

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MIXOTRÓFICA DE LA MICROALGA *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos

Maldonado Evelyn<sup>1</sup>, Morales Ever<sup>2</sup>, Romero Pedro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. <sup>2</sup>Proyecto de Becas PROMETEO-SENESCYT. <sup>3</sup>Departamento de Ciencias de la Vida/Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

## RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la capacidad mixotrófica de la microalga autóctona, *Graesiella emersonii* en presencia de sustratos amiláceos en cultivos discontinuos alimentados, en tres bioensayos. El primero para determinar la concentración adecuada del fertilizante foliar Nitrofoska (0.5, 1 y 3 mL.L<sup>-1</sup>), donde se obtuvo el mayor crecimiento con la concentración 3 mL.L<sup>-1</sup> del fertilizante foliar Nitrofoska con 57,017x10<sup>6</sup> cel.mL<sup>-1</sup>. En el segundo bioensayo se utilizó almidón de arroz, yuca y papa al 1% (p/v) y un control sin adición de almidón. Entre los resultados, se encontró la mayor densidad celular de 38.96x10<sup>6</sup>cel.mL<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ), con el almidón de papa, seguido del control, arroz y yuca con 34.10, 32.75 y 31.55x10<sup>6</sup>cel.mL<sup>-1</sup>; respectivamente. En el tercer bioensayo se determinó el crecimiento, producción de amilasa, clorofila, proteínas y de carbohidratos, utilizando almidones comerciales de yuca, maíz y achira; y extractos obtenidos de papa, yuca, maíz y arroz al 0.5% (p/v), se obtuvo el siguiente orden descendente: 78.76, 71.27, 68.37, 57.01, 56.19, 55.3 y de 51.03x10<sup>6</sup>cel.mL<sup>-1</sup>, con papa ( $p < 0.05$ ), arroz, maíz, yuca, yuca comercial, maíz comercial y control, respectivamente. La mayor actividad de amilasa, de 2,167cm se produjo con maíz. La condición mixotrófica no incrementó el contenido de clorofila, respecto al control autotrófico. El contenido de proteínas incrementó con papa, maíz, yuca y achira en un 3.8, 3.76, 3.54 y 3%; respectivamente; y el control sólo con 1.57%. Los carbohidratos también aumentaron con extracto de yuca y achira, con 3.11 y 2.36; en relación al 1.45% del control. Estos resultados demostraron que, la microalga *Graesiella emersonii* presenta capacidad mixotrófica de crecimiento y producción de proteínas, carbohidratos y actividad de amilasa, en presencia de sustratos amiláceos y en cultivos discontinuos alimentados.

**Palabras clave:** Mixotrófico, microalga, sustrato amiláceo, cultivo discontinuo alimentado, *Graesiella emersonii*.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos presentan ventajas de reproducirse en condiciones autotróficas, mixotróficas y en muchos casos heterotróficas

(García, 1988); ya que poseen la capacidad de utilizar diferentes sustratos orgánicos como fuente de carbono y de energía, además de CO<sub>2</sub> y agua (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993b).

Además las microalgas poseen un elevado contenido de proteínas, de pigmentos y un metabolismo versátil. Por lo que, su composición bioquímica puede modificarse variando las condiciones de cultivo como temperatura, intensidad luminosa, fotoperiodo, pH, salinidad y edad del cultivo (García, 1988), siendo de gran interés para la producción de compuestos de utilidad comercial, alimentaria, agrícola y farmacológica (Fábregas *et al.*, 1998).

Con el objetivo de mejorar el costo-beneficio de la producción industrial, diversas microalgas presentan capacidad de ser cultivadas con sustratos orgánicos tales como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, derivados agrícolas o de origen animal, aguas residuales como fuentes de carbono. La utilización simultánea de luz y sustrato orgánico en el crecimiento demuestra la capacidad mixotrófica de las microalgas (Fábregas *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2008). Los cultivos mixotróficos pueden producir una alta cantidad de biomasa en comparación con los obtenidos en autotrofia y heterotrofia, y esto es debido a posible efecto de la energía de la luz y el sustrato orgánico. Por tanto, la atención mundial se ha vuelto hacia el uso de materiales orgánicos de diversos orígenes como son los recursos excedentes agrícolas (Camargo & Alonso, 2006).

