

# MODELOS ESTADÍSTICOS PARA LA ESTIMACIÓN DE BIOMASA DE *Raphidocelis subcapitata*

## STATISTICAL MODELS FOR BIOMASS ESTIMATIONS OF *Raphidocelis subcapitata*

Sofía Cornejo León<sup>a</sup>, Daniel Alejandro Limón Huerta<sup>b</sup>, Sara Silva Padrón<sup>c</sup>, Gladys Elizabeth Zapien Rivera<sup>d</sup>, José Luis Zavala Aguirre<sup>e\*</sup>

<sup>a</sup> *Estudiante de Ingeniero en Conservación y Restauración Ambiental, UAG; sleon@edu.uag.mx*

<sup>b</sup> Estudiante de Ingeniero en Conservación y Restauración Ambiental, UAG, daniel.limon@edu.uag.mx

<sup>c</sup> Estudiante de Ingeniero en Conservación y Restauración Ambiental, UAG, sara.silva@edu.uag.mx

<sup>d</sup> Estudiante de Ingeniero en Conservación y Restauración Ambiental, UAG, gladys.zapien@edu.uag.mx

<sup>e</sup> Profesor Investigador, Departamento de Biotecnológicas y Ambientales, UAG, jzavala@edu.uag.mx

\* autor por correspondencia

## RESUMEN

La microalga *Raphidocelis subcapitata* tradicionalmente ha sido empleada como especie indicadora en sistemas acuáticos pero recientes trabajos la proponen como especie con potencial para producción de biodiesel. Se desarrolló un cultivo en condiciones de laboratorio donde se midió la producción de biomasa ( $214 \text{ mg L}^{-1}$ ), la tasa de crecimiento máxima de  $0.7828 \text{ día}^{-1}$  y otros parámetros poblacionales. Con los datos de fluorescencia de la clorofila se obtuvieron modelos de regresión para estimar la producción de biomasa y los coeficientes de la ecuación logística: 5.0, 0.50 y 0.002 respectivamente para  $P_0$ ,  $a$ , y  $b$ . La comparación del desempeño de *R. subcapitata* con otras microalgas confirma su potencial uso en aplicaciones biotecnológicas.

**Palabras clave:** *Raphidocelis subcapitata*, Biorremediación, Modelo logístico.

## ABSTRACT

Although microalgae *Raphidocelis subcapitata* has been used as a bioindicator in aquatic ecosystems, new results propose it as a species for biodiesel production. We developed a controlled culture under laboratory conditions to assess the biomass production ( $214 \text{ mg L}^{-1}$ ), the maximum growth rate ( $0.7828 \text{ day}^{-1}$ ) and other population indexes. Data obtained from chlorophyll fluorescence were useful to design regression models for the evaluation of biomass production and for calculating coefficients for the Logistic Equation: 5.0, 0.50 y 0.002 respectively for  $P_0$ ,  $a$ ,  $y_b$ . Comparison of the performance of *R. subcapitata* with other microalgae confirms its potential use in biotechnological applications.

**Keywords:** *Raphidocelis subcapitata*, Bioremediation, Logistic model.

■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■

## 1. Introducción

La microalga *Raphidocelis subcapitata*, anteriormente era identificada como *Pseudokirchneriella subcapitata*=*Selenastrum capricornutum* (Krienitz et al., 2011). Esta microalga clásicamente se ha utilizado como organismo prueba para la evaluación ecotoxicológica de ambientes dulceacuícolas (Moreira-Santos & Ribeiro, 2004; Machado & Soares, 2020), debido a que tiene un alto grado de sensibilidad a una gran variedad de sustancias tóxicas (Yamagishi et al., 2017) y a la velocidad de obtención de resultados; las pruebas con *R. subcapitata* se pueden realizar con tan solo 72 horas de exposición (Huarachi-Olivera et al., 2019). Esta microalga también ha sido utilizada para la evaluación del cambio climático (O'Neill et al., 2019). Son pocos los estudios que se han enfocado a la producción de biomasa de la microalga *R. subcapitata* con otros fines biotecnológicos. Nascimiento et al. (2020) compararon las capacidades biotecnológicas para tres algas diferentes, y *P. subcapitata* resultó ser la que mayor cantidad de ácidos grasos produjo en proporción a su biomasa. Esta característica es relevante en la producción de biodiésel. En un estudio posterior con esta misma microalga (Pugliese et al., 2020), los cultivos fueron caracterizados en términos de biomasa producida y distribución de la fracción lipídica, con el fin de analizar las propiedades combustibles para la producción de biodiesel: el biodiésel resultante se analizó por cromatografía de gases de alta resolución para determinar la concentración de los diferentes ésteres metílicos volviéndose a resaltar el potencial biotecnológico de *R. subcapitata*.

