

CAPÍTULO

8



Evaluación del crecimiento de tres especies de algas

unicelulares
con diferentes
dosis de nutrientes

POR

Edmundo René RECALDE POSSO

Luis ROCA PÉREZ

María Rosa MOSQUERA LOSADA

Introducción

El uso potencial de las microalgas en el ámbito mundial está creciendo debido a sus aplicaciones en nutrición humana (García et al., 2017), animal (Kholif et al., 2017) y producción de biocombustibles (Taher et al., 2015). Varios son los trabajos de investigadores en todo el mundo; así, por ejemplo, Tibbetts (2017) hizo una investigación en la que se utilizó *Chlorella vulgaris* en nutrición animal y también se ha empleado este tipo de algas para absorber los nutrientes de las aguas residuales (Zhai, et al., 2017), tan solo por poner un par de ejemplos. El enorme interés mundial se debe a que es una materia prima valiosa para la producción de energía renovable debido a su tasa de crecimiento, su producción elevada de lípidos y su alta capacidad de secuestrar carbono (Cheah, W. et al., 2015). Esta tendencia mundial hace que las investigaciones en torno a este campo sean de interés y posibiliten abrir un campo de investigación de interés nacional. Desde el punto de vista de sostenibilidad, las algas tienen una gran importancia, pues usan tierras infértiles, agua salada, aguas residuales y consumen CO₂ de gases de combustión (FAO, 2010). Por ejemplo, en la producción de biocombustibles, el interés es de importancia porque su uso sería respetuoso del medio ambiente disminuyendo el impacto ambiental de los combustibles fósiles (Bwapwa, J., 2017).

Las microalgas y cianobacterias son una fuente prometedora de biomasa que puede complementar los cultivos agrícolas para satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos, piensos, biocombustibles (Markou, G. Vandamme, D. Muylaert, K, 2014). Cabe mencionar el interés creciente en la obtención de componentes tales como carotenoides y ácidos grasos omega 3 y omega 6. Para Leu y Boussiba (2014), solo dos productos de alto valor agregado se comercializan con éxito en escala relevante: β -caroteno de *Dunaliella salina*, y astaxantina de *Haematococcus pluvialis*. Además, *Chlorella* y la *Spirulina* son comercializados en grandes volúmenes como nutracéuticos.

Se han hecho múltiples estudios con el fin de determinar la cinética de crecimiento de las algas unicelulares, sobre todo en la búsqueda de nutrientes que posibiliten disminuir costos en el crecimiento celular, de ahí que varios estudios hayan optado por la búsqueda de nutrientes comerciales de uso agrícola mientras que otros se enfocan en el uso de nutrientes de procedencia orgánica (subproductos animales), con el fin de incrementar la velocidad de crecimiento y disminuir el tiempo de duplicación celular. Para Blair, Kokabian y Gude (2014), la clave en la producción de biomasa se encuentra en la optimización de las condiciones de crecimiento.

Actualmente no existen estudios relacionados con el cultivo de algas unicelulares de la provincia de Imbabura (Ecuador), a pesar de que esta importante región geográfica cuenta con una diversidad de especies de microalgas verdeazules que se desarrollan en sus lagos y humedales. Dado el potencial de cultivo que representa esta región, el estudio de aspectos nutricionales relacionados con el crecimiento celular de microalgas se justifica con vistas al desarrollo de fotorreactores de tipo laminar. Se consideraron estas especies por ser las primeras que se aislaron en los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

Se ha efectuado un sinnúmero de estudios validando el uso de medios de cultivo preparados en laboratorio con el fin de incrementar la producción de especies de microalgas; así, en trabajos desarrollados por Sharma, Singh y Sharma (2011) se obtuvo el mejor crecimiento en medio *Chu-10* modificado. Singh, Sikarwara (2014) evaluaron medios de cultivo a base de fertilizantes líquidos, y los resultados obtenidos evidenciaron la influencia que ejercen las soluciones nutritivas en la cinética de crecimiento. Lee & Zhang (2016) estudiaron varios factores que influyen en el crecimiento microalgal (nitrógeno, dióxido de carbono, la intensidad de la luz y la temperatura). El estudio que se presentamos permitió evaluar dichas especies con diferentes concentraciones de nitrógeno constituyendo este como el elemento limitante.

