

Uso de fertilizante comercial en la cinética celular de *Desmodesmus opoliensis* (Chlorophyceae), reporte preliminar

Use of commercial fertilizer in the cell kinetics of *Desmodesmus opoliensis* (Chlorophyceae), preliminary report

Uso de fertilizante comercial na cinética celular de *Desmodesmus opoliensis* (Chlorophyceae), relatório preliminar

Cristian A. Burgos-Rada^{1*}; Juan A. Ramírez-Merlano^{2*}; Javier A. Jiménez-Forero³

¹ Estudiante de Ingeniería Agroindustrial;

² Profesional en Acuicultura, MSc;

³ Ing Agroindustrial, MSc

* Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos-GRITOX, Instituto de Acuicultura de los Llanos-IALL; Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta-Colombia.

Email: cristian.burgos@unillanos.edu.co

Recibido: 03 de octubre de 2016

Aceptado: 02 de diciembre de 2016

Resumen

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos reconocidos por su producción de vitaminas, carbohidratos, pigmentos y lípidos. Sin embargo, esta producción es afectada por la composición de nutrientes micro y macrominerales en el sistema de cultivo, que para algunos casos constituyen altos costos, un 70% en la producción de microalgas. El objetivo de este estudio fue evaluar un fertilizante edáfico comercial como medio de cultivo para la microalga *Desmodesmus opoliensis* y su efecto en la cinética celular. Para esto, se utilizó como medio comercial Remital® en cultivos estáticos, evaluando un total de cuatro concentraciones (0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 gr/l de agua destilada), este medio de cultivo fue comprando con el medio F/2 Guillard (1 ml/l) por triplicado para cada medio de cultivo (n=3). Para determinar la curva cinética y su comportamiento, la densidad celular (cel/ml) se llevó a cabo por medio de conteo celular en cámara de Neubauer y las clorofilas totales (µg/ml) por espectrofotometría, a una temperatura de cultivo de 24 ± 2 °C y un fotoperiodo de 12:12 (Luz:Oscuridad) durante 14 días. El F/2 Guillard alcanzó una densidad celular máxima de 4.33 ± 1.96 (10⁶ cel/ml). El tratamiento con concentraciones de 2 g/l, mostró el mayor crecimiento con un promedio de 2.9 × 10⁶ cel/ml, sin diferencias estadísticas significativas al ser comparado con las diferentes concentraciones del fertilizante comercial Remital® (P > 0.05). Estos resultados confirman y permiten el uso de fertilizantes no convencionales como el Remital® en la producción de *Desmodesmus opoliensis*.

Palabras clave: clorofila, densidad celular, edáfico, microalga, pigmentos.

Abstract

The microalgae are photosynthetic microorganisms recognized for their production of vitamins, carbohydrates, pigments and lipids. However, this production is affected by the composition of micro and macro nutrients in the culture system,

which in some cases constitute high costs, 70% in the production of microalgae. The objective of this study was to evaluate a commercial edaphic fertilizer as a culture medium for the microalgae *Desmodesmus opoliensis* and its effect on cell kinetics. For this, Remital® was used as a commercial medium in static cultures, evaluating a total of four concentrations (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 gr/l of distilled water), this culture medium was purchased with the Guillard F/2 medium (1 ml/l) in triplicate for each culture medium (n= 3). To determine the kinetic curve and its behavior, the cell density (cel/ml) was carried out by means of cell count in Neubauer chamber and total chlorophylls (µg/ml) by spectrophotometry, at a culture temperature of 24 ± 2 °C and a photoperiod of 12:12 (light:dark) for 14 days. The Guillard F/2 reached a maximum cell density of 4.33 ± 1.96 (10^6 cells/ml). The treatment with concentrations of 2 g/l, showed the highest growth with an average of 2.9×10^6 cel/ml, without significant statistical differences when compared with the different concentrations of the commercial fertilizer Remital® ($P > 0.05$). These results confirm and allow the use of unconventional fertilizers such as Remital® in the production of *Desmodesmus opoliensis*.

Key words: chlorophyll, cell density, edaphic, microalgae, pigments.

