

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Microbiología

**Efecto de dos fertilizantes agrícolas comerciales sobre las microalgas
Tetraselmis suecica (Kylin) Butcher y *Chlorella vulgaris* Beijerinck**

**Efecto de dous fertilizantes agrícolas comerciais sobre as
microalgas *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher e *Chlorella vulgaris*
Beijerinck**

**Effect of two commercial agricultural fertilizers on the microalgae
Tetraselmis suecica (Kylin) Butcher and *Chlorella vulgaris* Beijerinck**

Lara Ochoa García

Trabajo de Fin de Grado

28 de Junio de 2016

Dirigido por la Dra. Concepción Herrero López

El presente trabajo Fin de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Herrero López, Catedrática de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

Contenido

1. Introducción	1
2. Objetivo	2
3. Materiales y métodos	2
3.1. Descripción de las especies	2
3.2. Cultivo microalgal.....	3
3.3. Fertilizantes.....	4
3.4. Determinación del crecimiento.....	5
3.4.1. Densidad óptica.....	5
3.4.2. Recuento del número de células	5
3.4.3. Tasa de crecimiento	5
3.5. Determinación espectrofotométrica de pigmentos	5
3.6. Determinación espectrofotométrica de proteínas	6
3.7. Diseño experimental.....	7
3.8. Análisis estadístico	9
4. Resultados	9
4.1. Experiencia 1: Cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> con el fertilizante Abono Soluble en Agua ONE.	9
4.1.1. Crecimiento.....	9
4.1.2. Pigmentos	10
4.1.3. Proteínas	12
4.2. Experiencia 2: Cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> con el fertilizante Abono Azul Universal NovaTec.....	13
4.2.1. Crecimiento.....	13
4.2.2. Pigmentos	14
4.2.3. Proteínas	16

4.3. Experiencia 3: Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> con el fertilizante Abono Soluble en Agua ONE.	17
4.3.1. Crecimiento	17
4.3.2. Pigmentos	18
4.3.3. Proteínas	20
4.4. Experiencia 4: Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> con el fertilizante Abono Azul Universal NovaTec.	20
4.4.1. Crecimiento	20
4.4.2. Pigmentos	21
4.4.3. Proteínas	23
5. Discusión	25
6. Conclusiones	27
Conclusions	27
7. Bibliografía	28

Resumen

El uso de fertilizantes agrícolas es una preocupación creciente debido a su efecto potencial en microalgas, productores primarios de los ecosistemas acuáticos, esenciales para el mantenimiento del equilibrio de oxígeno, así como para el reciclaje de nutrientes.

En este trabajo se emplearon diferentes concentraciones de los fertilizantes agrícolas comerciales Abono Soluble en Agua ONE y Abono Azul Universal NovaTec para el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* y la microalga dulceacuícola *Chlorella vulgaris* y se compararon con un medio sin nutrientes y medios de cultivo convencionales.

Las concentraciones de fertilizante testadas proporcionaron unas tasas de crecimiento y contenido en proteínas y pigmentos fotosintéticos significativamente mayores que el medio sin nutrientes, próximas a las obtenidas con el medio de cultivo de referencia y a veces, superiores, variando en función del fertilizante y microalga empleados.

Los resultados obtenidos han determinado que con el uso de los fertilizantes es posible mejorar el rendimiento de la producción de las microalgas pero para ello es necesario conocer los requerimientos nutritivos de las especies estudiadas, ya que los parámetros óptimos para el crecimiento de las microalgas, así como los rangos tolerados dependen de cada especie.

Palabras clave

Microalga, *Tetraselmis suecica*, *Chlorella vulgaris*, fertilizante, pigmentos, proteínas.

Abstract

The use of agricultural fertilizers is a growing concern due to their potential effect on microalgae, because they are primary producers of aquatic ecosystems and essential for the maintenance of oxygen balance and the recycling of nutrients.

In this work different concentrations of commercial agricultural fertilizer Abono Soluble en Agua ONE and Abono Azul Universal NovaTec were used for the cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* and the freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* and they were compared with a medium without nutrients and with conventional culture media.

Growth rates and protein and photosynthetic pigments content were higher in the cultures with the fertilizer concentrations tested than in the medium without nutrients, and close or even higher than those obtained with the conventional culture media, varying according to the fertilizer and microalgae used.

According to the results obtained, the use of fertilizers can improve the yield in the production of microalgae but a better knowledge of the nutritional requirements of each species needed since the optimal growth parameters and tolerance ranges depend on the species.

Keywords

Microalgae, *Tetraselmis suecica*, *Chlorella vulgaris*, fertilizer, pigments, proteins.

1. Introducción

El término microalga se refiere a aquellos microorganismos eucariotas autótrofos que contienen clorofilas y son capaces de realizar la fotosíntesis. Comprende decenas de miles de especies que forman, junto con algunos microorganismos procariotas, el fitoplancton (Dodge, 1973; Berner, 1993).

Las microalgas son responsables de aproximadamente el 50% de la productividad fotosintética en la tierra. Captan luz y utilizan su energía para la asimilación de CO₂ y otros nutrientes inorgánicos a su propia biomasa, constituyendo el primer eslabón de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos.

Debido a la estructura celular sencilla que poseen, la acumulación de energía química tras realizar la fotosíntesis no se utiliza en la construcción de estructuras complejas, sino que se orienta a un uso más eficiente de formación de nuevas células. (Satyanarayana *et al.*, 2011). Su productividad y composición bioquímica depende en gran medida del modo de cultivo y estos microorganismos presentan la ventaja de poseer un metabolismo flexible que se adapta a las condiciones del medio.

Al ser organismos fotoautótrofos, dependen de la luz (que puede ser suministrada por el sol o por lámparas de luz fría), de temperatura adecuada y de una fuente de carbono (CO₂). Además, necesitan de macronutrientes como nitrógeno, fósforo, magnesio, calcio y azufre, y micronutrientes (Zaborsky, 1983), necesarios en cantidades específicas, en proporciones adecuadas y en forma química biodisponible en el medio de cultivo de manera que su crecimiento no se limite (Markou *et al.*, 2014).

La utilización de fertilizantes agrícolas es una preocupación creciente debido a su efecto sobre la biota acuática pero especialmente sobre las microalgas, ya que cualquier efecto sobre ellas puede afectar a los niveles tróficos superiores (Rioboo *et al.*, 2007).

En lugares desarrollados, la agricultura y actividades relacionadas han sido agresivamente vinculadas a daños ambientales de distinta índole, especialmente por su efecto sobre la calidad de las aguas. La contaminación por fertilizantes se produce cuando éstos se utilizan en mayor cantidad de la que pueden absorber los cultivos, o cuando se eliminan por acción del agua o del viento de la superficie del suelo antes de ser absorbidos de forma que los excesos pueden infiltrarse en las aguas subterráneas o ser arrastrados a cursos de agua. Esta sobrecarga de nutrientes provoca la eutrofización de lagos, embalses y estanques.

En las últimas décadas, las crecientes prácticas agrícolas, han generado y acelerado estos procesos de eutrofización, convirtiéndose en la problemática más seria y extendida de los sistemas acuáticos (Hosper, 1997). El abuso de fertilizantes agrícolas aumenta el contenido de nutrientes a un ritmo tal que genera una gran biomasa de organismos de vida generalmente efímera que al morir se acumulan sobre el fondo como materia orgánica y la descomposición del exceso de esta materia orgánica produce una disminución del oxígeno en las aguas.

Por otro lado, el uso de fertilizantes agrícolas se ha considerado como una alternativa económica para reducir los altos costes en la producción de microalgas en sistemas comerciales. Sin embargo, para volúmenes iniciales, de hasta 15 ó 20 litros, no se recomienda su uso, ya que el uso de medios simplificados de menor coste, puede afectar al crecimiento y por consiguiente a la composición de las microalgas en lo que se refiere a su contenido de las varias fracciones orgánicas (Peraza-Díaz, 1997).

2. Objetivo

El objetivo del presente trabajo es estudiar la utilización de dos fertilizantes agrícolas de uso comercial (Abono Soluble en Agua ONE y Abono Azul Universal NovaTec) para el cultivo de dos especies de microalgas, una marina (*Tetraselmis suecica*) y otra dulceacuícola (*Chlorella vulgaris*).

Se estudia su efecto tanto sobre el crecimiento como sobre la composición bioquímica en pigmentos fotosintéticos y proteínas.

El interés de este trabajo reside en la futura posibilidad de aumentar el rendimiento de la producción de las microalgas, mediante la búsqueda de combinaciones apropiadas de nutrientes.

3. Materiales y métodos

3.1. Descripción de las especies

Las especies de microalgas utilizadas para este estudio fueron *Tetraselmis suecica* (marina) y *Chlorella vulgaris* (dulceacuicola).

Tetraselmis suecica (Kyllin) Butcher se clasifica en la clase *Prasinophyceae*, orden *Chlorodendrales*, familia *Chlorodendraceae* dentro de la división *Chlorophyta*.

Es una microalga marina unicelular móvil de color verde debido a la presencia de clorofilas *a* y *b*. Posee una forma generalmente oval y su tamaño celular está comprendido entre 10 – 15 μm de longitud y entre 7 – 9 μm de diámetro. Presenta cuatro flagelos isodinámicos que salen de una invaginación apical de la porción anterior de la célula que está ubicada en la misma dirección en la que avanza (Figura 1). La cubierta celular está formada por una teca compuesta por 2 - 3 estratos producidos por partículas escamosas de aspecto cristalino que derivan del aparato de Golgi. Posee un núcleo central, un plasto acopado lobulado en la parte anterior y un pirenoide basal. La reproducción se realiza por división celular binaria, momento en el cual las células pierden el estado móvil, y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de la liberación de la teca (Butcher, 1959).

T. suecica es una especie muy utilizada en acuicultura y es considerada uno de los flagelados marinos más fácil de cultivar a gran escala. Se emplea como alimento para larvas de moluscos y crustáceos, con un valor nutritivo considerable por su excelente composición en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Fábregas *et al.*, 2001).



Figura 1. Fotografía de *Tetraselmis suecica* bajo el microscopio.