Este estudio tiene por objeto principal la evaluación de la respuesta fisiológica de tres especies de algas unicelulares creciendo en cuatro dosis de solución nutritiva. En posteriores investigaciones se utilizarán estos resultados en la producción masiva de algas unicelulares mediante el sistema laminar.

Materiales y métodos

Se utilizaron algas unicelulares aisladas en los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, sede Ibarra (cultivos no axénicos). Estos cultivos de algas provinieron de muestras tomadas en la laguna de Yahuarcocha (cantón Ibarra, provincia de Imbabura). Los géneros utilizados en el presente trabajo correspondieron a las especies *Chlorella* sp, *Desmodesmus* sp. y *Chlamydomonas* sp.

Correlación entre conteo vs absorbancia

Con el fin de evaluar la curva de crecimiento de las cepas *Chlorella* sp, *Desmodesmus* sp y *Chlamydomonas* sp se hizo un primer ensayo con cuatro réplicas en envases de vidrio de 500 ml con una solución de 300 ml y se utilizó como nutriente un fertilizante foliar (nombre comercial: Nitrofoska™, con concentración de nitrógeno del 10 %) a una dosis de 1 ml L⁻¹. Se utilizaron lámparas fluorescentes como fuente de iluminación a una intensidad media de 7640 +/- 31 lux y no se utilizó aireación, dadas las cantidades reducidas de medio de cultivo. Para la oxigenación se agitó el medio durante tres veces al día.

Para determinar la velocidad de crecimiento se hizo un conteo celular con un hematocitómetro y una cámara de Neubauer, y se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 750 nm con un espectrofotómetro visible ThermoSpectronic (Genesys™20, Thermo Fisher Scientific). Se estableció posteriormente una correlación entre el número de células y la absorbancia con el fin de determinar la ecuación que relacione dichas variables y utilizarla para la cuantificación de algas unicelulares por predicción a través de la absorbancia. Este procedimiento se utilizó por la dificultad de hacer conteos manuales con cámara Neubauer debido al alto número de unidades experimentales. Este procedimiento ha sido utilizado por otros investigadores, tal y como recomienda Arredondo & Voltolina (2007).

Condiciones de crecimiento y medio de cultivo

El bioensayo se realizó en recipientes de vidrio de boca ancha con capacidad de 500 ml, en cuyo interior se introdujeron 300 ml de medio de cultivo. Se agitó después 3 veces al día con el fin de homogeneizar el medio y mantenerlo aireado. El suministro de luz se efectuó mediante lámparas fluorescentes con un fotoperiodo de 12:12h.

Las tres cepas, *Chlorella sp* (E1), *Desmodesmus sp* (E2) y *Chlamydomonas sp* (E3), se desarrollaron en los siguientes medios de cultivo: sin nutriente (DO), 0,5 ml L⁻¹ (D1); 1,0 ml L⁻¹ (D2); 1,5 ml L⁻¹ (D3); 2,0 ml L⁻¹ (D4) de Nitrofoska™. En el medio de cultivo donde crecían las cepas se determinó diariamente el pH (pH-metro Extech®pH100: ExStik pH Meter, FLIR Systems, Inc, Oregon, USA xtrech Modelo PH100) y la conductividad eléctrica (Extech EC400: ExStik®pH Conductividad/TDS/Salinidad-Metro, FLIR Systems, Inc, Oregon, USA). La medición de la absorbancia se efectuó con el mismo equipo mencionado anteriormente y la muestra extraída de la unidad experimental fue reincorporada a ella con el fin de no alterar su volumen.

El conteo celular se hizo en el primer ensayo mediante el uso del hematocitómetro Neubauer por microscopía. En la muestra sometida a conteo también fue medida la absorbancia con el fin de establecer después las ecuaciones de regresión lineal en la fase de crecimiento. Además, esto permitirá utilizar dichas ecuaciones para determinar el grado de divisiones celulares. La velocidad de crecimiento (divisiones por día) y el tiempo de duplicación (días) se calcularon con las siguientes fórmulas (Reynolds, 2006), p. 194): *en donde* Nt = número de células en el tiempo t_1 . N_0 = número de células en el tiempo t_2 . Para el tiempo de duplicación:

Diariamente se midió la radiación fotosintéticamente activa (RFA con equipo Spectrum Technologies, Inc, modelo DRM-FQ Serie 5265), obteniéndose un promedio de 116±1,83 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La intensidad lumínica promedio fue de 7640 ± 31,08 lux (equipo EXTECH digital light meter 401025). La temperatura media durante el desarrollo del experimento fue de 23,8°C (temperatura máxima: 25,6°C; temperatura mínima: 22,1°C).

