

Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal

Chicken manure: poultry waste as an alternative nutrient source for microalgal biomass production

Néstor Rosales Loaiza*, José Bermúdez*, Reyna Moronta* y Ever Morales**

RESUMEN

La gallinaza puede ser usada como una fuente alternativa de nutrientes para el cultivo de microalgas, proveyendo de biomasa microalgal utilizable como producto final. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la fracción soluble de gallinaza (FSG) a tres diferentes concentraciones (6, 18 y 36%) sobre el crecimiento, la producción de pigmentos y proteínas de la microalga marina *Chroomonas* sp. y de la microalga de agua dulce *Chlorella sorokiniana*. La FSG no biodegradada mostró un efecto letal sobre el crecimiento de ambas microalgas. La FSG tratada aeróbicamente mejoró el crecimiento de *Chroomonas* sp. a 18% con $131,37 \pm 13,66 \times 10^6$ cel mL⁻¹, y a 36% para *C. sorokiniana* de $228,64 \pm 4,90 \times 10^6$ cel mL⁻¹ ($p < 0,05$). De igual forma, el peso seco más alto se obtuvo a 18 y 36% para *Chroomonas* y *C. sorokiniana* de $1,69 \pm 0,03$ y $1,07 \pm 0,01$ mg mL⁻¹, respectivamente ($p < 0,05$). La producción de pigmentos fue más alta a 36% de FSG. Los máximos valores de clorofila fueron de $21,49 \pm 2,51$ y $16,06 \pm 0,83$ µg mL⁻¹, y de carotenoides de $12,35 \pm 1,69$ y $1,96 \pm 0,19$ µg mL⁻¹ para *Chroomonas* y *C. sorokiniana*, respectivamente. La máxima producción de proteínas fue alcanzada a 18% para *Chroomonas* sp con $384,54 \pm 18,52$ µg mL⁻¹, y a 36% para *C. sorokiniana* con $779,53 \pm 11,14$ µg mL⁻¹ ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la fracción soluble de gallinaza puede ser usada como una fuente de nutrientes para la producción de biomasa enriquecida con pigmentos y proteínas, reduciendo así costos de cultivo.

Palabras clave: *Chroomonas*, *Chlorella*, gallinaza, pigmentos, proteínas.

ABSTRACT

Chicken manure can be used as an alternative nutrient source for microalgal cultures, providing usable algal biomass as an end-product. This study was aimed at assessing the effect of chicken manure soluble fraction (CMSF) at three different concentrations (6, 18 and 36%) on *Chroomonas* sp. marine microalgae and *Chlorella sorokiniana* freshwater microalgae growth, pigment and protein production. Non-biodegraded CMSF had a lethal effect on the growth of both types of microalgae. Aerobic-biodegraded CMSF enhanced *Chroomonas* growth at 18% ($131.37 \pm 13.66 \times 10^6$ cell mL⁻¹) and *C. sorokiniana* at 36% ($228.64 \pm 4.9 \times 10^6$ cell mL⁻¹) ($p < 0.05$). The greatest dry weight was obtained for *Chroomonas* and *C. sorokiniana* at 18% and 36% (1.69 ± 0.03 and 1.07 ± 0.01 mg mL⁻¹, respectively) ($p < 0.05$). Pigment production was highest at 36% CMSF. Maximum chlorophyll values were 21.49 ± 2.51 and 16.06 ± 0.83 µg mL⁻¹; maximum carotenoid values were 12.35 ± 1.69 and 1.96 ± 0.19 µg mL⁻¹ for *Chroomonas* and *C. sorokiniana*, respectively. Maximum protein production was reached at 18% for *Chroomonas* sp. (384.54 ± 18.52 µg mL⁻¹) and at 36% for *C. soro-*

* Licenciados en Biología, M.Sc. en Microbiología.

** Licenciado en Biología, M.Sc. en Biología, Ph.D. en Ciencias Biológicas. Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
Teléfono: +58-261-7597734 Fax: +58-261-7598078. evermster@gmail.com

kiniana ($779.53 \pm 11.14 \mu\text{g mL}^{-1}$) ($p < 0.05$). These results suggest that CMSF can be used as a nutrient source for pigment- and protein-enriched biomass production, thereby reducing culture costs.

Keywords: *Chroomonas*, *Chlorella*, chicken manure, pigment, protein.

