

The Biologist (Lima), 2017, 15(2), jul-dec: 387-395.



The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

INFLUENCE OF PHOTOPERIOD ON *TETRASELMIS STRIATA* (*CHLORODENDRACEAE*) IN BENTHIC CULTIVATION SYSTEM

INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE *TETRASELMIS STRIATA* (*CHLORODENDRACEAE*) EN SISTEMA DE CULTIVO BENTÓNICO

Sheyla Zevallos Feria¹

¹Laboratorio de Investigación Acuícola del Instituto del Mar del Perú Sede Ilo, Jr. Mirave 101 Ilo, Moquegua 18601, Perú

Autor para correspondencia: szevallos@imarpe.gob.pe

ABSTRACT

Microalgae form the basis of the food chain and are widely used for their nutritional properties in aquaculture and their biological activity in various industries. Increasing their productivity through controlled cropping systems represents a challenge that requires innovation in production systems. In this study we studied the influence of the photoperiod on the growth of *Tetraselmis striata* (Butcher, 1959) adapted to a benthic culture system. For this purpose, the crop was developed in the Laboratory of Aquaculture Research of the Institute of the Sea of Peru, where three tests were carried out; the first consisted in comparing the cellular density in fresh and marine water in response to two nutrient media: i) foliar nutrient Byfolan and ii) F/2 Guillard; In the second test development was assessed in relation to i) the water column (traditional system) and ii) in polycarbonate substrate (benthic system); and in the third test different photoperiods were applied: i) 12:12, ii) 16: 8, iii) 18: 6 and iv) 24: 0 hours light-dark. The results showed that the highest densities were reached in polycarbonate substrate submerged in seawater using F/2 Guillard, with a concentration of 1×10^6 cel·mL⁻¹. Measurements of the specific growth rates in response to light exposure at 24, 16, 12 and 8 light h, revealed that the highest specific growth rates were obtained at 24 h exposure to light with a value of 0,44 día⁻¹, followed by 16 h of exposure with a rate of 0,42 día⁻¹, 12 h and 8 h, both treatments with values of 0,17 días⁻¹; agreeing with the average speed of cellular duplication, that at 24 h of exposure to light it is possible to reach duplication rates of 1,56 h; followed by exposure to light for 16 h at 1,65 h, at 12 h of exposure to light a doubling rate of 3,97 h and 4,11 h was obtained when exposed to 8 h of light. We suggest that it is preferable to maintain the development of the *T. striata* biofilm in a polycarbonate substrate submerged in sterile sea water with F/2 Guillard with constant light, representing an alternative to amplify its population under controlled conditions. The product could potentially have applications in several sectors of the aquaculture, food, energy, pharmaceutical, health and environmental industries.

Keywords: Photoperiod – biofilm – benthic cultivation system

RESUMEN

Las microalgas constituyen la base de la cadena trófica y son ampliamente usadas por sus propiedades nutricionales en acuicultura y su actividad biológica en diversas industrias. El incremento de su productividad mediante sistemas de cultivo controlado representan un desafío que implica innovar los empleados clásicamente; por lo que se determinó la influencia del fotoperíodo en el crecimiento de *Tetraselmis striata* (Butcher, 1959) adaptada a un sistema de cultivo bentónico. Para tal efecto, el cultivo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación Acuícola del Instituto del Mar del Perú sede Ilo, Perú, donde se efectuaron tres ensayos; el primero consistió en comparar la densidad celular en agua dulce y marina en relación a dos medios nutritivos: i) nutriente foliar Byfolan y ii) F/2 Guillard; en el segundo ensayo se determinó el desarrollo en i) columna de agua (sistema tradicional) y ii) en sustrato de policarbonato (sistema bentónico); y en el tercer ensayo se aplicaron diferentes fotoperíodos: i) 12:12, ii) 16:8, iii) 18:6 y iv) 24:0 horas de luz - oscuridad. Los resultados mostraron que las mayores densidades se alcanzaron en sustrato de policarbonato sumergido en agua de mar utilizando F/2 Guillard, con una concentración de 1×10^6 cel·mL⁻¹. La estimación de la tasa de crecimiento específico evaluada por el efecto de la exposición lumínica sobre el cultivo de *T. striata* a 24, 16, 12 y 8 h de luz, reveló que las mayores tasas específicas de crecimiento se obtuvieron a las 24 h de exposición a la luz con un valor de 0,44 día⁻¹, seguido de 16 h de exposición con una tasa de 0,42 día⁻¹, 12 h y 8 h ambos tratamientos con valores de 0,17 días⁻¹; concordando con la velocidad media de duplicación celular, que a las 24 h de exposición a la luz es posible alcanzar velocidades de duplicación de 1,56 h; seguido de la exposición a la luz por 16 h con 1,65 h, a las 12 h de exposición a la luz se obtuvo una velocidad de duplicación de 3,97 h y 4,11 h cuando se expuso a 8 h de luz. Sugiriendo que es preferible mantener el desarrollo de la biopelícula de *T. striata* en un sustrato de policarbonato sumergido en agua de mar estéril con F/2 Guillard y luz constante, representando una alternativa para masificar su cultivo en condiciones controladas y posteriores aplicaciones en diversos sectores de la industria acuícola, alimentaria, energética, farmacéutica, sanitaria y medioambiental.

