

Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela

Roberta Mora, Reyna Moronta, José Ortega y Ever Morales*

Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

Resumen

El estudio taxonómico, fisiológico y ecológico de microalgas aisladas de represas es de sumo interés para determinar su utilización como bioindicadores de calidad de aguas, su potencial nutricional y producción de sustancias de interés comercial. En este trabajo se evaluó la influencia de la intensidad luminosa (20, 39, 59, 78 y 118 $\mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$), temperatura (25, 30 y 35°C), salinidad (15, 25 y 35‰) y pH (6,0; 7,0; 8,0; y 9,0) sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp., aislada de la represa de Tulé, Estado Zulia, Venezuela. Los experimentos se realizaron por triplicado, con un fotoperíodo 12:12h, aireación continua y durante 30-45 días. El crecimiento se determinó mediante recuento celular, el contenido de pigmentos mediante espectrofotometría y el análisis químico del agua utilizada para los nutrientes por métodos estándares. La microalga alcanzó la mayor densidad celular en cultivos no salinos, pero con una disminución significativa a salinidades superiores del 15‰. El crecimiento es favorecido a pH 8,0 y 9,0, con densidades celulares de $348,57\pm 51,47$ y $339,88\pm 35,45\times 10^6$ cel/mL, respectivamente, con diferencia significativa ($P<0,05$) respecto al control. El contenido de clorofila $1,58\pm 0,10$ pg/cel y de carotenoides $0,38\pm 0,45$ pg/cel no varió con el pH. El crecimiento de la microalga fue dos veces superior con agua potable con relación al obtenido con agua destilada. La producción de biomasa se optimiza con el uso de agua potable enriquecida con nutrientes, a un pH entre 8,0 y 9,0, 30°C y a 59 $\mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$.

Palabras clave: *Chlorella*; crecimiento; microalga; pigmentos.

Growth and pigment Production of the microalgae native *Chlorella* sp. isolated from Tulé Reservoir Municipio Mara, State of Zulia

Abstract

The taxonomic, physiological, ecological study of microalgae isolated from reservoirs constitutes important purpose to determine their utilization as bioindicators of the quality of water, as well as evaluate their potential as food and production of compounds of commercial interest. We evaluated the influence of light intensity (20, 39, 59, 78 and 118 $\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$), temperature (25, 30, and 35°C), salinity (15, 25, and 35‰) and pH (6.0; 7.0; 8.0 and 9.0) on growth and pigment of the microalga *Chlorella* sp. isolated from Tulé Reservoir, State of Zulia, Venezuela. Experiments were carried out by triplicate with light: dark cycle of 12:12 h, constant aeration, 30-35°C, during 30-45 days. The growth was determined by cell count and the pigment content by spectrophotometry and chemical analysis of water for nutrients by Standard Methods. The microalga reached the highest cell density in non saline cultures, but with a significant decrease at salinities over 15 ‰. The growth is favored at pH 8.0 and 9.0, with cell densities of 348.57 ± 51.47 and $339.88\pm 35.45\times 10^6$ cell/mL, respectively, with significant differences respect to control. The chlorophyll content of 1.58 ± 0.10 pg/cel and carotenoids of 0.38 ± 0.45 pg/cel didn't vary with pH. The growth of the microalga was twofold higher with tap water as compared

with distilled water. Biomass production is optimized by using of tap water enriched with nutrients, at pH 8.0 and 9.0, 30°C and 59 mol quanta/m².s.

Key words: Chlorella; growth; Microalga; pigment.

Recibido: 10-09-02 Aceptado: 30-04-04

Introducción

Las microalgas han sido utilizadas durante mucho tiempo para la alimentación humana y animal. En las recientes décadas, han sido cultivadas para la producción de proteínas, vitaminas y otros suplementos nutritivos. Así como, para el tratamiento de aguas residuales, calidad de aguas o como biofertilizantes (1-5).

El cultivo de microalgas se ha incrementado por ser potencialmente fuente de proteínas, ácidos grasos insaturados, vitaminas, minerales, pigmentos, enzimas, aceites esenciales, antibióticos y otros metabolitos biológicamente activos (6-9).

La variación de las condiciones de cultivo, tales como el tipo y concentración de nutrientes, temperatura, intensidad luminosa, fotoperíodo, régimen de cosecha de cultivos discontinuos, continuos o semicontínuos, manipulación genética, etc. (10-13) ha contribuido a establecer sistemas dirigidos hacia la obtención de biomasa microalgal enriquecida (14).