Recibido: abril 28 de 2007

Aceptado: junio 13 de 2007

INTRODUCCIÓN

El creciente aumento en los costos de fertilizantes inorgánicos ha tenido como consecuencia la búsqueda de fuentes alternativas, particularmente de nitrógeno; teniendo en cuenta, además, la aparición de serios problemas de contaminación por el uso excesivo de dichos fertilizantes (Sevrin-Reysac, 1998).

La atención mundial se ha vuelto hacia el uso de materiales orgánicos de diversos orígenes como fertilizantes (Benedetti et ál., 1998). Los desechos animales tienen una larga historia de uso como fuente de fósforo, nitrógeno y carbono para el crecimiento microalgal y la producción de alimento natural (Knud-Hansen, 1998).

El cultivo de algas en desechos animales ricos en nitrógeno y fósforo se presenta como una alternativa al uso de medios de cultivo inorgánicos, los cuales son altamente costosos. Existe considerable literatura sobre el uso de desechos animales crudos y digeridos anaeróbicamente para el crecimiento de algas (Paniagua y Bucle, 1985; Costa et ál., 2000; Olguin et ál., 2001; Jiménez-Pérez et ál., 2004; Kebede-Westhead et ál., 2004).

En Venezuela se producen cantidades apreciables de estiércol provenientes de la explotación intensiva de animales (Rivero y Carracedo, 1999), las cuales deberían contribuir a la producción de fertilizantes, permitiendo así el uso de un recurso que, de otra manera, se perdería o causaría la contaminación de aguas, aire y suelos por manejo inadecuado. La producción de estiércol en el país proviene de la cría de diversos tipos de animales, ocupando la gallinaza un lugar muy importante debido a la cantidad producida. Parra et ál. (1985) estimaron una producción de $135.493 \text{ kg año}^{-1}$ de excretas puras.

Una alternativa potencial para el uso de los desechos de excretas de las granjas avícolas es el

cultivar microalgas aprovechando el nitrógeno y el fósforo presentes dentro de estas excretas y, de esta forma, convertir estos nutrientes en biomasa microalgal (Pizarro et ál., 2002). Con esta modalidad de cultivo se ha obtenido biomasa a partir de *Chlorella saccharophila*, *Phaeodactylum tricoratum*, *Skeletonema costatum* y *Pavlova lutheri* (De Pauw et ál., 1980; Paniagua et ál., 1987).

La gallinaza es un abono orgánico de excelente calidad. Se compone de eyecciones de las aves de corral y del material usado como cama, que por lo general es la cascarilla de arroz mezclada con cal en pequeña proporción, la cual se coloca en el piso. Es un apreciado fertilizante orgánico, relativamente concentrado y de rápida acción. Lo mismo que el estiércol, contiene todos los nutrientes básicos indispensables para las plantas, pero en mucha mayor cantidad. Este abono orgánico se diferencia de todos los demás estiércoles en que su contenido de nutrientes es más alto, pero al igual que todos los estiércoles de granja, su composición es variable dependiendo de su ordenación, almacenamiento y de la cantidad de camas que se utilicen (Hernández y Cruz, 1993).

Uno de los nutrientes más variables es la proteína cruda, la cual es afectada por la humedad que contenga, ya que las bacterias presentes en el material desdobl原因 el ácido úrico y lo convierten en amoníaco, el cual se evapora. Otro aspecto importante en la gallinaza es su alto contenido de calcio, que alcanza valores de 6% en promedio; en algunos casos se observan valores del 10-12% (Hernández y Cruz, 1993).

El uso de estos productos generados como parte del proceso productivo de la actividad agrícola ha sido regulado en países como Costa Rica, con la finalidad de recomendar el tratamiento previo de los mismos a fin de reducir al mínimo la contaminación del ambiente, la generación de desechos y los riesgos para la salud humana y animal (MINAE, 1986). De tal ma-

nera que es necesario su procesamiento anaeróbico o aeróbico para la utilización posterior bien sea de su extracto, fracción soluble o del compost.