Es así como, los sustratos de origen vegetal representan fuentes alternativas en el diseño de medios de cultivo para microalgas con capacidad de crecimiento mixotrófico o heterotrófico (Fábregas *et al.*, 1998). Algunos de los derivados de origen vegetal como el almidón de papa, yuca, maíz, y otros, pueden ser utilizados como medios de cultivo enriquecidos a partir de fuentes naturales de almidón para el crecimiento y producción de metabolitos, principalmente del grupo de enzimas de la  $\alpha$ -amilasa (Morales, 1996).

Es por ello que el uso de sustratos amiláceos, los cuales en muchos casos constituyen parte de residuales productos de las cosechas, pueden ser utilizados como fuente de compuestos orgánicos para economizar costos de producción de biomasa microalgal enriquecida con proteínas, lípidos o carbohidratos y de otros compuestos de interés económico en comparación al uso de medios de cultivos costosos o de fertilizantes comerciales. De tal manera que, en Ecuador puede resultar de suma importancia la producción de microalgas en condiciones mixotróficas con derivados agrícolas ricos en almidones, que generalmente son descartados; y a la vez reducir los costos por consumo de energía eléctrica y uso de nutrientes inorgánicos.

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del medio de cultivo orgánico con sustratos amiláceos sobre el crecimiento y composición bioquímica de la microalga en condiciones mixotróficas, para la producción de biomasa microalgal con mayor calidad nutricional y de enzimas amilolíticas de interés económico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de la microalga asociada a una planta ornamental fue aislada en el laboratorio y evaluada para confirmar su ubicación taxonómica.

Se realizaron 3 ensayos, el primero para determinar la concentración adecuada del fertilizante foliar Nitrofoska, y en los otros dos se evaluó el efecto de sustratos amiláceos de yuca, papa, maíz, arroz y achira, sobre el crecimiento de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados.

### Ensayo 1

Se utilizaron 9 frascos de vidrio con 250 ml de agua destilada autoclavada y se añadió el fertilizante comercial Nitrofoska foliar  $0.5\text{ml.L}^{-1}$ ,  $1\text{ml.L}^{-1}$  y  $3\text{ml.L}^{-1}$  con un inóculo de  $2 \times 10^6$  células/ml, a un flujo fotónico de  $115 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ,  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, fotoperiodo 12:12h y agitación constante. Se determinó la cinética de crecimiento mediante densidad celular en la cámara de Neubauer realizando recuento cada 3 y 4 días, durante 42 días.

### Ensayo 2

Se prepararon 12 frascos cada uno con 250 ml de medio de cultivo Nitrofoska (NF) a 3 ml/L y un inóculo de  $2 \times 10^6$  células/ml, de los cuales 3 fueron controles (solo NF), 3 con 1% de almidón de arroz, 3 con 1% de almidón de yuca y 3 con 1% de almidón de papa. Se utilizaron las mismas condiciones ambientales que el ensayo 1. Cada 7 días se colocó 1% (v/v) de almidón a cada frasco. Mientras que la cinética de crecimiento se determinó cada 3 y 4 días mediante recuento celular en cámara de Neubauer, durante 37 días.

### Ensayo 3

Se determinó el crecimiento, producción de amilasa, clorofila, proteínas y de carbohidratos en *Graesiella emersonii* utilizando almidones comerciales de yuca, maíz y achira; y extractos obtenidos de papa, yuca, maíz y arroz 0.5% (p/v).

- Crecimiento

Se utilizaron 24 frascos de 1000 ml de capacidad con 250 ml de medio de cultivo Nitrofoska 3 ml/L, un inóculo de  $2 \times 10^6$  células/ml y una concentración del 0.5% de 7 fuentes de almidón diferentes para cada frasco con tres repeticiones cada una. El control correspondió al cultivo con solo el fertilizante comercial Nitrofoska a 3 ml/L. Se mantuvieron las mismas condiciones ambientales que el ensayo 1.

Cada 7 días se colocó 0.5% de almidón a cada cultivo y se realizó recuento celular cada 3 o 4 días en cámara de Neubauer, durante 39 días.

