

Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático

Variation of the composition of pigments of Chlorella vulgaris Beijerinck, with the application of the static magnetic field

Lic. Yadira Silveira-Font^I; Dra. C. Liliana Gómez-Luna^I; Lic. Marília D. Kufundala-Wemba^{II}; Ing. Dianelys Salazar-Hernández^{III}; Lic. Yadenis Ortega-Díaz^I

ysilveira9@uo.edu.cu

^I Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Universidad de Oriente,
^{II} Ministerio de la Agricultura, Angola, ^{III} Central Dos Ríos, Palma, Santiago de Cuba

Recibido: 8 de Septiembre de 2017

Aprobado: 29 de octubre de 2017

Resumen

Chlorella vulgaris es una de las especies de microalgas más estudiadas por su fácil crecimiento y múltiples aplicaciones. En este trabajo se evalúa el efecto de la dosis y el momento de aplicación de un campo magnético estático (CME) de 47,23 mT, aplicado durante una hora en dosis repetidas en fase exponencial temprana y tardía, sobre la cinética de crecimiento y la relación clorofila: carotenos en cultivos de *C. vulgaris* a escala de laboratorio. Los valores máximos de concentración celular se obtuvieron en cultivos expuestos al CME durante la fase exponencial temprana, en dosis repetidas durante tres días ($10\ 800 \pm 123 \times 10^4$ cél. mL⁻¹), valores significativamente superiores respecto al control ($4\ 122 \pm 112 \times 10^4$ cél. mL⁻¹) y a aquellos expuestos a la misma dosis en fase exponencial tardía ($9\ 576 \pm 207,5 \times 10^4$ cél. mL⁻¹). Los cultivos expuestos al CME presentaron además, mayores concentraciones de clorofila y carotenos, siendo evidente una estimulación de la síntesis de pigmentos como respuesta al estrés.

Palabras clave: campo magnético, *Chlorella vulgaris*, pigmentos, microalgas.

Abstract

Chlorella vulgaris is one of the most studied microalgae species due to its easy growth and multiple applications. This work evaluates the effect of the dose and the moment of application of a static magnetic field (SMF) of 47,23 mT applied during one hour in repeated doses in early and late exponential phase, on the growth kinetics and the chlorophyll relation: carotenes in cultures of *C. vulgaris* at laboratory scale. The maximum values of cellular concentration were obtained in cultures exposed to SMF during the early exponential phase, in repeated doses for three days ($10\ 800 \pm 123 \times 10^4$ cell. mL⁻¹), values significantly superior to the control ($4\ 122 \pm 112 \times 10^4$ cell. mL⁻¹) and those exposed to a similar dose in late exponential phase ($9\ 576 \pm 207,5 \times 10^4$ cell. mL⁻¹). The cultures exposed to the SMF also presented higher concentrations of chlorophyll and carotene, which evidences a stimulation of the synthesis of pigments as a response to stress.

Keywords: magnetic field, *Chlorella vulgaris*, pigments, microalgae.

Introducción

Las microalgas son conocidas por sus múltiples aplicaciones entre las que se encuentran la agricultura, acuicultura, producción de alimentos para animales y humanos, cosmética, productos farmacéuticos, e importantes servicios ambientales como la eliminación de metales pesados [1, 2]. Estudios llevados a cabo hasta la fecha en diferentes países, concluyen que para su cultivo a escala comercial aún se requiere un consumo elevado de energía, CO₂ y nutrientes inorgánicos, dependiendo de los metabolitos a producir [3, 4], lo que sigue siendo una problemática en la producción a gran escala.