De las microalgas estudiadas, de la primera de ellas, *Chroomonas* sp., se conocen pocos trabajos publicados sobre cultivo y usos. La mayor parte de los trabajos disponibles se refieren a fisiología y producción de pigmentos (Volkman et ál., 1989; Hiller et ál., 1992; Dunstan et ál., 2005). Aunque estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado el potencial de esta microalga para ser usada como alimento de *Artemia*, bivalvos y larvas de camarón (datos no publicados). Por otro lado, *Chlorella sorokiniana* ha sido ampliamente utilizada en trabajos sobre fisiología, genética y producción de biomasa de microalgas de valor agregado con propósitos biotecnológicos (Ugwu et ál., 2005; Singh y Goyal, 2007).

Es de suma importancia la realización de estudios sobre cultivos de microalgas con compuestos orgánicos en condiciones mixotróficas, debido a la estimulación que pueden ejercer sobre el crecimiento y la producción de pigmentos o de otros compuestos de interés, ya que éste es un tipo de fertilizante de bajo costo y de fácil adquisición. Por tal motivo, en el presente trabajo se evaluó la influencia de la fracción soluble de gallinaza sobre el crecimiento, contenido de pigmentos y proteínas de la microalga marina *Chroomonas* sp. y de la microalga de agua dulce *Chlorella sorokiniana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microalgas

En este estudio se utilizaron dos microalgas. *Chroomonas* sp. es una microalga flagelada marina, aislada en la laguna Gato Negro del sistema lagunar Las Peonías (10° 46' 20" N, 71° 40' 05" O), al norte de Maracaibo, y *Chlorella sorokiniana* es una microalga de agua dulce, aislada de la represa de Tulé (10° 52' 57" N, 72° 07' 23" O), en el municipio Mara, estado Zulia, Venezuela.

Preparación de la FSG

El excremento de gallina procedente de una granja avícola comercial fue limpiado, pulverizado y seca-

do en una estufa, para luego ser resuspendido en agua de mar y en agua destilada, para una concentración final de 5% p/v. Una parte fue filtrada y esterilizada inmediatamente para evitar la degradación por parte de su flora bacteriana acompañante. La otra parte fue colocada en un Erlenmeyer y sometida a aireación constante durante ocho días, con la finalidad de inducir la biodegradación aeróbica de la misma, por parte de su flora bacteriana asociada (De Pauw et ál., 1980). Posteriormente, esta solución fue filtrada y la fracción soluble obtenida fue esterilizada y mantenida a 4 °C para su posterior utilización en los cultivos.

Sistema y condiciones de cultivo

La fracción soluble de gallinaza fue evaluada en concentraciones de 6, 18 y 36% v/v. Los cultivos control se realizaron con medio inorgánico (Algal®) (Fábregas et ál., 1984) a una concentración equivalente de 8 mM NaNO₃.

Los cultivos por triplicado se iniciaron con una densidad celular de 2x10⁶ cel mL⁻¹ en frascos de 350 mL de capacidad a un volumen de cultivo de 200 mL. Estos experimentos se mantuvieron con iluminación lateral a una intensidad luminosa de 156 μmol quanta m⁻² s⁻¹, fotoperiodo de 12:12 horas, aireación constante y 28 ± 2 °C durante 25 días. *Chroomonas* sp. fue cultivada en agua de mar a 35‰, mientras que *C. sorokiniana* fue cultivada en agua destilada.

Análisis de biomasa

La densidad celular fue determinada por recuento en microscopio cada tres días hasta alcanzar fase estacionaria, usando un hematocitómetro Neübauer. Los datos de cinética de crecimiento se calcularon a partir de los datos de densidad celular en fase exponencial, usando las fórmulas propuestas por Lobban et ál. (1988). Todos los análisis de biomasa fueron realizados durante la fase estacionaria.

La determinación del peso seco se realizó mediante el sistema de filtración Millipore®, con filtros de fibra de vidrio de 0,45 μm de poro, y de acuerdo con el método de Utting (1985). Los pigmentos fueron analizados mediante extracción en acetona:metanol (2:1 v/v) y corridos en HPLC según las condiciones de corrida descritas por Vidussi et ál. (1996). Por su parte, el contenido

de proteínas fue determinado por el método de Lowry-Folin (Lowry et ál., 1951) modificado por Herbert et ál. (1971).