Palabras clave: fotoperíodo – biopelícula – sistema de cultivo bentónico

INTRODUCCIÓN

La comunidad del plancton (del griego plangkτός, errante) está constituida por el conjunto de organismos de pequeño tamaño que viven suspendidos en la columna de agua y a merced de sus corrientes; con movimientos locales y limitados dentro de la masa de agua, incapaces de migrar activamente en contra de mareas y corrientes; comprenden decenas de miles de especies como parte del fitoplancton, microorganismos eucariotas autótrofos que contienen clorofilas y realizan fotosíntesis (Fidalgo, 1995). Las microalgas son organismos fotoautótrofos, ya que obtienen la luz del sol y se desarrollan a partir de la materia orgánica (Malgas, 2013); siendo el alimento natural de diversos organismos filtradores y la base esencial de la cadena trófica acuática (Benemann, 1992). Las microalgas, son un grupo heterogéneo de plantas

que poseen una amplia diversidad de tamaños, pigmentación, bajo nivel de especialización celular; típicamente acuáticas y viven fijas a un sustrato o flotando libremente en el plancton (Uribe, 1992); soportan la producción de la pesquería de recursos renovables de 100 x 10⁶ t por año (Muller, 2000).

El aumento de la producción acuícola y la necesidad de cultivo de nuevas especies implican la producción masiva de microalgas, que son un complemento imprescindible para el desarrollo de la acuicultura (Leon *et al.*, 2003); tal como lo manifestó Borowitzka (1997) y posteriormente Chisti (2007), quienes revelaron que las microalgas constituyen una fuente de alimentación importante en la crianza comercial de animales acuáticos, especialmente en larvas y juveniles de moluscos bivalvos, rotíferos usados para alimentar larvas de crustáceos y peces marinos; ya que la nutrición de las larvas y juveniles depende del contenido y

naturaleza de los constituyentes bioquímicos de las algas (Álvarez, 1994). Por su parte, Alvarez & Gallardo (1989) y Pradilla & Salcedo (2010) consideran que las microalgas tienen un amplio espectro de aplicación, desde alimentación en acuicultura hasta su uso en biotecnología; la misma que consta de dos fases: producción controlada de la biomasa algal y aprovechamiento de dicha biomasa. Las tendencias recientes en investigación de fármacos de fuentes naturales han demostrado que las algas son organismos que prometen proveer bioquímicamente compuestos activos en las ciencias de nutrición, industria farmacéutica y la salud pública, con énfasis en ácidos grasos, esteroides, carotenoides, polisacáridos, lecitinas, micosporina, aminoácidos, compuestos halogenados y toxinas (Cardozo *et al.*, 2007).

El cultivo de microalgas se puede llevar a cabo mediante diversos modos de operación: discontinuo o batch, semicontinuo o fed-batch y continuo; demostrando que la operación en continuo es una opción viable para el cultivo de microalgas, ya que de este modo se alcanzan mayores productividades, se facilita una elevada homogeneidad del producto y una mayor regularidad de la producción (Ulloa, 2011).