El objetivo del presente proyecto consistió en analizar el desempeño de un cultivo estático de *Raphidocelis subcapitata* en condiciones de laboratorio mediante la obtención de la curva de crecimiento, parámetros poblacionales, biomasa, y modelos de correlación con la finalidad de compararlo con otras especies algales de importancia biotecnológica.

Se espera que los indicadores de desempeño de *R. subcapitata* serán similares a los de especies algales de importancia biotecnológica y al mismo tiempo se espera que la especie muestre alta correlación entre la biomasa y los índices de densidad, debido a la sensibilidad propia de una especie bioindicadora.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Origen de la cepa y condiciones de cultivo

La microalga fue obtenida de la empresa “Microbiotests” con sede en Bélgica (<https://www.microbiotests.com/>). La presentación, que se muestra en la Figura 1, consiste en una inclusión de las microalgas en esferas de agarosa suspendidas en medio nutritivo. Las esferas deben ser previamente disueltas en una solución de hexametáfosfato de sodio para su posterior propagación en medio nutritivo de acuerdo con las instrucciones del producto. La propagación de los cultivos madre y posteriormente de los cultivos experimentales se realizó a  $24 \pm 2$  °C utilizando iluminación fluorescente continua "Cool-White" a 4304 lúmenes. Todos los cultivos fueron agitados una o dos veces al día, durante el período de prueba, para mantener las células en suspensión.



**Figura 1.** Tubo de ensayo conteniendo las microalgas incluidas en matriz de agarosa con forma de esferas.

## 2.2 Medio de cultivo.

El medio nutritivo EPA (por las siglas en inglés de “Environment Protection Agency”) se preparó agregando 1 mL de cada solución concentrada de  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$  y micronutrientes; todas ellas aforadas a 1,000 mL de agua destilada. Las concentraciones y métodos de preparación de las soluciones son descritas con detalle en Miller et al., (1978).

## 2.3 Preparación del inóculo e inicio de cultivos.

Para la obtención del inóculo, se enjuagó el cultivo madre por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se decantó el sobrenadante y las células sedimentadas se suspendieron, en agua destilada esterilizada por filtración (membranas de acetato de celulosa de 0.45 micras). El material resultante se utilizó para inocular los cultivos como se explica en las siguientes líneas.

La propagación y mantenimiento de los cultivos madre se hizo en tres matraces balón de 250 mL de capacidad. Para el cultivo experimental se dispuso de 11 repeticiones en tubos de ensayo de 15 mL de capacidad. Ambos tipos de recipientes de cultivo fueron cargados con medio EPA de la siguiente forma: 50 mL en cada matraz y 10 mL en cada tubo. El inóculo consistió, respectivamente, en 1 mL y 3 gotas de la suspensión de algas lavadas para los matraces y para los tubos de ensayo.

## 2.4 Curva de crecimiento y parámetros poblacionales.

Para el registro de crecimiento de las microalgas, durante dos semanas, se utilizó un fluorómetro (Turner® modelo 450) equipado con filtros de 450 y 650 nm, respectivamente para estimulación y emisión de fluorescencia de la clorofila. La calibración del equipo se hizo con clorofila extraída de folíolos de árbol de fresno (*Fraxinus sp.*). La extracción se hizo con acetona al 90% alcalinizada de acuerdo con el protocolo de Lind (1985). Se estableció una escala relativa de 0 a 400 unidades de emisión. Los tubos de cultivo se agitaron cada día (equipo Thermolyne, Maxi Mix Plus®) con la finalidad de suspender las algas previo a la lectura (ver Figura 2). El crecimiento algal en los tubos de ensayo fue registrado en una hoja de cálculo, con los valores obtenidos de fluorescencia, para generar la curva de crecimiento de cada una de las réplicas. Posteriormente se calcularon los parámetros poblacionales de acuerdo con Paniagua et al., (1987): Tasa de crecimiento (K), Tiempo de duplicación (TD), Divisiones (D), Producción diaria (PD), y Valor porcentual (VP).