Análisis estadístico

Los datos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (Manova) para la determinación de grupos significativamente diferentes. En todos los casos donde la prueba F resultó significativa, se empleó la prueba de rangos múltiples de Scheffé a un nivel de significancia del 95%, mediante el programa SPSS 11.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso del extracto de gallinaza sin previa degradación aeróbica indujo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las microalgas estudiadas, debido posiblemente a la presencia de factores tóxicos y baja disponibilidad de nutrientes.

Cuando se utilizó la fracción soluble de gallinaza (FSG) degradada aeróbicamente como fuente de nutrientes para el cultivo de la microalga *Chroomonas* sp. se encontró que a 18% se produjeron los valores más elevados de densidad celular con $131,37 \pm 13,66 \times 10^6$ cel mL⁻¹, el cual fue significativamente superior ($p < 0,05$) al resto de los tratamientos incluyendo al control (figura 1).

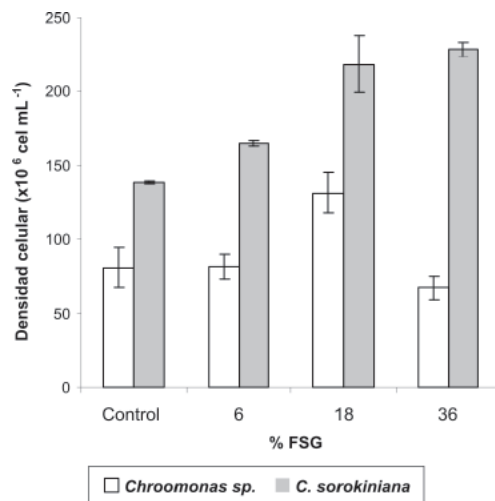


Figura 1. Densidad celular en fase estacionaria de *Chroomonas* sp. y *Chlorella sorokiniana*, crecidas a diferentes concentraciones de fracción soluble de gallinaza (% FSG).

Así mismo, *C. sorokiniana* también incrementó su crecimiento con la FSG biodegradada. A 36% se presentó el valor más elevado de densidad celular en fase estacionaria, con $228,64 \pm 4,90 \times 10^6$ cel mL⁻¹, y con diferencia significativa ($p < 0,05$) (figura 1).

El mismo patrón fue observado en relación con el peso seco, con máximos a 18% para *Chroomonas* sp. y a 36% para *C. sorokiniana*, de $1,69 \pm 0,03$ y $1,07 \pm 0,01$ mg mL⁻¹, respectivamente, y con diferencias significativas ($p < 0,05$) (tabla 1). De la misma forma, se presentaron los datos de cinética de crecimiento; con los mejores valores para *Chroomonas* sp. a 18% de $0,29$ div d⁻¹ y $2,39$ d⁻¹, y para *C. sorokiniana* a 36% de $0,35$ div d⁻¹ y $1,97$ d⁻¹, de velocidad de crecimiento y tasa de duplicación, respectivamente (tabla 1).

Baumgarten et ál. (1999) obtuvieron altos crecimientos de la microalga *Chlorella* sp. –de hasta 200×10^6 cel mL⁻¹– en desechos provenientes de la cría de cerdos, pero los cultivos presentaban fases de latencia de hasta 4 días. 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 ál., 2000; Chojnacka y Noworyta, 2004).

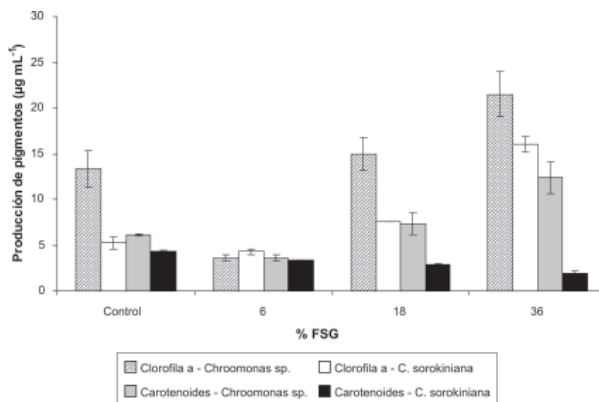
Por otro lado, Kebede-Westhead et ál. (2006) encontraron que el uso de efluentes provenientes de la cría de cerdos aumenta el crecimiento de microalgas de agua dulce pero a bajas concentraciones (0,5 g L⁻¹). Además, el uso de afluentes digeridos anaeróbicamente fue dos veces más productivo que los obtenidos con efluentes crudos.