En los últimos años ha aumentado el interés del cultivo de microalgas destinado a la producción de biocombustibles [5, 6], sustancias de origen lipídico como el omega 3 [7, 8], así como algunos pigmentos y vitaminas [9]. Los pigmentos ocupan un papel esencial en la captura de la energía solar durante el proceso fotosintético [10], y tienen gran utilidad por su poderosa actividad antioxidante, secuestrando radicales libres de oxígeno, directamente relacionados con la aparición de enfermedades degenerativas, con beneficios para la salud humana y animal, previniendo o retrasando algunas enfermedades como cáncer, aterosclerosis, entre otras [11, 12]. Muchos esfuerzos se dedican hoy para abaratar la producción de microalgas, desde el establecimiento de inóculos, de cuya calidad depende la del cultivo final, hasta la obtención de metabolitos de interés industrial, existiendo especificidades en el manejo de los cultivos y algunas tecnologías alternativas como el uso del campo magnético.

Varios trabajos demuestran los beneficios del campo magnético estático (CME) sobre la productividad de metabolitos secundarios, crecimiento y estado de los cultivos de especies de microalgas y cianobacterias, entre las que destacan *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* [13-15]. Sin embargo, aún existen muchos vacíos del conocimiento científico sobre el efecto del campo magnético en especies promisorias de microalgas, su interacción con parámetros que definen el crecimiento y el ensayo de otras dosis y protocolos de aplicación del CME. Por las razones antes mencionadas el objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de diferentes esquemas de aplicación de un CME de 47,23 mT sobre parámetros de crecimiento y concentración de pigmentos.

Materiales y métodos

Descripción de la especie: chlorella vulgaris beijerinck

La cepa utilizada fue aislada 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 medio Bristol sólido y líquido, desde el 2002, año en que fue aislada (figura 1).

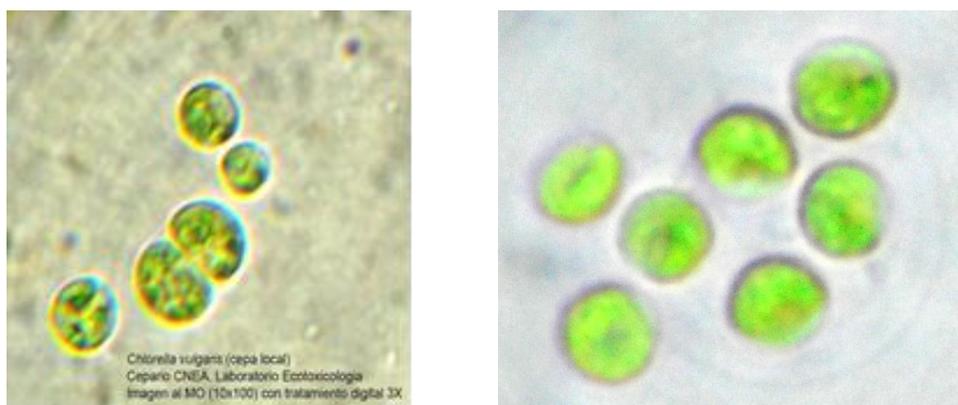


Fig. 1. Imágenes de *Chlorella vulgaris*. Cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA)

Condiciones experimentales para el cultivo de Chlorella vulgaris

Medio de cultivo

El medio utilizado para el mantenimiento y desarrollo de estos cultivos fue el medio Bristol, el que se detalla a continuación (tabla 1). Se utiliza el nitrato de sodio (NaNO_3) como principal fuente de nitrógeno.

TABLA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MEDIO BRISTOL PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

<u>Macroelementos</u>		<u>Oligoelementos</u>
	(g L ⁻¹)	
NaNO_3	1,000	Solución de Algal (8,3 g L ⁻¹)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025	(EDTA 39,80 % + Fe 10,20 % + Zn 0,53 % + Mn 0,44 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,075	+ Mo 0,56 % + Co 0,46 % + Cu 0,49 % + Tiamina 0,162 %
K_2HPO_4	0,075	+ Biotina + Cianocobalamina 0,008 %
K_2HPO_4	0,175	+ Excip. Vit 0,390 %)
NaCl	0,025	

La solución de oligoelementos se esterilizó a 120 °C, durante 25 min, por separado de la solución de macroelementos; estas se añaden en frío. La solución de oligoelementos se prepara a partir de la formulación comercial Algal, de Nutrición Avanzada, S.A. El pH se ajusta a siete.