Chlorella vulgaris Beijerinck (Figura 2) pertenece a la clase *Trebouxiophyceae*, orden *Chlorellales* y familia *Chlorellaceae*, dentro de la división *Chlorophyta* (Van den Hoek *et al.*, 1995). Es un alga verde unicelular de agua dulce, las células se presentan aisladas aunque eventualmente pueden formar agregados; son esféricas, de forma cocoide, carecen de flagelos y tienen un tamaño que oscila entre 3,75 y 6 μm de diámetro. Los pigmentos presentes en las células de *C.vulgaris* son clorofila a, clorofila b, β -caroteno y varias xantofilas. Como material de reserva, presenta almidón asociado al pirenoide dentro del cloroplasto. Se reproduce asexualmente mediante la formación de autoesporas (Van den Hoek *et al.*, 1995) que son liberadas al medio cuando la pared de la célula madre se rompe.

Es ampliamente utilizada, ya que es fácil de cultivar y contiene proteínas, pigmentos y ácidos grasos con alto valor nutricional (Shi *et al.*, 1997).

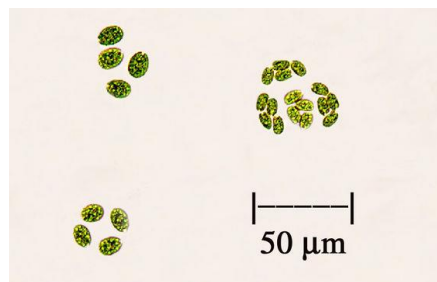


Figura 2. Fotografía de *Chlorella vulgaris* bajo el microscopio.

(http://www.eol.org/data_objects/24626196)

3.2. Cultivo microalgal

Los cultivos de *Tetraselmis suecica* se realizan en agua de mar filtrada por 5 μm y esterilizada en autoclave a 120 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.

Como medio de cultivo se utiliza el medio Algal-1 (Tabla 1), preparado a partir de una solución de macroelementos, fundamentalmente N y P y otra de oligoelementos realizadas en agua destilada. Ambas soluciones son esterilizadas en autoclave por separado. Posteriormente se mezclan en condiciones de esterilidad y el medio completo se almacena refrigerado a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Se utiliza una relación de 10 mL de Algal-1 por cada L de agua de mar, obteniéndose la composición mostrada en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición del medio de cultivo Algal-1

N	39.37 mgL ⁻¹
P	4.2 mgL ⁻¹
Fe	1.78 mgL ⁻¹
Zn	0.092 mgL ⁻¹
Mn	0.077 mgL ⁻¹
Mo	0.098 mgL ⁻¹
Co	0.008 mgL ⁻¹
Cu	0.008 mgL ⁻¹
Tiamina HCl	0.028 mgL ⁻¹
Biotina	0.0014 mgL ⁻¹
Cianocobalamina	0.0014 mgL ⁻¹

Los cultivos de *Chlorella vulgaris* se realizan en agua destilada esterilizada en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

El medio empleado es el GOLDMEDIUM-FWS comercial.

Estas soluciones son esterilizadas en autoclave y almacenadas por separado a 4 °C. Posteriormente se mezclan en relación de 10 mL de cada solución por cada L de agua destilada.

Los cultivos *stock* de ambas especies se realizan en botellas Pyrex de 500 mL y se mantienen con aireación en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. La temperatura de la cámara de cultivo es constante a 18±1 °C y la iluminación artificial se aplica con una intensidad de 68,25 μmol fotón·m²·s⁻¹ proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36 W. El aire inyectado a los cultivos es filtrado mediante filtros Millipore FG de 0,20μm de tamaño de poro para evitar la contaminación del cultivo.

3.3. Fertilizantes

Los fertilizantes utilizados son:

- Abono soluble en agua ONE (Agroterra)

Es un fertilizante complejo NPK (MgO, SO₃) 10-10-10 (2, 33) cuya composición es la siguiente:

Nitrógeno (N) total.....	10,0%
Nitrógeno (N) amoniacal.....	10,0%
Anhídrido Fosfórico (P ₂ O ₅).....	10,0%
Óxido de Potasio (K ₂ O).....	10,0%
Óxido de Magnesio (MgO).....	2,0%
Anhídrido sulfúrico (SO ₃).....	33,0%
Microelementos (B, Zn, Cu, Mn, Fe).....	< 0,05%

- Abono Azul Universal NovaTec (COMPO)

Es un fertilizante complejo NPK (Mg, S) 12-8-16 (3, 25) cuya composición es la siguiente:

Nitrógeno (N) total.....	12,0%
Nitrógeno (N) Nítrico.....	5,0%
Nitrógeno (N) Amoniacal.....	7,0%
Anhídrido Fosfórico (P ₂ O ₅).....	8,0%
Óxido de Potasio (K ₂ O).....	16,0%
Óxido de Magnesio (MgO).....	3,0%
Anhídrido sulfúrico (SO ₃).....	25,0%
Microelementos (B, Zn, Fe).....	≤ 0,06%

Ambos son fertilizantes de uso común, empleados para la nutrición de todo tipo de plantas.

3.4. Determinación del crecimiento

3.4.1. Densidad óptica

El crecimiento de los cultivos de *T.suecica* y *C.vulgaris* se determina diariamente mediante la medida de densidad óptica expresada como 100-T, donde T es la transmitancia (%). Se toman alícuotas (2mL) de los cultivos y se realizan lecturas de transmitancia a 530 nm de longitud de onda utilizando espectrofotómetro Spectronic 20, frente a un blanco de agua destilada (Griffiths *et al.*, 2011).

3.4.2. Recuento del número de células

La densidad celular (células mL⁻¹) de los cultivos microalgales se determina mediante recuentos realizados al microscopio óptico utilizando una cámara Improved Neubauer, empleando una alícuota de cada uno de los cultivos fijada con lugol. Se utiliza un microscopio óptico de contraste de fases Nikon Labophot. En caso de muestras muy concentradas se efectúan las diluciones necesarias.

3.4.3. Tasa de crecimiento

Se calculan las tasas de crecimiento para cada tiempo y concentración de fertilizante utilizado (μ), expresadas en día⁻¹, mediante la fórmula $\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t-t_0)$, donde (t₀) y (t) son el tiempo inicial y final del periodo estudiado, ambos expresados en días, y (N_t) y (N₀) son el número de células mL⁻¹ o la absorbancia medida en dichos tiempos.

3.5. Determinación espectrofotométrica de pigmentos

Para el análisis espectrofotométrico del contenido en pigmentos de *T.suecica* y *C.vulgaris*, se recogen las células por centrifugación de un volumen de 10 mL de

cultivo en una centrifuga refrigerada ALC PK121R a 4500 rpm durante 15 min a 4 °C. Se retira el sobrenadante y la biomasa se resuspende en 2 ml de acetona-metanol 2:1. Se mantienen de este modo durante 24 h a 4 °C y en oscuridad para que la extracción sea completa. Tras este tiempo, se centrifuga de nuevo para retirar los restos celulares y se recoge el sobrenadante que contiene los pigmentos extraídos. Se hacen las diluciones necesarias y se realizan lecturas de absorbancia a 664, 647 y 480 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Shimadzu UV- 1700, frente a un blanco de acetona-metanol 2:1.

El valor de los coeficientes y la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción varían en función del solvente utilizado (Parsons y Strickland, 1965) y de la microalga empleada. De los propuestos hasta ahora, se han adoptado los de Jeffrey y Humphrey (Jeffrey y Humphrey, 1975) para las clorofilas y los de Strickland y Parsons (1972) para los carotenoides totales, ambos usando acetona-metanol 2:1 como solvente.

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de las concentraciones de pigmentos en el extracto son:

$$\text{Clorofila } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20.36 A_{647} - 5.5 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 4 A_{480}$$

donde las clorofilas a y b y los carotenoides totales representan concentraciones de dichos pigmentos en μgml^{-1} de extracto y A_{664} , A_{647} y A_{480} representan las absorbancias (D.O = log I₀/I) medidas a 664, 647 y 480 nm, respectivamente.

3.6. Determinación espectrofotométrica de proteínas

Para la cuantificación de la concentración de proteínas hidrosolubles presente en las células de *T.suecica* y *C.vulgaris* se ha utilizado el método de Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de color diferencial del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. El máximo de absorbancia para una solución ácida de dicho colorante cambia de 465 a 595 nm cuando se produce el enlace a una proteína, principalmente a residuos de aminoácidos aromáticos. Este método cuantifica proteínas y polipéptidos cuyo peso molecular sea superior a 3 kDa. El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción, lo cual proporciona sensibilidad al ensayo.

En este trabajo se ha utilizado el reactivo preparado comercialmente por BioRad en el producto *ProteinAssay Kit*.

Las células de *T. suecica* y *C.vulgaris* se recogen por centrifugación en una centrifuga refrigerada ALC PK121R a 4500 rpm durante 15 min a 4 °C. Se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 3 mL de agua destilada con ayuda de un vórtex. Esta suspensión celular se somete a una rotura con ultrasonidos utilizando un sonicador Labsonic durante 5 minutos en el caso de *T.suecica* y 4+4 minutos en el caso de *C.vulgaris*. A continuación, se centrifuga de nuevo para retirar los restos celulares. El extracto celular se diluye convenientemente en agua destilada y se cuantifica su contenido proteico. Para ello, se prepara una recta de calibrado con concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) entre 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en agua

destilada frente a un blanco también de agua destilada. La reacción colorimétrica se inicia añadiendo colorante azul de Coomassie en una relación muestra:reactivo 4:1 (v:v) a cada una de las muestras, y agitando suavemente. Las medidas de absorbancia se realizan en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 a 595 nm.

Todo el proceso de extracción se realiza inmediatamente antes del análisis del contenido proteico.

3.7. Diseño experimental

Se han realizado cuatro experiencias, estudiando el efecto de cada fertilizante sobre cada una de las especies microalgales.

Experiencia 1

Se cultivó la microalga marina *Tetraselmis suecica* con distintas concentraciones del fertilizante Abono Soluble en Agua ONE durante 144 horas. Las concentraciones de fertilizante utilizadas fueron 0.17, 0.33, 0.5, 0.67, 0.83 y 1 gL⁻¹.

Así mismo se realizó un cultivo en agua de mar en ausencia de nutrientes (control negativo o 0) y otro cultivo de referencia utilizando el medio Algal-1.

Los cultivos se iniciaron a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial con una densidad celular de 60x10⁴ células mL⁻¹. El primer día, antes de añadir las células se midió la absorbancia de todas las botellas conteniendo las diferentes concentraciones de fertilizante así como del medio de referencia (valores a restar a las posteriores densidades ópticas de las botellas conteniendo las células).

Los cultivos se realizaron en botellas pyrex de 500 mL que se mantuvieron en las mismas condiciones de aireación, luz y temperatura descritas anteriormente (Apartado Materiales y Métodos).