Los parámetros relevantes que deben considerarse en un criadero están relacionados a la ubicación cercana del plantel a la zona marina con agua de calidad disponible, la temperatura del agua de mar, el contenido de oxígeno, los rangos de salinidad (Surier *et al.*, 2010). La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalgas, quienes necesitan en promedio 2500 lux (Gonzales *et al.*, 2014), representa la fuente de energía para la fotosíntesis y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (Humphrey, 1979). En los cultivos autotróficos se suministra la luz necesaria para la fotosíntesis a través de dos fuentes: lámparas de luz o luz solar. Cuando se requiere una producción controlada de biomasa, se utilizan lámparas de luz, debido a que proporcionan menos calor en comparación a otras variantes de luz artificial y son similarmente efectivos en promover altas tasas de multiplicación y crecimiento (Fidalgo, 1995). La luz debe ser continuamente suministrada al cultivo, ya que la energía radiante no se puede acumular (Molina *et al.*, 1996).

La microalga *Tetraselmis* es usada en la producción de biodiesel (Sheehan *et al.*, 1998), presenta capacidad purificadora y biocontroladora de la calidad de agua en acuicultura (Palaco, 2008), en la industria farmacéutica por su actividad antimicrobiana (Dooslin & Krishnakumar, 2013), en la obtención de metabolitos que ayuden a mejorar la salud, que sean aditivos en alimentos o sean aplicables en la industria (Ulloa, 2011).

Por estas consideraciones, el presente estudio se orienta a la implementación de un sistema de cultivo bentónico y determinación del tiempo óptimo de exposición a la luz artificial a fin de mejorar la producción eficiente de la microalga *Tetraselmis striata* (Butcher, 1959).

MATERIALES Y MÉTODO

Colecta de microalgas y aislamiento

La microalga fue colectada con una red para fitoplancton (20µm) en la capa superficial del río Locumba (LS 17°54'29,31"y LO 70°57'31,07") que discurre hacia los humedales de ITE (Tacna); trasladada posteriormente al laboratorio donde fue aislada mediante la combinación de dos métodos: diluciones sucesivas y aislamiento en placas usando la pipeta Pasteur (Almaguer *et al.*, 2004), obteniendo la cepa monoespecífica de la muestra de agua y cultivos clonales (Trujillo, 1997); identificada a nivel molecular por el laboratorio MACROGEN Advancing through Genomics (Korea del Norte).

Sistema de producción de la microalga

El sistema de cultivo bentónico (unidad experimental) consistió en un recipiente de 4L conteniendo una placa de policarbonato reticulada con 150 cuadrantes de 1 cm² como superficies de adhesión de las microalgas, embebida en medio líquido estéril (dulce o marina) y enriquecida con nutriente foliar Bayfolan y/o F/2 Guillard (Guillard, 1975); el cultivo se desarrolló en una sala con estanterías provistas con baterías de lámparas fluorescentes (50watts), aeración moderada suministrada por un regenerador de aire (blower) y temperatura constante (19°C ± 1°C)

Adaptación de microalga al sistema de cultivo

Se realizó un primer ensayo de acondicionamiento inoculando la microalga en agua dulce y agua de mar con nutriente foliar Bayfolan y F/2 Guillard (Guillard, 1975) dispuestos en tubos de 10 mL hasta matraces de 300 mL para luego ser inoculados en envases de 4 L y se determinó la curva de crecimiento, tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación.

El segundo ensayo consistió en verter los inóculos provenientes de cultivos ensayados previamente en el sistema de cultivo bentónico; con la finalidad de comparar la curva de crecimiento, tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación de la microalga en la columna de agua y en la placa de policarbonato.