Condiciones generales de la instalación

Los cultivos fueron desarrollados en una instalación en la que fue determinada *a priori* la interferencia electromagnética de campos de baja frecuencia (hasta 300 Hz). El valor de dicha interferencia estuvo en el rango de 0,03 a 0,23 μT ; dentro del límite restrictivo más riguroso que existe, que en este caso se refiere a la directriz asumida por Suecia (0,25 μT). Considerando que se trata de eliminar interferencias posibles en una instalación para la experimentación, los cultivos fueron ubicados en aquellos lugares donde la exposición fue menor que 0,25 μT [14].

Las condiciones de temperatura en la cámara de cultivo se mantuvieron estables a un valor de $22 \pm 2,3$ °C, con una humedad relativa del $62,5 \pm 3,1$ %. Para mantener iluminados los cultivos en régimen de luz continua, se utilizaron cuatro lámparas fluorescentes Daylight TL-D 36W/54-765 de la marca comercial PHILIPS. La densidad de flujo fotónico (DFF) utilizada ($8,59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fue ajustada diariamente utilizando una estación meteorológica de bolsillo TP LM 8000 4 en 1, con sensor instalado permanentemente con un fotodiodo integrado exclusivo y sensor de luz con filtro para la corrección del color en el rango de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), fotópico (0-20 000 lx, error: ± 8). Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

Aireación de los cultivos

Los cultivos se mantienen aireados mediante burbujeo de aire filtrado con pre-filtros de jeringa de microfibra de vidrio MIDISART 2000 de 0,20 μm . El flujo de aireación se mantuvo relativamente constante a $0,45 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Estas condiciones permiten un crecimiento uniforme y aporta a los cultivos una cantidad mínima de CO_2 , que es la que está presente en el aire (0,03 %), que indiscutiblemente favorece, al actuar como fuente de carbono y colaborar así con el tamponamiento de los cultivos.

Exposición de los cultivos a un Campo Magnético Estático (CME) de 47,23 mT

Los cultivos se exponen a un CME de 47,23 mT siguiendo dos protocolos de aplicación:

1. Una hora de exposición con dosis a repetición cada 24 h durante tres días consecutivos, a partir del segundo día de cultivo (fase exponencial temprana, segundo al cuarto día).
2. Una hora de exposición con dosis a repetición cada 24 h durante tres días consecutivos, a partir del séptimo día (fase exponencial tardía, sexto al octavo día).

La selección de estos protocolos se realizó considerando resultados de experimentos previos. Estos contribuirán a entender la respuesta del cultivo ante situaciones de perturbación extrema, con dosis a repetición en diferentes momentos de la curva de crecimiento.

Se establecieron además, cultivos controles sin exposición al CME

Descripción del arreglo de imanes

Los cultivos se exponen a un campo magnético estático de 47,23 mT. El dispositivo fue construido y caracterizado en el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), en Santiago de Cuba. La intensidad se selecciona considerando el rango efectivo recomendado por varios autores [16-18].

Metodología para evaluación de parámetros sobre células en cultivo

Cinética de crecimiento

Se realiza una evaluación de la cinética de crecimiento durante quince días a los cultivos expuestos al CME y controles, calculando la concentración celular máxima. El recuento diario de células se lleva a cabo con ayuda de una cámara de recuento hematológico Neubauer de procedencia China.

Determinación espectrofotométrica de pigmentos

Los pigmentos fueron extraídos con acetona al 90 % (UNI CHEM®, calidad reactivo) a partir de biomasa fresca recogida por centrifugación de 2 mL de cultivo a (8 000 r.p.m.) durante 10 min, en una centrífuga de mesa Sigma de procedencia alemana. La extracción se realiza en completa oscuridad, 24 h a -7 °C, previa agitación en vortex por 30 s y posterior sonicación en una sonda ultrasónica SONICS® de procedencia americana durante 1 min, con pulsos de 50 y 10 s, a una amplitud del 100 %. Los

extractos son clarificados por centrifugación a (5 000 r.p.m.) durante 10 min antes del análisis espectrofotométrico. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro de marca Genesys 10 uv de procedencia americana.