**Figura 2.** Agitación de las microalgas para suspenderlas previo a la lectura de fluorescencia. Sobre la mesa de trabajo se aprecian en orden: el equipo Maxi Mix Plus, la gradilla con los tubos de cultivo y al fondo, el

fluorómetro Turner 450.

## 2.5 Medición de biomasa.

Para la determinación de la biomasa se utilizaron los cultivos en los tres matraces balón de 250 mL: en el último día de cultivo se unificaron los contenidos para tener mayor volumen y biomasa al momento de la filtración y pesado (balanza analítica AND®, HS-120). Se generaron tres suspensiones de 50 mL cada una: A) Solución al 100% consistió en 50 mL de cultivo sin diluir; B) Solución al 50% (25 mL de cultivo concentrado + 25 mL de agua destilada) y C) Solución al 10% (5 mL de cultivo concentrado + 45 mL de agua destilada). Con las tres suspensiones a diferentes concentraciones, se procedió a obtener las triadas de fluorescencia (equipo Turner 450), densidad algal (retículo de Neubauer) y biomasa (microfiltración y determinaciones gravimétricas de acuerdo con Miller et al., 1978) para generar los datos necesarios para los modelos de correlación.

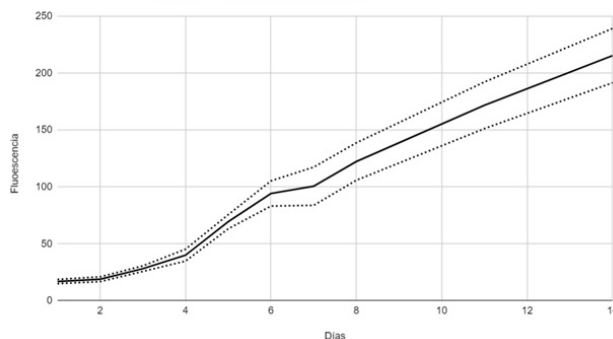
## 2.6 Correlaciones.

Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y modelos de regresión lineal entre fluorescencia (variable independiente) con densidad algal y biomasa (variables dependientes), se obtuvieron mediante rutinas automáticas precargadas en la hoja de cálculo de Excel (Microsoft®).

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Curva de crecimiento y parámetros poblacionales.

El crecimiento de *R. subcapitata*, graficado con los valores promedio de los once tubos con los que se trabajó durante el período de dos semanas, se aprecia en la Figura 3. Se observa que a partir del día 4, el cultivo se encuentra en fase de crecimiento exponencial. El tiempo de cultivo no fue suficiente para la observación de la fase estacionaria. Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza del 95% en el crecimiento del cultivo.



**Figura 3.** Incremento de fluorescencia con relación al tiempo medido en días. La línea central representa el promedio de las réplicas y las líneas punteadas representan límites de confianza al 95%.

En la Tabla 1 se muestran los valores de promedio y desviación estándar de los parámetros poblacionales durante la curva de crecimiento de las 11 repeticiones del cultivo de *R. subcapitata*. Estos valores fueron obtenidos a partir de los valores máximos de fluorescencia de cada repetición. La tasa de crecimiento (K) fue 0.6281 con desviación estándar de 0.1291. El tiempo de duplicación (TD) fue de 1.1552 con desviación estándar de 0.2798. En las divisiones por día (D) el promedio fue de 0.9061 y la desviación estándar de 0.1863. En la producción diaria (PD) el promedio fue de 36.69 y la desviación estándar de 5.36. Finalmente, del valor porcentual (VP) se obtuvo un promedio de 88.79% y la desviación estándar de 23.46.