Análisis estadístico

Los resultados se procesaron con el software estadístico *Infostat* y se utilizó el modelo experimental de bloques completamente al azar con arreglo factorial A x B con cinco réplicas. La unidad experimental correspondió a un envase de vidrio de 500 ml, en la cual se introdujeron 300 ml de solución algal. Para la determinación de diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó un nivel $\alpha=0,05$, y para determinar la normalidad se utilizó la prueba de *Shapiro-Wilks* modificada por *Mahibbur y Govindarajulu* (1997), y la prueba de *Levene* para homogeneidad de varianzas. En todos los tratamientos en donde se detectaron diferencias significativas se utilizó la prueba post-hoc de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Comportamiento del pH y la conductividad eléctrica (CE)

En el comportamiento del pH en cada etapa de desarrollo se encontró una tendencia similar para las 3 especies en estudio. En la etapa inicial de adaptación, el pH promedio se mantuvo en 6,35±0,5, y en la etapa de desarrollo, el pH se incrementó a un valor medio de 8,75±0,73. El análisis de varianza para el pH (fase final de crecimiento: día 33) determina diferencias significativas ($p < 0,05$) para especies, dosis y su interacción ($p < 0,0001$). El coeficiente de variación para esta variable fue de 1,32%. *Desmodesmus sp* y *Chlorella sp* presentan valores de pH significativamente mayores (Tukey $p < 0,05$) que *Chlamydomonas sp* al final del crecimiento (**FIGURA 1**).

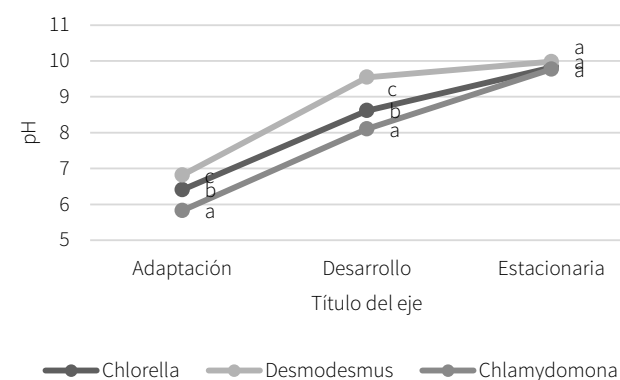


FIGURA 1
Comportamiento del pH en las distintas fases de crecimiento.
Fuente: Elaboración propia

El comportamiento del pH durante todas las fases de desarrollo de las tres especies estudiadas mantiene incrementos similares durante los 33 días de evaluación, tan solo en *Desmodesmus* se aprecia un aumento acentuado del pH a partir del quinto día. El rango de pH durante la fase de crecimiento se encuentra entre 5 y 9,5; en este sentido, estudios recientes de Jaatinen, S. y col (2016) indican que la producción de biomasa fue similar cuando los rangos de pH están entre 5 a 9 para la especie *Chlorella vulgaris*. Así pues, podemos decir que las condiciones de pH son óptimas para el crecimiento de esta especie.

Como puede observarse, el pH no es constante durante el cultivo, coincidiendo con lo reportado por Zhu (2015), pues a medida que se incrementan los días de cultivo existe un incremento gradual de pH. Estudios de Lam y Lee (2012) determinaron variaciones en la producción microalgal al variar el pH, valores bajos de 3 no favorecen el crecimiento del cultivo, y niveles de 4, 5 y 6 reducen la producción de biomasa. Trabajos citados por Begum, H. et al. (2016) dan cuenta de que hay una relación entre la especie en estudio y el pH, en particular en la producción de pigmentos, de los que se puede obtener el máximo rendimiento con un pH entre 7 a 9.