Determinación del efecto del fotoperíodo

Con el objetivo de optimizar las condiciones de cultivo de la microalga en sistema bentónico, se realizó el tercer ensayo tendiente a evaluar el efecto del tiempo de exposición a la luz sobre la concentración celular de la cepa utilizada en el estudio. Se estableció un control consistente en bandejas por triplicado bajo iluminación constante y tres tratamientos con fotoperíodo 12:12 (luz: oscuridad), 18:6 (luz: oscuridad) y 6:18 (luz: oscuridad). Previo a la evaluación, la cepa fue aclimatada al menos tres generaciones, de acuerdo a la condición de periodicidad lumínica a determinar; una vez que los cultivos fueron aclimatados, se estimaron los parámetros de crecimiento.

Cinética de parámetros de crecimiento

Se removieron las microalgas adheridas en las placas de policarbonato, desprendiendo 5 cuadrados al azar con un pincel delgado (Nro. 0) y se trasvasaron en 5 tubos de ensayo conteniendo 1 mL de agua de mar estéril (microfiltrada hasta 1 μm e irradiada con luz UV) con 1 mL de EDTA (separa las células aglutinadas); para su recuento mediante una cámara de Neubauer y un microscopio óptico compuesto Carl Zeiss.

Los principales parámetros del crecimiento de un cultivo de células, según Paniagua (1986) se calcularon de la siguiente forma:

Tasa Específica de Crecimiento (μ)

Para la determinación de la tasa específica de crecimiento (μ) se utilizó la concentración diaria

registrada en la fase de crecimiento exponencial del cultivo. La tasa específica de crecimiento poblacional se calculó con la siguiente fórmula:

$$\mu = (\text{Log } N_f - \text{Log } N_o) / (T_f - T_o)$$

Donde:

N_f = densidad celular en T_f

N_o = densidad celular en T_o .

T_o = tiempo inicial de la fase exponencial

T_f = tiempo final de la fase exponencial

Tiempo de Duplicación (TD)

El tiempo de duplicación se obtuvo una vez conseguida μ mediante la siguiente fórmula:

$$TD = \text{Ln } (2) / \mu$$

Donde TD es el tiempo de duplicación, $\text{Ln } (2)$ es una constante y μ es la tasa específica de crecimiento.

Análisis estadísticos

Los datos registrados fueron procesados en hojas de cálculo Excel y para comparar la tasa de crecimiento en los diferentes tratamientos se aplicó un Análisis de Varianza de una Vía (ANOVA, $p=0,05$) utilizando el software estadístico SPSS versión 21.0, previa comprobación de la normalidad de los datos y homocedasticidad de sus varianzas.

RESULTADOS

Se cultivó una cepa de microalga verde previamente aislada en cultivos axénicos e identificada molecularmente por MACROGEN Advancing through Genomics (Korea del Norte) como *T. striata*; las condiciones de cultivo en medio controlado estuvieron asociadas a 21°C $\pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,7, intensidad promedio de luz 2126 lux, oxígeno disuelto promedio de 6,04 ml/L, salinidad promedio de 35,146 UPS y aumento progresivo de volúmenes desde tubo de ensayo hasta 4 L.

La curva de crecimiento en el sistema planctónico conteniendo agua dulce enriquecida con Byfoland, mostró que luego de la inoculación iniciada con 3×10^4 cel·mL⁻¹, la fase de adaptación presentó una caída abrupta descendiendo hasta 1×10^4 cel·mL⁻¹ al tercer día de cultivo, para luego recuperarse dando

paso a la fase exponencial con una concentración promedio de 3×10^4 cel·mL⁻¹, evidenciando posteriormente la fase de muerte; similar comportamiento se presentó en el caso del cultivo enriquecido con F/2 Guillard, donde luego de la inoculación iniciada con 4×10^4 cel·mL⁻¹, la fase de

adaptación presentó una caída abrupta descendiendo hasta 2×10^4 cel·mL⁻¹ al tercer día de cultivo, para recuperarse dando paso a la fase exponencial con una concentración promedio de 4×10^4 cel·mL⁻¹, evidenciando posteriormente la fase de muerte (Fig. 1).