**Tabla 1.** Parámetros poblacionales máximos del cultivo de *R. subcapitata* en condiciones de laboratorio. Tasa de crecimiento por día (K), tiempo de duplicación en días (TD), divisiones por día (D), producción diaria (PD), valor porcentual (VP).

|            | K      | TD     | D      | PD    | VP    |
|------------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Promedio   | 0.6281 | 1.1552 | 0.9061 | 36.69 | 88.79 |
| Desv. Est. | 0.1291 | 0.2798 | 0.1863 | 5.36  | 23.46 |

En la Tabla 1, se presentan los valores promedio de los parámetros poblacionales calculados en base a la fluorescencia, pero a continuación se presentan los valores máximos obtenidos en alguna de las once réplicas con que se trabajó: la mayor tasa de crecimiento (K) fue 0.7828; el mejor tiempo de duplicación (TD) fue 1.7095; el mejor índice de divisiones por día (D) fue 1.1293; el mayor valor de producción diaria (PD) fue 44 y finalmente, el mayor valor porcentual (VP) fue 118.75%. El mejor valor de productividad fue 0.214 g L<sup>-1</sup>.

### 3.2 Biomasa para diferentes densidades.

En la Tabla 2 se muestran los valores de fluorescencia, densidad Neubauer y biomasa para las tres suspensiones algales con diferente cantidad porcentual de cultivo. En el matraz de densidad baja (10%) el valor de fluorescencia fue de 62, la densidad de Neubauer de 1,525,000 cel mL<sup>-1</sup> y la biomasa de 0.044 g L<sup>-1</sup>. En el matraz de densidad media (50%) el valor de fluorescencia fue de 225, la densidad Neubauer 6,925,000 cel mL<sup>-1</sup> y la biomasa de 0.122 g L<sup>-1</sup>. En el matraz de densidad alta (100%) el valor de fluorescencia fue de 346, la densidad Neubauer 10,900,000 cel mL<sup>-1</sup> y la biomasa de 0.214 g L<sup>-1</sup>.

**Tabla 2.** Relaciones entre fluorescencia, densidad Neubauer y biomasa en las suspensiones algales con diferente densidad

| Densidad cualitativa | Fluorescencia | Densidad Neubauer<br>cel mL <sup>-1</sup> | Biomasa g L <sup>-1</sup> |
|----------------------|---------------|-------------------------------------------|---------------------------|
| Baja                 | 62            | 1,525,000                                 | 0.044                     |
| Media                | 225           | 6,925,000                                 | 0.122                     |
| Alta                 | 346           | 10,900,000                                | 0.214                     |

### 3.3 Correlaciones entre variables.

Con respecto a la correlación entre fluorescencia y densidad algal se encontró (ver Tabla 3) un alto valor del coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) equivalente a 0.999 (P = 0.0015). El modelo de regresión lineal que se obtuvo se presenta en la Fórmula (1):

$$Y = 0.0000303x + 15.64 \quad (1)$$

donde 'Y' es la densidad algal en unidades de células mL<sup>-1</sup> y 'x' es el valor de fluorescencia.

Con respecto a la correlación entre fluorescencia y biomasa, se encontró un alto valor de Coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) equivalente a 0.982 (P = 0.084). El modelo de regresión lineal que se obtuvo se presenta en la Fórmula (2):

$$Y = 1660x + 0.727 \quad (2)$$

donde 'y' es la biomasa en unidades de g mL<sup>-1</sup> y 'x' es la fluorescencia.

**Tabla 3.** Correlaciones entre fluorescencia con densidad Neubauer y fluorescencia con biomasa en gramos por litro.

| Indicadores estadísticos | Fluorescencia vs Densidad cel mL <sup>-1</sup> | Fluorescencia vs Biomasa g L <sup>-1</sup> |
|--------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| R <sup>2</sup>           | 1.00000                                        | 0.9825                                     |
| Significancia P          | 0.00150                                        | 0.0845                                     |
| Intercepto               | 15.64840                                       | 0.7266                                     |
| Pendiente                | 0.00003                                        | 1660.0534                                  |

### 3.4 Sobre la curva de crecimiento y parámetros poblacionales.

En relación con los resultados obtenidos en la curva de crecimiento de las once réplicas, entre los días 1 al 14, se obtuvieron valores de fluorescencia en el rango de 16.90±3.17 a 215.45±40.33, similar a lo reportado por Miller et al., (1978). Se observó que diez de las muestras presentaron un crecimiento exponencial dentro del período de los días 6 al 14 lo cual es un buen indicador de que las algas utilizadas como inóculo fueron células aptas en fase de crecimiento exponencial al momento de ser utilizadas en el bioensayo.