La concentración de FSG también ejerció influencia sobre el contenido de pigmentos tanto en *Chroomonas* sp., como en *Chlorella sorokiniana*. Los valores más elevados para la producción de clorofila *a* se hallaron a la mayor concentración de FSG del 36% con $21,49 \pm 2,51$ y $16,06 \pm 0,83$ µg mL⁻¹, respectivamente, y con diferencia significativa ($p < 0,05$) (figura 2). El aumento de la clorofila con respecto al control fue de 3 veces para *C. sorokiniana*, mientras que para *Chroomonas* sp. fue de 1,6 veces.

La producción a 6% FSG resultó ser más baja que la alcanzada por el cultivo control, mientras que a 18% se observa una producción ligeramente mayor ($p > 0,05$) con respecto al control para ambas

Tabla 1. Peso seco y parámetros de cinética de crecimiento de *Chroomonas* sp. y *Chlorella sorokiniana*, crecidas a diferentes concentraciones de fracción soluble de gallinaza (% FSG).

	Peso seco (mg mL ⁻¹)	Velocidad de crecimiento (div d ⁻¹)	Tasa de duplicación (d ⁻¹)
<i>Chroomonas</i> sp.			
Control	0,88 ±0,04	0,22	3,15
6% FSG	0,65 ±0,03	0,17	4,08
18% FSG	1,69 ±0,03	0,29	2,39
36% FSG	0,89 ±0,05	0,22	3,15
<i>C. sorokiniana</i>			
Control	0,54 ±0,01	0,07	9,47
6% FSG	0,88 ±0,04	0,10	7,27
18% FSG	0,85 ±0,02	0,25	2,83
36% FSG	1,07 ±0,01	0,35	1,97

**Figura 2.** Producción de pigmentos en fase estacionaria de *Chroomonas* sp. y *Chlorella sorokiniana*, crecidas a diferentes concentraciones de fracción soluble de gallinaza (% FSG).

microalgas. Estas bajas producciones pueden sugerir: a) la presencia de algún factor inhibitorio, o b) la insuficiencia de los nutrientes esenciales para la producción de este pigmento a estas concentraciones de FSG.

La producción de carotenoides en *Chroomonas* sp. presentó la misma tendencia observada en la producción de clorofila. Los mayores valores

fueron obtenidos a la mayor concentración de 36% FSG con $12,35 \pm 1,69 \mu\text{g mL}^{-1}$, y con diferencia significativa ($p < 0,05$). Para *C. sorokiniana* la producción de carotenoides fue inversa a la concentración de FSG. Los mayores valores se obtuvieron con el control con $4,34 \pm 0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido por 6% FSG con $3,40 \pm 0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$, con diferencias entre ellos ($p < 0,05$).

Aunque en cultivos mixotróficos se alcanzan mayores productividades celulares que en cultivos autotróficos, éstos producen menores cantidades de pigmentos liposolubles (Yang et ál., 2000). El uso de una fuente carbonada distinta al CO₂ para el crecimiento puede disminuir la tasa fotosintética, lo que podría traducirse en la disminución de los pigmentos. Además, el aumento de la turbidez del medio de cultivo disminuye el riesgo de fotoinhibición y fotooxidación, disminuyendo así la producción de carotenoides (Tandeau de Marsac y Houmar, 1993).

Por otro lado, el aumento de los pigmentos fotosintéticos durante el crecimiento mixotrófico ha sido verificado en microalgas como *Chlorella*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Spirulina* (*Arthrospira*), pero a bajas concentraciones de los compuestos utilizados como fuente orgánica de nutrientes (Olguín et ál., 2001; Ip et ál., 2004; Cerón García et ál., 2005).

El aumento de pigmentos en *Chroomonas* sp. también puede estar relacionado con el aumento de la turbidez en los medios de cultivo por la concentración de FSG usada. A altas concentraciones de FSG, y altas densidades celulares, los cultivos eran más oscuros y turbios. Bajo estas condiciones las células necesitan sintetizar mayor cantidad de pigmentos para poder captar la energía radiante suficiente y contrarrestar así el efecto de ensombrecimiento producido por la FSG (Rosales et ál., 2006)

La producción de proteínas fue altamente mejorada en presencia de FSG. Para *Chroomonas* sp. el aumento de proteínas a 6, 18 y 36% FSG con respecto al control fue de 1,5; 2,5 y 2,2 veces, respectivamente. El valor más alto se obtuvo a 18% FSG con $384,54 \pm 18,52 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$) (figura 3).