Se realizaron dos réplicas de cada cultivo. Diariamente se midió la densidad óptica y tras 144 horas se determinaron la densidad celular, la tasa de crecimiento y el contenido en pigmentos y proteínas.

Experiencia 2

Se cultivó la microalga marina *Tetraselmis suecica* con distintas concentraciones del fertilizante Abono Azul Universal NovaTec durante 216 horas. Las concentraciones de fertilizante utilizadas fueron 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 1.2 gL⁻¹.

Así mismo se realizó un cultivo en agua de mar en ausencia de nutrientes (control negativo o 0) y otro cultivo de referencia utilizando el medio Algal-1.

Los cultivos se iniciaron a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial con una densidad celular de 60x10⁴ células mL⁻¹. El primer día, antes de añadir las células se midió la absorbancia de todas las botellas conteniendo las diferentes concentraciones de fertilizante así como del medio de referencia (valores a restar a las posteriores densidades ópticas de las botellas conteniendo las células).

Los cultivos se realizaron en botellas *pyrex* de 500 mL que se mantuvieron en las mismas condiciones de aireación, luz y temperatura descritas anteriormente.

Se realizaron dos réplicas de cada cultivo. Diariamente se midió la densidad óptica y tras 216 horas se determinaron la densidad celular, la tasa de crecimiento y el contenido en pigmentos y proteínas.

Experiencia 3

Se cultivó la microalga dulceacuícola *Chlorella vulgaris* con distintas concentraciones del fertilizante Abono Soluble en Agua ONE durante 96 horas. Las concentraciones de fertilizante utilizadas fueron 0.4, 0.7 y 1 gL⁻¹.

Así mismo se realizó un cultivo en agua destilada en ausencia de nutrientes (control negativo o 0) y otro cultivo de referencia utilizando el medio GOLDMEDIUM-FWS.

Los cultivos se iniciaron a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial con una densidad óptica inicial de 40 (expresada como 100-T). El primer día, antes de añadir las células se midió la absorbancia de todas las botellas conteniendo las diferentes concentraciones de fertilizante así como del medio de referencia (valores a restar a las posteriores densidades ópticas de las botellas conteniendo las células).

Los cultivos se realizaron en botellas *pyrex* de 500 mL que se mantuvieron en las mismas condiciones de aireación, luz y temperatura descritas anteriormente.

Se realizaron dos réplicas de cada cultivo. Diariamente se midió la densidad óptica y tras 96 horas se determinaron la tasa de crecimiento y el contenido en pigmentos y proteínas.

Experiencia 4

Se cultivó la microalga dulceacuícola *Chlorella vulgaris* con distintas concentraciones del fertilizante Abono Azul Universal durante 96 horas. Las concentraciones de fertilizante utilizadas fueron 0.4, 0.8 y 1.2 gL⁻¹.

Así mismo se realizó un cultivo en agua destilada en ausencia de nutrientes (control negativo o 0) y otro cultivo de referencia utilizando el medio GOLDMEDIUM-FWS.

Los cultivos se iniciaron a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial con una densidad óptica inicial de 40 (expresada como 100-T). El primer día, antes de añadir las células se midió la absorbancia de todas las botellas conteniendo las diferentes concentraciones de fertilizante así como del medio de referencia (valores a restar a las posteriores densidades ópticas de las botellas conteniendo las células).

Los cultivos se realizaron en botellas *pyrex* de 500 mL que se mantuvieron en las mismas condiciones de aireación, luz y temperatura descritas anteriormente.

Se realizan dos réplicas de cada cultivo. Diariamente se midió la densidad óptica y tras 96 horas se determinaron la tasa de crecimiento y el contenido en pigmentos y proteínas.

3.8. Análisis estadístico

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de cada tratamiento así como de los controles y medios de referencia para todos los parámetros analizados (crecimiento, contenido en pigmentos y contenido en proteínas).

Para determinar diferencias significativas entre los distintos cultivos, los datos se analizaron estadísticamente mediante el estudio de la varianza (ANOVA) con el software IBM SPSS Statistics versión 20.0, con un nivel de confianza del 95%, y bajo la hipótesis nula de que la concentración del fertilizante del medio no afecta al parámetro de estudio (no hay diferencia significativa entre las medias de los distintos cultivos).

Cuando los resultados fueron significativos y la hipótesis nula se rechazó, se utilizó el test de rango múltiple de Tukey para comparar las medias y analizar de qué forma afecta cada concentración de fertilizante al parámetro en cuestión, utilizando el mismo programa estadístico (IBM SPSS Statistics 20.0) y con un nivel de significación (p) de 0.05. Las gráficas se realizaron en todos los casos con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot 12.0, y los resultados se representan con su respectiva desviación estándar.

4. Resultados

4.1. Experiencia 1: Cultivo de *Tetraselmis suecica* con el fertilizante Abono Soluble en Agua ONE.

4.1.1. Crecimiento

El crecimiento de *T.suecica* con las distintas concentraciones del fertilizante Abono ONE, además del crecimiento de los cultivos control y los cultivos con el medio de referencia (Algal-1) se muestran en la Figura 3.

Las densidades celulares finales y las tasas de crecimiento se muestran en la Tabla 2.

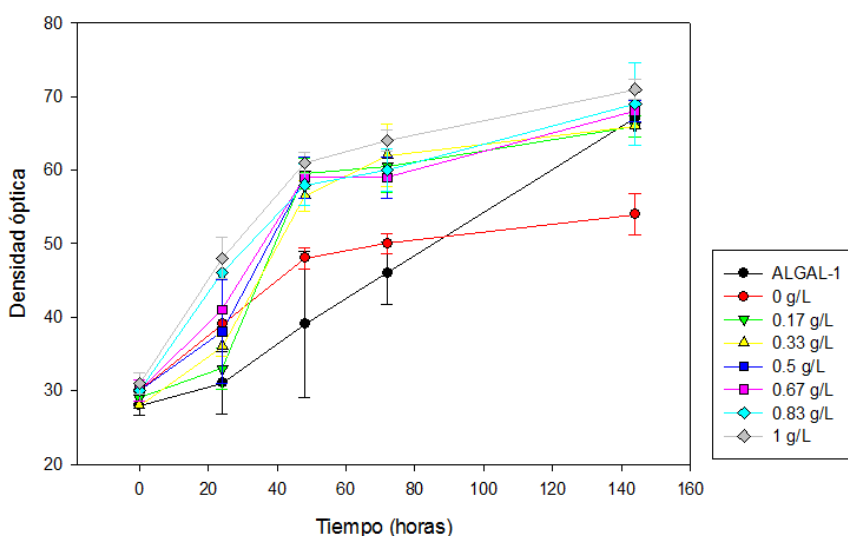


Figura 3. Crecimiento de los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 durante 144 horas (6 días). Los valores representados son la media de las dos réplicas de cada cultivo \pm la desviación estándar.

En todos los cultivos realizados se produjo el crecimiento de la microalga, si bien los cultivos control sin nutrientes solo alcanzaron una densidad celular final de $105 \cdot 10^4 \pm 7,07$ células mL^{-1} , frente a las $243 \cdot 10^4 \pm 24,04$ células mL^{-1} alcanzadas en los cultivos realizados en el medio de referencia Algal-1. Los valores obtenidos en los distintos cultivos con el fertilizante Abono ONE varían entre $218 \cdot 10^4 \pm 25,45$ y $310 \cdot 10^4 \pm 7,07$ células mL^{-1} .

La tasa de crecimiento fue significativamente mayor en todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE con respecto al medio sin nutrientes. A medida que aumenta la concentración de fertilizante, la tasa de crecimiento lo hace también. Sin embargo, no existen diferencias significativas con respecto a los cultivos realizados con el medio de referencia (Algal-1) en los cultivos con concentraciones de fertilizante de 0.17 y 0.33 gL^{-1} . Sólo los cultivos con las concentraciones de fertilizante más altas (0.5, 0.67, 0.83 y 1 gL^{-1}) superaron significativamente la tasa de crecimiento del medio de referencia (Tabla 2)

Tabla 2. Densidades celulares finales y tasas de crecimiento de los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones del fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 tras 144 horas. Los valores representados son la media de las dos réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. El (*) indica diferencias significativas respecto al control sin nutrientes. El (†) indica diferencias significativas respecto al medio de referencia Algal-1.

Cultivo	Densidad celular (144 h)	Tasa de crecimiento (día ⁻¹)
ALGAL-1	$243 \cdot 10^4 \pm 24,04$	$0,336 \pm 0,024$
0 gL^{-1}	$105 \cdot 10^4 \pm 7,07$	$0,134 \pm 0,016$
0.17 gL^{-1}	$218 \cdot 10^4 \pm 25,45$	$0,309 \pm 0,028^*$
0.33 gL^{-1}	$226 \cdot 10^4 \pm 27,57$	$0,319 \pm 0,029^*$
0.5 gL^{-1}	$268 \cdot 10^4 \pm 19,79$	$0,359 \pm 0,028^{*†}$
0.67 gL^{-1}	$284 \cdot 10^4 \pm 50,9$	$0,372 \pm 0,043^{*†}$
0.83 gL^{-1}	$310 \cdot 10^4 \pm 7,07$	$0,394 \pm 0,005^{*†}$
1 gL^{-1}	$300 \cdot 10^4 \pm 7,07$	$0,387 \pm 0,005^{*†}$

4.1.2. Pigmentos

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en pigmentos, tanto por mililitro de cultivo (Figura 4A) como por célula (Figura 4B), mostraron diferencias en función del medio de cultivo utilizado.