En las tres especies en estudio, la conductividad eléctrica (CE) se fue incrementando a medida que las algas cumplían con su fase de desarrollo. En promedio la CE para la

fase de adaptación fue de $435,51 \pm 44,60 \mu\text{scm}^{-1}$, llegando a un valor de $503,36 \pm 35,78 \mu\text{scm}^{-1}$ en la fase estacionaria. La conductividad eléctrica por dosis de nutriente mantiene un comportamiento muy parecido en cuanto a su incremento por dosis empleada, y para cada una de ellas, los valores obtenidos son totalmente diferentes.

El análisis de varianza para la conductividad eléctrica (fase final de crecimiento: día 33) establece diferencias significativas ($p < 0,05$) para especies y dosis mas no para su interacción ($p = 0,8719$). El coeficiente de variación para esta variable fue de 4,24%. El test Tukey para las especies ($p < 0,05$) establece tres grupos, correspondiendo en cada uno de ellos a las especies en estudio, por lo que el valor de CE es diferente entre ellas (**FIGURA 2**). Los valores obtenidos de CE para la dosis de nutriente estadísticamente son diferentes luego de aplicar el test Tukey ($p < 0,05$). Como cabría esperar, el máximo valor de CE es de $893,07 \mu\text{scm}^{-1}$ y corresponde a la dosis D4 ($2,0 \text{ ml l}^{-1}$), mientras que el valor más bajo corresponde al medio de cultivo que no tiene nutriente ($110,01 \text{ ml l}^{-1}$).

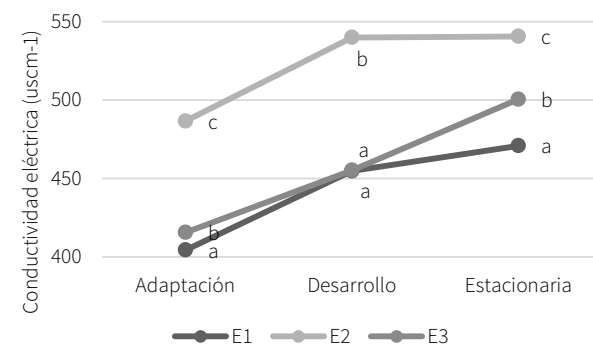


FIGURA 2
Comportamiento de la conductividad eléctrica en las distintas fases de crecimiento. Fuente: Elaboración propia

Absorbancia

Como medida de cuantificación de la densidad celular se utilizó la absorbancia (ABS) a una longitud de onda de 750 nm; el análisis de varianza detecta diferencias significativas para las especies ($p = 0,0001$), para dosis ($p < 0,0001$) y para la interacción especie por dosis ($p < 0,0001$). El test Tukey ($p < 0,05$) detecta dos grupos *Desmodesmus* y *Chlamydomonas* en el primera y *Chlorella* en el segundo. El comportamiento de la absorbancia por dosis de nutriente luego de aplicar este mismo test establece tres grupos.

Las medidas de la absorbancia, pasando un día en cada especie estudiada, determinan un comportamiento muy parecido a la fase de crecimiento de las especies de algas unicelulares. Para *Chlorella* (**FIGURA 3A**) se puede apreciar que el tratamiento sin dosis de nutriente tiene medidas de absorbancia menores a las que si lo tienen, lo mismo ocurre para *Desmodesmus* (**FIGURA 3B**), aunque para *Chlamydomona* (**FIGURA 3C**), su comportamiento es diferente.