- Clorofila

Se extrajo 2 mL de cultivo para cada uno de los tratamientos, se centrifugó por 15 minutos a 5500 RPM. El sobrenadante se desechó y se colocó 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al pellet, las muestras se resuspendieron y se guardaron por 24 h a 4°C. Para la medición las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 5500 RPM y el sobrenadante se colocó en una celda para espectrofotómetro. Los valores de absorbancia (DO) son 665 nm para clorofila a y 649 nm para clorofila b. La concentración de clorofila a y b se determinó a partir de las ecuaciones propuestas Wellburn, A. (1994).

- Amilasas

Se preparó placas de agar al 1.5% con almidón al 1%, se les hondaron 5 pozos a cada placa y se inocularon las muestras de cada cultivo de microalgas a examinar. Luego se mantuvieron a un flujo fotónico de  $96 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  durante 3 días. A fin de revelar presencia de actividad amilasa, se procedió a rociar toda la superficie del agar con una solución de lugol La hidrólisis del almidón se manifestó por la aparición de un halo claro alrededor del pozo de crecimiento, mientras que el resto de la placa se tiñó de color azul oscuro, como signo de ausencia

de la actividad amilasa (Rodríguez, 2010).

- Proteínas y carbohidratos

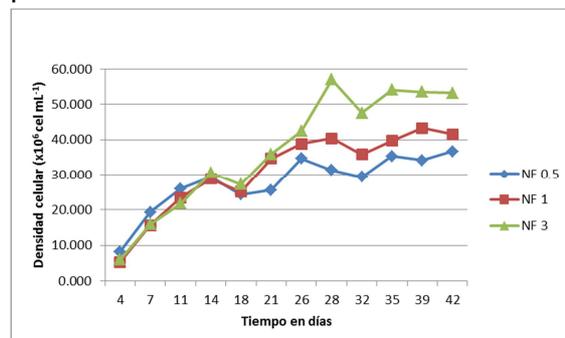
Para proteínas Se utilizó la metodología descrita por Lowry, Rosenbrough, Farr, & Randall (1951) y el método colorimétrico de Wiener Lab.

Para carbohidratos se utilizó el método de Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith (1956).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo 1

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, donde se obtuvo un valor de significancia  $p < 0.0001$ . En la figura 1 se presenta la curva de crecimiento para cada concentración de Nitrofoska.



**Figura 1:** Curva de crecimiento ( $\times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ) en función de la concentración de Nitrofoska (0.5, 1, 3  $\text{mL.L}^{-1}$ )

Los resultados obtenidos indicaron que la microalga obtuvo el mayor crecimiento con la concentración  $3\text{mL.L}^{-1}$  del fertilizante foliar Nitrofoska con  $57,017 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ .

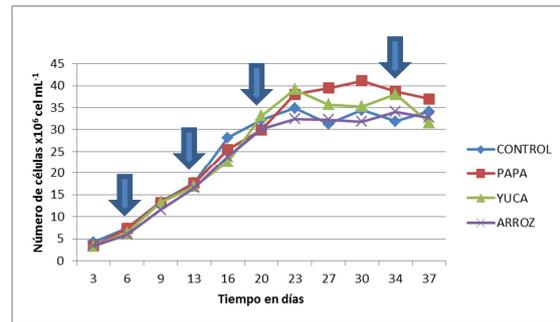
Los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de microalgas son nitrógeno, fósforo, magnesio,

manganeso, potasio, hierro, zinc, sodio, boro, entre otros (Richmond, 2004); y de acuerdo a las proporciones atómicas N:P óptimas para microalgas de agua dulce; el cual es de 6-10:1 (Wang *et al.*, 2009), el fertilizante agrícola Nitrofoska foliar se encuentra dentro de este rango (Portilla, 2010).

En la investigación realizada por Portilla (2010) se determinó que la densidad celular máxima de *Chlorella* sp. a una concentración de 1mL.L<sup>-1</sup> de fertilizante Nitrofoska foliar fue de  $4.392 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ . Al igual que Brito *et al.* (2006) determinó densidad celular máxima de *Chlorella vulgaris* con una concentración de 0.4 mL.L<sup>-1</sup> del medio Nitrofoska fue de  $3.45 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ . Con lo que se demuestra que los resultados obtenidos con *Chlorella emersonii* son mayores que los obtenidos en esas investigaciones. En los datos obtenidos se observa que mientras mayor es la concentración del fertilizante mayor es la concentración celular; aun cuando en algunos casos puede haber inhibición a elevadas concentraciones de estos fertilizantes.