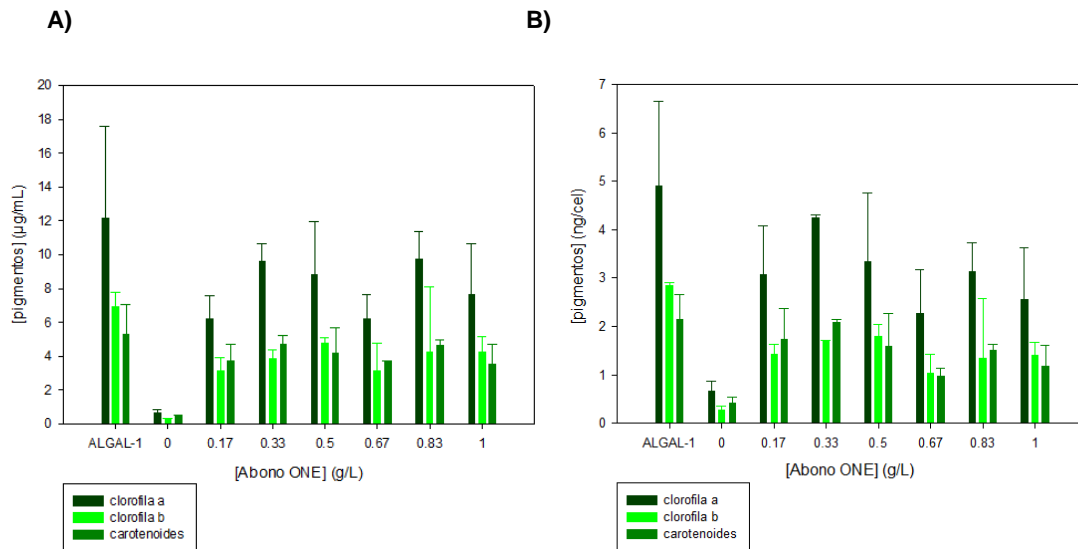


Figura 4: Concentración de pigmentos por mL de cultivo (A) y por célula (B) de los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 tras 144 horas (6 días). Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar.

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de clorofila a significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0) tanto por mL como por célula. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los cultivos realizados con las distintas concentraciones de fertilizante con respecto al medio de referencia. La concentración de clorofila a en el medio sin nutrientes (0) fue de $0,69 \pm 0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,66 \pm 0,21 \text{ ng célula}^{-1}$. Los valores de clorofila a en el medio de referencia fueron de $12,13 \pm 5,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $4,9 \pm 1,75 \text{ ng célula}^{-1}$. La concentración de clorofila a por volumen de cultivo varió entre $6,18 \pm 1,42 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,17 \text{ g L}^{-1}$ y $9,73 \pm 1,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de $0,83 \text{ g L}^{-1}$. La concentración celular de clorofila a varió entre $2,26 \pm 0,91 \text{ ng célula}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,67 \text{ g L}^{-1}$ y $4,25 \pm 0,062 \text{ ng célula}^{-1}$ en los de $0,33 \text{ g L}^{-1}$.

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de clorofila b significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0) tanto por mL como por célula. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los cultivos realizados con las distintas concentraciones de fertilizante con respecto al medio de referencia. La concentración de clorofila b en el medio sin nutrientes fue de $0,29 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,28 \pm 0,07 \text{ ng célula}^{-1}$. Los valores de clorofila b en el medio de referencia fueron de $6,91 \pm 0,87 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $2,84 \pm 0,07 \text{ ng célula}^{-1}$. La concentración de clorofila b por volumen de cultivo varió entre $3,13 \pm 0,82 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,17 \text{ g L}^{-1}$ y $4,79 \pm 0,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de $0,5 \text{ g L}^{-1}$. La concentración celular de clorofila b varió entre $1,04 \pm 0,38 \text{ ng célula}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,67 \text{ g L}^{-1}$ a $1,79 \pm 0,24 \text{ ng célula}^{-1}$ en los de $0,5 \text{ g L}^{-1}$.

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de carotenoides mayor que en ausencia de nutrientes (control 0) tanto por mL como por célula, siendo estas diferencias significativas en los cultivo con las concentraciones de $0,33$ y $0,83 \text{ g L}^{-1}$. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los cultivos realizados con las distintas concentraciones de fertilizante con respecto al medio de referencia.

La concentración de carotenoides en el medio sin nutrientes fue de $0,44 \pm 0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,42 \pm 0,11 \text{ ng célula}^{-1}$. Los valores de carotenoides en el medio de referencia fueron de $5,28 \pm 1,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $2,15 \pm 0,5 \text{ ng célula}^{-1}$. La concentración de carotenoides por volumen de cultivo varió entre $3,69 \pm 0,98 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de 0.17 g L^{-1} y $4,73 \pm 0,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 0.33 g L^{-1} . La concentración celular de carotenoides varió entre $0,97 \pm 0,15 \text{ ng célula}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de 0.67 g L^{-1} y $2,09 \pm 0,04 \text{ ng célula}^{-1}$ en los de 0.33 g L^{-1} .

A partir de los datos de clorofilas se calculó la relación clorofila a/clorofila b en todos los cultivos (Figura 5). La menor relación clorofila a/clorofila b se obtuvo en los cultivos con el medio de referencia Algal-1. En los restantes cultivos, se observa que a medida que aumenta la concentración de fertilizante en el medio existe una tendencia a disminuir la relación clorofila a/clorofila b en los cultivos de *T.suecica*.

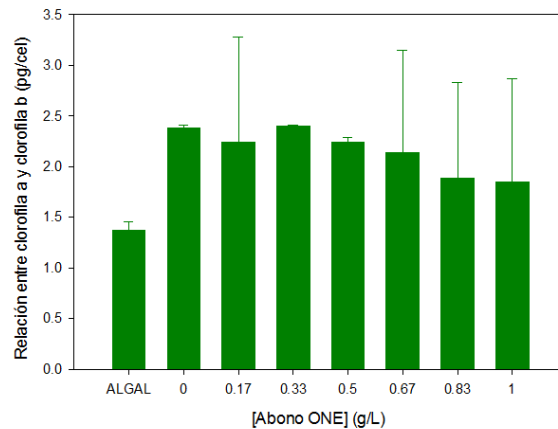


Figura 5: Relación clorofila a / clorofila b en los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 tras 144 horas (6 días). Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar.

4.1.3. Proteínas

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en proteínas se muestran en la Figura 6.

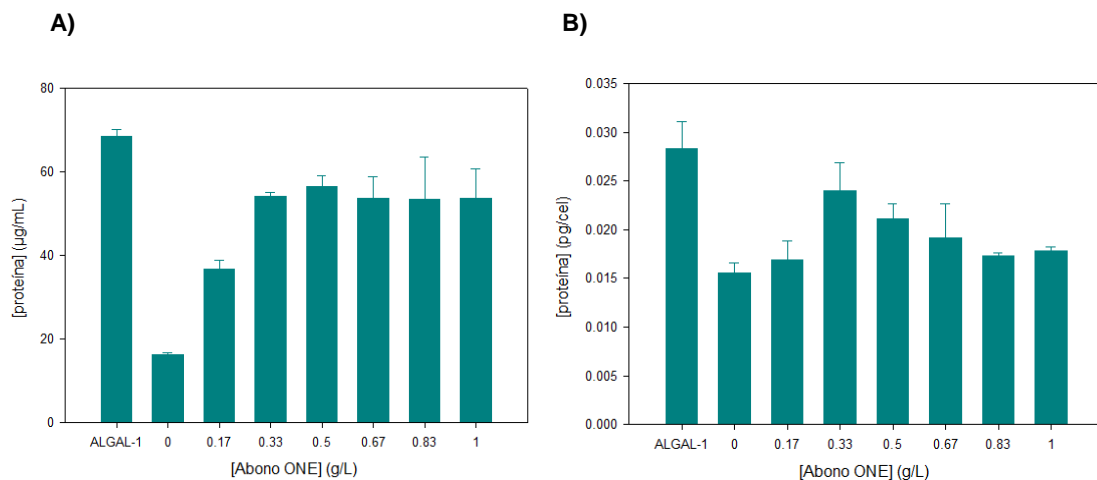


Figura 6: Concentración de proteínas por mL de cultivo (A) y por célula (B) de los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 tras 144 horas (6 días). Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de proteína por volumen de cultivo ($\mu\text{g mL}^{-1}$) significativamente mayor que los cultivos control sin nutrientes. En el caso de la concentración celular de proteína, no hubo diferencias significativas entre los cultivos control sin nutrientes y los cultivos con 0.17 gL^{-1} de fertilizante.

Con respecto al medio de referencia, no existen diferencias significativas en el contenido en proteínas entre este y los cultivos con las concentraciones de fertilizante mayores a 0.17 gL^{-1} . Es decir, que las células de *T.suecica* en los cultivos con concentraciones de fertilizante Abono ONE de $0.33, 0.5, 0.67, 0.83$ y 1 gL^{-1} aumentan significativamente su contenido en proteínas pero este contenido no llega a ser tan alto como el obtenido en cultivos con el medio de referencia Algal-1.

El contenido en proteínas en el medio sin nutrientes fue de $16,26 \pm 0,59 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,015 \pm 0,001 \text{ pg célula}^{-1}$ y en el medio de referencia de $72,15 \pm 2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,029 \pm 0,003 \text{ pg célula}^{-1}$. La concentración de proteínas en los cultivos con las distintas concentraciones de fertilizante varió entre $36,70 \pm 2,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los cultivos con 0.17 gL^{-1} y $56,48 \pm 2,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los cultivos con 0.5 gL^{-1} y entre $0,017 \pm 0,0019 \text{ pg célula}^{-1}$ en los cultivos con 0.17 gL^{-1} y $0,024 \pm 0,003 \text{ pg célula}^{-1}$ para los de 0.33 gL^{-1} .

4.2. Experiencia 2: Cultivo de *Tetraselmis suecica* con el fertilizante Abono Azul Universal NovaTec.

4.2.1. Crecimiento

El crecimiento de *T.suecica* con las distintas concentraciones del fertilizante Abono NovaTec, además del crecimiento de los cultivos control y los cultivos con el medio de referencia (Algal-1) se muestran en la Figura 7.

Las densidades celulares finales y las tasas de crecimiento se muestran en la Tabla 3.

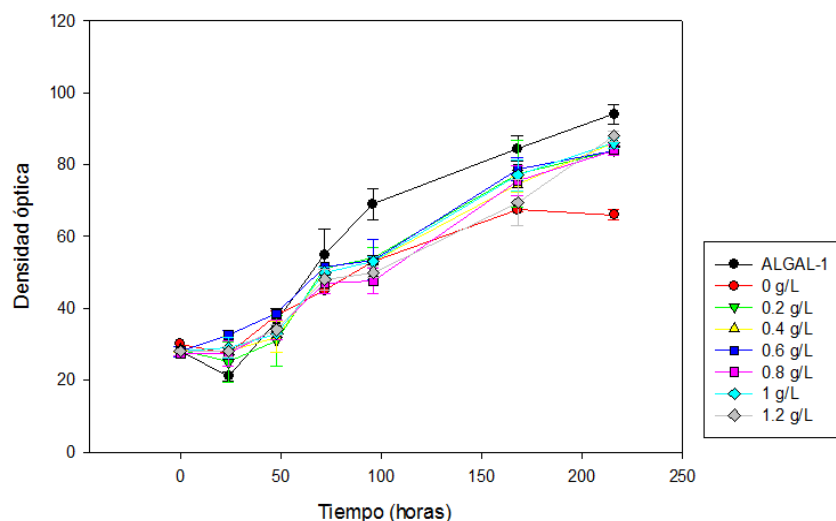


Figura 7. Crecimiento de los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 durante 216 horas (9 días) de exposición. Los valores representados son la media de las dos réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

En todos los cultivos realizados se produjo el crecimiento de la microalga, si bien los cultivos control sin nutrientes solo alcanzaron una densidad celular final de $162 \cdot 10^4 \pm 28.28$ células mL^{-1} , frente a las $945 \cdot 10^4 \pm 38.18$ células mL^{-1} alcanzadas en los cultivos realizados en el medio de referencia. Los valores obtenidos en los distintos cultivos con el fertilizante Abono NovaTec oscilan entre $545 \cdot 10^4 \pm 29$ y $738 \cdot 10^4 \pm 11,31$ células mL^{-1} . Por tanto, en todos los casos la densidad celular final fue significativamente mayor que el 0, aunque ninguno superó al medio de referencia.

