

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CHLORELLA VULGARIS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VINAZA

EVALUATING OF THE CHLORELLA VULGARIS GROWING IN DIFFERENT VINASSE CONCENTRATION

Leyanis Rodríguez Rodríguez^{1}, Lilitiana María Gómez Luna² y*

Yamilet Peraza Haramboure³

¹Departamento de Ingeniería Química. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba

²Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Avenida de las Américas s/n, Santiago de Cuba, Cuba

³Electroquímica de Sagua. Carretera a Santa Clara Km 4 ½, Sagua La Grande, Villa Clara, Cuba

Recibido: Junio 4, 2014; Revisado: Julio 20, 2014; Aceptado: Septiembre 5, 2014

RESUMEN

Dentro los contaminantes más agresivos de la industria azucarera y sus derivados se encuentran las vinazas de destilería. En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de vinaza; además de la caracterización físico-química de dicho residual, explicando de forma general el efecto de los componentes de la vinaza, sobre el crecimiento de esta microalga y su contenido clorofila *a*. El empleo de la vinaza como medio de cultivo no solo provee una opción para el aprovechamiento de sus propiedades físico químicas, sino que además, la biomasa de *C. vulgaris* obtenida presenta un alto valor agregado, considerando que entre sus aplicaciones más recientes se encuentra su empleo como fuente renovable de energía en la producción de biocombustibles.

Palabras clave: vinaza, microalga, biocombustibles

ABSTRACT

Inside of the most aggressive pollutants in the sugar industry and their derived are the still vinasse. In this work the results of the evaluation of the growth of *Chlorella vulgaris* are presented in different vinasse concentrations; besides the physical-chemical characterization of having said residual, explaining in a general way the effect of the components of the vinasse, on the growth of this microalgae and their contained of *a chlorophyll*. The employment of the vinasse like half of non alone cultivation provides an option for the use of its chemical properties physique, but rather also, the biomass of obtained *C. vulgaris* presents a high added value, considering that enters its more recent applications is its employment as renewable source of energy in the biofuels production.

Key words: vinasse, microalgae, biofuels

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo de organismos unicelulares pertenecientes a sistemas acuáticos o húmedos, los cuales, eventualmente, presentan más diferencias que semejanzas entre sí (Lourenço 2006). Actualmente el mercado de las microalgas se basa en la acuicultura, en la producción de biomasa nutritiva para la alimentación y en la producción de compuestos de alto valor agregado, como antioxidantes (Spolaore et al., 2006).

En la última década se registró un aumento de las investigaciones dirigidas al cultivo masivo de microalgas debido a que representan una fuente de biomasa que puede ser empleada en la producción de biocombustibles y biofertilizantes (Xu, Miao et al., 2006, Demirbas 2009). Los combustibles derivados de biomasa vegetal emitirían menos gases de efecto invernadero (GHG) a la atmósfera que los combustibles fósiles. Actualmente las tecnologías asociadas al empleo de microalgas en estos sistemas se encuentran en estado de investigación y desarrollo con el objetivo principal de abaratar su producción, por lo cual la búsqueda de medios de cultivo alternativos para obtener mayor biomasa con un menor costo, se hace imprescindible, en este sentido, *Chlorella vulgaris* parece ser una especie promisoría. Algunas especies de microalgas serían capaces de alcanzar una alta productividad de lípidos por área; sin embargo estas productividades aún no han sido obtenidas y además serían necesarias innovaciones tecnológicas en el sector para que la producción de biodiesel a partir de microalgas represente un proceso viable, tanto en el aspecto económico como en el energético (U.S. DOE, 2010).

La vinaza es un residual líquido industrial considerado un desecho, y debido a las grandes cantidades generadas de este material se empezó a investigar en opciones para el aprovechamiento de sus propiedades fisicoquímicas (Santos et al., 2007).