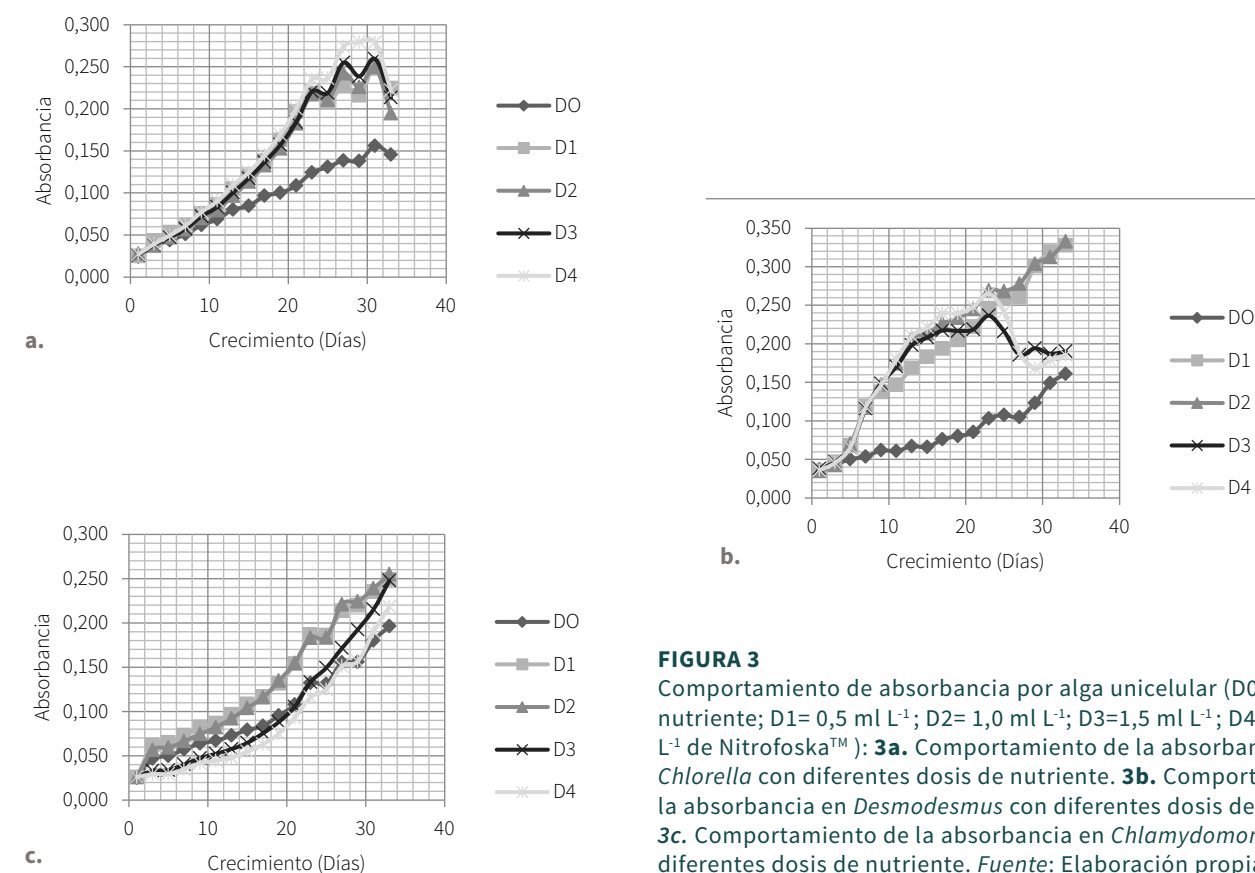


FIGURA 3
Comportamiento de absorbancia por alga unicelular (D0= sin nutriente; D1= $0,5 \text{ ml l}^{-1}$; D2= $1,0 \text{ ml l}^{-1}$; D3= $1,5 \text{ ml l}^{-1}$; D4= $2,0 \text{ ml l}^{-1}$ de Nitrofoska™): **3a.** Comportamiento de la absorbancia en *Chlorella* con diferentes dosis de nutriente. **3b.** Comportamiento de la absorbancia en *Desmodesmus* con diferentes dosis de nutriente. **3c.** Comportamiento de la absorbancia en *Chlamydomonas* con diferentes dosis de nutriente. Fuente: Elaboración propia

Densidad celular

Para la predicción de la densidad celular se determinó en una primera fase la ecuación que relaciona la absorbancia frente a número de células de microalgas por ml. Para *Chlorella* existe una relación lineal entre absorbancia y número de células, el coeficiente de correlación corresponde a 0,96, y el coeficiente de determinación (R^2) es de 0,92. El análisis de varianza confirma dicha relación lineal ($p < 0,0001$). La prueba de Shapiro-Wilks (modificada por Mahibbur y Govindarajulu, 1997) confirma que los datos siguen una distribución normal ($p = 0,2977$).