Resumo

As microalgas são microorganismos fotossintéticos conhecidos pela sua produção de vitaminas, carboidratos, pigmentos e lípidos. No entanto, esta produção é afectada pela composição de nutrientes micros e macro no sistema de cultura, o que nalguns casos apresentam custos elevados, 70% na produção de microalgas. O objetivo deste estudo foi avaliar um fertilizante edáfica comercial como meio de cultura para a microalga *Desmodesmus opoliensis* e seu efeito sobre a cinética celular. Para isso, foi utilizado como um meio comercial Remital® em culturas estáticas, avaliando um total de quatro concentrações (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/l de água destilada), este meio de cultura foi comprando o F/2 Guillard (1 ml/l), em triplicado, para cada meio de cultura (n= 3). Para determinar a curva cinética e comportamento, a densidade celular (cel/ml) foi efectuada por contagem de células numa câmara de Neubauer e clorofilas totais (ug/ml) por espectrofotometria a uma temperture de cultura de 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 12:12 (luz:escuro), durante 14 dias. O F/2 Guillard atingido uma densidade celular máxima de 4.33 ± 1.96 (10^6 cel/ml). O tratamento em concentrações de 2 g/l, mostrou o maior crescimento com uma média de 2.9×10^6 cel/ml, sem diferencias estatísticas significativas quando comparada com as diferentes concentrações do fertilizante comercial Remital® ($P > 0,05$). Estes resultados confirmam e permitir que o uso de fertilizantes não convencionais, tais como Remital® na produção de *Desmodesmus opoliensis*.

Palavras chave: clorofila, densidade celular, edáficas, microalgas, pigmentos.

Introducción

Las microalgas son un importante recurso para la generación de biocombustibles de tercera generación, debido a su rápido crecimiento y capacidad de minimizar o evitar el uso de tierras cultivables y nutrientes usados en la agricultura convencional (Scott *et al.*, 2010; Bhatnagar *et al.*, 2011). Las células de este recurso biológico puede ser afectado bioquímicamente y fisiológicamente por los medios de cultivo, las condiciones de crecimiento y la composición de nutrientes, sumado a la tecnología de transformación génica (Nichols, 1973; Kim y Giraud, 1989; Kim y Smith, 2001).

Desmodesmus opoliensis es una microalga de la clase de las clorofíceas, perteneciente a la familia *Scenedes-maceae*, que se encuentra en aguas dulces como ríos, siendo dominante en este tipo de ambientes (John *et al.*, 2011; Guiry y Guiry, 2016). El género *Desmodes-mus* posee interés biotecnológico por ser cercana a la microalgas del género *Scenedesmus* ampliamente estudiada y como recurso biológico con potencialidad como alimento para peces, nutrientes suplementarios,

productos farmacéuticos (Belay *et al.*, 1993), y biorremediación de agua contaminada (Chong *et al.*, 2000).

Las microalgas se producen en cultivos de tipo batch que se caracterizan por largas fases de latencia en los diferentes medios de cultivo (Lim *et al.*, 2006). Unas de las variables de mayor estudio es el conocimiento de la estructura de los cloroplastos, donde se almacena parte de la energía acumulada por el proceso de fotosíntesis y los pigmentos producidos, permitiendo verificar los cambios físicos y químicos que se producen en las células en crecimiento. Así el medio de cultivo o microambiente debe aportarle los parámetros mínimos de supervivencia para la especie (Fernández *et al.*, 2014).

Una gran variedad de medios de cultivo incluyendo Erdschreiber, Grund, ES, CHU-10, F/2 de Guillard y series de los medios ASP (McLachlan, 1973; Nichols, 1973), han sido desarrollados para la efectividad de los cultivos en especies de microalgas de agua dulce y marinas. Sin embargo, presentan algunas limitaciones en nutrientes seleccionados para mejorar los crecimientos en cultivos de largo tiempo (Kim *et al.*, 2007).

Otro de los aspectos a tener en cuenta cuando se prueban medios de cultivos alternativos, es su forma de presentación, recomendándose tener en cuenta algunos factores que puedan limitar a la microalga en su crecimiento como solubilidad, textura y coloración del medio, así el microorganismo no va encontrar obstáculos a la hora de disponer de los nutrientes (Gärtner, 2008; Koller *et al.*, 2012). Estudios previos han demostrado que con el uso de fertilizantes agrícolas permite obtener un mayor crecimiento, una similar composición proximal y un menor costo que con aquellos medios que son específicos o convencionales para el cultivo de microalgas como el F/2 de Guillard (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005). Por ejemplo, Morris-Quevedo *et al.*, (1999), reportaron altos valores de proteína (44.6%) en *Chorella vulgaris* cultivada con Triple 15.