En este trabajo se evalúa la factibilidad del uso de diferentes concentraciones de vinaza como medio alternativo de *C. vulgaris*, con el propósito de establecer cultivos densos para la producción de biomasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio exploratorio descriptivo para evaluar la factibilidad del uso de la vinaza a diferentes concentraciones para el cultivo de *Chlorella vulgaris*. Este fue desarrollado en los Laboratorios de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) de la Universidad de Oriente.

La cepa utilizada fue aislada del medio local, específicamente de un estanque dedicado al cultivo de ciprínidos en la estación de acuicultura de Maffo, Contramaestre, y mantenida en el cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del CNEA con el código F010102-A, donde se conserva en condiciones adecuadas desde el 2002, año en que fue aislada, tanto en el Banco Maestro como en el Banco de Trabajo, en medio Bristol sólido y líquido.

Para su clasificación se utilizaron las claves dicotómicas tradicionales y se siguieron los criterios de varios autores (Sant'Anna 1984, Van den Hoek, Mann et al., 1995). Además, se consultaron expertos en Cuba y Japón, y las bases de datos ALGATERRA y NIES. La cepa fue depositada en el cepario de la Empresa Genix, del Ministerio de la Agricultura, en Ciudad de La Habana.

El género *Chlorella* pertenece a la clase Trebouxiophyceae (NIES 2001); orden Chlorococcales (Chlorellales según Kouwets) (Van den Hoek, Mann et al. 1995) familia Oocystaceae, Bourrelly (1990). *Chlorella vulgaris* es un alga verde unicelular de agua dulce; las células se presentan aisladas aunque eventualmente pueden formar agregados; tiene forma esférica y un tamaño que oscila entre 2 y 6 μm . Cada célula posee un pirenoide y un cloroplasto parietal único en forma de copa, con abertura irregular, que ocupa gran parte del volumen celular (Sant'Anna 1984). Se reproduce solamente por autósporas (Van den Hoek, Mann et al., 1995). Presentan una pared celular celulósica rígida que dificulta su digestibilidad por animales monogástricos, Becker (1994); esta es fina, lisa y está compuesta fundamentalmente por esporopolenina (Van den Hoek, Mann et al., 1995), que es un politerpeno resistente a la degradación (Soeder and Hegewald 1988). Las especies del género tienen marcadas diferencias en cuanto al comportamiento ante factores como la salinidad, acidez y elevadas temperaturas, Kessler (1986), aunque de forma general, toleran amplios intervalos de salinidad y de pH (Oh-Hama and Miyachi 1988). La mayoría de las especies del género crecen con gran facilidad, lo que favorece el desarrollo de sus cultivos; debido a esto frecuentemente se utilizan como modelo biológico en investigaciones fisiológicas y bioquímicas (Van den Hoek, Mann et al., 1995). Esta microalga es una de las especies más abundantes y frecuentes en la flora de las aguas residuales y lagunas de oxidación (Lincoln and Earle 1990); crece rápidamente a elevadas temperaturas y tolera hasta 37 °C en condiciones de cultivo a cielo abierto.

2.1. Lógica de experimentación

Se establecen cultivos en un cuarto acondicionado utilizando mezclas de vinaza residual previamente caracterizada y medio Bristol, el cual además se utiliza sólo como medio control en condiciones experimentales generales (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones experimentales para el cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre vinaza y medio Bristol. No aireados y aireados

NO AIREADOS	Control Bristol	Vinaza 100 mL	Vinaza 50 mL	Vinaza 25 mL	Vinaza 12,5 mL
Volumen de cultivo (mL)	150	150	150	150	150
Temperatura (°C)	20± 2°	20± 2°	20± 2°	20± 2°	20± 2°
Concentración inicial (*10 ⁴ cél/mL ⁻¹)	19,25	26,77	15,9	32,02	22,4
Intensidad de la luz (μE m ⁻² s ⁻¹)	75	75	75	75	75
pH	7	7	7	7	7
AIREADOS	Control Bristol	Vinaza 100 mL	Vinaza 50 mL		
Volumen de cultivo (mL)	250	250	250		
Temperatura (°C)	20± 2°	20± 2°	20± 2°		
Concentración inicial (*10 ⁴ cél/mL ⁻¹)	17	18	14		
Intensidad de la luz (μE m ⁻² s ⁻¹)	58,59	58,59	58,59		
pH	7	7	7		