El análisis de regresión lineal para la especie *Desmodesmus* determina una relación entre la variable respuesta y la explicativa, el coeficiente de correlación (R) corresponde a 0,95 y el coeficiente de determinación (R^2) es de 0,90. Al efectuar el ANOVA se verifica el supuesto de regresión lineal ($p < 0,0001$). La prueba de Shapiro-Wilks (modificada por Mahibbur y Govindarajulu, 1997) confirma que los datos siguen una distribución normal ($p = 0,1255$).

El coeficiente de determinación para absorbancia y número de células en *Chlamydomonas* corresponde a 0,97, con un coeficiente de determinación (R^2), es de 0,95, por lo después de efectuar el análisis de varianza se confirma una relación lineal entre las dos

variables ($p < 0,0001$). La prueba de Shapiro-Wilks confirma que los datos siguen una distribución normal ($p = 0,4229$).

TABLA 1. Ecuaciones lineales utilizadas para la predicción de número de células

Especie	Ecuación	Coefficiente de correlación (R)	Coefficiente de determinación (R ²)	p-valor
<i>Chlorella</i> sp	$Y = 66,15x + 0,06$	0,96	0,92	<0,0001
<i>Desmodesmus</i> sp	$Y = 16,43x - 0,45$	0,95	0,90	<0,0001
<i>Chlamydomonas</i> sp	$Y = 68,05x - 0,09$	0,97	0,95	<0,0001

Fuente: Elaboración propia

Velocidad de crecimiento

Con las ecuaciones obtenidas mediante regresión lineal se rehizo una predicción de número de células por ml a partir de la absorbancia. La velocidad de crecimiento se obtuvo en la fase de desarrollo de las algas unicelulares.

En *Chlorella* sp, para las dosis de nutriente D1, D2, D3 y D4 se consideraron los días 5 y 27, mientras que para D0 se establecieron los días 5 y 25. En *Desmodesmus* sp, las dosis D0, D1 y D2 se consideraron los días 5 y 33, y para las dosis D3 y D4 se establecieron los días 5 y 23. Finalmente, para *Chlamydomonas* sp, los días 5 y 33 fueron establecidos para todas las dosis. Esta consideración se tomó debido a que corresponde a los días en que cada tratamiento tiene una acentuada fase de desarrollo visiblemente con las curvas de crecimiento desarrolladas a través del valor de la absorbancia a 750 nm.

La prueba de ANOVA determina diferencias significativas para especies, dosis de nutriente y su interacción ($p < 0,0001$), con un coeficiente de variación de 5,65 %. La prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0,05$) para especies determina la existencia de dos grupos: *Desmodesmus* sp y *Chlorella* sp, y presenta la mayor velocidad de crecimiento (0,1148 y 0,1117 divisiones por día respectivamente), *Chlamydomonas* tiene una menor velocidad de crecimiento con un valor de 0,08918 divisiones por día (**FIGURA 4**). De la misma manera, la prueba de Tukey ($p < 0,05$) para la dosis de nutriente determina dos grupos, uno de los cuales corresponde al tratamiento sin nutriente que tiene una velocidad de crecimiento menor (**FIGURA 5**).

Tiempo de duplicación

El análisis de varianza para el modelo detecta diferencias significativas para los factores ($p < 0,0001$). El menor tiempo de duplicación se observa en las especies *Chlorella* sp y *Desmodesmus* sp, en esta última con un menor tiempo (**FIGURA 6**). El análisis por dosis de nutriente detecta menor tiempo de duplicación para todos los tratamientos que contienen dosis de nutrientes, y dentro de estos, la dosis 2 es la que mejor se comporta.

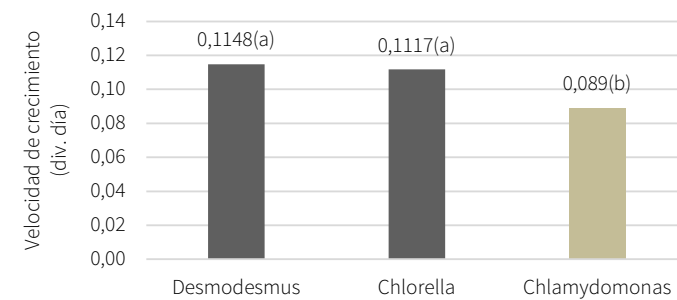


FIGURA 4

Comportamiento de la velocidad de crecimiento por especie.

Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5

Comportamiento de la velocidad de crecimiento por dosis de nutriente.

Fuente: Elaboración propia

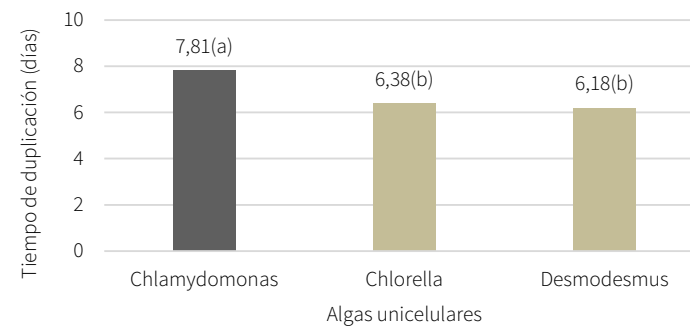
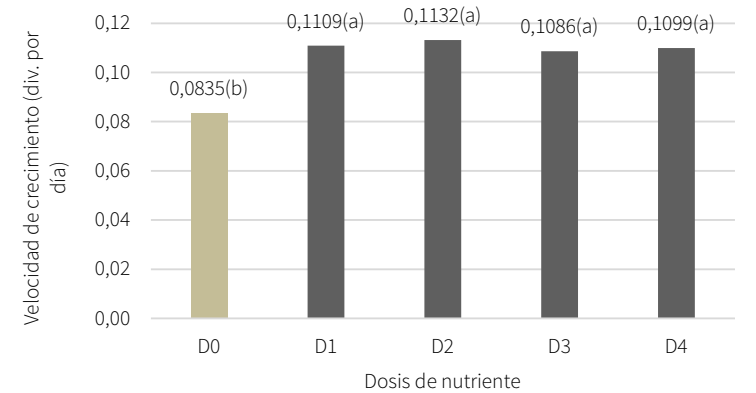


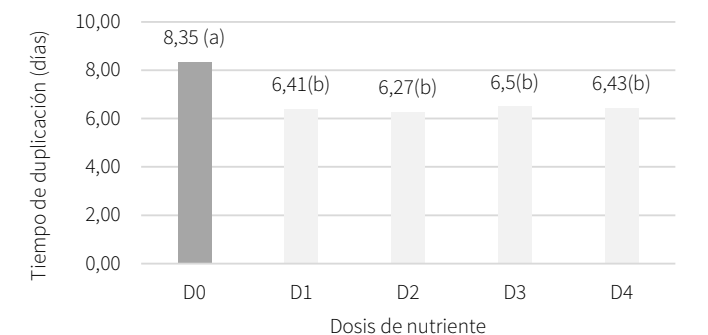
FIGURA 6

Tiempo de duplicación por especie. Fuente: Elaboración propia

FIGURA 7

Comportamiento del tiempo de duplicación por dosis de nutriente.

Fuente: Elaboración propia



Conclusiones

Las dosis de nutrientes utilizadas en el presente estudio influyeron en el crecimiento de las algas. Las mayores velocidades de crecimiento se obtuvieron de *Desmodesmus* sp y *Chlorella* sp, y de la misma manera, en estos mismos géneros se obtuvo menor tiempo de duplicación. Si bien entre estas dos algas no se encontraron diferencias significativas, puede notarse un ligero incremento en la velocidad de crecimiento para *Desmodesmus* sp.

Para todas las dosis en estudio no se encontraron diferencias significativas en cuanto a crecimiento celular, por lo que las dosis de nutrientes empleadas de 1, 1.5, 2, 2,5 ml L⁻¹ no inciden significativamente en un incremento de la producción microalgal, siendo recomendable el uso de una dosis de 1 ml L⁻¹ de Nitrofoska™ desde el punto de vista de costos.

La estimación indirecta del número de células mediante el uso de las ecuaciones obtenidas permitió predecir el crecimiento microalgal, logrando así tener un análisis rápido tan solo con las lecturas de la densidad óptica.

Conocida la mejor especie y la dosis a usar en la producción de algas unicelulares, se pueden hacer pruebas a nivel piloto en sistemas de producción de algas que disminuyan los costos de producción y se genere mayor volumen microalgal. En ensayos posteriores se utilizarán soluciones nutritivas de 1 ml L⁻¹ usando *Desmodesmus* sp. con la finalidad de incrementar la masa microalgal, sobre todo en los sistemas de producción en paneles verticales.