Organismos como *Chondracanthus canaliculatus* y *Gardnerella vaginalis* fueron cultivados en estiércol de bovino de forma anaerobia, demostrando que es eficiente y más económico con respecto a medios convencionales como el F/2 de Guillard (Faria *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2003). Una alternativa a los medios de cultivo tradicionales ya estandarizados, químicamente definidos, son aquellos sustratos orgánicos, mayormente subproductos de otras industrias como las vinícolas, donde existe una buena fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, micro minerales y otros nutrientes (Silveira *et al.*, 2008).

Por otro lado, la utilización de fertilizantes agrícolas y/o comerciales se ha considerado como una alternativa económica para reducir los altos costos en el mantenimiento y producción de microalgas en laboratorios comerciales (Piña *et al.*, 2007). La importancia de seleccionar el medio de cultivo para producir determinada especie de microalga radica en que el uso de un sustrato adecuado puede optimizar el valor nutricional de estos (Nieves-Soto *et al.*, 1994). Por este motivo el objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de un fertilizante comercial (Remital®) como medio de cultivo sobre la cinética celular de *Desmodesmus opoliensis*, como posible opción favorable en el uso de fertilizantes edáficos de uso comercial, los cuales pueden llegar a ser muy económicos y efectivos en la producción de microalgas a nivel de laboratorio y a escala industrial de manera sostenible y viable.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio fue realizado en el laboratorio de Alimento Vivo del Instituto de Acuicultura de la Universidad

de los Llanos (IALL), localizado en el kilómetro 12 vía Puerto López, vereda Barcelona del municipio de Villavicencio (Meta-Colombia), ubicado a 418 m.s.n.m. Las condiciones climáticas de la región son características de un clima húmedo tropical, con temperatura promedio de 25°C, precipitación anual promedio de 4.050 mm y promedio de humedad relativa de 75%.

Descripción de la especie

Desmodesmus opoliensis (variedad *carinatus*) de la familia de las *Scenedesmaceae*, fue identificada por descripción morfológica de acuerdo a John, Whitton y Brook (2002) y uso de Microscopía Electrónica de Barrido (Figura 1). Especie nativa de la región de la Orinoquia, obtenida del banco de cepas de microalgas del Laboratorio de alimento vivo del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos - IALL (Villavicencio, Meta). La microalgas estuvo mantenida en medio líquido F/2 Guillard estándar (Guillard y Ryther, 1962), bajo condiciones de laboratorio (temperatura de 24°C), con un fotoperiodo de 10:14 L:O (Luz:Oscuridad).

Condiciones experimentales de cultivo

Evaluación de los medios de cultivo

Para evaluar el efecto del fertilizante comercial Remital® (Abocol, Cartagena, Colombia) y F/2 Guillard como medio control de referencia. Se realizaron cultivos estáticos, evaluando un total de cuatro concentraciones (0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 gr/l de agua destilada) para el caso de Remital® y a una concentración de 1 ml/l de agua destilada para el F/2 Guillard (ver Tabla 1, composición de los medios utilizados). Para cada

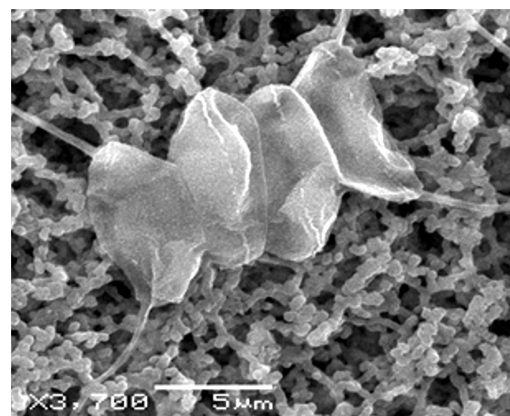


Figura 1. Células de *Desmodesmus opoliensis*. Microscopía electrónica de Barrido para identificación morfológica de la especie.

concentración se hicieron tres replicas (n=3), con un total de trece (13) unidades experimentales, ubicados aleatoriamente en estantes metálicos con condiciones fijas de luz (lámparas de neón Phillips, 72 Watts, Amsterdam, Holanda) con un fotoperiodo de 12:12 L:O (Luz:Oscuridad), una temperatura promedio de cultivo de 25 °C, una temperatura ambiental controlada con termohigrómetro (Extech, Nashua, USA) y aireación constante suministrada por medio de un blower (Sweetwater S-41, Florida, USA).