Las algas de agua dulce pueden ser un suplemento dietético potencial y actualmente pueden ser uno de los métodos alternativos para proporcionar fuentes variables de alimento a bajo costo (15, 16). *Chlorella* sp., y *Scenedesmus* sp., son microalgas ampliamente utilizadas por su excelente crecimiento y facilidad de manejo en condiciones de laboratorio (17). Entre las microalgas de mayor importancia económica y nutricional se indica a la microalga *Chlorella*; la cual ha sido más estudiada y presenta una alta eficiencia en productividad por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio.

La sistemática, aislamiento, cultivo y la caracterización de cepas nativas de microalgas presentes en represas de agua para el consumo humano constituyen un objetivo esencial para evaluar la calidad del agua y su posible efecto en casos de eutrofización. Asimismo, el conocimiento de la ecofisiología de las microalgas permite evaluar su potencial biotecnológico para la producción de sustancias de interés comercial, su utilidad como alimento para el levantamiento de cosechas de larvas de peces y crustáceos y su capacidad mixotrófica para purificar aguas residuales o producción alternativa de biomasa microalgal. Debido a ello, es de suma importancia evaluar el crecimiento de microalgas aisladas y no evaluadas previamente en función de distintos factores ambientales, tales como la luz, salinidad, temperatura, pH y nutrientes. En el presente estudio se reporta la influencia de la intensidad luminosa, temperatura, salinidad y pH de una cepa autóctona de la microalga *Chlorella* sp., sobre el crecimiento y la producción de pigmentos en cultivos discontinuos.

Materiales y Métodos

Microalga estudiada

Se seleccionó la microalga *Chlorella* sp., procedente del Embalse de Tulé ubicado en la Costa Nor-Occidental del Lago de Maracaibo, Municipio Mara, Estado Zulia. Su aislamiento se realizó mediante la técnica de dilución en serie en cultivo selectivo líquido y sólido. Ambos enriquecidos con nutrientes inorgánicos ALGAL (18) y BG 11 (19). La ubicación

taxonómica de la microalga se determinó mediante el uso de bibliografía especializada y claves taxonómicas ([1](#), [20](#), [21](#)).

Condiciones de cultivo

Los cultivos de la microalga fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), con aireación constante, fotoperíodo de 12:12 h y una intensidad luminosa de $58 \mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$. La iluminación se suministró por lámparas fluorescentes laterales que proporcionaron la misma intensidad de luz a todos los cultivos durante 15 días. Transcurrido este tiempo se procedió al reislamiento en medios sólidos mediante siembras sucesivas hasta obtener cultivos unialgales. Las colonias obtenidas se sembraron en medio de cultivo líquido en tubos de ensayo y periódicamente, se revisaron al microscopio óptico.

Los cultivos por triplicado se realizaron con un volumen de 250 mL en matraces de 500 mL de capacidad utilizando medio comercial ALGAL a una concentración equivalente a 6 mM NO_3 . Todos los experimentos se iniciaron con un inóculo de 1×10^6 cel/mL en fase exponencial. Los cultivos se mantuvieron con un fotoperíodo de 12:12 h, a una intensidad luminosa de $58 \mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$, aireación constante, $30\text{-}35^\circ\text{C}$ y a pH inicial de 7. El crecimiento de la microalga se determinó mediante la utilización de una cámara de Neubauer para recuento celular y un microscopio óptico binocular Olympus CH20 a una magnificación de 40X.

Estudios fisiológicos

El efecto de la intensidad luminosa, temperatura, salinidad y pH sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella sp.*, se realizó con cultivos discontinuos en condiciones unialgales.

El crecimiento se evaluó a diferentes intensidades luminosas (20, 39, 59, 78 y $118 \mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$), temperatura (25, 30 y 35°C) y salinidad (15, 25 y 35‰), para lo cual se utilizó agua de mar ajustada a las salinidades indicadas. En este caso, como control se utilizó dos tipos de cultivos no salinos, unos con agua potable destilada (APD) y otro con agua no destilada (APND) en función de observar si existen diferencias por aporte natural en el agua.

El efecto del pH se determinó a pH 6, 7, 8 y 9 utilizando Buffer Tris HCl a 25mM en relación con un cultivo no tamponado y sin ajuste de pH.