Los cultivos estáticos simulan las condiciones de lagunas de oxidación, sin consumo de energía para el mezclado, para el ensayo de diferentes concentraciones de vinaza y los cultivos aireados se establecen para el desarrollo de la cinética de crecimiento bajo condiciones de luz continua durante 15 días.

2.2. Descripción experimental

Se establecen cultivos continuos de 250 y 150 mL a partir del inóculo en frascos de vidrio cilíndricos de 250 y 150 mL. Para el desarrollo de los mismos se utilizó vinaza procedente de la destilería Heriberto Duquesne, la misma fue decantada y filtrada para eliminar residuos sólidos sedimentables e impurezas y se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Experimento 1: Se establecen cultivos no aireados de 150 mL (1, 2, 3, 4, 5) con 0, 12,5; 25, 50 y 100 mL de vinaza respectivamente.

Experimento 2: Se establecen cultivos aireados de 250 mL (A, B, C, D) y al cabo de los cinco días son restituidos los mismos. Los medios A y C son restituidos con 100 mL medio Bristol, mientras que los medios B y D son restituidos con 100 mL y 50 mL de vinaza respectivamente.

Caracterización físico-química de los medios de ensayo

Los medios artificiales se usan principalmente para fines experimentales, aunque existen algunas especies que no crecen en medios artificiales por factores desconocidos ya que se ve afectado su crecimiento.

El medio utilizado para el mantenimiento y desarrollo de estos cultivos fue el sugerido por Bristol, Gómez (1997).

Se utiliza el nitrato de sodio (NaNO_3) como fuente de nitrógeno. La disolución de oligoelementos se esterilizó a 121 °C durante 15 min, por separado de los macroelementos. La disolución de oligoelementos se prepara a partir de la formulación comercial Algal, de Nutrición avanzada, S.A. Estos constituyen el punto de partida para el establecimiento de los cultivos de ensayo. En todos los casos fueron utilizados para los subcultivos en la fase exponencial de crecimiento.

2.3. Caracterización de la vinaza

La vinaza es un residuo industrial del proceso de la destilación alcohólica que posee características propias, que lo convierten en un agente muy contaminante del medio ambiente, también posee materia orgánica abundante que incluye una cantidad considerable de fenoles y sus polímeros, los cuales son difíciles de degradar biológicamente y poseen propiedades antimicrobianas y fitotóxicas que impiden el tratamiento eficiente por degradación microbiológica, especialmente aerobia.

Estas aguas residuales cuentan con una concentración rica de nutrientes que permiten el desarrollo de las microalgas que requieren nitrógeno y fósforo para su crecimiento; usualmente el requerimiento de nitrógeno es de 0,1 a 0,14 en fracción másica. El cultivo de las mismas en aguas residuales tiene dos objetivos, proveer de nutrientes a las microalgas para su desarrollo y reducir la carga de nutrientes en las mismas (tratamiento terciario).

De manera general la composición de las vinazas depende de las características de la materia prima usada en la producción de alcohol, del sustrato empleado en la fermentación, del tipo y eficiencia de la fermentación y destilación.

En la Tabla 2. se muestra la composición química promedio de las vinazas estudiadas, así como los valores máximos y mínimos. El contenido de DQO de las vinazas aunque elevado, como es característico de este tipo de residual, se encuentra muy por debajo de los 100 000 mg. mL^{-1} , a menudo reportados en la literatura (Al-Widyan and Al-Shyoukh 2002).