Tabla 1. Resumen de composiciones de macro y microminerales en las concentraciones de los medios utilizados.

Elemento	Remital (mg.l ⁻¹) [2g.l ⁻¹]	F/2 Guillard (mg.l ⁻¹)
Nitrógeno total (N)	353,6	0,8501
Nitrógeno amoniacal (N)	205,6	-
Nitrógeno nítrico (N)	156,8	0,8501
Nitrógeno ureico (N)	-	-
Fósforo asimilable (P2O5)	133,4	-
Potasio soluble en agua (K2O)	380,2	0,0871
Boro (B)	5,1	-
Cobre (Cu)*	-	-
Hierro (Fe)*	-	-
Manganeso (Mn)*	55	0,0018
Molibdeno (Mo)*	-	-
Zinc (Zn)*	2,9	0,00022
Azufre (S)	40,4	0,0001

(*) Quelatados con EDTA.

El cultivo se tuvo en matraces de vidrio con un volumen fijo de 300 ml. En cada unidad experimental se adicionó entre 400 y 600 µl de *Desmodesmus opoliensis* a una densidad celular inicial de 1.4 de X10⁶ cel/ml (Figura 2). La duración del ensayo estuvo determinada por el tiempo de máxima densidad celular.

Análisis sobre la cinética celular

La densidad celular (cel/ml) fue determinada por conteo en cámara de Neubauer (Bright Line, Optik Labor, Friedrichshofen, Germany) bajo un microscopio Óptico (Nikon Eclipse E200, Tokio, Japón) a una magnifica-

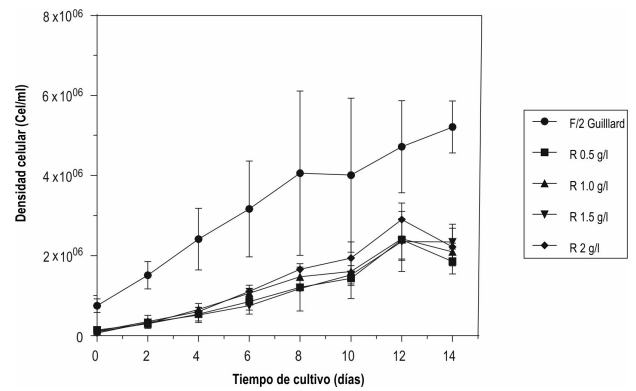


Figura 2. Montaje de las unidades experimentales bajo los parámetros establecidos. Fertilizante Comercial (0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 g/l de agua destilada), a 25°C y Fotoperiodo 12-12 (L-O).

ción de 400x, siguiendo la metodología reportada por Sipaúba-Tavares y Rocha, (2003).

La concentración de pigmentos o clorofila total (µg/ml) se determinó por medición de absorbancias con la ayuda de un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Fisher scientific, Waltham, USA), de acuerdo con el método propuesto por Ritchie, (2008) a diferentes longitudes de onda: 480, 664, 647, 630 y 691 nanómetros (nm), mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila total} = \left[\frac{(21.3873 * A_{630}) + (10.3739 * A_{647}) + (5.3805 * A_{664}) + (5.5309 * A_{691})}{\text{Vol. de la muestra}} \right] * \text{Vol. del extracto}$$

El monitoreo se realizó día por medio, extrayendo una muestra de 1.5 ml y 0.5 ml para pigmentos y densidad celular, respectivamente. De acuerdo con la concentración del inoculo y su volumen, se calculó la cantidad volumétrica de inoculo que cada unidad experimental debía recibir en iguales cantidades, para asegurar que todas iniciarían dicho experimento con la misma densidad de microorganismos. Este trabajo para su desarrollo, contó con el aval del comité de bioética de la Universidad de los Llanos.