Posteriormente se realizan las determinaciones espectrofotométricas de clorofilas *a*, *b* y carotenos, determinando la absorbancia a 480, 630, 647 y 664 nm contra un blanco de acetona al 90 %. La concentración de cada uno de los pigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) se determinó mediante las ecuaciones (1-3) y por sumatoria la concentración de clorofilas totales:

$$\text{Clorofila } a = 11,93 A_{664} - 1,93 A_{647} \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{Clorofila } b = 20,36 A_{647} - 5,50 A_{664} \dots \dots \dots (2)$$

$$\text{Clorofilas totales} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b \dots \dots \dots (3)$$

$$\text{Carotenos} = 4,0 * A_{480} \dots \dots \dots (4)$$

La concentración se expresa en $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$. A partir de los resultados anteriores se calcula la relación clorofila: carotenos, para analizar el estado de los cultivos. La relación clorofila: carotenos se establece dividiendo la concentración de clorofilas totales entre la concentración de carotenos, de cada cultivo.

Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, de dos factores con una sola muestra por grupo, para una $p < 0,05$ con el objetivo de comparar medias.

Resultados y discusión

Comparación de cultivos control y expuestos a un CME de 47,23 mT

La cinética durante 16 días de cultivos expuestos al CME se presenta en la figura 2. Se evaluaron dos esquemas de aplicación del CME a los cultivos; los cuadrados negros representan los cultivos control, los círculos rojos representan los cultivos expuestos al CME durante la fase exponencial temprana y los triángulos azules los cultivos expuestos durante la fase exponencial tardía.

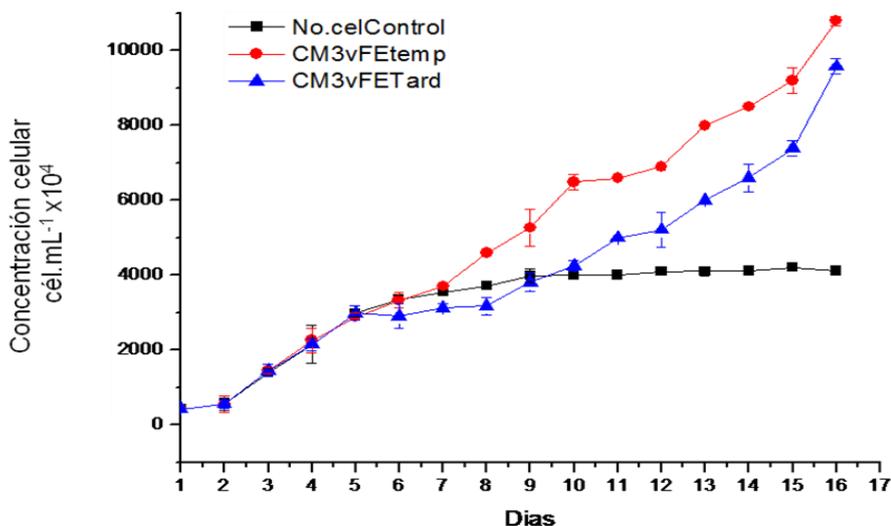


Fig. 2. Variación de la cinética de crecimiento de cultivos densos de *C. vulgaris* durante 16 días de cultivo

De manera general se hace evidente que la cinética de los controles es diferente a la de los cultivos expuestos al CME, obteniéndose los mayores valores de concentración celular máxima en aquellos expuestos a este agente físico durante la fase exponencial temprana ($10\,800 \pm 123 \times 10^4$ cél. mL⁻¹), los que fueron significativamente superiores a los obtenidos en cultivos expuestos durante la fase exponencial tardía ($9\,576 \pm 207,5 \times 10^4$ cél. mL⁻¹), y respecto al control ($4122 \pm 112 \times 10^4$ cél. mL⁻¹).