## Ensayo 2

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, y se obtuvo un valor de significancia  $p = 0.0001$ . En la figura 2 se presenta la curva de crecimiento para cada medio almidón al 1%, donde las flechas indican la adición de 1% de almidón (cultivo discontinuo alimentado).



**Figura 2:** Curva de crecimiento ( $\times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ) de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con almidón al 1% (control, papa, yuca, arroz)

La microalga exhibió el mayor crecimiento, de  $41.134 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$  con almidón de papa ( $p < 0,05$ ), seguido del obtenido con yuca, control y arroz con 39.184, 34.905 y  $34.081 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ; respectivamente.

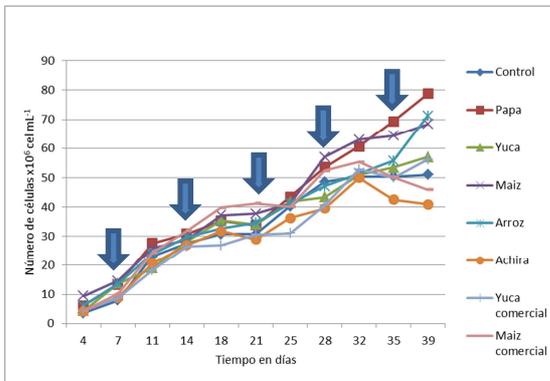
En estudios anteriores (Fábregas *et al.*, 1996a) (Fábregas *et al.*, 1996b) realizados con cultivos mixotróficos con derivados agrícolas, el extracto soluble de papa ha demostrado ser una excelente fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas por su alto contenido de aminoácidos, amonio, nitrato, fosfato y carbono.

La densidad de células más elevada fue causada por un suministro adecuado de nutrientes. Estos resultados también sugieren que *Graesiella* (*Chlorella*) *emersonii* fue capaz de utilizar los extractos solubles como fuente de carbono, nitrógeno y fosfato (Fábregas *et al.*, 1997).

### Ensayo 3

- Crecimiento

Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, y obtuvo un valor de significancia  $p < 0.0001$ . En la figura 3 se presenta la curva de crecimiento para cada medio de cultivo con almidón al 0.5%, donde las flechas indican la adición de 0.5% de almidón (cultivo discontinuo alimentado).



**Figura 3:** Curva de crecimiento ( $\times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ ) de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con almidón al 0.5% (control, papa, yuca, maíz, arroz, achira, yuca comercial, maíz comercial). Las flechas indican el tiempo al cual fueron añadidos los extractos amiláceos correspondientes a cada tratamiento.

La microalga produjo altas densidades celulares en el siguiente orden: 78.76, 71.27, 68.37, 57.01, 56.19, 55.3 y de  $51,03 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$  con papa ( $p < 0,05$ ), arroz, maíz, yuca, yuca comercial, maíz comercial y control; respectivamente.

Comparando los resultados obtenidos de los extractos de papa, yuca y arroz al 0.5% con los reportados anteriormente al 1%, sugieren que la inducción de diferente concentración

de los extractos afecta el crecimiento microalgal (Wang *et al.*, 2009), ya que se obtuvieron mayores densidades celulares.

El crecimiento mixotrófico de *Chlorella emersonii* puede ser influenciado por la disponibilidad y calidad de los nutrientes empleados (Ortiz *et al.*, 2011), como fuentes de nitrógeno y de fosfato orgánicos e inorgánicos, y también otros nutrientes en los extractos solubles y almidones comerciales utilizados en presencia de  $\text{CO}_2$ . Ya que si se emplean sustancias fácilmente metabolizables por la microalga, y en el control autotrófico bajos niveles de nitrógeno y fósforo en consecuencia el crecimiento será favorecido en el medio de cultivo mixotrófico (Xu *et al.*, 2006) (Kumar *et al.*, 2010).

En general, en cultivos mixotróficos donde el cultivo es provisto de luz y una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo orgánico, se obtienen concentraciones celulares y velocidades de crecimiento mucho más altas que en cultivos autotróficos (Yang *et al.*, 2000).