Análisis estadístico

Para la asignación de los tratamientos se empleó un diseño completamente al azar. Los resultados fueron procesados por medio de estadística descriptiva y mostrados como media ± desviación estándar (SD). Se llevó a cabo un análisis de varianza (Anova) para verificar diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Además de esto, se realizaron test de normalidad y homogeneidad de los datos, para detectar datos anormales o heterogéneos (Humberto y Román,

2008). Dicho análisis se llevó a cabo en el programa estadístico R versión i386 3.3.0.

Resultados

El comportamiento cinético de *Desmodesmus opoliensis* con el fertilizante comercial (Remital®) muestra al día 12 como el de mayor o máximo crecimiento celular para las cuatros concentraciones evaluadas (Figura 3). De igual forma se evidencia la fase de latencia considerada desde el día 0 hasta el día 2, una fase exponencial a partir del día 4 hasta el día 11 y finalmente una fase de descenso a partir de los días 13 y 14 para ambas variables respuestas, densidad celular (Figura 3) y clorofila total (Figura 4) .

La cinética de crecimiento en términos de densidad celular se observa en la figura 3. La máxima densidad celular fue observada a los 12 días de cultivo mostrando diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) al ser comparada con el medio convencional F/2 Guillard = 4.33 ± 1.96 (10^6 cel/ml) con las diferentes concentraciones del fertilizante comercial (Remital®). Estos

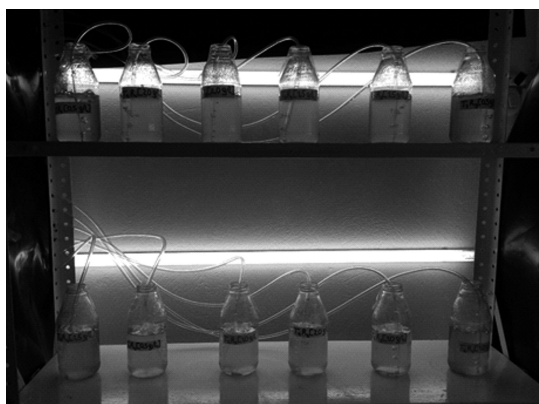


Figura 3. Comportamiento cinético de Densidad celular (cel/ml) de *Desmodesmus opoliensis* cultivadas en medio a base de fertilizante comercial durante 14 días. Datos expresados como media \pm error estándar de la media. (n=3).

valores de máximo crecimiento cinético se muestran en la tabla 2. Las curvas cinéticas representadas en la figura 3, muestran que no existe una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos a diferentes concentraciones con respecto a la densidad celular. Sin embargo, el tratamiento con concentraciones de 2 g/l, mostró el mayor crecimiento con un promedio de 2.9×10^6 cel/m ($P > 0.05$).

La mayor concentración de pigmentos (clorofila total $\mu\text{g/l}$) son observados en la figura 4, donde el F/2 Guillard presentó la mayor concentración a los 12 días de cultivo ($16.24 \pm 2.67 \mu\text{g/l}$) al ser comparado con las diferentes concentraciones del fertilizante comercial Remital®, comportamiento que refleja valores altos en concentraciones de 1.0 y 2.0 mg/l (14.64 ± 2.22 y $13.56 \pm 3.37 \mu\text{g/l}$, respectivamente) sin presentar diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

Discusión

De acuerdo con John *et al.*, (2011), las microalgas llevan a cabo sus procesos de crecimiento y generación de compuestos intracelulares y extracelulares por

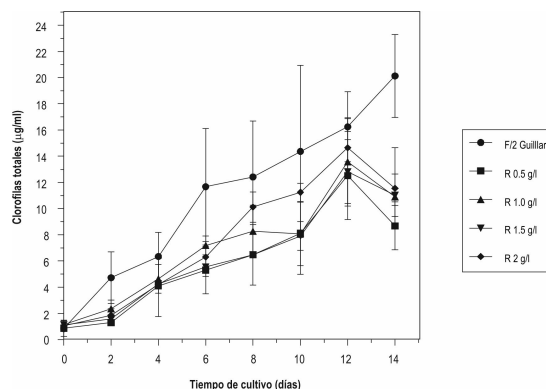


Figura 4. Comportamiento cinético de producción de Clorofilas totales ($\mu\text{g/ml}$) de *Desmodesmus opoliensis* cultivadas en medio a base de fertilizante comercial durante 14 días. Datos expresados como media \pm error estándar de la media.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de *Desmodesmus opoliensis*, evaluados durante 12 días de cultivo. Densidad celular ($\times 10^6$ cel/ml) e Clorofilas totales ($\mu\text{g/ml}$). Datos expresados como media \pm desviación estándar (DS).