Referencias

- Arredondo, B.; Voltolina, D. (2007) *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.c. La Paz, México ISBN 968-5715-51-3 pp. 21-29.
- Blair, M.F.; Kokabian, B.; Gude, V.G. (2014) Light and growth medium effect on chlorella vulgaris biomass production. In: *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665-674. doi:10.1016/j.jece.2013.11.005
- Begum, H.; Yusoff, F.M.D.; Banerjee, S.; Khatoon, H.; Shariff, M. (2016) Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209-2222. doi:10.1080/10408398.2013.764841
- Bwapwa, J.K.; Anandraj, A.; Tris, C. (2017) Possibilities for conversion of microalgae oil into aviation fuel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 1345-1354. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.224
- Cheah, W.Y.; Show, P.L.; Chang, J.; Ling, T.C.; Juan, J.C. (2015) Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 190-201. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.026
- FAO (2010) *Algae-Based Biofuels Applications and Co-products*. ISBN 978-92-5-106623-2 Roma, Italia, 121 p.

- García, J.; de Vicente, M.; Galán, B. (2017) Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*. doi: 10.1111/1751-7915.12800
- Jaatinen, S.; Lakaniemi, A.; Rintala, J. (2016) Use of diluted urine for cultivation of *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 37(9), 1159-1170. doi:10.1080/09593330.2015.1105300
- Kholif, A.E.; Morsy, T.A.; Matloup, O.H.; Anele, U.Y.; Mohamed, A.G.; El-Sayed, A.B. (2017) Dietary chlorella vulgaris microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of damascus goats. *Journal of Agricultural Science*, 155(3), 508-518. doi: 10.1017/S0021859616000824
- Lam, M.K.; Lee, K.T. (2012) Potential of using organic fertilizer to cultivate chlorella vulgaris for biodiesel production. *Applied Energy*, 94, 303-308. doi:10.1016/j.apenergy.2012.01.075
- Lee, E.; Zhang, Q. (2016) Integrated co-limitation kinetic model for microalgae growth in anaerobically digested municipal sludge centrate. *Algal Research*, 18, 15-24. doi:10.1016/j.algal.2016.05.019
- Leu, S.; Boussiba, S. (2014) Advances in production of High-Value Products by Microalgae Industrial Biotechnology, 10 (3), pp. 169-183.
- Li, Y.; Horsman, M.; Wu, N.; Lan, C.Q.; Dubois-Calero, N. (2008) Biofuels from Microalgae. *Biotechnol Progress*, 24: 815-820. doi:10.1021/bp070371k
- Markou, G.; Vandamme, D; Muylaert, K. (2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients Water Research Volumen 65 Noviembre 2014, 186-202: doi: 10.1016/j.watres.2014.07.025. De: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135414005211>
- Reynolds, C. (2006) *Ecology of phytoplankton*, Serie: Ecology, biodiversity and Conservation. Cambridge University Press: 552 p.
- Sharma, R.; Singh, G.P.; Sharma, V.K. (2011) Comparison of different media formulations on growth, morphology and Chlorophyll content of green alga, Chlorella vulgaris. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2 (2), pp. 509-516.
- Sharma, R.; Singh, G.P.; Sharma, V.K. (2011) Comparison of different media formulations on growth, morphology and chlorophyll content of green alga, chlorella vulgaris. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2), 509-516. Retrieved from www.scopus.com
- Taher, H.; Al-Zuhair, S.; Al-Marzouqi, A.; Haik, Y.; Farid, M. (2015) Growth of microalgae using CO₂ enriched air for biodiesel production in supercritical CO₂. *Renewable Energy* 82: 61-70
- Zayadan, B.K.; Purton, S.; Sadvakasova, A.K.; Userbaeva, A.A.; Bolatkhan, K. (2014) Isolation, mutagenesis, and optimization of cultivation conditions of microalgal strains for biodiesel production. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(1), 124-130. doi:10.1134/S102144371401018X
- Zhu, L. (2015) Microalgal culture strategies for biofuel production: A review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(6), 801-814. doi:10.1002/bbb.1576.