- Clorofila

Para el día 25 se realizó un análisis de varianza, donde se obtuvo un valor de significancia  $p = 0.0269$ . Siendo el más adecuado el cultivo control con una media igual a 29.44, seguido del maíz comercial con 28.6.

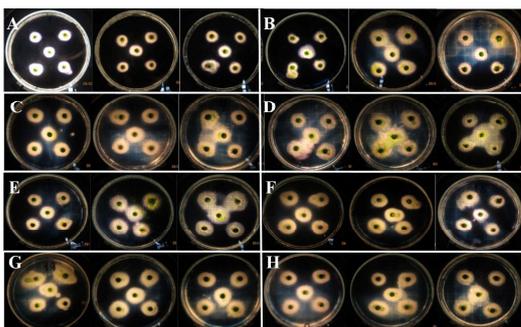
Para el día 32 se aplicó estadística no paramétrica, donde se obtuvo un valor

de significancia de  $p = 0.6000$ ; lo que indica que no existe diferencia significativa entre tratamientos.

La producción de clorofila *a* va a depender directamente de la asimilación de nitrógeno (Lehninger, 2005) y de otros nutrientes esenciales como el hierro y el magnesio. De esta manera, la síntesis y acumulación de clorofila puede ser inhibida por la deficiencia de hierro, nitrógeno y magnesio al igual que por la alta intensidad luminosa y abundancia de carbono orgánico en el medio (Abalde *et al.*, 1995). Por lo tanto los bajos valores de clorofila total encontrados en este estudio podrían atribuirse a algunos de estos factores.

- Amilasas

Luego de la tinción con lugol (figura 4) se midieron los halos y con los datos obtenidos se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, donde se obtuvo un valor de significancia  $p = 0.001$ .



**Figura 4:** Presencia de amilasa en muestras de cultivo de la microalga *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con diferentes extractos amiláceos en medio sólido. A) Control, B) Papa, C) Yuca, D) Maíz, E) Arroz, F) Achira, G) Yuca comercial, H) Maíz comercial (Maldonado, 2013).

El mayor halo de actividad de amilasa, de 2,167 cm se produjo con maíz y el menor de 1,58 cm en el control.

Rodríguez (2010) reportó halos de amilasa para *Chlorella* para 3 cepas diferentes: *Chlorella sp 1* con 2.11 cm; *Chlorella sp 2* con 6.9 cm y *Chlorella sp 3* con 1.35 cm. Debido al crecimiento fúngico obtenido en las cajas Petri, no se puede asegurar que la expresión de amilasa sea por actividad intrínseca de la microalga, ya que pudo ser por su flora bacteriana asociada, debido a que cultivos mixotróficos de microorganismos fotosintéticos no axénicos, el crecimiento de la flora bacteriana asociada se estimula por la fuente alternativa de carbono en el medio, en este caso los sustratos amiláceos. Por lo que, se establece una competencia interespecífica entre ambos organismos (Ortega *et al.*, 2004).

- Proteínas y carbohidratos

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 1:** Contenido de proteínas y carbohidratos según cada fuente de almidón.

Fuente de Almidón	% Proteínas	% Carbohidratos
Control	1.57	1.45
Papa	3.80	0.84
Yuca	3.54	3.11
Maíz	3.76	1.08
Arroz	1.00	0.78
Achira	3.00	2.36
Yuca Comercial	1.49	0.87
Maíz Comercial	1.02	0.88

El valor nutricional de cualquier especie de microalga depende del tamaño de la célula, digestibilidad, producción de componentes tóxicos y la composición bioquímica (Toro, 1989).

Erazo *et al.* (1989) indican que un bajo contenido de proteínas puede ser atribuido a una deficiencia de nutrientes, específicamente nitratos. En cuanto a los resultados de carbohidratos, Morris *et al.* (1983) indican cambios en el contenido de hidratos de carbono, lípidos y proteínas de fitoplancton cuando existe una limitación de nutrientes.