Variables de respuesta	F/2 Guillard	Fertilizante comercial (g/l)			
		0.5	1.0	1.5	2.0
Densidad celular	4.33 ± 1.96^a	2.66 ± 0.51^{bc}	2.66 ± 0.50^{bc}	2.30 ± 0.77^{bc}	2.9 ± 0.44^{bc}
Clorofilas totales	16.24 ± 2.67^a	12.52 ± 3.36^{bc}	13.56 ± 3.37^{bc}	12.81 ± 2.44^{bc}	14.64 ± 2.22^{bc}

a,b,c Entre columnas, valores con letras distintas son diferentes ($P < 0,05$, n =3).

medio de la fotosíntesis, procesos que dependen directamente de la disponibilidad de nutrientes, siendo importante la selección del medio de cultivo en microalgas con potencial de ser cultivada como *Desmodesmus opoliensis*.

Los factores ambientales tienen un efecto significativo en la biomasa de microalgas, las condiciones ambientales, como la radiación de luz, la temperatura y el valor del pH causan diversos comportamientos sobre la producción de biomasa de diferentes especies de microalgas (Li *et al.*, 2011), más directamente afecta la productividad (Soletto *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010; Xenopoulos *et al.*, 2002). Otros factores como la concentración de nutrientes afectan el crecimiento, consumo de nutrientes y propiedades y acumulación de lípidos (Aslan y Kapdan, 2006; Goldberg y Cohen, 2006; Rodolfi *et al.*, 2009).

La concentración de nitrógeno y fósforo presente en el agua es considerada como factor fundamental y su influencia directa en la cinética de crecimiento de la microalga, relacionado con el consumo de nutrientes y la acumulación de lípidos (Xin, Hong-ying, Ke y Ying-xue, 2010).

Con la incorporación a las diferentes características de un medio cultivo, el uso de productos agrícolas (fertilizantes) como el Remital® fue observada una tendencia exponencial en la cinética de crecimiento de la densidad celular y clorofila total, al aumentar la concentración. Estos resultados confirman lo reportado por Ortiz-Moreno *et al.*, (2012), usando el mismo fertilizante comercial para el cultivo de *Chlorella sorokiniana*, sin presentar diferencias significativas en las concentraciones propuestas (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 g/l). Sin embargo, Estrada *et al.*, (2010) reporta que concentraciones bajas el sustrato se convierte en una limitante de para el crecimiento de la microalga, además de que el bajo costo del fertilizante no justifica el riesgo de cultivar microalgas con cantidades reducidas de medio a gran escala.

Investigaciones en *Chorella vulgaris*, reportan el efecto de diferentes medios de cultivo (chu10, fertilizante complejo NPK, humus de lombriz y equinaza) sobre el crecimiento y el contenido proteico, observando la mayor densidad con el fertilizante complejo NPK ($10.9 \pm 1.6 \times 10^6$ cel/ml) en el día 22 de cultivo (Muñoz *et al.*, 2011).

De acuerdo a Domínguez-Bocanegra, (2004), las microalgas clorofilas como *Haematococcus pluvialis* cambian su color de verde a amarillo, dicho fenómeno es atribuido

a la acumulación de clorofilas a y β -carotenoides y a las condiciones de cultivo establecidas.

A pesar de que la absorción de los nutrientes (N, P y K) en un sistema tipo batch, se agotan a la primera semana de inoculado el cultivo, el crecimiento continua hasta un 300% de producción, por lo que se asume que la microalga puede almacenar nutrientes y el stress causado por las variaciones de nitrógeno induce la producción de otros tipos de componentes o la reproducción de celular (An *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el incremento de las fuentes de carbono, junto con bajos niveles de pH pueden afectar las tasas de crecimiento y la fotosíntesis de las microalgas, lo cual puede explicar la similitud en las variables de crecimiento (densidad celular y producción de pigmentos), relacionadas directamente y pueden ser un punto de partida para futuros trabajos en los que se busque evaluar cinéticas por medio de la densidad óptica o la producción de pigmentos como parámetros de crecimiento (Kim *et al.*, 2007).