Tabla 2. Composición química de las vinazas

		<i>Promedio</i>	<i>Desv. Estand.</i>	<i>Xmáx</i>	<i>Xmín</i>	<i>n</i>
DQOt	g/L	71,20	29,27	168,4	26,4	49
DBOt	g/L	49,94	7,68	63,3	38,4	14
pH		4,47	0,43	6,4	4	46
ST	g/L	52,67	4,15	60,46	45,47	14
STF	g/L	12,61	0,90	13,7	11,12	6
STV	g/L	38,67	4,29	44,25	33,05	6
SST	g/L	10,70	5,12	18,03	1,42	14
SSF	g/L	3,39	2,91	8,89	0,91	6
SSV	g/L	7,31	6,14	17,26	1,47	6
SDT	g/L	41,97	8,11	52,54	30,7	6
SDF	g/L	9,23	2,67	12,19	4,18	6

SDV	g/L	31,08	8,24	40,38	19,1	6
CE	mS/cm	8,36	2,86	13,41	6,6	5
Sulfatos	g/L	15,81	29,53	76	2,893	6
Nitrógeno	g/L	0,21	0,10	0,322	0,02	6
Fósforo	g/L	0,11	87,53	181,16	0,189	6
Calcio	g/L	0,55	0,34	1,2	0,26	6
STV/ST		0,75	0,02	0,77	0,73	6
SSV/SST		0,68	0,64	2,07	0,28	6

2.4. Ajuste de parámetros de cultivo

2.4.1. pH y temperatura

El pH fue medido después de la esterilización de cada uno de los medios, para lo que se emplearon tiras Panreac con escala de color (3,8 – 5,5 y 6,0 – 8,1 u).

Los cultivos se desarrollan en una cámara de cultivo con una temperatura promedio de 20 ± 2 °C. La temperatura fue medida con un termómetro electrónico profesional Quartz de Oregon Scientific.

2.4.2. Aireación

El flujo de aire aplicado a los cultivos fue de $0,45 \text{ L min}^{-1}$, para ello se empleó aire atmosférico durante 15 días. Se mantuvo el flujo constante para garantizar las condiciones óptimas para el crecimiento.

2.4.3. Medición de la densidad de flujo fotónico (DFF)

Los cultivos se mantuvieron en régimen de luz continua, para lo cual se utilizaron lámparas fluorescentes Daylight F40T 12/D 40 W PHILIPS. La DFF fue ajustada diariamente utilizando un Luxómetro Digital VoltcraftMS/1300 (200-50000 lux) con sensor instalado permanentemente, fotodiodo integrado y un filtro sensible a la radiación fotosintéticamente activa (PAR). La DFF fue de $75 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para los no aireados y $58,59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para los aireados. Para la conversión de lux a $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se utilizó el factor de conversión: 51,2 (Ginzburg 1987)

Determinaciones experimentales.

Determinaciones sobre células en cultivo.

2.4.4. Densidad celular

La densidad celular se determina por recuento diario de una alícuota del cultivo en cámara de recuento hematológica Neubauer mejorada, utilizando un microscopio óptico MOTIC (40x). Se realizaron diluciones en agua destilada siempre que fue necesario, de forma tal que el número de células contadas por campo en 1 mm^2 se encontrase entre 30 y 300.

A partir de los datos diarios de densidad celular se determina la tasa de crecimiento, esta se calcula mediante la expresión:

$$\mu = \ln N_t / N_0 / (t - t_0) = [(t - t_0) / g] * \ln 2 \quad (1)$$

Donde:

N_t y N_0 : densidades celulares (cél.mL^{-1})

t_t y t_0 : tiempos (días)

g : coeficiente del crecimiento balanceado

2.4.5. Determinación de la concentración de clorofila *a*

Las células fueron recogidas por centrifugación a 14 630 rpm, 10 min en una centrífuga Sigma 1-14, a partir de volúmenes preestablecidos (2 mL). El sobrenadante se retira cuidadosamente y se recoge la biomasa, a la que se añade un volumen determinado de metanol (1 mL).