### 3.5 Sobre indicadores de biomasa.

En la Tabla 4 se muestran los resultados reportados por Miller et al., (1978) sobre el efecto del pH inicial del medio (EPA) en el rendimiento de *Selenastrum capricornutum* (*R. subcapitata*) al final de dos semanas de cultivo. La microalga presenta limitaciones fisiológicas en medios ácidos o alcalinos, independientemente de la formulación del medio de cultivo. El mayor resultado de producción de biomasa fue de 101.22 mg L<sup>-1</sup> a un pH de 10.

**Tabla 4.** Rendimiento máximo de peso seco de *Selenastrum capricornutum* respecto al pH. Datos obtenidos de Miller et al., (1978).

| pH inicial | Rendimiento máximo (peso seco) mg L <sup>-1</sup> |
|------------|---------------------------------------------------|
| 3          | 0.20                                              |
| 4          | 0.33                                              |
| 5          | 79.69                                             |
| 6          | 89.30                                             |
| 7          | 87.95                                             |
| 8          | 90.02                                             |
| 9          | 82.32                                             |
| 10         | 101.22                                            |
| 11         | 75.10                                             |

Los resultados de biomasa obtenidos en el presente estudio, a partir del cultivo en matraz sin diluir (ver Tabla 2), muestran un valor de 214 mg L<sup>-1</sup> que superan significativamente los rendimientos reportados por Miller et al., (1978). El resultado es alentador para el uso de *R. subcapitata* en aplicaciones biotecnológicas. Las diferentes cepas involucradas en cada estudio pudieran dar cuenta de las diferencias en la productividad reportada.

### 3.6 Sobre los modelos estadísticos.

A partir de las correlaciones de fluorescencia con densidad y fluorescencia con biomasa, fue posible



asignar una significancia estadística. Analizando la correlación fluorescencia vs densidad Neubauer, se sabe que se trabajó con base en un modelo prácticamente exacto con un error bastante aceptable ( $P=0.0015$ ), lo que lleva a inferir la confiabilidad de las estimaciones que se hagan (ver Tabla 3). En cambio, al observar la correlación fluorescencia vs biomasa, el valor  $P=0.0845$  indica precauciones con las posibles estimaciones por tratarse de un valor arriba del error del 5% clásicamente usado como referencia.

En este punto se detectó un área de oportunidad consistente en el desarrollo de un modelo bifactorial para la estimación de la biomasa en función de los dos índices de densidad. Con los datos de la Tabla 2 se generó el modelo que se presenta a continuación en la Fórmula (3):

$$Y = 0.034109589x_1 - 1.01516x_2 - 0.5226757 \quad (3)$$

donde Y es la biomasa en  $\text{mg L}^{-1}$ ;  $x_1$  la fluorescencia y  $x_2$  la densidad Neubauer.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) generado por la rutina de regresión integrada en Excel mostró un valor unitario, que da soporte con la más alta confiabilidad ( $R^2=1.0000$ ) al modelo bifactorial.

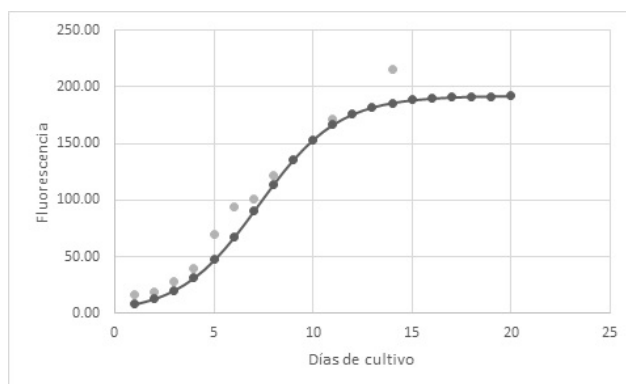
Por otra parte, tomando en cuenta un comportamiento sigmoideal en las principales etapas de crecimiento del alga, se realizó también un análisis de regresión logístico (ver Figura 4) empleando el programa MATLAB Ver 7.10.0 (2010) y el comando “nlinfit” (regresión no lineal ponderado) alimentado con los valores experimentales y la ecuación logística de Verhulst (1945) que se presenta a continuación en la Fórmula (4):