Determinación del contenido total de clorofila y carotenoides de la microalga *Chlorella sp.*, a diferentes salinidades y pH.

Previamente a la extracción de los pigmentos se procedió a la estandarización de la técnica, mediante el uso de los solventes: Metanol, Acetona y la mezcla Acetona/Metanol (2:1). La extracción se realizó comparativamente a fin de determinar el solvente más eficiente.

La estimación del contenido de clorofila a y b y de carotenoides totales se realizó sobre la biomasa fresca, siguiendo el método descrito por Lichtenthaler y Wellburn 1983 ([22](#)). El contenido de estos pigmentos solamente se determinó en los experimentos de salinidad y pH.

Análisis químico del agua potable y agua destilada

Se tomaron muestras de agua potable destilada (APD) y no destilada (APND) de las utilizadas en los cultivos para realizar el análisis de los aniones (sulfato, nitrato y nitrito), y de cationes (calcio, magnesio, cobre, potasio, hierro, zinc y amonio) utilizando técnicas estándares (1).

Análisis estadísticos

Con el propósito de comparar los tratamientos en los parámetros estudiados se utilizó la prueba de Scheffé previa comprobación de diferencias significativas mediante un Anova 1 vía ($P < 0,05$) utilizando el programa estadístico Stat Most for Window versión 3,0 (Stat Most Corporation, 1995).

Resultados y Discusión

Influencia de la intensidad luminosa

El crecimiento de la microalga *Chlorella sp.*, se incrementó con la intensidad luminosa, hasta $58 \mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$, en la cual se alcanzó la máxima densidad celular de $300,8 \pm 5,59 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ con diferencia significativa ($P < 0,05$). En cambio, a las intensidades de 77 y de $115 \mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$, la densidad celular descendió en un 6,5 y 70,3% respecto a la máxima obtenida (Tabla 1).

Algunos investigadores (23) observaron que *Chlorella vulgaris* fue capaz de crecer entre 576 y $58 \mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$). Aunque, las células a bajas intensidades luminosas expresaron mayor eficiencia fotosintética; pero comenzaron a saturarse a elevadas irradiancias. Además, indicaron que las células a bajas intensidades incrementaron la concentración de clorofila. Otros autores han demostrado que, *Chlorella*, al igual que muchas algas son capaces de utilizar substratos orgánicos, tales como azúcares y ácidos orgánicos, en completa oscuridad (24). El hecho que esta cepa de microalga optimice la producción de biomasa a bajas intensidades luminosas, sugiere su adaptación a cuerpos de agua con baja irradiancia, como suele ocurrir en los embalses.

Influencia de la temperatura

La microalga creció a todas las temperaturas estudiadas, alcanzando las mayores densidades celulares entre 25 y 30°C , con $207,1 \pm 9,0$ y $218,78 \pm 31,3 \times 10^6 \text{ cel/mL}$, respectivamente. No obstante, el crecimiento disminuyó en un 24,5% cuando los cultivos se mantuvieron a 35°C con un valor de $163,2 \pm 9,7 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ y con diferencia significativa ($P < 0,05$) con relación a 25 y 30°C .

La mayoría de las algas tienen una curva de respuesta del crecimiento a la temperatura con una manifestación continua de elevadas tasas, lo cual forma una amplia meseta en la curva y luego un rápido descenso con pronunciados efectos inhibitorios por temperaturas que superan el óptimo en sólo 2 ó 3°C (26).

Algunas microalgas son capaces de crecer a temperaturas elevadas respecto a otras cuyas óptimas temperaturas se encuentran entre 18 y 25°C . Para el caso de *Chlorella vulgaris*, se han logrado cultivos de hasta 36°C , con una óptima de $32,4^\circ\text{C}$ (28). Todo parece indicar la adaptación de esta cepa de *Chlorella* a cuerpos de aguas tropicales y su posibilidad de ser utilizada para cultivos abiertos a temperaturas entre 25 y 30°C .

Influencia de la salinidad

Los resultados indican que la microalga presenta mejor crecimiento en los cultivos controles con agua potable no destilada (APND) y potable destilada (APD); en los cuales se exhibieron los máximos valores de densidad celular con $79,51 \pm 10,54$ y $30,71 \pm 10,12 \times 10^6$ cel/mL, respectivamente con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al resto de los tratamientos.