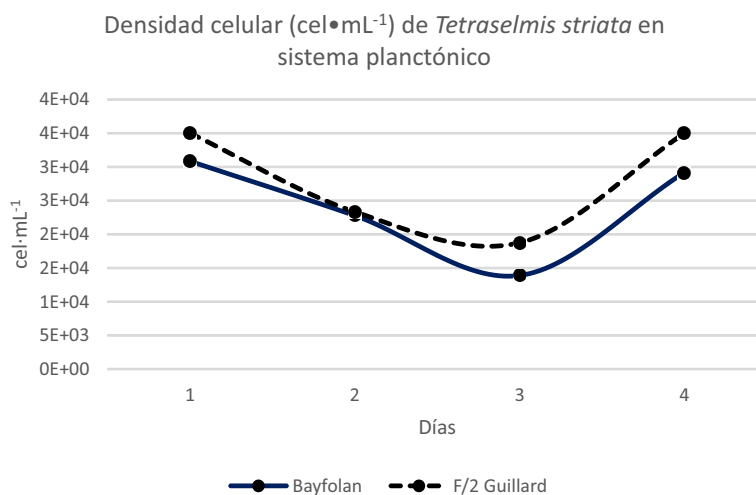


Figura 1. Crecimiento de *T. striata* en sistema planctónico.

La curva de crecimiento determinada a partir de las células adheridas a la placa de polipropileno (Pp) conteniendo agua dulce enriquecida con Byfoland, muestra que tras la inoculación iniciada con 8×10^4 cel·mL⁻¹, la fase de adaptación presentó una caída abrupta descendiendo hasta 3×10^4 cel·mL⁻¹ al cuarto día de cultivo, sin lograr recuperarse;

mientras que en el caso del cultivo enriquecido con F/2 Guillard, donde se muestra que luego de la inoculación iniciada con 4×10^5 cel·mL⁻¹, la fase de adaptación presentó un incremento constante dando paso a la fase exponencial con una concentración promedio de 1×10^6 cel·mL⁻¹ al tercer día de cultivo (Fig. 2).

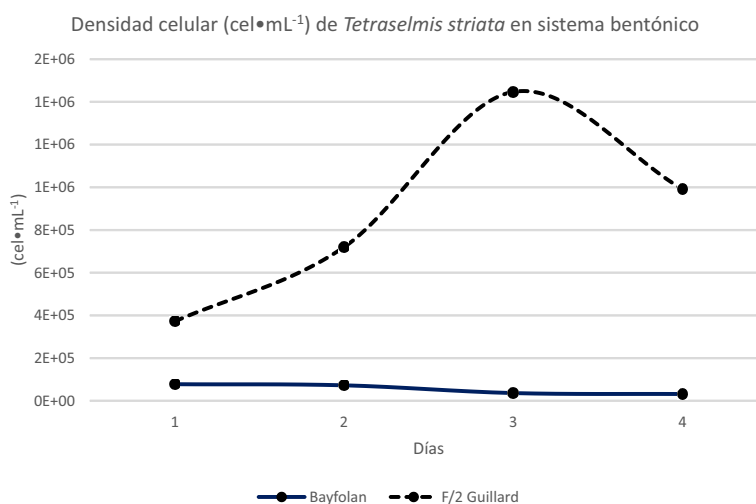


Figura 2. Crecimiento de *T. striata* en sistema bentónico

Determinación del efecto del fotoperíodo

Las densidades iniciales promedio de los cultivos de 24, 12, 16 y 8 h luz de *T. striata* fueron 4×10^4 cel·mL⁻¹, 4×10^4 cel·mL⁻¹, 1×10^4 cel·mL⁻¹ y 3×10^4 cel·mL⁻¹ respectivamente, las que después de 5 días

de cultivo para los mismos tratamientos aumentaron llegando a 2×10^6 cel·mL⁻¹, 2×10^5 cel·mL⁻¹, 1×10^4 cel·mL⁻¹ y 1×10^5 cel·mL⁻¹ respectivamente (Fig. 3).