$$\frac{dP}{dt} = P(a - bP) \quad (4)$$

La solución de la ecuación logística, dependiente de los coeficientes  $P_0$ , a, y b, se presenta en la Fórmula (5):

$$P(t) = \frac{aP_0}{bP_0 + (a - bP_0)e^{-at}} \quad (5)$$

Los coeficientes de la ecuación logística: 5.0, 0.50 y 0.002 respectivamente para  $P_0$ , a, y b, fueron obtenidos por el método de aproximaciones con supervisión del coeficiente de correlación (r) con la rutina integrada en la librería de Excel (Microsoft®). En la Figura 3 los puntos negros, unidos por la línea, representan el modelo teórico para el desempeño de la microalga bajo las condiciones experimentales; los puntos grises corresponden al valor promedio de los valores de fluorescencia de los 11 cultivos en los días en los que se hicieron registros.



**Figura 4.** Modelo logístico para el crecimiento de *Raphidocelis subcapitata* (línea continua con puntos) en base a los valores obtenidos en forma experimental (puntos color gris).

### 3.7 Comparación con otras especies.

La producción masiva de microalgas es considerada como la fuente de alimento de mayor importancia para los cultivos industriales de larvas de moluscos y crustáceos debido a la calidad, factibilidad y bajo costo del cultivo de fitoplancton (Piña et al., 2007). Comparando los valores de producción de biomasa de *R. subcapitata* con otras algas, como *Chlorella vulgaris*, se encontró que nuestra especie es reportada por algunos autores con bajo potencial productivo: Silva et al., (2015) reportan una producción de  $0.05 \text{ g L}^{-1}$  en 12 días para *R. subcapitata*, mientras que *Chlorella vulgaris*, duplica su valor con  $0.106 \text{ g L}^{-1}$  en ese mismo tiempo. No obstante, Nascimiento et al., (2020) reportaron mucha más alta productividad para *R. subcapitata* en 45 días de cultivo: hasta  $0.741 \text{ g L}^{-1}$ . Y aún más, Pugliese et al., (2020) reportan valores de productividad de  $2 \text{ g L}^{-1}$  en fotobiorreactores de 500 mL durante 10 días. En el trabajo de Fergola et al., (2007) se reporta el desempeño en conjunto de estas dos microalgas. Silva et al., (2015) apuntan el potencial para el uso de *R. subcapitata* a gran escala en la mitigación de impactos ambientales y en la producción de energías alternativas, basándose en los indicadores de productividad, en la alta concentración de ácidos grasos (similar a lo reportado por Nascimiento et al., 2020) y la capacidad de ser usada para la remediación de aguas residuales de granjas avícolas.

#### 4. Conclusiones

Los índices de desempeño obtenidos en forma experimental y los datos comparativos con otros reportes técnicos permiten concluir y reafirmar que *R. subcapitata* tiene potencial para ser utilizada en la industria de los biocombustibles y para ser utilizada en la remediación de aguas de descargas industriales (Koukal et al., 2007) y agropecuarias independientemente de su uso clásico como organismo prueba en análisis ecotoxicológicos. También se concluye que la estimación de la biomasa en los cultivos de esta especie puede ser obtenida con alta confiabilidad en forma indirecta a partir de la densidad óptica medida por fluorometría. En futuras investigaciones se sugiere explorar condiciones de cultivo que favorezcan aún más la productividad de esta microalga.

#### Financiamiento y/o Agradecimientos

La adquisición de la cepa algal fue gracias a la donación de la empresa Cuprosa, S.A de C.V.

#### Conflictos de interés

No se declaran conflictos de interés

#### Contribución de autores

Sofía Cornejo León, Sara Silva Padrón y Gladys Elizabeth Zapien Rivera participaron en forma directa en el trabajo de laboratorio. Sofía Cornejo León tuvo el liderazgo en la escritura del manuscrito. Daniel Limón Huerta contribuyó en el análisis estadístico de los datos y en la revisión bibliográfica. José Luis Zavala Aguirre fue el autor intelectual del proyecto, así como el coordinador de que las actividades de laboratorio se realizaran conforme a los protocolos.