En *C. sorokiniana* también se observó un aumento comparado con el cultivo control, de 1,2; 2,0 y 2,7 veces para 6, 18 y 36%, respectivamente. La producción máxima fue de $779,53 \pm 11,14 \mu\text{g mL}^{-1}$, con diferencias significativas entre todos los tratamientos y sin distinción entre ambas microalgas ($p < 0,05$) (figura 3).

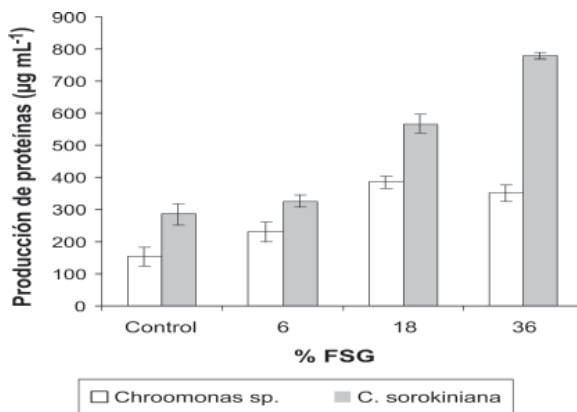


Figura 3. Producción de proteínas en fase estacionaria de *Chroomonas* sp. y *Chlorella sorokiniana*, crecidas a diferentes concentraciones de fracción soluble de gallinaza (% FSG).

El aumento de la producción proteica en cultivos utilizando desechos avícolas ha sido verificado en trabajos previos (Quintana y Fernández, 2004) y está relacionado de forma obvia con una mayor disponibilidad de nutrientes, especialmente nitrógeno (Sevrin-Reyssac, 1998).

CONCLUSIONES

Estos resultados evidencian que la fracción soluble de gallinaza (FSG) previamente digerida aeróbicamente puede ser usada como fuente de nutrientes para microalgas, mejorando la producción de biomasa en condiciones mixotróficas. Se verifica de esta forma el uso de este desecho animal como medio de cultivo alternativo y económico para la producción de biomasa microalgal enriquecida con metabolitos de valor económico y biotecnológico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fonacit) por el financiamiento a través del proyecto S1-2000000786, por su aporte al desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baumgarten, E.; Nagel, M.; Tischner, R. 1999. Reduction of the nitrogen and carbon content in swine waste with algae and bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 281-284.
- Benedetti, A.; Canalli, S.; Lianello, F. 1998. La fertilizzazione organica dei suoli. En: Sequi, P. (ed.). *I Fertilizzanti Organici*. Roma: Edizioni L'Informatore Agrario. pp. 1-12.
- Cerón García, M.; Sánchez Mirón, A.; Fernández Sevilla, J.; Molina Grima, E.; García Camacho, F. 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Proc. Biochem.* 40: 297-305.
- Chojnacka, K.; Noworyta, A. 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enz. Microb. Technol.* 34: 461-465.
- Costa, R.; Medri, W.; Perdomo, C. 2000. High-rate pond for treatment of piggery wastes. *Water Sci. Technol.* 42: 357-362.