## CONCLUSIONES

- El fertilizante comercial Nitrofoska con la concentración 3mL.L<sup>-1</sup> obtuvo la densidad celular máxima con  $57.017 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ , en relación con las concentraciones 0.5 mL.L<sup>-1</sup> y 1 mL.L<sup>-1</sup> ( $p < 0.0001$ ).
- Los medios de cultivo enriquecidos con extracto solubles al 1% (v/v) indicaron que se produce la densidad celular máxima con extracto soluble de papa y yuca en relación con el control autotrófico.
- Una óptima concentración de sustancias orgánicas es importante para el cultivo microalgal, por lo que se probó condiciones mixotróficas con sustratos amiláceos provenientes de origen vegetal y

comercial a 0.5% obteniendo mayores densidades celulares.

- La microalga *Graesiella emersonii* demostró actividad amilasa en presencia de sustratos amiláceos.
- La síntesis de clorofila en presencia de los sustratos amiláceos utilizados, no es disminuida de una manera significativa.
- La concentración de proteínas y carbohidratos obtenida con cultivos mixotróficos fue superior a la obtenida con el cultivo autotrófico.
- Se demuestra que la microalga *Chlorella emersonii* es capaz de crecer mixotróficamente en cultivos discontinuos alimentados con sustratos amiláceos, para la producción de biomasa microalgal enriquecida con proteínas y con actividad de amilasas extracelulares.

## BIBLIOGRAFÍA

Abalde, A., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., & Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad de Da Coruña.

Brito, D., Milani, N., Pereira, G., González, M., & Morán, R. (Diciembre de 2006). Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska. Venezuela.

- Camargo, J., & Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32: 831-849.
- Erazo, S., Prosa, P., Viani, M., & Muller, K. (1989). Estudio de la biomasa y de los pigmentos carotenoides en una especie nativa de la microalga *Dunaliella salina* sp. *Rev. Agroquím. Tecnología de Alimentos*, 29(4): 538-547.
- Fábregas, J., Morales, E., Arán, J., & Otero, A. (1998). Germinated *Solanum tuberosum* an agricultural product for marine microalgae culture. *Biores Technol*, 66:19-24.
- Fábregas, J., Morales, E., García, D., Cabezas, B., & Otero, A. (1997a). The soluble fraction of *Solanum tuberosum* enhances growth and pigmentation of the microalga *Tetraselmis suecica* under Photoheterotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 263-266.
- Fábregas, J., Morales, E., Polanco, N., Patiño, M., & Otero, A. (1996a). Soluble fractions of *Solanum tuberosum* enhance cell and pigment production of semi-continuous cultures of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Microbiology*, 23: 223-226.
- Fábregas, J., Morales, E., Polanco, N., Patiño, M., Otero, A., & Tobar, J. (1996b). Use of agricultural surpluses for production of biomass by marine microalgae. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12:47-49.
- García, D. (1988). Productos biotecnológicos de microalgas marinas. Tesis Doctoral. Universidad Santiago de Compostela. España, pp 181.
- Lehninger, A. (2005). Principios de Bioquímica. 4ta ed. 1119 pp. Barcelona, España: Ediciones Omega.
- Morales, E. (1996). Productos agrícolas para el cultivo de microalgas marinas. España: Tesis Doctoral, Universidad Santiago de Compostela.
- Morris, H., Quintana, M., Almarales, A., & Hernández, L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, 13(2): 123-128.
- Ortega, J., Moronta, R., & Morales, E. (2004). Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. *Ciencia*, 12:25-31.
- Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., Padilla, J., & Otero, A. (2011). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. Villavicencio, Meta, Colombia.
- Portilla, A. (2010). Evaluación del rendimiento de producción de aceite en cuatro Microalgas nativas de las

Provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de luminancia y de medio de cultivo a nivel de laboratorio. Sangolquí, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.

Rodríguez, S. (Julio de 2010). Evaluación de microalgas y de bacterias asociadas productoras de exoenzimas para tratamiento de aguas residuales de una extractora de aceite de palma. Maracaibo, Venezuela.

Sánchez, H., Juscamaita, J., Vargas, J., & Oliveros, R. (10 de Julio de 2008). Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. Lima.

Tandeau de Marsac, N., & Houmard, J. (1993b). Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. *Methods Enzymol*, 167:318-328.

Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Liu, Y., & Wang, Y. (2009). Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. USA: Springer Science.

Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126:499-507.

Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mmixotrophic and cyclic light-autotrophic/darkheterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.*, 6:87-102.