Se reporta el uso de fertilizantes comerciales en el cultivo de *Chondracanthus Squarulosus* utilizando diversas fuentes de nitrógeno y aguas vertidas de industrias, consideradas altamente contaminantes, con el objetivo de generar procesos de biorremediación por medio de las microalgas (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006), alternativa tan efectiva como la incorporación al medio de cultivo de compuestos nitrogenados de alto grado de pureza (Pacheco-Ruiz *et al.*, 2004).

Medios de cultivo no convencionales como ensilado de pescado generan resultados satisfactorios en producciones masivas de *Nannochloropsis oculata*, evidenciando la búsqueda de recursos nuevos para el escalamiento de las microalgas de manera económica (Sánchez-Torres *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman el uso de Remital® como un medio ideal para *Desmodesmus opoliensis*, además por el bajo costo permitiendo la producción de componentes de alto valor agregado y de interés a nivel industrial.

Agradecimientos

Agradecimientos especiales al Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos-IALL, por facilitar las instalaciones y el recurso humano para realizar el presente estudio. También a la Dirección General de Investigaciones (DGI) de la Universidad de los Llanos, por el financiamiento de la investigación en el marco del proyecto marco C04-F01-005-2016.

Referencias

- An JY, Sim SJ, Lee JS, Kim BW. Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *Appl Phycol*. 2003;15(2-3):185-191.
- Aslan S, Kapdan IK. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecol Eng*. 2006;28:64-70.
- Belay A, Ota Y, Miyakawa K, Shimamatsu H. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *J Appl Phycol*. 1993;5:235-241.
- Bhatnagar A, Chinnasamy S, Singh M, Das KC. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl Energy*. 2011;88:3425-3431.
- Chong AMY, Wong YS, Tam NFY. Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial waste water. *Chemosphere*. 2000; 41:251-257.
- Domínguez-Bocanegra AR, Legarreta IG, Jeronimo FM, Campocoscio AT. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technol*. 2004;92(2): 209-214.
- Espinosa I, Lorenzo M, Riverón Y, Álvarez E, Villoch A. Evaluación de diferentes medios líquidos para el cultivo de *Gardnerella vaginalis* y caracterización del perfil de proteína por electroforesis PAGE-SDS. *Rev Cubana Med Trop*. 2003;5(2):69-75.
- Estrada CA, Noguera YC, Lopez JE. 2010. Desarrollo tecnológico prototipo para la producción de biodiesel a partir de microalgas en sistemas cerrados, como biocombustible de segunda generación. In *Eighth LACCEI Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology, Arequipa*.
- Faria de ACE, Hayashi C, Soares CM, Furuya WM. Dinâmica da comunidade fitoplanctónica e variáveis físicas e químicas em tanques experimentais submetidos a diferentes adubações orgánicas. *Acta Scientiarum*. 2001;23:291-297.
- Fernández C, Gauna MC, Croce ME, Parodi ER. Primer registro de *Spermatozopsis similis* (Chlorophyta) en un ambiente marino. *Rev Mex Biodivers*. 2014;85(2):606-609.
- Ferrera-Cerrato R, Rojas-Avelizapa NG, Poggi-Valardo HM, Alarcón A, Cañizares-Villanueva RO. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol*. 2006;48(2):179-187.
- Gärtner G. *Algal Culturing Techniques*. Andersen R.A. (Eds.). Academic Press, Burlington, San Diego, London, (2005), ISBN: 0-12-088426-7. *J Plant Physiol*. 2008;165(3):350-352.
- Goldberg IK, Cohen Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*. 2006;67:696-701.
- Guiry MD, Guiry GM. 2016. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available at: <http://www.algaebase.org> [Accessed September 30, 2016].
- Guillard R, Ryther J. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol*. 1962;8(2):229-239.
- Humberto GP, Román DLVS. 2008. *Análisis y diseño de experimentos* Second Ed., Mexico D.F.
- John DM, Whitton BA, Brook AJ. 2002. The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae, Vol. 1, Cambridge University Press.
- John DM, Whitton BA, Brook AJ. 2011. The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae (Eds.). (Vol. 2). Cambridge University Press.
- Kim MK, Giraud G. Characters of neutral lipids of *Detonula* sp. in culture. *Korean J Phycol*. 1989;4:55-61.
- Kim MK, Smith RE. Effect of ionic copper toxicity on the growth of green alga. *J Microbiol Biotechnol*. 2001;11(2):211-216.
- Kim MK, Park JW, Park CS, Kim SJ, Jeune KH, Chang MU, Acreman J. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresour Technol*. 2007;98(11):2220-2228.
- Koller M, Alerio A, Tuffner P, Koinigg M, Böchzelt H, Schober S, Pieber S, Schnitzer H, Mittelbach M, Braunnegg G. "Characteristics and Potential of Micro Algal Cultivation Strategies: A Review." *J Clean Prod*. 2012;37:377-88.
- Li Y, Zhou W, Hu B, Min M, Chen P, Ruan RR. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresour Technol*. 2011;102(23):10861-10867.
- Lim CY, Yoo YH, Sidharthan M, Ma CW, Bang IC, Kim JM, Lee KS, Park NS, Shin HW. Effects of copper (II) oxide on growth and biochemical compositions of two marine microalgae. *J Environ Biol*. 2006;27:461-466.
- Mata MT, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sust Energ Rev*. 2010;14(1):217-232.
- McLachlan J. 1973. Growth media - marine. In: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods - Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25-51.
- Morris-Quevedo HJ, Quintana-Cabrales MM, Almarales-Arceo A, Hernandez- Nazario L. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 1999;13:123-128.
- Muñoz-Peñuela M, Ramirez-Merlano J, Otero-Paternina A, Medina-Robles V M, Cruz-Casallas PE, Velasco-Santamaria Y. Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*. *Rev Colomb Cienc Pec*. 2012;25:438-449.
- Nichols HW. 1973. Growth media - freshwater. In: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods - Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 7-24