Las muestras se resuspenden con ayuda de un vórtex; se centrifugan durante 10 min a 14 630 rpm para clarificar el sobrenadante. La lectura espectrofotométrica de las muestras se realiza a 665 nm, en un espectrofotómetro Genesys 10UV con un paso de luz de 1 cm, y un rango de resolución de 1 nm. Para el cálculo de la concentración de clorofila *a* se utiliza como coeficiente de extinción molar a 665 nm ($74,46 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Rivas, Fontes et al., 1992).

El contenido de clorofila *a* se calcula mediante la siguiente fórmula, aplicando la Ley de Lambert Beer y por acidificación de la muestra, se determinan las concentraciones de feopigmentos para corregir los valores obtenidos.

$$\mu\text{g clorofila } a \text{ mL}^{-1} = 13.43 \times (A_{665})^* (\text{vol. extracto/ vol. cultivo}) \quad (2)$$

Después de la determinación de clorofila se realizan las correcciones pertinentes con las lecturas a 750 nm para la turbidez y la corrección mediante la resta de la concentración de feopigmentos los que se determinan a través de la acidificación de la muestra en extracto metanólico con 0,1 mL de HCl (3M), luego se agita y después de 5 min se leen los feopigmentos a la misma longitud de onda (665 nm). Los resultados se expresan en $\text{pigm c\acute{e}l}^{-1}$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cultivos estáticos

Se estudió el cultivo de *C. vulgaris* en medios estáticos simulando lagunas de oxidación sin consumo de energía para el mezclado con diferentes concentraciones de vinazas, determinando el crecimiento celular y la concentración de clorofila *a*.

Como se presenta en la Figura 1, los cultivos de *C. vulgaris* inoculados con vinaza, mostraron evidencias de efecto tóxico en los parámetros medidos en dichos experimentos.

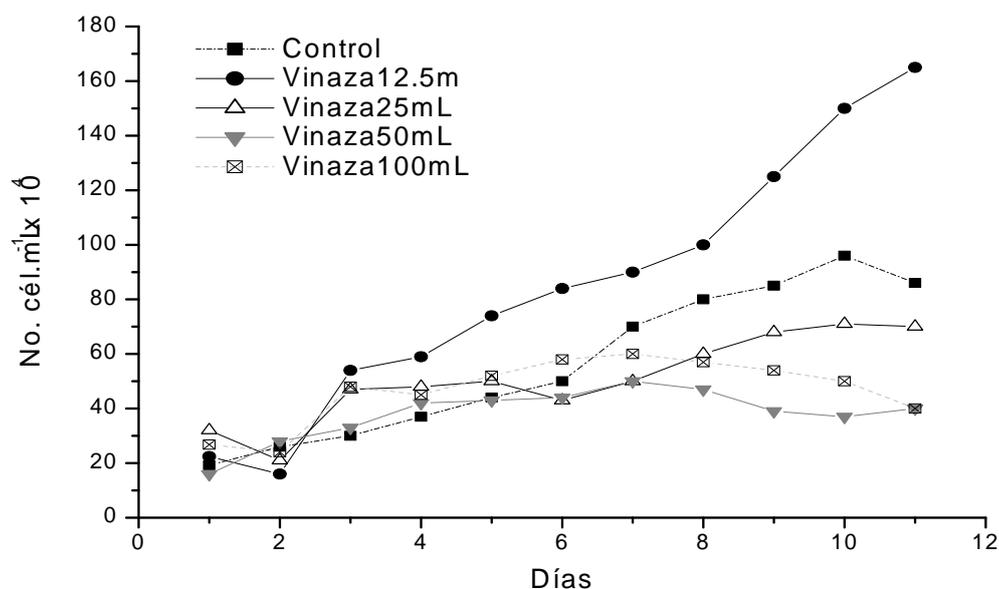


Figura 1. Cinética de cultivos de *Chlorella vulgaris* no aireados (150 mL) con diferentes concentraciones de vinaza y control con medio Bristol