La tasa de crecimiento fue significativamente mayor en todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec con respecto al medio sin nutrientes y a medida que aumenta la concentración de fertilizante, la tasa de crecimiento lo hace también. Sin embargo, la tasa de crecimiento para las concentraciones de Abono NovaTec fue significativamente inferior a la tasa de crecimiento del medio de referencia, excepto para la concentración de 1.2 gL^{-1} .

Tabla 3: Densidades celulares finales y tasas de crecimiento de los cultivos de *T. suecica* con diferentes concentraciones del fertilizante Abono NovaTec, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 tras 216 horas. Los valores representados son la media de las dos réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. El (*) indica diferencias significativas respecto al control sin nutrientes. El (†) indica diferencias significativas respecto al medio de referencia Algal-1.

Cultivo	Densidad celular (216 h)	Tasa de crecimiento (día ⁻¹)
ALGAL-1	$945 \cdot 10^4 \pm 38.18$	$0,442 \pm 0,006$
0 gL^{-1}	$162 \cdot 10^4 \pm 28.28$	$0,157 \pm 0,028$
0.2 gL^{-1}	$545 \cdot 10^4 \pm 29$	$0,353 \pm 0,008^{*†}$
0.4 gL^{-1}	$615 \cdot 10^4 \pm 17,67$	$0,373 \pm 0,004^{*†}$
0.6 gL^{-1}	$600 \cdot 10^4 \pm 26,87$	$0,369 \pm 0,007^{*†}$
0.8 gL^{-1}	$607 \cdot 10^4 \pm 88,4$	$0,370 \pm 0,023^{*†}$
1 gL^{-1}	$634 \cdot 10^4 \pm 11,31$	$0,377 \pm 0,003^{*†}$
1.2 gL^{-1}	$738 \cdot 10^4 \pm 11,31$	$0,402 \pm 0,002^*$

4.2.2. Pigmentos

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en pigmentos, tanto por mililitro de cultivo (Figura 8A) como por célula (Figura 8B), mostraron diferencias en función del medio de cultivo utilizado.

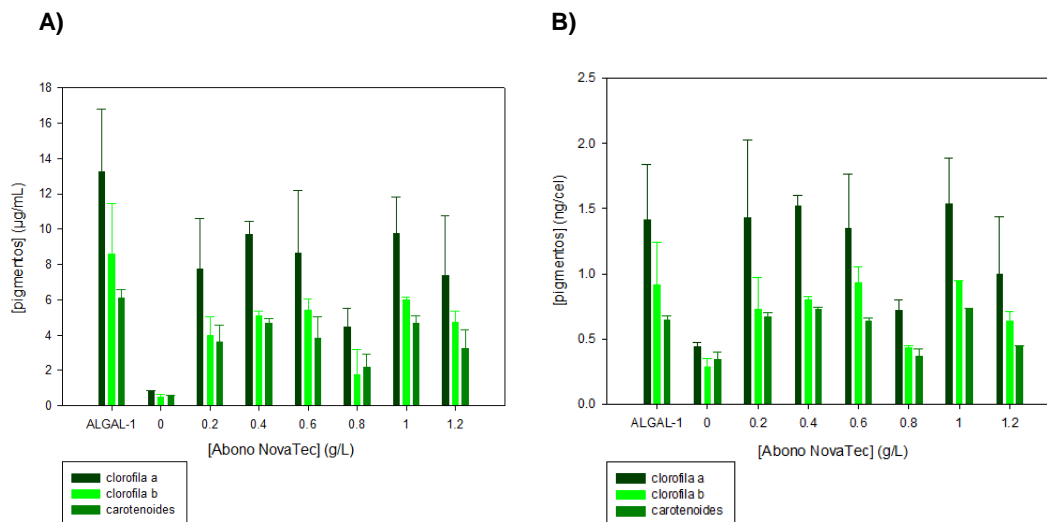


Figura 8: Concentración de pigmentos por mL de cultivo (A) y por célula (B) de los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 tras 216 horas (9 días). Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec presentaron una concentración de clorofila a significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0), tanto por mL como por célula. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los cultivos realizados con las distintas concentraciones de fertilizante con respecto al medio de referencia. La concentración de clorofila a en el medio sin nutrientes fue de $0,80 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,44 \pm 0,03 \text{ ng célula}^{-1}$. Los valores de clorofila a en el medio de referencia fueron de $13,26 \pm 3,51 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1,41 \pm 0,42 \times 10^{-5} \text{ ng célula}^{-1}$. La concentración de clorofila a por volumen de cultivo varió entre $4,46 \pm 1,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ y $9,73 \pm 2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1 g L^{-1} . La concentración celular de clorofila a varió entre $0,72 \pm 0,08 \text{ ng célula}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ y $1,53 \pm 0,35 \text{ ng célula}^{-1}$ en los de 1 g L^{-1} .

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec presentaron una concentración de clorofila b significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los cultivos realizados con las distintas concentraciones de fertilizante con respecto al medio de referencia. La concentración de clorofila b en el medio sin nutrientes fue de $0,48 \pm 0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,29 \pm 0,06 \text{ ng célula}^{-1}$. Los valores de clorofila b en el medio de referencia fueron de $8,58 \pm 2,84 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,91 \pm 0,33 \text{ ng célula}^{-1}$. La concentración de clorofila b por volumen de cultivo varió entre $1,77 \pm 1,42 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ y $6,01 \pm 0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1 g L^{-1} . La concentración celular de clorofila b varió entre $0,43 \pm 0,02 \text{ ng célula}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ y $0,94 \pm 0,01 \text{ ng célula}^{-1}$ en los de 1 g L^{-1} .

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec presentaron una concentración de carotenoides significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0), tanto por mL como por célula. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los cultivos realizados con las distintas concentraciones de fertilizante con respecto al medio de referencia. La concentración de carotenoides en el medio sin nutrientes fue de $0,54 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,34 \pm 0,06 \text{ ng célula}^{-1}$. Los valores de carotenoides en el medio de referencia fueron de $6,12 \pm 0,47$

$\mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,65 \pm 0,02 \text{ ng célula}^{-1}$. La concentración de carotenoides por volumen de cultivo varió entre $2,2 \pm 0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ y $4,65 \pm 0,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1 g L^{-1} . La concentración celular de carotenoides varió entre $0,37 \pm 0,05 \text{ ng célula}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de fertilizante de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ y $0,72 \pm 0,01 \text{ ng célula}^{-1}$ en los de 1 g L^{-1} .

A partir de los datos de clorofilas se calculó la relación clorofila a/clorofila b en todos los cultivos (Figura 9). La menor relación clorofila a/clorofila b se obtuvo en los cultivos con el medio de referencia Algal-1. En los restantes cultivos, se observa que a medida que aumenta la concentración de fertilizante en el medio existe una tendencia a disminuir la relación clorofila a/clorofila b en los cultivos de *T.suecica*.

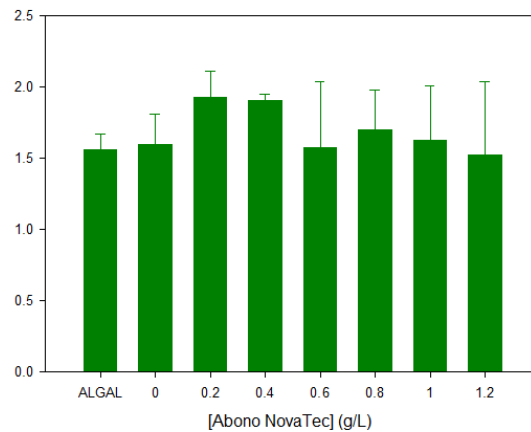


Figura 9: Relación clorofila a/ clorofila b en los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec , cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 tras 216 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar.

4.2.3. Proteínas

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en proteínas se muestran en la Figura 10.

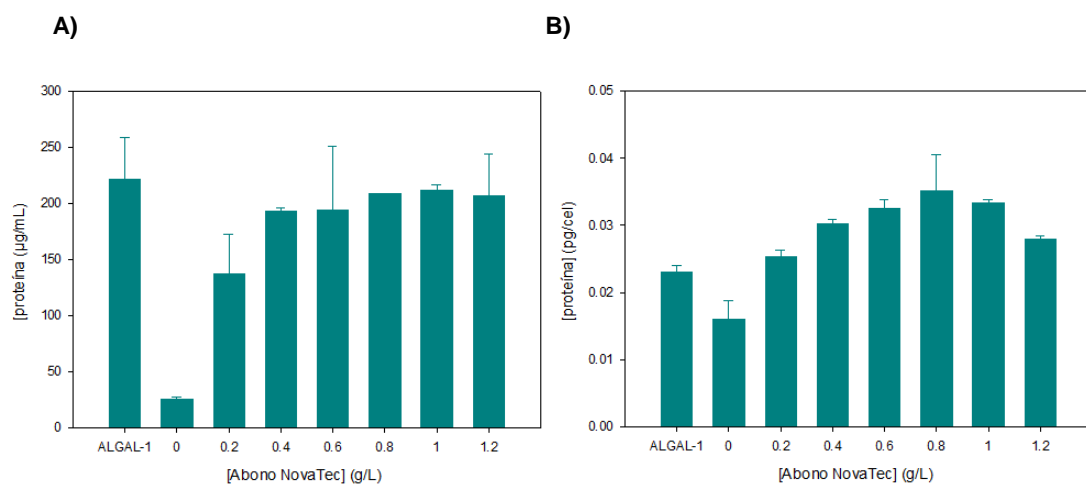


Figura 10: Concentración de proteínas por mL de cultivo (A) y por célula (B) de los cultivos de *T.suecica* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec , cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia Algal-1 tras 216 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec utilizadas presentaron una concentración de proteína por volumen de cultivo ($\mu\text{g mL}^{-1}$) significativamente mayor que los cultivos control sin nutrientes. En el caso de la concentración celular de proteína, no hubo diferencias significativas entre los cultivos control sin nutrientes y los cultivos con 0.2 g L^{-1} de fertilizante.

