agriculture Agnote* ISSN 1034-6848. PL(IH)92. Agdex 200/13, Gosford, Australia.
- Beckmann, J., Lehr, F., Fináís, G., Hankamer, B., Posten, C., Wobbe, L., Kruse, O. 2009. Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotech* 142: 70–77.
- Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol* 26(3): 126-131.
- Chiu, S-Y., Kao, C-Y., Tsai, M-T., Ong, S-C., Chen, C-H., Lin, C-S. 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresour Technol* 100: 833-838.
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., y C. Lodeiros. 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Rev Biol Trop* 53: 3-4.
- Das, P., Lei, W., Aziz, S.S., Obrad, J.P. 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour Technol* 102: 3883-3887.
- Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J., Otero, A. 2009. Enriching rotifers with “premium” microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Mar Biotechnol* 11: 585–595.
- Hu, H., Gao, K. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnol Lett* 28(13): 987-992.
- Koberg, M., Cohen, M., Ben-Amotz, A., Gedanken, A. 2011. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresour Technol* 102: 4265-4269.
- Liu, B., Zhao, Z. 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem Technol Biotechnol* 82: 775-780.
- Loera-Quezada, M., Olguín, E.J. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 1(1): 91-116.
- López, A., Muller, M., Bocanfusso, J.J. 2007. Producción masiva de la microalga *Nannochloropsis oculata* en tanques exteriores. *Informe Técnico N° 3*. Instituto

- Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, Argentina.
- Oswald, W.J. 1988. Large-scale algal culture systems (engineering aspects). *In*: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L. J. (Eds). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. pp. 357-394.
- Pérsico, M.M., Beligni, M.V., Bambill, G., Lucero, N.M., Saubidet, A.A. 2010. Barros cloacales como fuente de nutrientes para el cultivo masivo de *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd. *In*: Sandoval Fabián, G.C., Olguín Palácios, E.J., Sánchez Galván, G. II Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (SOLABIAA), México. pp. 272-275.
- Pidwirny, M. 2006. Earth-Sun Relationships and Insolation. *In*: Encyclopedia of Earth. Cleveland, C.J. (Ed). Washington DC, USA.
- Posten, C., Schaub, G. 2009. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels – a process view. *J Biotechnol* 142: 64-69.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, M.C. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot Cell* 9(4): 486-501.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S., Rengasamy, R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit Rev Microbiol* 34(2): 77-88.
- Richmond, A., Qiang, H. 1997. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol* 63-65: 649-658.
- Rocha, J.M.S., García, J.E.C., Henriques, M.H.F. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol Eng* 20: 237-242.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102: 100-112.
- Romero, Y. 1999. Efecto del cadmio sobre las microalgas *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. Tesis de Licenciatura. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 92p.
- Sandnes, J.M., Källqvist, J.M.T., Wenner, D., Gislerød, H.R. 2010. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *J Appl Phycol* 17(6): 515-525.
- Sayegh, F.A., Montagnes, D.J. 2011. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresour Technol* 102: 3007-3013.
- Schatten, K.H. Heliographic latitude dependence of the Sun's irradiance. 1993. *J Geophys Res* 98, (A11) 18,907-18,910.
- Servicio Meteorológico Nacional, República Argentina. Datos de la Estación Aeródromo Mar del Plata. 2010. <http://www.smn.gov.ar>.
- Simionato, D., Sforza, E., Corteggiani Carpinelli, E., Bertucco, A., Giacometti, G.M., Morosinotto, T. 2011. Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresour Technol* 102: 6026–6032.
- Sukenik A., Beardall J., Kromkamp, J.C., Kopeck, J., Masojídek, J., Stef van Bergeijk, S., Gabai, S., Shaham, E., Yamshon, A. 2009. Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions. *Aquat Microb Ecol* 56: 297-308.

- Tadros, M.G., Mbuthia, P., Smith, W. 1990. Differential response of marine diatoms to trace metals. *Bull Environ Contam Toxicol* 44(6): 826-31.
- Visviki I., Rachlin, J.W. 1994a. Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects of ultrastructure. *Arch Environ Contam Toxicol*. 26(2): 154-62.
- Visviki I., Rachlin, J.W. 1994b. Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects of growth. *Arch Environ Contam Toxicol*. 26(2): 149-53.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., Ruan, R.R. 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp.* *Bioresour Technol* 101(8): 2623-2628.