Del análisis del gráfico se infiere que *C. vulgaris* es capaz de crecer sobre el residual; sin embargo, se afecta la densidad celular, lo que resulta evidente al comparar contra el control, sin embargo en el procedimiento experimental vemos que el mayor crecimiento se observa en primer lugar en el cultivo con menor concentración de vinaza (12,5 mL), seguido por el control lo que puede explicarse debido a que la vinaza como ha sido mencionado anteriormente contiene nutrientes que permiten el crecimiento microalgal y enriquecieron el medio, aunque también contiene elementos que afectan el crecimiento, pero al ser este el experimento de menor concentración de vinaza, las cantidades añadidas son asimilables por la *C. vulgaris* que tiene una gran adaptabilidad a diferentes medios. En los demás experimentos al aumentar la concentración de vinaza aumentan los nutrientes en el medio a la vez que los elementos limitantes del crecimiento contenidos en ella por lo que la densidad celular fue menor.

En el caso de la concentración de clorofila *a* (Figura 2), pigmento primario presente en todas las algas vemos como la mayor cantidad de la misma se obtiene en el control seguida por el cultivo con menor concentración de vinaza (12,5 mL), luego disminuye bruscamente cuando se aumenta la concentración del residual a 25 mL; valor a partir del cual ocurre un aumento progresivo de la concentración de clorofila con el aumento de la concentración de vinaza, por lo que podemos decir que al inhibirse el crecimiento, los nutrientes contenidos en el medio son empleados en la producción de clorofila.

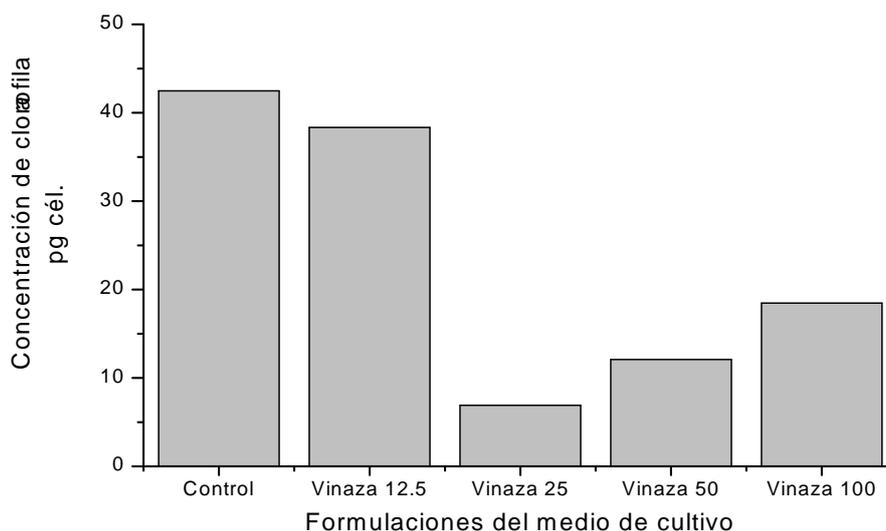


Figura 2. Variación de la concentración de clorofila *a* por célula (pg c $é$ l. $^{-1}$) en cultivos de *Chlorella vulgaris* no aireados (150 mL) con diferentes concentraciones de vinaza y control con medio Bristol al día 15 de cultivo

Comparando los resultados obtenidos en cuanto a densidad celular y concentración de clorofila *a* en los experimentos no aireados, podemos concluir que la vinaza en bajas concentraciones enriquece el medio provocando un efecto favorable en la densidad celular sin afectar mucho la concentración de clorofila ya que las sustancias limitantes que aporta todavía son asimilables por esta especie de microalga, sin embargo al aumentar la concentración de vinaza se limita el crecimiento disminuyendo la densidad celular y se ejerce el efecto contrario en la concentración de clorofila *a*, ya que los nutrientes aportados por la vinaza son utilizados en la producción de la misma.