- Nieves-Soto M, Cortes-Altamirano R, Gutiérrez-Corona C, Pacheco-Marges M. Producción de fitoplancton a bajo costo. 1. Aislamiento y cultivo de *Monoraphidium* sp. (Chlorophyceae) en un sistema estático en medio F y cuatro a base de fertilizantes agrícolas. *An Inst Cienc Mar Limnol*. 1994;21:119-127.
- Ortiz-Moreno ML, Cortés-Castillo CE, Sánchez-Villarraga J, Padilla J, Otero-Paternina AM. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*. 2012;16(1):12-20.
- Pacheco-Ruiz I, Zertuche-González JA, Arroyo-Ortega E, Valenzuela-Espinoza E. Agricultural fertilizers as alternative culture media for biomass production of *Chondracanthus squarrolus* (Rhodophyta, Gigartinales) under semi-controlled conditions. *Aquaculture*. 2004;240(1-4):201-209.
- Piña P, Medina MA, Nieves M, Leal S, López-Elías JA, Guerrero MA. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Rev Invest Mar*. 2007;28(3):225-236.
- Ritchie RJ. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*. 2008;46(1):115-126.
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(1):100-112.
- Sánchez-Torres H, Juscamaita-Morales J, Vargas-Cárdenas J, Oliveros-Ramos R. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecología Aplicada*. 2008;7(1-2):149-158.
- Scott SA, Davey, MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Smith AG. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnol*. 2010;21: 277-286
- Silveira ST, Daroit DJ, Brandelli A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. *LWT-Food Sci Technol*. 2008;41(1):170-174.
- Sipauba-Tavares LH, Rocha O. 2003. Produção de Plancton (Fitoplancton e Zooplancton) para alimentação de Organismos Aquáticos. São Carlos, Brasil: RiMa editora.
- Soletto D, Binaghi L, Ferrari L, Lodi A, Carvalho JCM, Zilli M, Converti A. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochem Eng J*. 2008;39(2):369-375.
- Valenzuela-Espinoza E, Lafarga-de la Cruz F, Millán-Núñez R, Núñez-Cebrero F. Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Cienc Mar*. 2005;31:79-89.
- Xenopoulos MA, Frost PC, Elser JJ. Joint effects of UV radiation and phosphorus supply on algal growth rate and elemental composition. *Ecology*. 2002;83(2):423-435.
- Xin L, Hong-ying H, Ke G, Ying-xue S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol*. 2010;101(14):5494-5500.