Tabla 1
Influencia de la intensidad luminosa ($\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2.\text{s}$) sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel/mL) de la microalga *Chlorella*

Intensidad luminosa	19	38	58	77	115
Densidad celular	$243,3 \pm 7,1$	$246,4 \pm 4,6$	$300,8 \pm 5,5$	$106,8 \pm 1,8$	$89,3 \pm 1,3$

En cambio, la salinidad ejerció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento. Cuando fue cultivada a 25 y a 35‰ disminuyó la densidad celular en un 97,8 y en un 98,2%, respectivamente. Sin embargo, parece tolerar salinidades hasta 15‰, ya que no se registró diferencia significativa entre este tratamiento y C-II APD; aun cuando, también se acusa una disminución de su crecimiento (Tabla 2). Por lo que, se sugiere que esta microalga es sensible a la salinización de cuerpos de aguas. De tal manera que, podría ser utilizada como indicadora de aguas dulces o de muy baja salinidad.

En cuanto a la utilización de cultivos controles con dos tipos de agua potable, se indica la influencia de los nutrientes contenidos en el agua no destilada, con lo cual se logra estimular el crecimiento de la microalga en un 61,4% en relación al uso del agua destilada. Esto podría ser debido a que el agua no destilada está más enriquecida con sulfato, calcio, magnesio, cobre y hierro que el agua potable destilada (Tabla 3). Estos nutrientes enriquecen aún más, el medio de cultivo comercial utilizado. Las dos evaluaciones realizadas en las muestras de agua, indicaron que las concentraciones de los aniones y cationes, Fe^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} y Ca^{+2} fueron superiores en 3,7; 1,8; 20,9; 13,1 y 188,4 veces respecto al agua potable destilada. Se sugiere, que el agua potable no destilada presenta una mayor disponibilidad de los nutrientes, lo cual estimuló el crecimiento de la microalga.

La salinidad produjo un incremento del contenido celular de clorofila y carotenoides totales. A 25 y 35‰ se alcanzaron los valores más altos, con relación a los cultivos no salinos (Tabla 2). Este resultado obedece, al hecho que las células disminuyen la velocidad de crecimiento con la salinidad, con lo cual permanecen de mayor talla respecto a las células de menor talla no sometidas a salinidad las cuales exhiben la mayor tasa de duplicación. Por lo tanto, el contenido de metabolitos también es acumulado. Sin embargo, el contenido de estos pigmentos por volumen de cultivo es mayor en los controles, debido a las elevadas densidades celulares obtenidas.

Tabla 2
Influencia de la salinidad (‰) sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel/ml) y contenido de pigmentos (pg/cel) de la microalga *Chlorella* sp

Salinidad	Densidad celular	Clorofila	Carotenoides	Chlo/Car
C-I-APND	79,51 \pm 10,54	0,94 \pm 0,18	0,13 \pm 0,01	7,23
C-II-APD	30,71 \pm 10,12	0,33 \pm 0,09	0,07 \pm 0,02	4,71
15	24,28 \pm 7,63	0,69 \pm 0,40	0,14 \pm 0,01	4,93
25	1,75 \pm 0,58	3,49 \pm 0,45	0,64 \pm 0,15	5,45
35	1,47 \pm 0,17	3,04 \pm 0,25	2,8 \pm 0,06	1,09

Cultivos C-I: Control con agua potable no destilada (APND), C-II: Control con agua potable destilada (APD), Chlo/Caro: relación clorofila /carotenoides.

Tabla 3
Análisis químico del agua potable y agua destilada

Análisis	SO ₄	Dureza	Cloruros	NO ₃	NO ₂	Ca	Mg	Cu	K	Fe	Zn	NH ₄
APD	2,81	10	1,77	0,01	<0,002	0,17	<0,40	15,50	<0,03	13,34	0,017	0,08
APND	5,41	100	14,40	0,04	<0,002	32,03	8,38	28,66	2,52	50	0,222	0,09
APD/APND	1,9	10	8,1	4	1	188,4	20,9	1,8	84	3,7	13,06	1,1

No fue detectado carbonato, APND: Agua Potable no destilada APD: Agua potable Destilada.

El análisis estadístico demostró un aumento en el contenido de clorofila con diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los cultivos a 25, 35‰ y controles. De igual manera para los carotenoides totales, se reporta un aumento con diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el control (C-I APND) y el cultivo a 35‰. Esto se debe quizás a la presencia de sales de Mg⁺², Ca⁺², SO₄⁻², Fe en el agua de mar, con lo cual se logra una mayor disponibilidad de nutrientes para mejorar la producción de biomasa y de clorofila en microalgas como *Chlorella*. Por otra parte el estrés salino cuando genera células de mayor talla, implica una mayor estructura fotosintética y por consiguiente mayor clorofila.