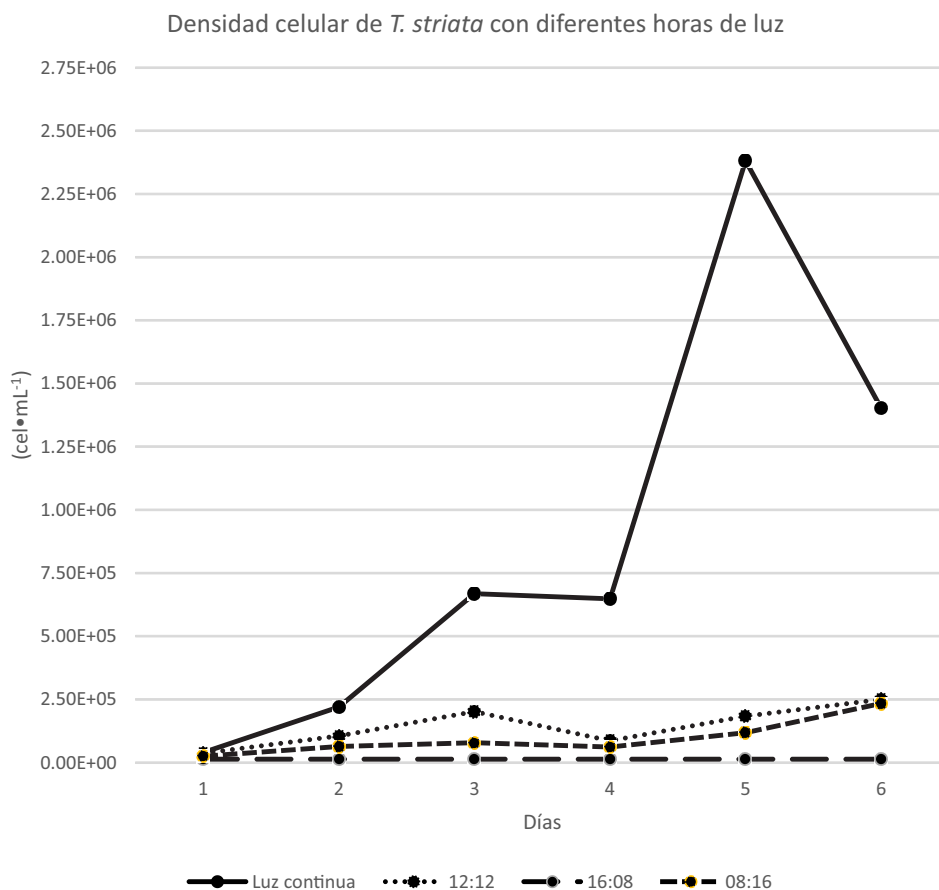


Figura 3. Curvas de crecimiento de *T. striata* en sistema bentónico con diferentes horas de exposición a la luz (24, 12, 16 y 8 h luz).

Estimación de la tasa específica de crecimiento

La velocidad de crecimiento constante de *T. striata*

expuesta a diferentes horas de luz se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Tasa específica de crecimiento de *T. striata* en sistema bentónico con diferentes horas de exposición a la luz (24, 12, 16 y 8 h luz)

HORAS LUZ	24	12	16	8
μ	0,44	0,17	0,42	0,17

La estimación del tiempo de duplicación de *T. striata* mostró que durante las 24 horas de exposición a la luz es posible alcanzar velocidades de duplicación de 1,56 h; seguido de la exposición a la luz por 16 h con 1,65 h, a las 12 horas de exposición a la luz se obtuvo una velocidad de duplicación de 3,97 h y 4,11 h cuando se expuso a 8 h de luz.

DISCUSIÓN

Especies del género *Tetraselmis* son ampliamente utilizadas en acuicultura como alimento vivo, en los últimos años se ha aprovechado la composición y facilidad con la que se puede manipular para producir metabolitos de interés comercial y para obtener biodiesel a partir de microalgas, tal como lo manifiesta Chisti (2007), cuyo potencial está centrado en la productividad celular y por la facilidad de su cultivo en sistema continuo (Rodolfi *et al.*, 2009); por lo que sería importante ampliar las investigaciones sobre *T. striata* que podría ser usada para estos fines, centrando esfuerzos en su composición bioquímica, metabolitos potencialmente interesantes para la industria alimentaria, etc.; ya que debido a su alta productividad, rápido crecimiento y valor económico, las investigaciones en este campo vienen aumentando (OHSE *et al.*, 2008).