- De Pauw, N.; Verlet, H.; De Leenheer, L. 1980. Heated and unheated outdoor cultures of marine algae with animal manure. En: Shelef, G.; Soeder, C. (editors). *Algae biomass*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 315-341.
- Dunstan, G.; Brown, M.; Volkman, J. 2005. Cryptophyceae and rhodophyceae; chemotaxonomy, phylogeny, and application. *Phytochem.* 66: 2557-2570.
- Fábregas, J.; Abalde, J.; Herrero, C.; Cabezas, B.; Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture.* 42: 207-215.
- Herbert, D.; Phipps, P.; Straone, R. 1971. Automated chemical analysis. En: Norris, J.; Ribbons, D. (editors). *Methods in Microbiology*. Academic Press. 5: 209-344.
- Hernández, J.; Cruz, A. 1993. Boletín informativo sobre el uso de subproductos: Gallinaza. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. p. 5.
- Hiller, R.; Scaramuzzi, C.; Breton, J. 1992 The organization of photosynthetic pigments in a cryptophyte alga: A linear dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1102(3): 360-364.
- Ip, P.; Wong, K.; Chen, F. 2004. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Proc. Biochem.* 39: 1761-1766.
- Jiménez-Pérez, M.; Sánchez-Castillo, P.; Romera, O.; Fernández-Moreno, D.; Pérez-Martínez, C. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enz. Microb. Technol.* 34: 392-398.
- Kebede-Westhead, E.; Pizarro, C.; Mulbry, W. 2004. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Elemental composition of algal biomass at different manure loading rates. *J. Ag. Food. Chem.* 52: 7293-7296.
- Kebede-Westhead, E.; Pizarro, C.; Mulbry, W. 2006. Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: Production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates. *J. Appl. Phycol.* 18: 41-46.
- Knud-Hansen, C. 1998. *Pond fertilization: Ecological approach and practical application. Pond dynamics/aquaculture collaborative research support program*. Oregon: Universidad Estatal de Oregon. p. 125.
- Lobban, C.; Chapman, D.; Kremer, B. 1988. *Experimental Phycology: A laboratory manual*. New York: Cambridge University Press. p. 295.
- Lowry, D.; Rpsenbrough, H.; Farr, A.; Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Biochem.* 193: 265-275.
- MINAE. 1986. *Reglamento sobre el manejo y control de gallinaza y pollinaza*, núm. 29145-MAG-S-MINAE. 10 pp.
- Olgún, E.; Galicia, S.; Angulo-Guerrero, O.; Hernández, E. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Biores. Technol.* 77: 19-24.
- Paniagua, J.; Bucle, L. 1985. Cultivo en condiciones controladas de *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con extractos de macrófitas marinas. *Ann. Inst. Cienc. del Mar y Limnol.* México: UNAM. 12: 59-70.
- Paniagua, J.; Farfán, B.; Buckle, F. 1987. Culture of marine microalgae with natural biodigested resource. *Aquaculture.* 64: 249-256.
- Parra, R.; Escobar, A.; Goiri, G. 1985. Recursos alimenticios no tradicionales para la ceba de bovinos. En: León, R. (editor). *Manejo, procesamiento y utilización de excretas de aves*. Quinto Ciclo de Conferencias sobre Producción Avícola. Maracay, Venezuela. p. 1-77.
- Pizarro, C.; Kebede-Westhead, E.; Mulbry, W. 2002. Nitrogen and phosphorus removal rates using small algal turfs grown with dairy manure. *J. Appl. Phycol.* 14: 469-473.
- Quintana, M., Fernández, M. 2004. Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas [artículo en línea]. MEDISAN 8 (3). Acceso a través de: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol8_3_04/san05304.htm [Consultado: abril 26 de 2007].
- Rivero, C.; Carracedo, C. 1999. Efecto del uso de gallinaza sobre algunos parámetros de fertilidad química de dos suelos de pH contrastante. *Rev. Fac. Agron. Maracay.* 25: 83-93.
- Rosales, N.; Jonte, L.; Morales, E. 2006. Crecimiento y composición bioquímica de *Synechococcus* sp. modulados por el nitrato de sodio. *Bol. Centro de Inv. Biol.* 40 (2): 120-132.
- Sevrin-Reyssac, J. 1998. Biotreatment of swine manure by production of aquatic valuable Biomasses. *Agricul. Ecosys. Environ.* 68: 177-186.

- Singh, S., Goyal, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Biores. Technol.* 98: 2243-2257.
- Tandeau de Marsac, N. ; Houmard, J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 119-190.
- Ugwu, C.; Ogbonna, J.; Takana, H. 2005. Characterization of light utilization and biomass yields of *Chlorella sorokiniana* in inclined outdoor tubular photobioreactors equipped with static mixers. *Proc. Biochem.* 40: 3406-3411.
- Utting, S. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture.* 56: 123-138.
- Vidussi, F.; Claustré, H.; Bustillos, J.; Cailliau, C.; Marty, J. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.* 18: 237-282.
- Volkman, J.; Jeffrey, S.; Nichols, P.; Rogers, G.; Garland, C. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128 (3): 219-240.
- Yang, C.; Hua, Q.; Shimizu, K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Engin. J.* 6: 87-102.