3.2. Cultivos aireados

Parte de los medios de cultivos aireados de *C. vulgaris* son restituidos por vinaza en su fase de crecimiento exponencial mostrando evidencias de efecto tóxico al igual que en los cultivos estáticos, ver Figura 3.

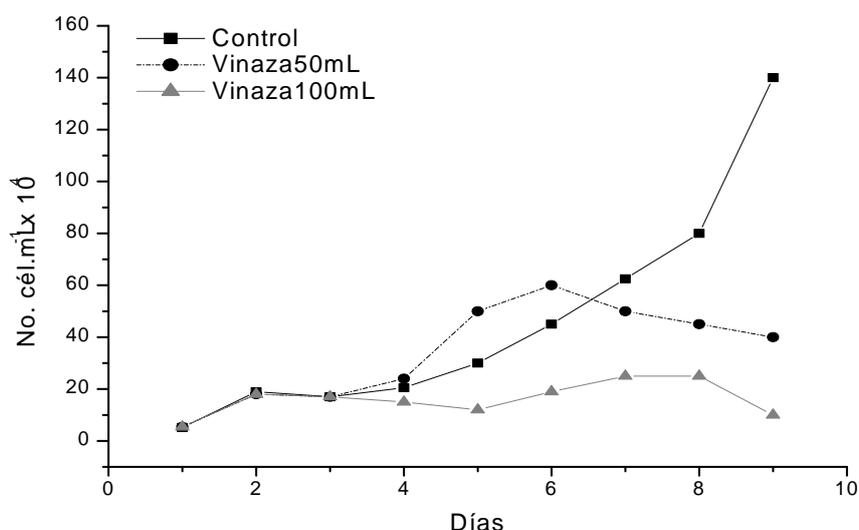


Figura 3. Cinética de cultivos de *Chlorella vulgaris* aireados (250 mL) expuestos a diferentes concentraciones de vinaza y control con medio Bristol

Se realizan cuatro experimentos en los cuales se restituye parte del medio al sexto día de cultivo, en dos de ellos se restituye por medio Bristol fresco en diferentes proporciones, como ambos manifestaron resultados similares se halló una media y se tomó como control. En los restantes parte del medio de cultivo fue restituido por diferentes concentraciones de vinaza, lo cual afectó drásticamente el crecimiento de *C. vulgaris* con respecto al control; comportamiento que podría deberse a la muerte celular inmediata de un porcentaje significativo de la población; al incorporarse sustancias tóxicas, mostrando un comportamiento con tendencia a la muerte.

En estos experimentos aireados se calcula la tasa de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) que resultó ser mayor para el control con un valor de 4,33 días⁻¹ prácticamente el doble con respecto a las tasas máximas de crecimiento de los experimentos donde se restituyó parte del medio con vinaza en cantidades de 50 mL y 100 mL, cuyos resultados fueron 2,49 y 2,45, respectivamente, lo que evidencia una limitación en el crecimiento con el aumento de la concentración de vinaza.

De los análisis realizados se infiere que; la vinaza limita el crecimiento de dicha microalga no resultando una alternativa para el desarrollo en cultivos densos, sin preparación previa, lo que puede estar relacionado con las grandes concentraciones de amonio y nitrito presentes en la misma, siendo algunas microalgas sensibles a altas concentraciones de amonio lo cual resulta perjudicial ya que pueden inhibir su crecimiento, esto puede estar relacionado con un aumento del pH interno, debido a la penetración de moléculas de hidróxido amónico no disociadas (Morris, 1974). Por encima de pH 7, el NH₃ libre se hace disponible, y la difusión de este aumentara el pH interno, a diferencia del NH₄⁺, Gómez, (1997). De igual manera, el nitrito en altas concentraciones puede inhibir el crecimiento microalgal (Cresswell and Syrett, 1982). La vinaza presenta también melanoidinas, tóxicas para los microorganismos a cultivar en ese medio (Fitzgibbon et al., 1995, Verma, 1976),