En este estudio, se observó que *T. striata* es capaz de fijarse a un sustrato tal como lo indica Uribe (1992) sobre su hábitat; y mantener una producción constante en el sistema de cultivo bentónico y semicontinuo, este último planteado por Ulloa (2011) como una alternativa para la producción viable y permanente; así mismo, se determinó que la luz constante es el factor que permite mantener altas densidades celulares en el sistema de cultivo bentónico, por lo que coincidimos con Molina *et al.* (1996) quienes destacan que la luz debe ser continuamente suministrada al cultivo porque representa la fuente de energía para la fotosíntesis y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (Humphrey, 1979).

A medida que fue decreciendo la exposición de las microalgas a la luz, estas se vieron afectadas en términos de densidad, por lo que compartimos lo

manifestado por Gonzáles (2000), quien estableció que la adaptación de las microalgas a variaciones extremas en la intensidad de luz, es decir, a la luz y sombra, es un fenómeno muy conocido y caracterizado por cambios en el contenido intracelular de pigmentos, generalmente acompañados por cambios en la respuesta fotosintética y en la composición bioquímica.

Lo señalado anteriormente, se respalda con lo mencionado por López & *et al.* (2009); ya que en el caso de *T. striata* como en la mayoría de microalgas el crecimiento se lleva a cabo durante el periodo de luz debido a que a través de la fotosíntesis generan material orgánico y energía suficiente para este proceso, así como la división celular.

A diferencia del trabajo realizado por López *et al.* (2009) sobre el crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* (Cleve, 1873) en cultivos estáticos con luminosidad permanente y a un fotoperiodo a diversas salinidades, en el que determinó que la densidad celular de *T. pseudonana* no se vio afectada por las condiciones de luz, pero si disminuyeron las tasas de crecimiento máxima con fotoperiodo; los cultivos con fotoperiodo 12 h luz:12 h oscuridad tuvieron un crecimiento menor; nuestro trabajo mantuvo altas densidades celulares y las mejores tasas específicas de crecimiento a menores tiempos de duplicación con luz constante.

Coincidiendo con los resultados de Humphrey (1979), que encontró un crecimiento más lento de *Chaetoceros didymus* (Ehrenberg, 1845), *Chroomonas* sp. (Hansgirg, 1885), *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) (Reimann & J.C.Lewin 1964), *Dunaliella tertiolecta* (Teodoresco, 1905), *Pavlova lutheri* (Droop) (J.C.Green 1975) y *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin, 1897) cuando crecieron en un ciclo 12 h luz: 12 h oscuridad comparado con cultivos expuestos a iluminación continua; quedando evidenciado en esta investigación que la iluminación continua favoreció el crecimiento de *T. striata*; tal como lo señalan Tzovenis *et al.* (2003) al encontrar que la tasa de crecimiento máxima para una cepa de *Isochrysis galbana* (T-ISO) (Parke, 1949), fue mayor con iluminación continua y disminuyó con el fotoperiodo.

Por su parte, Viramontes-Robles (1991), evaluó el

efecto de tres fotoperiodos: 12:12, 14:10 y 16:8 e iluminación continua en el crecimiento de *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898), *Skeletonema costatum* (Cleve, 1873) y *Tetraselmis suecica* (Butcher, 1959), encontrando que las dos diatomeas crecieron bien en cualquiera de las intensidades luminosas, pero *Tetraselmis* creció menos con fotoperiodo que con iluminación continua; situación similar se presentó en los ensayos realizados en esta investigación; ya que al aplicar 24:00, 16:8, 12:12 y 8:16 de fotoperiodo, a medida que fue disminuyendo la luz se evidenció menores concentraciones celulares, una tasa específica de crecimiento descendente y mayor tiempo de duplicación celular de *T. striata*.

El hecho de que *Tetraselmis* adquiera un hábito bentónico de crecimiento propició una dificultad para Arredondo *et al.* (1997) en su recuento, ya que fue muy difícil conseguir una muestra homogénea a través de la cuantificación directa en la cámara de Neubauer; optando por la implementación de la técnica de extracción de pigmentos con acetona y la determinación de la absorbancia por medio de espectrofotometría, que permite la determinación de las concentraciones de clorofilas a y c presentes en las diatomeas. En esta investigación usamos 1 mL de EDTA para separar las células aglutinadas de *T. striata* obteniendo resultados favorables durante su recuento en la cámara de Neubauer.