#### Referencias

- Fergola, P., Cerasuolo, M., Pollio, A., Pinto, G., & DellaGreca, M. (2007). Allelopathy and competition between *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*: Experiments and mathematical model. *Ecological Modelling*, 208, 205-214. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLMODEL.2007.05.024>.
- Huarachi-Olivera, R., Yapó, U., Dueñas-Gonza, A., Romero-Ugarte, M., Mendoza, G., Silva-Paredes, W., Lazarte-Rivera, A., & Esparza, M. (2019). Ecotoxicological Bioassays with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, in lotic ecosystems using confocal fluorescence microscopy techniques. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1-14. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.175>
- Koukal, B., Rossé, P., Reinhardt, A., Ferrari, B., Wilkinson, K., Loizeau, J., & Dominik, J. (2007).



- Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. *Water research*, 41, 1, 63-70. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.09.014>.
- Krienitz, L., Bock, C., Nozaki, H. & Wolf, M. (2011). SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga '*Selenastrum capricornutum*' recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped Chlorophyta. *J. Phycol.* 47, 880–893. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26331-6>
- Lind, O. T. (1985). *Handbook of common methods in Limnology*. Kendall/Hunt Publishing Company. Dubuque, Iowa, USA. 199 pp.
- Machado, M., & Soares, E. (2020). Exposure of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to environmentally relevant concentrations of the herbicide metolachlor: Impact on the redox homeostasis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 207(111264). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111264>.
- Miller, W. E., Greene, J. C., & Shiroyama, T. (1978). *The Selenastrum capricornutum Printz Algal Assay Bottle Test*. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=9100TBVY.txt>
- Moreira-Santos, M., Soares, A., & Ribeiro, R. (2004). An *in situ* bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(2), 164-73. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2003.07.004>.
- O'Neill, E., Rowan, N., & Fogarty, A. (2019). Novel use of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, as an early-warning indicator to identify climate change ambiguity in aquatic environments using freshwater finfish farming as a case study. *The Science of the total environment*, 692, 209-218 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.243>.
- Nascimento, V. M., Nascimento, K. M., & Fonseca, G. G. (2020). Biotechnological potential of *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus spinosus*, and *Scenedesmus acuminatus*. *Acta Alimentaria*, 49(2), 154-162. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.2.4>
- Paniagua, J., Farfán, B. C. & Buckle, F. (1987). Culture of marine microalgae with natural biodigested resources. *Aquaculture*. 64, 249-256. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90330-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90330-9)
- Piña, P., Medina, A., Nieves, M., Leal, S., López-Elías, J., & Guerrero, M. (2007). Cultivos de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Investigaciones marinas*, 28(3), 225-236. <http://www.rim.uh.cu/index.php/RIM/article/view/101/101>
- Pugliese, A., Biondi, L., Bartocci, P., & Fantozzi, F. (2020). *Selenastrum capricornutum* a new strain of algae for biodiesel production. *Fermentation*, 6(2), 46. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020046>
- Silva, N. F. P., Gonçalves, A. L., Moreira, F. C., Silva, T. F. C. V., Martins, F. G., Alvim-Ferraz, M. C. M., Boaventura, R. A. R., Vilar, V. J. P., & Pires, J. C. M. (2015). Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater. *Algal Research*, 11, 350-358. DOI:10.1016/j.algal.2015.07.014
- Suzuki, S., Yamaguchi, H., Nakajima, N., Kawachi, M. (2018). *Raphidocelis subcapitata* (= *Pseudokirchneriella subcapitata*) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the Sphaeropleales. *Scientific reports* 8(8058). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26331-6>
- Verhulst, P. F. (1845). Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. *Mémoires de l'Académie Royale des Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique*, 18, 1-42. <https://www.academieroyale.be/fr/publications-academie-toutes-publications-detail/oeuvres-2/recherches-mathematiques-sur-la-loi-daccroissement-de-la-population/>
- Yamagishi, T., Yamaguchi, H., Suzuki, S., Horie, Y., & Tatarazako, N. (2017). Cell reproductive patterns in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (= *Selenastrum capricornutum*) and their variations under exposure to the typical toxicants potassium dichromate and 3,5-DCP. *PLoS ONE*, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171259>.