Una vía para solucionar esta problemática sería la mezcla de la vinaza con otros residuales disponibles que aporten los elementos deficitarios, una vez que se haya diluido la misma hasta concentraciones de sustancias tóxicas permisibles para el crecimiento de las microalgas. Las aguas residuales del proceso azucarero o de otras industrias de producción de alimentos podrían ser empleadas con este fin. Resulta válido señalar que ya han sido evaluadas algunas alternativas para la producción de microalgas a partir de residuales, como por ejemplo, los residuales de la industria láctea (González, C., 2006; Gómez, 2011)

Sin embargo para la clorofila tiene un efecto contrario ya que al inhibirse el crecimiento por sustancias tóxicas presentes en el medio, los nutrientes disponibles son utilizados por las microalgas para la producción de clorofila *a*.

4. CONCLUSIONES

1. Se pueden utilizar las vinazas de destilería como medio de cultivo para la obtención de biomasa microalgal, pues contienen todos los macro y micronutrientes necesarios para el cultivo de *C. vulgaris*, objeto de estudio del presente trabajo.

2. La presencia de sustancias tóxicas en las vinazas de destilería inhiben el crecimiento microalgal, por lo que se hace indispensable la preparación previa de esta materia prima, constituyendo una fuente barata de nutrientes.
3. Se confirma que en condiciones de estrés se inhibe el crecimiento microalgal, pero se sintetizan otros compuestos de alto valor agregado, como es el caso de la clorofila *a*.

REFERENCIAS

- Al-Widyan, M. I., and Al-Shyoukh, A. O., Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel., *Bioresource Technology*, Vol. 85, No. 3, 2002, pp. 253-256.
- Becker, E. W., *Microalgae: Biotechnology and Microbiology.*, Cambridge University Press, 1994.
- Demirbas, A., Production of biodiesel from algae oils., *Energy Sources Part A: Recovery, Utilization & Environmental Effects*, Vol. 31, No. 2, 2009, pp.163-168.
- Gómez, L., Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chorella vulgaris* en Cuba., Universidad de la Coruña, La Coruña, 1997, pp.265-275.
- Kessler, E., Limits of growth of live *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals., *Arch. Hydrobiol.*, Vol. 73, 1986, pp. 123-128.
- NIES, Microbial Culture Collection. National Institute of Environmental Studies, 2001.
- Oh-Hama, T., Miyachi, S., *Chlorella*. in: M.A.a.B. Borowitzka, L. J, *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge University Press, 1988, pp. 3-26.
- Sant´Anna, L., *Chlorococcales (Chlorophyceae)*, *Journal of Cramery of Germany*, 1984.
- Santos, M., Martin, F., Dianez, F., Carretero, M., García, M., Tello, J., , Efecto de la aplicación de la vinaza de vino como biofertilizantes y en el control de enfermedades en el cultivo de pepinos., 2007.
- Soeder, C.J., Hegewald, E., *Scenedesmus*. In: M.A.B. Borowitzka, *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, 1988, pp. 59-84.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C.; Duran, E., Isambert, A., Commercial applications of microalgae., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 101, 2006, pp.87–96.
- U.S. DOE. National Algal Biofuels Technology Roadmap. ,U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program, 2010. Disponible en: <http://biomass.energy.gov>
- Van Den Hoek, C., Mann, D.G., Jans, H.M., *Algae. An Introduction to Phycolog.* Cambridge Univ. Press, 1995.
- Xu, H., X. Miao and Q. Wu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters., *Journal of Biotechnology*, Vol. 126, No. 4, 2006, pp. 499-507.