La relación clorofila/carotenoides también disminuyó con la salinidad. Es posible, que el incremento de la salinidad estimule la síntesis de carotenoides, por efecto de estrés salino; con lo cual se sugiere una tendencia al incremento de las moléculas de carotenoides con relación a las de clorofila. No obstante, el uso del agua potable no destilada produjo un incremento de esta relación, ocasionado por un bajo contenido de carotenoides por célula no expuesta a condiciones de estrés como lo es la salinidad. Además, de demostrarse que el elevado contenido de clorofila total por volumen de cultivo se obtuvo con esta fuente de agua potable.

La concentración de sales inorgánicas disueltas, tanto en las aguas dulces como marinas, puede potencialmente afectar el crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica (30). Sin embargo, el efecto de la salinidad adquiere más influencia cuando se relaciona con otras variables, como temperatura, luz, fuente de nitrógeno y concentración de nutrientes (13, 31-33).

pH

Los análisis estadísticos de la prueba Scheffé, revelaron que hubo un aumento significativo ($P < 0,05$) de la densidad celular en el tratamientos evaluados a diferentes pH en relación al control. La máxima densidad celular se obtuvo a pH 9 y 8 con 323,43 \pm 74,18 y 309,88 \pm 59,79 $\times 10^6$ cel/mL respectivamente (Tabla 4); con lo cual se

produjo un orden descendente de crecimiento de 9=8>6>7>control. Esto sugiere que el pH se ve afectado por la capacidad tampón, al igual que la composición del medio de cultivo, cantidad de dióxido de carbono disuelto, la temperatura que a su vez controla la solubilidad del CO₂ y la actividad metabólica de las células microalgales. Asimismo, la fuente de nitrógeno utilizada (nitrato de sodio) ejerce también un papel importante en el incremento del pH del cultivo debido a la liberación de iones OH⁻ durante la fotoasimilación del nitrato (34).

Tabla 4
Influencia del pH sobre el crecimiento (x10⁶ cel/ mL) y producción de pigmentos (pg/cel) de la microalga *Chlorella* sp

pH	Densidad celular	Clorofila Total	Carotenoides	Chlo/caro
Control	31,40±12,92	1,16±0,49	0,15±0,019	7,73
6,0	218,34±67,01	0,26±0,12	0,04±0,02	6,50
7,0	215,11±39,50	0,25±0,09	0,04±0,01	6,25
8,0	309,78±59,79	0,08±0,04	0,03±0,01	2,67
9,0	323,43±74,18	0,1±0,05	0,02±0,01	5,00

Control: Sin tampón ni ajuste de pH, Chlo/Caro: relación clorofila total/carotenoides.

El pH en cultivos unialgales es un factor de importancia que afecta el crecimiento y la incorporación de amonio del medio. Investigaciones realizadas (35) reportan que en cultivos de *Chlorella vulgaris*, estos factores coinciden con un decrecimiento en el pH, a altas concentraciones de amonio provoca descenso del pH y que a valores bajos de estos producen la formación de amonio gaseoso y favorecen la existencia de las formas iónicas, que son menos tóxicas para las microalgas.

La producción de los pigmentos a nivel celular no se vio influenciada por el pH; ya que los mayores valores de clorofila y de carotenoides se produjeron en el control y el pH 6 (Tabla 4).

La relación Clorofila/carotenoides indica que hubo un aumento de la clorofila en comparación con el contenido de carotenoides a medida que el pH aumentó, con un valor máximo de 7,73 y un valor mínimo de 2,67, respectivamente.

Conclusiones

La producción de biomasa de la microalga *Chlorella* sp., es estimulada con agua potable no destilada, a una temperatura entre 25-30°C, intensidad luminosa de 58 μmol quanta/m².s, y a pH entre 8,0-9,0. Sin embargo, su crecimiento es inhibido con la salinidad y es capaz de crecer favorablemente en medios no tamponados. Por lo tanto, su crecimiento y producción de pigmentos está influenciado por la intensidad luminosa, salinidad, temperatura y pH en cultivos discontinuos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONDES-LUZ por el apoyo financiero a través del proyecto 2773-97, al Instituto para la Conservación del Lago de Maracaibo (ICLAM) a Neyla Ortiz y César Loreto por su colaboración.