La producción de *T. striata* bajo este sistema de cultivo bentónico en agua marina con F/2 Guillard y luz constante constituye una estrategia de alimentación para organismos que requieren un sustrato para fijarse y alimentarse; contribuyendo a la acuicultura; así mismo, podría emplearse en diversas aplicaciones como en alguna fase de sistemas de tratamiento de aguas residuales.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se llevó a cabo gracias al apoyo logístico del Instituto del Mar del Perú; la autora agradece a Kattyahna Vega Ascuña por su valioso desempeño en la parte experimental y a todas las personas que brindaron su apoyo en el campo y en la fase experimental de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almaguer, Y.; Alfonso, E. & Leal, S. 2004. Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Revista de Investigaciones Marinas*, 25: 57–64.
- Álvarez, M. & Gallardo, T. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las algas. *Botánica. Complutenses*, 15: 9–60.
- Álvarez, H. 1994. *Introducción al método ficológico*. Folleto de Algas. Escuela Superior Politécnica del Litoral, 19–27.
- Benemann, J. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology*, 4: 233–245.
- Borowitzka, M. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9: 393–401.
- Cardozo, K.; Guaratini, T.; Barros, M.; Falcão, V.; Tonon, N.; Lopes, S.; Torres, M.; Souza, A.; Colepicolo, P. & Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146: 60–78.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294–306.
- Fidalgo, P. 1995. *Variabilidad bioquímica de las microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno*. Tesis de doctorado. Universidad de la Coruña. España.
- Gonzales, C.; Sol, M. & Nava, M. 2014. Estimación de iluminación en un fotobiorreactor productor de biomasa a partir de microalgas. *Conciencia Tecnológica*, 47: 29–35.
- Guillard, R. 1975. *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. In: Smith, W.L. & Chanley, M.H. (Eds). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York. 26–60, consultado el 20 de Mayo de 2017, <<https://uwaterloo.ca/canadian-physiological-culture-centre/cultures/culture-media/f2>>
- Humphrey, G. 1979. Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 40:63–70.
- Malgas. 2013. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. AST Ingeniería S.L. 70.
- Molina, E.; Fernández, J.; Sevilla, J.; Sánchez, J. &

- García, F. 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45: 1-93.
- Muller, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12: 527–534.
- Pradilla, S. & Salcedo, A. 2010. *Estudio de la incidencia luminosa en la producción de microalgas en un fotobiorreactor a escala laboratorio*. Tesis. Universidad industrial de Santander. 48.
- Surier A. & Karney, R. 2010. *Hatchery Culture of the Bay Scallop*. University of Maryland, NRAC Publication No. 214.10.
- Sheehan, J.; Dunahay, T.; Benemann, J. & Roessler, P. 1998. *A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae*. Disponible en: <http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf>
- Trujillo V. 1997. *Manual de Técnicas de Aislamiento de cepas de microalgas. Informe Técnico. Comunicaciones académicas, Serie Acuicultura, 29*. CTA9701. Recuperado 20 Mayo, 2017, consultado el 20 de Mayo de 2017, <<https://core.ac.uk/download/pdf/54220483.pdf>>
- Paniagua J, Buckle, I.; Granados, C.; & Loya, D. 1986. *Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe Especial OC 86 02*. CICESE. México.
- Rodolfi, L.; Chini, 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. *Biotechnology Bioeng*, 102: 100-112.
- Ulloa, R. 2011. *Inducción de productos bioactivos en la microalga marina Tetraselmis suecica*. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. España. 220.
- Uribe E. 1992. *Cultivo de Microalgas. 5º Curso Internacional de Cultivo de Moluscos*. AGCI-JICA-UCN. Coquimbo. Chile. 19 Octubre – 13 Noviembre. 39–81.

Received July 4, 2017.
Accepted July 29, 2017.