Con respecto al medio de referencia, no existen diferencias significativas en el contenido en proteínas entre este y los cultivos con las concentraciones de fertilizante mayores a 0.2 g L^{-1} . Es decir, que las células de *T.suecica* en los cultivos con concentraciones de fertilizante Abono NovaTec de $0.4, 0.6, 0.8, 1$ y 1.2 g L^{-1} aumentan significativamente su contenido en proteínas siendo este contenido superior al del medio de referencia cuando nos referimos a concentración proteica celular.

El contenido en proteínas en el medio sin nutrientes fue de $25,72 \pm 1,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,016 \pm 0,003 \text{ pg célula}^{-1}$ y en el medio de referencia de $221,43 \pm 37,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,023 \pm 0,001 \text{ pg célula}^{-1}$.

La concentración de proteínas en los cultivos con las distintas concentraciones de fertilizante varió entre $139,19 \pm 32,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los cultivos de 0.2 g L^{-1} y $211,74 \pm 4,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1 g L^{-1} y $0,025 \pm 0,001 \text{ pg célula}^{-1}$ para los cultivos de 0.2 g L^{-1} y $0,035 \pm 0,005 \text{ pg célula}^{-1}$ en los de 0.8 g L^{-1} .

4.3. Experiencia 3: Cultivo de *Chlorella vulgaris* con el fertilizante Abono Soluble en Agua ONE.

4.3.1. Crecimiento

El crecimiento de *C.vulgaris* con las distintas concentraciones del fertilizante Abono ONE, además del crecimiento de los cultivos control y los cultivos con el medio de referencia (GOLDMEDIUM FWS) se muestran en la Figura 11.

Las tasas de crecimiento se muestran en la Tabla 4.

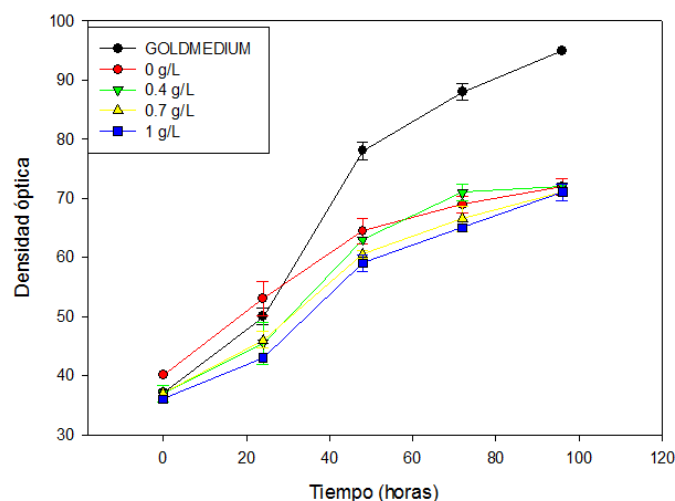


Figura 11. Crecimiento de los cultivos de *C.vulgaris* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM durante 96 horas (4 días) de exposición. Los valores representados son la media de las dos réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

En todos los cultivos realizados se produjo el crecimiento de la microalga.

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los cultivos tratados con las diferentes concentraciones de fertilizante con respecto al medio sin nutrientes (control 0). Con respecto al medio de referencia, estas tasas de crecimiento fueron significativamente inferiores.

Tabla 4. Tasas de crecimiento en base a las absorbancias de los cultivos de *C. vulgaris* expuestos a diferentes concentraciones del fertilizante Abono ONE tras 96 horas. Los valores representados son la media de las dos réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. El (*) indica diferencias significativas respecto al medio de referencia GOLDMEDIUM-FWS.

Cultivo	Tasa de crecimiento (día -1)
GOLDMEDIUM-FWS	0,340\pm0,00
0 gL ⁻¹	0,212\pm0,007
0.4 gL ⁻¹	0,240\pm0,013'
0.7 gL ⁻¹	0,235\pm0'
1 gL ⁻¹	0,234\pm0,006'

4.3.2. Pigmentos

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en pigmentos por mililitro de cultivo (Figura 12), mostraron diferencias en función del medio de cultivo utilizado.

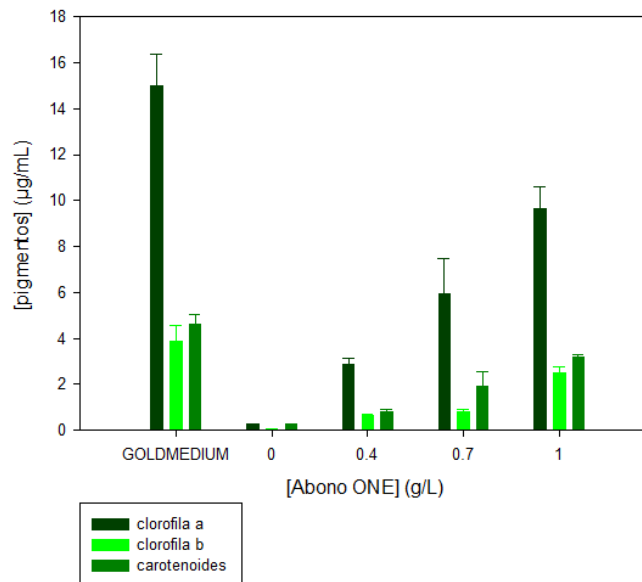


Figura 12: Concentración de pigmentos por mL de cultivo de los cultivos de *C. vulgaris* con diferentes concentraciones del fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM-FWS tras 96 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Los cultivos realizados con las concentraciones más altas (0.7 gL^{-1} y 1 gL^{-1}) de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de clorofila a significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0). Con respecto al medio de referencia, el contenido en clorofila a fue significativamente inferior para todas las concentraciones testadas. La concentración de clorofila a en el medio sin nutrientes fue de $0,28 \pm 0,003 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y en el medio de referencia de $14,97 \pm 1,41 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de clorofila a por volumen de cultivo varió entre $2,86 \pm 0,29 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para los cultivos con una concentración de fertilizante de 0.4 gL^{-1} y $9,64 \pm 0,95 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1 gL^{-1} .

Los cultivos realizados con la concentración más alta (1 gL^{-1}) de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de clorofila b significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0). Con respecto al medio de referencia, el contenido en clorofila b fue significativamente inferior para las concentraciones de fertilizante de $0,4$ y $0,7 \text{ gL}^{-1}$ (las más bajas testadas). La concentración de clorofila b en el medio sin nutrientes fue de $0,03 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y para el medio de referencia de $3,86 \pm 0,70 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de clorofila b por volumen de cultivo varió entre $0,63 \pm 0,06 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para los cultivos con una concentración de fertilizante de 0.4 gL^{-1} y $2,49 \pm 0,24 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1 gL^{-1} .

Los cultivos realizados con las concentraciones más altas (0.7 gL^{-1} y 1 gL^{-1}) de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de carotenoides significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0). Con respecto al medio de referencia, el contenido en carotenoides fue significativamente inferior para la concentración de fertilizante más baja testada (0.4 gL^{-1}). La concentración de carotenoides en el medio sin nutrientes fue de $0,25 \pm 0,002 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y en el medio de referencia de $4,62 \pm 0,41 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de carotenoides por volumen de cultivo varió entre $0,81 \pm 0,11 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para los cultivos con una concentración de fertilizante de 0.4 gL^{-1} y $3,21 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1 gL^{-1} .

A partir de los datos de clorofilas se calculó la relación clorofila a/clorofila b en todos los cultivos (Figura 13). La menor relación clorofila a/clorofila b se obtuvo en los cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM. En los restantes cultivos, se observa que a medida que aumenta la concentración de fertilizante en el medio existe una tendencia a disminuir la relación clorofila a/clorofila b en los cultivos de *C. vulgaris*.

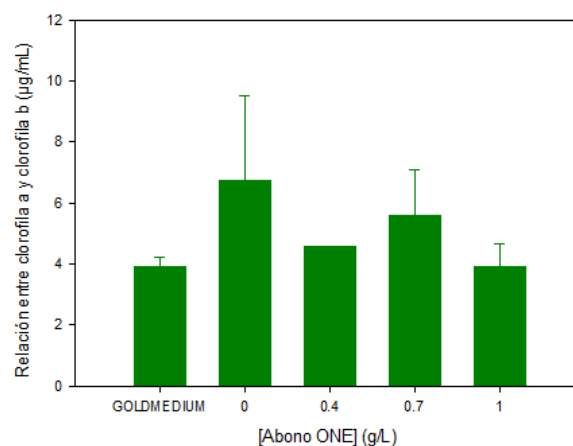


Figura 13: Relación clorofila a/ clorofila b en los cultivos de *C. vulgaris* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM-FWS tras 96 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar.

4.3.3. Proteínas

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en proteínas se muestran en la Figura 14. Cuanto mayor es la concentración de fertilizante en el medio, mayor es la concentración de proteína.

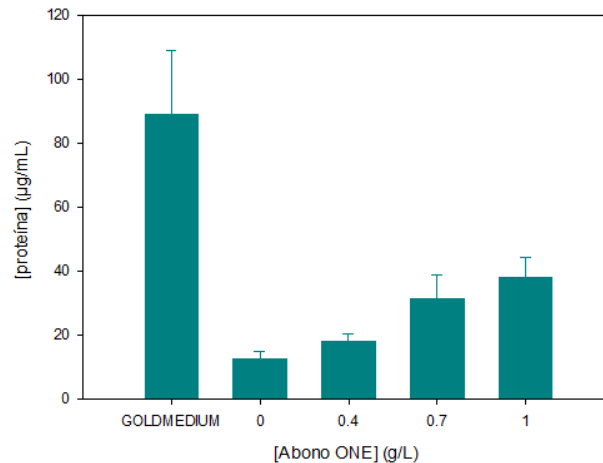


Figura 14: Concentración de proteínas por mL de cultivo de los cultivos de *C.vulgaris* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM-FWS tras 96 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de proteína por volumen de cultivo ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mayor que los cultivos control sin nutrientes pero estas diferencias sólo fueron significativas para la concentración más alta testada (1 g L^{-1}).