En los cultivos control hay un cambio de pendiente al quinto día, y al noveno día entran en fase estacionaria, mientras que los expuestos al CME mantienen un ritmo de crecimiento sostenido y no se verifica su decline durante los dieciséis días de cultivo. En otros trabajos realizados por el equipo de investigación [19], aplicando un CME de 30 mT, se observó que los cultivos expuestos a dicho campo mantenían una cinética de crecimiento similar a la descrita para este tipo de microorganismo, es decir que se observan todas las fases de crecimiento hasta llegar a la muerte celular. El hecho de que cuando se aplica un CME de 47 mT, en los cultivos expuestos no se observe decline de la concentración celular, pudiera estar indicando que dichos cultivos se han adaptado de forma positiva al estrés generado por el campo magnético; y que la inducción y el esquema de aplicación de este agente físico ejerce un papel fundamental en los cultivos.

En las investigaciones desarrolladas por otros autores con aplicación del CME en microalgas [20], se ha observado que la influencia de este agente físico sobre los microorganismos depende de la inducción de campo magnético que se aplique, así como el tiempo de exposición. De ahí que se pueda considerar al tratamiento magnético como un agente promotor del crecimiento, que puede causar cambios en el metabolismo de las microalgas.

El campo magnético puede dar lugar a efectos positivos o negativos sobre el crecimiento y el metabolismo de los organismos vivos. El crecimiento es una respuesta de los organismos a las condiciones del entorno y los efectos positivos o negativos podrían indicar cómo las rutas biosintéticas pueden ser impulsadas por el campo magnético externo [20]. El hecho de que se observe mayores densidades celulares en los cultivos expuestos durante la fase exponencial temprana (días 2-4), respecto a los expuestos en la fase exponencial tardía (días 6-8) y a los controles, puede estar indicando la influencia de este agente físico sobre el metabolismo de la microalga. El CME de 47,23 mT pudiera estar facilitando una mejor absorción de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, durante la etapa de desarrollo del microorganismo en la cual tiene mayores requerimientos nutricionales para su crecimiento, no siendo así, en la fase exponencial tardía, en la cual la microalga ha alcanzado un crecimiento determinado y los requerimientos nutricionales son menores.

Efecto del CME a 47,23 mT sobre la relación clorofila: carotenos

La variación de la composición pigmentaria entre los días 8 y 15 de cultivo se presenta en las figuras 3 y 4. Control: Cultivos control, CMETempr: Cultivos expuestos al CME en la fase exponencial temprana, CMETard: Cultivos expuestos al CME en fase exponencial tardía. Se confirma que hay una estimulación de la síntesis de clorofilas totales ($35,15 \pm 11,23$ pg cél.⁻¹) cuando el CME es aplicado en la fase exponencial temprana. Estos valores son superiores a los que se obtienen al aplicar el CME en la fase exponencial tardía ($26,948 \pm 8,48$ pg cél.⁻¹) y respecto al control ($28,992 \pm 8,47$ pg cél.⁻¹) (figura 3).