Referencias Bibliográficas

1. APHA. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater. American Public Health Association, AWWA, WPCF, 27th edition, Washington (USA), pp. 71-93, 1995.
2. MATUSIAK K., PROZYTOCKA M., LEZCZYNNska K., HOROCH M. **Acta Microbiol** 25: 361-374, 1990.
3. OSWALD W., LEE E., ADAMS E., YAO K. **Who Chronicle** 32 (9): 348-350, 1978.
4. PROZYTOCKA J., DUSZOTA M., MATISIAK K., MYCIELSKI R. **Wat Res** 18: 1-7, 1984.
5. RODRÍGUEZ A., OLI VIERA J. **Wart Sci Tech** 19: 43-49, 1978.
6. BOROWITZKA M. **Microbiol** 3: 372-375, 1986.
7. METTING B., PAYNE J. **Microb Technol** 8: 386-394, 1986.
8. BOROWITZKA M., BOROWITZKA I. **Microalgal Biotechnology**, (Eds. Cambridge) University Press España, pp. 415-455, 1989.
9. BROWN M., JEFFREY S., GARLAND C., **Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature Review**. CSiro Marine Laboratories, Report, pp 205, 1989.
10. THOMPSON P., GUO M., HARRISON P. **J Phycol** 28: 481, 1993.
11. MOLINA E., SÁNCHEZ J., GARCIA F., FERNÁNDEZ J., ACIÉN F., URDA J. **Applied Microbiol Biotechnology** 42: 658-663, 1995.
12. FABREGAS J., PATIÑO M., MORALES E., CORDERO B., OTERO A. **Applied Environ Microbiol** 62: 266-268, 1996.
13. MORALES E. Productos agrícolas para el cultivo de microalgas marinas (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, España, pp. 149, 1996.
14. HERRERO C., FÁBREGAS J. **Acta Científica Compostelana** 21: 301-306, 1984.
15. WASLIEN J. **Crit Rev Fd Sci Nutr** 6: 77-92, 1975.
16. NIGAN B., RAMANATHAN P., VENKATARAMAN L. **Biotechnology** 11: 467-747. 1980.
17. GOLDMAN J. **Physiological aspects in algal mass culture**. En: *Algae Biomass: Production and use*. G. Shelefand C., Soeder (eds) 343-360. 1980.
18. FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C. **Aquaculture** 83:289-304, 1989.
19. RIPPKA R. **Methods Enzymology** 167: 27-100, 1988.
20. YACUBSON S. **Bol Centro Inv Biol** 16: 19-95, 1985.
21. INFANTE A. El Plancton de las aguas continentales. Secretaría General de la

organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington (USA), pp. 130, 1988.

22. LICHTENTHALER H., WELLBURN A.R. **J Plant Physiol** 144: 307-313, 1983.

23. STEEMANN N., HANSEN V., JORGENSEN E. **Physiol Plant** 15: 505-517, 1962.

24. FOGG G.E. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology**. Second Edition. The University of Wisconsin Press. pp. 126, 1977.

25. LAING I., AYALA F. **Introduction to Applied Phycology** (Ed. Akatsuka) Volumen 1, SPB Academic Publishing Bv, The Hague, pp. 447-477, 1990.

26. MAYO A. **Water Environment Research** 69: 64-72, 1997.

27. LEE Y., TAM H., HEW C. **Biotechnology. Bioengng** 27: 555-561, 1985.

28. ABALDE J., CID A., FIDALGO P., TORRES E., HERRERO C. **Microalgas: Cultivo y Aplicaciones**. Universidad de la Coruña, (España), pp. 119-41, 75-91, 1995.

29. FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B. **Aquaculture** 50: 1-11, 1984.

30. TERLIZZI D., KARLANDERE P. **J Phycol** 16: 364-368, 1980.

31. FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B. **Aquaculture** 49: 231-244, 1985.

32. RAVEN J. **The CO₂ concentrating mechanism**. In: W. J. Lucas, JA Barry, Eds, Inorganic carbon uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms. American Society of Plant Physiologists. Rockville, M.D. pp. 67-82. 1985.

33. TAM N., WONG Y. **Bioresource Technology** 57: 45-50, 1996.

* Autor para la correspondencia. E-mail: everm@iamnet.com