Con respecto al medio de referencia, el contenido en proteínas fue significativamente inferior en los cultivos con las diferentes concentraciones de fertilizante usadas. El contenido en proteínas en el medio sin nutrientes fue de $12,39 \pm 2,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ y en el medio de referencia de $89,10 \pm 20,03 \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de proteínas en los cultivos con las distintas concentraciones de fertilizante varió entre $18,04 \pm 2,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ para para los cultivos de 0.4 g L^{-1} y $37,95 \pm 6,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1 g L^{-1} .

4.4. Experiencia 4: Cultivo de *Chlorella vulgaris* con el fertilizante Abono Azul Universal NovaTec.

4.4.1. Crecimiento

El crecimiento de *C.vulgaris* con las distintas concentraciones del fertilizante Abono NovaTec, además del crecimiento de los cultivos control y los cultivos con el medio de referencia (GOLDMEDIUM FWS) se muestran en la Figura 15.

Las tasas de crecimiento se muestran en la Tabla 5.

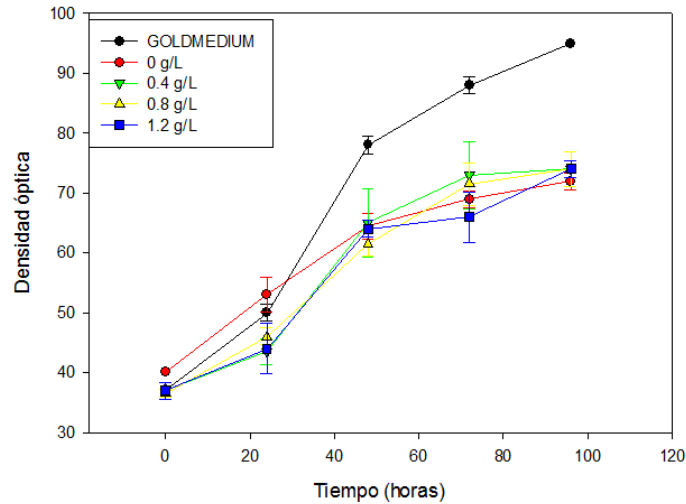


Figura 15. Crecimiento de los cultivos de *C.vulgaris* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM durante 96 horas (4 días) de exposición. Los valores representados son la media de las dos réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

En todos los cultivos realizados se produjo el crecimiento de la microalga.

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los cultivos tratados con las diferentes concentraciones de fertilizante con respecto al medio sin nutrientes (control 0). Con respecto al medio de referencia, estas tasas de crecimiento son significativamente inferiores.

Tabla 5. Tasas de crecimiento en base a las absorbancias de los cultivos de *C. vulgaris* expuestos a diferentes concentraciones del fertilizante Abono NovaTec tras 96 horas. Los valores representados son la media de las dos réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. El (') indica diferencias significativas respecto al medio de referencia GOLDMEDIUM-FWS.

Cultivo	Tasa de crecimiento (día -1)
GOLDMEDIUM-FWS	0,340\pm0,00
0 gL ⁻¹	0,212\pm0,007
0.4 gL ⁻¹	0,250\pm0,0'
0.8 gL ⁻¹	0,235\pm0,007'
1.2 gL ⁻¹	0,238\pm0,006'

4.4.2. Pigmentos

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en pigmentos por mililitro de cultivo (Figura 16), mostraron diferencias en función del medio de cultivo utilizado.

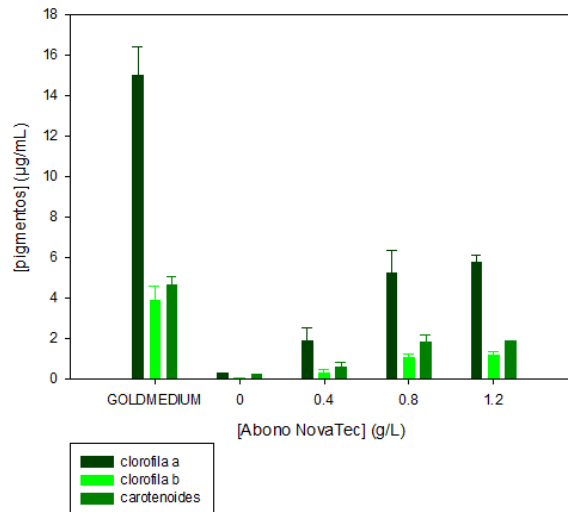


Figura 16: Concentración de pigmentos por mL de cultivo de los cultivos de *C.vulgaris* con diferentes concentraciones del fertilizante Abono NovaTec, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM-FWS tras 96 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Los cultivos realizados con las concentraciones más altas (0.8 gL^{-1} y 1.2 gL^{-1}) de fertilizante Abono ONE presentaron una concentración de clorofila a significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0). Con respecto al medio de referencia, el contenido en clorofila a fue significativamente inferior para todas las concentraciones testadas. La concentración de clorofila a en el medio sin nutrientes fue de $0,28 \pm 0,003 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y en el medio de referencia de $14,97 \pm 1,41 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de clorofila a por volumen de cultivo varió entre $1,9 \pm 0,64 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para los cultivos con una concentración de fertilizante de 0.4 gL^{-1} y $5,78 \pm 0,33 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1.2 gL^{-1} .

Los cultivos realizados con las concentraciones más altas (0.8 gL^{-1} y 1.2 gL^{-1}) de fertilizante Abono NovaTec presentaron una concentración de clorofila b significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0). Con respecto al medio de referencia, el contenido en clorofila a fue significativamente inferior para todas las concentraciones testadas. La concentración de clorofila b en el medio sin nutrientes fue de $0,03 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y para el medio de referencia de $3,86 \pm 0,70 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de clorofila b por volumen de cultivo varió entre $0,31 \pm 0,13 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para los cultivos con una concentración de fertilizante de 0.4 gL^{-1} y $1,17 \pm 0,19 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1.2 gL^{-1} .

Los cultivos realizados con las concentraciones más altas (0.8 gL^{-1} y 1.2 gL^{-1}) de fertilizante Abono Novatec presentaron una concentración de carotenoides significativamente mayor que en ausencia de nutrientes (control 0). Con respecto al medio de referencia, el contenido en carotenoides fue significativamente inferior para todas las concentraciones testadas. La concentración de carotenoides en el medio sin nutrientes fue de $0,25 \pm 0,002 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y en el medio de referencia de $4,62 \pm 0,41 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de carotenoides por volumen de cultivo varió entre $0,61 \pm 0,23 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para los cultivos con una concentración de fertilizante de 0.4 gL^{-1} y $1,89 \pm 0,009 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en los de 1.2 gL^{-1} .

A partir de los datos de clorofilas se calculó la relación clorofila a/clorofila b en todos los cultivos (Figura 17). La menor relación clorofila a/clorofila b se obtuvo en los cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM. En los restantes cultivos, se observa que a medida que aumenta la concentración de fertilizante en el medio existe una tendencia a disminuir la relación clorofila a/clorofila b en los cultivos de *C.vulgaris*.

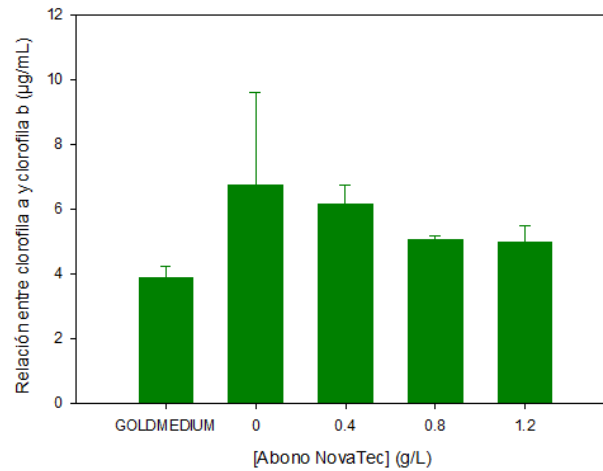


Figura 17: Relación clorofila a/ clorofila b en los cultivos de *C.vulgaris* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM tras 96 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar.

4.4.3. Proteínas

Los resultados obtenidos del contenido en proteínas se muestran en la Figura 18. Como en la experiencia anterior, observamos que cuanto mayor es la concentración de fertilizante en el medio, mayor es la concentración de proteína

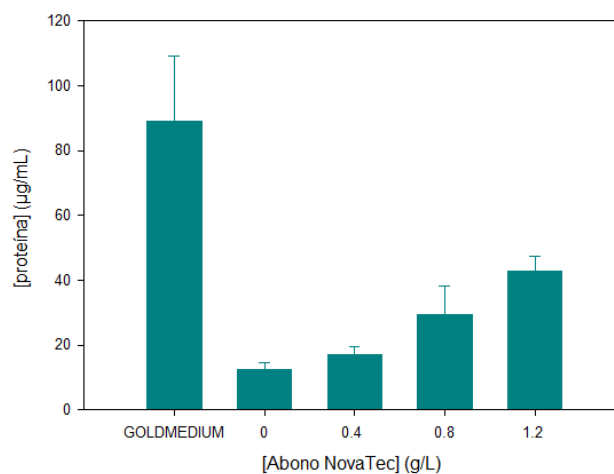


Figura 18: Concentración de proteínas por mL de cultivo de los cultivos de *C.vulgaris* con diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec, cultivos control (0) y cultivos con el medio de referencia GOLDMEDIUM-FWS tras 96 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las dos réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Todos los cultivos realizados con las diferentes concentraciones de fertilizante Abono NovaTec presentaron una concentración de proteína por volumen de cultivo ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mayor que los cultivos control sin nutrientes pero estas diferencias sólo fueron significativas para la concentración más alta testada (1.2 g L^{-1}).

Con respecto al medio de referencia, el contenido en proteínas fue significativamente inferior en los cultivos con las diferentes concentraciones de fertilizante usadas. El contenido en proteínas en el medio sin nutrientes fue de $12,39 \pm 2,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ y en el medio de referencia de $89,10 \pm 20,03 \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de proteínas en los cultivos con las distintas concentraciones de fertilizante varió entre $17,05 \pm 2,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los cultivos de 0.4 g L^{-1} y $42,76 \pm 4,65 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los de 1.2 g L^{-1} .