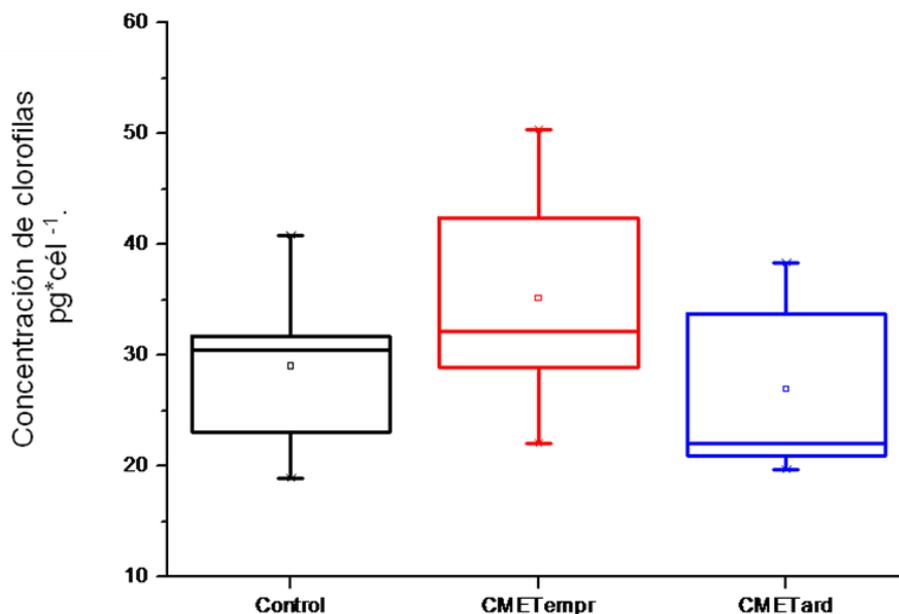


Fig. 3. Variación de la concentración promedio de clorofilas totales ($\text{pg} \cdot \text{cél}^{-1}$) en cultivos de *C. vulgaris*

Respecto a la concentración de carotenos (figura 4), el CME aplicado en fase exponencial temprana presenta mayores concentraciones, respecto a los controles y al otro esquema de aplicación, por lo que puede afirmarse que de forma general, este esquema estimula la síntesis de pigmentos, lo que constituye una evidencia de una respuesta al estrés modulado, en la cual hay estimulación de la síntesis de pigmentos quizás como mecanismo de fotoprotección, sin que se afecte la viabilidad, siendo siempre mayor la acumulación de clorofila.

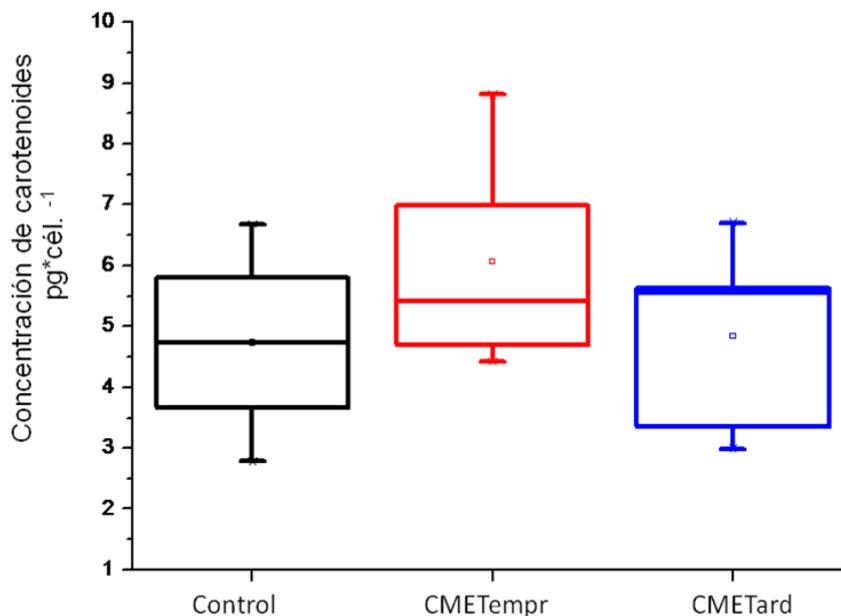


Fig. 4. Variación de la concentración promedio de carotenoides (pg cel.^{-1}) después del octavo día en cultivos de *C. vulgaris*

La relación entre los pigmentos ha sido utilizada por varios autores para definir el estado de cultivos [15], y se ha relacionado con una mejor absorción de nutrientes [21], específicamente de nitrógeno [14] para el caso de la estimulación de la clorofila. Por lo que pudiera explicarse que la estimulación de la síntesis de clorofilas puede estar asociada a una mejora en la disponibilidad y/o absorción de nutrientes, mientras que el aumento de carotenoides se pudiera considerar como una respuesta al estrés con efecto fotomodulador.