5. Discusión

Los parámetros óptimos para el crecimiento de las microalgas, así como los rangos tolerados dependen de cada especie. El conocimiento de estos factores posibilita su modulación para conseguir una composición celular determinada y con ello, redirigir el metabolismo del microorganismo hacia la producción del compuesto o proceso deseado (Hu, 2004).

Crecimiento

Algunos autores indican que el crecimiento es el parámetro más sensible dentro de los estudiados (Franklin *et al.*, 2001; Strom *et al.*, 2009), aunque esto depende del organismo, de las condiciones y de los parámetros de estudio.

En las experiencias realizadas con *T.suecica* la tasa de crecimiento aumenta al aumentar la concentración de fertilizante utilizada, superando la obtenida en el medio de referencia con las concentraciones más altas testadas del fertilizante Abono ONE (experiencia 1) y superando significativamente la tasa de crecimiento del medio sin nutrientes.

En estas dos experiencias se encontró que a mayor concentración de fertilizante se presentaba una densidad celular final mayor de la microalga así como una mayor tasa de crecimiento, sin embargo, el ANOVA indicó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Estos resultados se pueden comparar a los obtenidos por Ortiz-Moreno *et al* (2011) quienes utilizaron concentraciones del fertilizante complejo NPK Remital en cultivos de la microalga *Chlorella sorokiniana* y obtuvieron que el uso de altas concentraciones de Remital no mejoró significativamente el crecimiento de la microalga y por tanto, recomiendan el uso de Remital en bajas concentraciones como la mejor opción para la producción masiva de biomasa de *C.sorokiniana*.

Por el contrario, en las experiencias realizadas con *C.vulgaris*, la tasa de crecimiento de los cultivos con diferentes concentraciones de fertilizante no presenta diferencias significativas con respecto al medio sin nutrientes.

La tasa de crecimiento va incrementando a mayor concentración de fertilizante pero se observa que al llegar a cierta concentración de fertilizante ya no hay incremento, esto sugiere que los crecimientos algales óptimos no se obtienen con las mayores cantidades de fertilizante, sino con concentraciones equilibradas. Al igual que en las plantas superiores se busca una concentración adecuada para lograr óptimos resultados: cuando se aplica fertilizante en demasiada cantidad podría ocasionar un efecto tóxico, desperdiciando medio nutritivo; mientras que con concentraciones pequeñas no se lograrían la densidad poblacional adecuada con un buen rendimiento y quizás con poco valor nutritivo (Rodríguez *et al.*, 2007).

Pigmentos

El contenido en pigmentos en las microalgas nos permite conocer su estado fisiológico y los cambios que se dan en este como respuesta al estrés ambiental (Hendry y Price 1993; Masojídek *et al.*, 2000).

En la experiencia realizada con *Tetraselmis suecica* y el Abono ONE, se obtuvo la menor concentración de pigmentos para una concentración de fertilizante de 0.17 gL^{-1} (la más baja testada) pero la mayor concentración de los distintos pigmentos no coincidió para la misma concentración de fertilizante testada (0.33 gL^{-1} para la clorofila a y los carotenoides y 0.5 gL^{-1} para la clorofila b).

En la experiencia realizada con *Tetraselmis suecica* y el Abono NovaTec, se obtuvo la menor concentración de pigmentos para una concentración de fertilizante de 0.8 gL^{-1} , siendo máxima esta para una concentración de 1 gL^{-1} , por lo que no se observó una tendencia clara entre la concentración de fertilizante del medio y la concentración de pigmentos obtenida.

En las experiencias realizadas con *C.vulgaris*, se observó que todos los pigmentos fotosintéticos estudiados presentaron las concentraciones más bajas para la concentración de fertilizante más baja testada, y que esta concentración de pigmentos aumentó al aumentar la concentración de fertilizante en el medio.

En ningún caso se superó la concentración de pigmentos obtenida en el medio de referencia pero si se superó significativamente la del medio sin nutrientes.

Según Edmondson (1957), el enriquecimiento con nutrientes provoca un rápido aumento en las concentraciones de clorofila a, lo cual coincide con los resultados de estas experiencias, donde el contenido de clorofila a fue mayor en todos los casos (por mililitro de cultivo y por célula), seguido de los carotenoides, siendo la clorofila b el pigmento menos abundante.

Las relaciones entre pigmentos permiten determinar distintas características de las células y de su estado fisiológico, como son el envejecimiento o la adaptación al estrés oxidativo (Kobayashi *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1997; Masojídek *et al.*, 2000), por lo que calculamos la relación entre el contenido en clorofila a y clorofila b en los distintos cultivos. Esta relación fue siempre menor en el medio de referencia y existe una tendencia a disminuir cuando aumenta la concentración de fertilizante en el medio.

Proteínas

El contenido en proteínas aumenta al aumentar la concentración de los fertilizantes en el medio en las experiencias realizadas, tanto cuando hablamos de concentración de proteína por ml de cultivo como cuando hablamos de contenido por célula, pero en las dos primeras experiencias, realizadas con *T.suecica*, el contenido en proteínas parece disminuir al llegar a cierta concentración de fertilizante.

Sólo algunas concentraciones de Abono NovaTec generaron en *T.suecica* concentraciones de proteína mayores que el medio de referencia cuando nos referimos al contenido por célula.

6. Conclusiones

- Los datos obtenidos muestran que las diferencias en el crecimiento y contenido en pigmentos y proteínas se deben más al fertilizante utilizado que a la especie de microalga empleada.
- En todos los casos las concentraciones de fertilizante testadas proporcionaron unas tasas de crecimiento y contenido en proteínas y pigmentos fotosintéticos mayores que el medio sin nutrientes, próximas a las obtenidas con el medio de cultivo de referencia y a veces, superiores, variando en función del fertilizante y microalga empleados.
- El uso de estos fertilizantes permite mejorar el rendimiento de la producción de las microalgas estudiadas.
- Sólo las concentraciones más altas empleadas del Abono ONE lograron generar tasas de crecimiento mayores a las obtenidas en el medio de referencia en *T.suecica*.
- Sólo las concentraciones más altas empleadas del Abono NovaTec generaron mayor concentración de proteína que en el medio de referencia en *T.suecica*.
- En las experiencias realizadas con *C.vulgaris* no se superaron los valores obtenidos con el medio convencional en cuanto al crecimiento, proteínas y pigmentos.

Conclusions

- According to the data obtained, differences observed in growth and pigment and protein content are due more to the fertilizer added than to the species of microalgae used.
- Growth rates and protein and photosynthetic pigments content were higher in the cultures with the fertilizer concentrations tested than in the medium without nutrients, and close or even higher than those obtained with the conventional culture media, varying according to the fertilizer and microalga used.
- The use of these fertilizers improves the yield in the the production of microalgae.
- In *T.suecica*, growth rates obtained with the highest concentrations of fertilizer ONE were higher than those obtained in the reference medium.
- In *T.suecica*, higher protein content than that obtained in the reference médium only was achieved with the highest concentrations of NovaTec fertilizer.
- In the experiments with *C.vulgaris*, growth, protein and pigment contents obtained with the two fertilizers assayed were lower than those obtained in the reference medium.

7. Bibliografía

- Berner, T. (1993). Ultrastructural characterization of eukariotic algal groups. En: *Ultrastructure of microalgae*. Berner, T. (Ed.). CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida. pp. 2-6.
- Dodge, J.D. (1973). *The fine structure of algal cells*. Academic Press Inc., New York. 261 pp
- Edmondson, W.T. (1957). Trophicrelations of the zooplankton. *Transactions of the American Microscopical Society*, 76: 225-245.
- Fábregas, J., Otero, A., Dominguez, A. & Patiño, M. (2001). Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Marine biotechnology*, 3(3), 256-263.
- Franklin, N. M., Adams, M. S., Stauber, J. L. & Lim, R. P. (2001). Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 469-480.
- Griffiths, M.J., Garcin, C., Van Hille, R.P. & Harrison, S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85: 119-123.
- Hendry, G. A. F. & Price, A. H. (1993). Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. En *Methods in comparative plant ecology*, L. Chapman & Hall (Ed.), Chapman & Hall, London, UK. pp: 148-152.
- Hosper, H. (1997). *Clearing Lakes: an ecosystem approach to the restoration and management of shallow lakes in the Netherlands*. Ministry of Transport, Public Works and Water Management. Institute of Inland Water Management and Waste Water Treatment (RIZA). Lelystad.
- Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. En *Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology)*. A. Richmond (Ed). Blackwell Publishing, pp: 83-96.
- Jeffrey, S.W., & Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemieund Physiologie der Pflanzen*, 167(2), 191-194.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. & Nagai, S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cell of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 867-873.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N. & Tsuji, Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 94-97.
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, 65: 186-202.
- Masojídek, J., Torzillo, G., Kopecký, J., Koblížek, M., Nidiaci, L., Komenda, J., Lukavská, A. & Sacchi, A. (2000). Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, 12: 417-426.
- Ortiz-Moreno, Martha L., Cortés-Castillo, Carol E., Sánchez-Villaraga, J., Padilla, J. & Otero-Paternina, Angélica M. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11-20.

- Parsons, T. R. & Strickland, J.D.H. (1965). Particulate organic matter. III. I. Pigment analysis. III. II. Determination of phytoplankton pigments. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 18: 117-127.
- Peraza-Díaz, D.M. (1997). Cultivo de la diatomea *Chaetoceros sp.* con tres fertilizantes agrícolas. México. Universidad Autónoma de Sinaloa. *Tesis de técnico en acuicultura*, 24 pp.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C. & Cid, A. (2007). Population growth study of the rotifer *Brachionus sp.* fed with triazine-exposed microalgae. *Aquatic Toxicology*, 83: 247-253.
- Rodríguez, L., Juscamaita, J. & Vargas, J. (2007). Efecto del medio em-bokashi en el cultivo de la microalga Marina *Tetraselmis suecica*. *Ecología Aplicada*, 6(1-2), 111-116.
- Satyanarayana, K. G., Mariano, A. B. & Vargas, J. V. C. (2011). A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, 35 (4): 291-311.
- Shi, X-M., Chen, F., Yuan, J-P., & Chan, H. (1997). Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains. *Journal of Applied Phycology*, 9 (5), 445–450.
- Strom, D., Ralph P. J. & Strauber J. L. (2009). Development of a toxicity identification evaluation protocol using chlorophyll-a fluorescence in a marine microalga. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56: 30-3
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press.
- Zaborsky, RO., Mitsui, A., Clanton, C., Black, Jr (1983). Handbook of biosolar resources. CRC Press Inc, Florida, USA. 657 pp.