La figura 5 muestra la relación clorofilas totales: carotenoides de cultivos de *C. vulgaris* expuestos al CME en dos momentos del crecimiento; Control: Cultivos control, CMETempr: Cultivos expuestos al CME en la fase exponencial temprana, CMETard: Cultivos expuestos al CME en fase exponencial tardía. Los resultados indican que *C. vulgaris* normalmente, acumula más clorofila que carotenos. Al aplicar el CME durante la fase exponencial temprana se estimula la acumulación de clorofilas totales y de carotenoides, por lo que la relación disminuye respecto al control. Esto pudiera constituir una evidencia de una respuesta al estrés, lo que podría convertirse en un mecanismo promisorio para estimular la producción de lípidos.

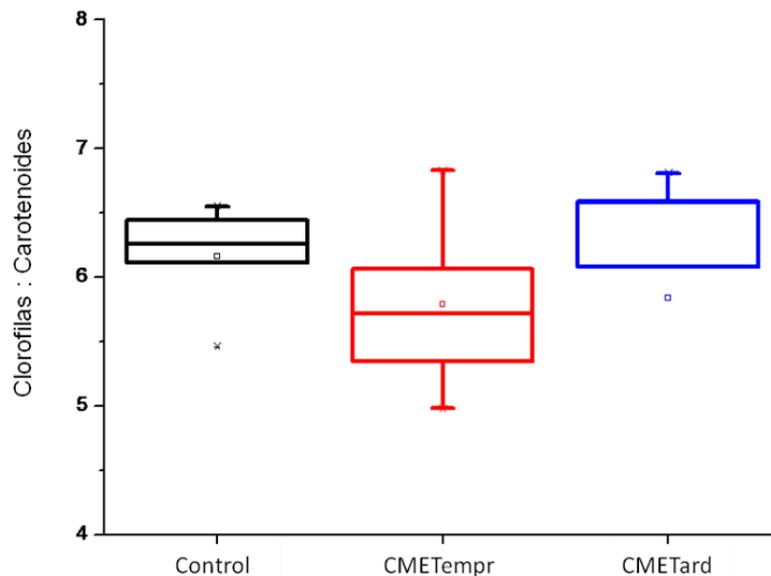


Fig. 5. Variación de la relación clorofilas totales: carotenos después del octavo día en cultivos de *C. vulgaris*

Al aplicar el CME en fase tardía, la relación aumenta respecto al control, lo que se debe al efecto observado sobre la concentración de clorofilas. Por la tendencia observada puede explicarse un efecto estimulador del CME sobre la síntesis de pigmentos.

Por todo lo antes expuesto se reafirma la hipótesis de que el efecto del CME sobre los sistemas biológicos, tiene una alta dependencia del momento en que este es aplicado. Según los resultados obtenidos, los primeros días de la fase exponencial son mucho más susceptibles a variaciones metabólicas permanentes en los cultivos; lo que determina la magnitud de la modificación.

Los mecanismos por los cuales los campos magnéticos afectan el desarrollo de sistemas biológicos están sin esclarecer completamente, pero se especula sobre sus efectos en la permeabilidad en las membranas y la acción directa sobre partículas coloidales en el medio de cultivo, con repercusiones metabólicas [14, 15, 22].

El hecho de que un factor de estrés como lo es el campo magnético estático mejora parámetros de crecimiento y viabilidad, hace que esta tecnología sea promissora para el desarrollo de cultivos a escala comercial, ahorrando recursos y tiempo y permitiendo un mejor manejo de los cultivos a gran escala, dependiendo del metabolito que se desee producir. En cultivos a gran escala podría lograrse mayor eficiencia fotosintética, mejor

asimilación de nutrientes y aceleración del crecimiento, lo que repercutiría en los modelos productivos de la especie en cultivo, en este caso: *C. vulgaris*.

Conclusiones

El CME aplicado a dosis repetidas durante la fase exponencial, estimula el crecimiento e incrementa los valores de concentración de pigmentos fotosintético de C. vulgaris; siendo la aplicación durante la fase exponencial temprana, la que permite los mejores resultados, lo que evidencia una adaptación más rápida de los microorganismos al estímulo inducido.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido realizada en el marco del Proyecto 1 del Macroproyecto VLIR-IUC-UOS.

Referencias bibliográficas

1. BECKER, A.; HERSCHEL, A.; WILHELM, C. "Biological effects of incomplete destratification of hypertrophic freshwater reservoir". *Hydrobiologia*. 2006, **559** (1), 85-100.
2. BECKER, E. W. "Micro-algae as a source of protein". *Biotechnology Advances*. 2007, **25** (2), 207-210.
3. CAKMAK, T. *et al.* "Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, **109** (8), 1947-1957.
4. CHISTI, Y. "Biodiesel from microalgae". *Biotechnology advances*. 2007, **25** (3), 294-306.
5. XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters". *Journal of Biotechnology*. 2006, **126** (4), 499-507.
6. DEMIRBAS, A. "Production of biodiesel from algae oils". *Energy Sources Part A: Recovery, Utilization & Environmental Effects*. 2009, **31** (2), 163-168.
7. BRUNEEL, C. *et al.* "Impact of microalgal feed supplementation on omega-3 fatty acid enrichment of hen eggs". *Journal of Functional Foods*. 2013, **5** (2), 897-904.

8. GLADYSHEV, M. I. *et al.* "Seasonal correlations of elemental and omega 3 PUFA composition of seston and dominant phytoplankton species in a eutrophic Siberian Reservoir". *Aquatic Ecology*. 2007, **41** (1), 9-23.
9. DE ALENCAR, D. B. *et al.* "Contents of beta-carotene in supplements and biomass of Spirulina". *Ciencia E Agrotecnologia*. 2011, **35** (2), 386-391.
10. BENAVENTE VALDÉS, J. R.; AGUILAR, C.; CONTRERAS ESQUIVEL, J. C.; MÉNDEZ ZAVALA, A.; MONTAÑEZ, J. "Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species". *Biotechnology Reports*. 2016, **10** (1), 117-125.
11. BECKER, W. "18 Microalgae in Human and Animal Nutrition". *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. 2004, p. 312.
12. BOROWITZKA, M. A. "High-value products from microalgae—their development and commercialisation". *Journal of applied phycology*. 2013, **25** (3), 743-756.
13. VU, B. C.; VULETICH, D. A.; KURIAKOSE, S. A.; FALZONE, C. J.; LECOMTE, J. T. J. "Characterization of the heme-histidine cross-link in cyanobacterial hemoglobins from *Synechocystis* sp PCC 6803 and *Synechococcus* sp PCC 7002". *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2004, **9** (2), 183-194.
14. GÓMEZ, L.; MENÉNDEZ, J.; ÁLVAREZ, I.; FLORES, I. "Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno". *Biotecnología Vegetal*. 2009, **9** (2), 105-117.
15. GOMEZ LUNA, L.; RIVERO, R. D.; INAUDIS, Á. "Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2011, **13** (2), 27-38.
16. YANG, G.; WANG, J.; MEI, Y.; LUAN, Z. "Effect of Magnetic Field on Protein and Oxygen-production of *Chlorella Vulgaris*". *Mathematical and Physical Fisheries Science*. 2011, **9** (1), 116-126.
17. WANG, H. Y.; ZENG, X. B.; GUO, S. Y.; LI, Z. T. "Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*". *Bioelectromagnetics*. 2008, **29** (1), 39-46.

18. TU, R. *et al.* "Effect of static magnetic field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater". *Water research*. 2015, **86** (1), 132-138.
19. KIM, S. K.; RAVICHANDRAN, Y. D.; KHAN, S. B.; KIM, Y. T. "Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2008, **13** (5), 511-523.
20. DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. "Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition". *Process Biochemistry*. 2016, **51** (7), 912-916.
21. GONZALEZ, M. V. R.; GÓMEZ, L. G.; HINOJOSA, J. G. C.; CASTILLA, A. P. "Efecto de carbón tipo lignito sobre el crecimiento y producción de pigmentos de *Arthrospira platensis*". *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2016, **18** (1), 73-80.
22. DINI, L.; ABBRO, L. "Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures". *Micron*. 2005, **36** (3), 195-217.