

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 016 752**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)

A01N 65/03 (2009.01)

A01N 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2015 E 21199239 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025 EP 3959982**

54 Título: **Método para preparar una composición a base de Chlorella mixotrófica**

30 Prioridad:

16.12.2014 US 201462092766 P

16.12.2014 US 201462092771 P

16.12.2014 US 201462092774 P

16.12.2014 US 201462092703 P

16.12.2014 US 201462092777 P

22.01.2015 US 201514602331

22.01.2015 US 201514602348

22.01.2015 US 201514602356

22.01.2015 US 201514602362

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2025

73 Titular/es:

HELIAE DEVELOPMENT, LLC (100.00%)

578 E. Germann Road

Gilbert, AZ 85297, US

72 Inventor/es:

SHINDE, SANDIP;

VENTRE, STEPHEN;

DONOWITZ, NICHOLAS;

ROHLFSEN, MICHAEL CLINT y

CARNEY, LAURA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 3 016 752 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para preparar una composición a base de *Chlorella* mixotrófica

5 **Antecedentes**

La emergencia de las semillas se produce cuando una planta inmadura se desprende de su cubierta seminal, seguido típicamente de la salida de un tallo del suelo. Las primeras hojas que aparecen en muchas plántulas son las llamadas hojas de semilla, o cotiledones, que a menudo tienen poca semejanza con las hojas posteriores. Poco después de que aparezcan las primeras hojas verdaderas, que son más o menos típicas de la planta, los cotiledones se caerán. La germinación de las semillas es un proceso fisiológico complejo desencadenado por la imbibición de agua después de que los posibles mecanismos de dormancia se hayan liberado por desencadenantes apropiados. En condiciones favorables, el crecimiento de expansión rápida del embrión culmina en la ruptura de las capas de cobertura y la aparición de la radícula. Se han propuesto varios agentes como moduladores de la emergencia de las semillas. La modulación de la temperatura y la humedad son métodos comunes para afectar a la emergencia de las semillas. También se ha propuesto la adición de nutrientes al suelo para promover la emergencia de las semillas de determinadas plantas.

De manera similar, el crecimiento y la producción de frutos de una planta madura también es un proceso fisiológico complejo que implica insumos y vías en las raíces, brotes y hojas. Ya sea a escala comercial o de huerto doméstico, los agricultores se esfuerzan constantemente por optimizar el rendimiento y la calidad de un cultivo para asegurar un alto retorno de la inversión realizada en cada temporada de crecimiento. A medida que aumenta la población y aumenta la demanda de materias primas vegetales para los mercados de alimentos y tecnologías renovables, se intensifica la importancia de una producción agrícola eficiente. La influencia del medio ambiente en la salud y la producción de una planta han dado como resultado la necesidad de estrategias durante la temporada de crecimiento que permitan a las plantas compensar la influencia del medio ambiente y maximizar la producción. También se ha propuesto la adición de nutrientes al suelo o la aplicación al follaje para promover el rendimiento y la calidad en determinadas plantas. La eficacia puede atribuirse a los ingredientes o al método de preparación del producto. Aumentar la eficacia de un producto puede reducir la cantidad de producto necesaria y aumentar la eficacia del proceso agrícola.

El documento US 3.889.418 (Porter *et al.*) describe el uso de *Chlorella pyrenoidosa* para modificar el suelo y mejorar la emergencia de las plántulas. Las propiedades reológicas de la *Chlorella* sp. pasteurizada para su uso como componente alimentario funcional se han estudiado por Kang *et al.* (J. Microbiol. Biotechnol. 2002, pág. 740-745).

35 **Sumario**

Las realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para preparar una composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica. La composición incluye la pasteurización y estabilización de una baja concentración de células enteras de *Chlorella* mixotrófica que no han sido sometidas a un proceso de secado. La composición líquida se puede usar para mejorar la emergencia y el crecimiento de las plantas en las aplicaciones al suelo y foliar de baja concentración y baja frecuencia.

En el presente documento, pero no como parte de la invención reivindicada, también se divulga un método de mejora de las plantas que incluye administrar a una planta un tratamiento con la composición líquida que incluye un cultivo de *Chlorella*. La composición puede incluir células enteras de *Chlorella* pasteurizadas. En algunas realizaciones, la composición se puede administrar en una concentración en el intervalo del 0,003-0,080 % de sólidos en peso.

En algunas realizaciones, las células de *Chlorella* se pueden pasteurizar a entre 50 y 80 °C durante un tiempo entre 15 y 360 minutos. En algunas realizaciones, las células de *Chlorella* se pueden pasteurizar en un cultivo que tiene una concentración superior al 11 % en peso de *Chlorella*, a entre 55 y 65 °C durante entre 90 y 150 minutos. En algunas realizaciones, a continuación, el cultivo se puede diluir al 10-11 % de *Chlorella* en peso y enfriar a entre 35 y 45 °C. En algunas realizaciones, el cultivo pasteurizado se puede ajustar a un pH entre 3,5 y 4,5.

En algunas realizaciones, las células de *Chlorella* se pueden cultivar en condiciones mixotróficas. En algunas realizaciones, las condiciones mixotróficas incluyen cultivar las células de *Chlorella* en un medio adecuado durante un período de cultivo de 7-14 días, a una temperatura de entre 20 y 30 °C, a un pH de entre 6,5 y 8,5, y una concentración de oxígeno disuelto que puede variar entre 0,1 y 4 mg/l.

En algunas realizaciones, las células de *Chlorella* se pueden cultivar en condiciones mixotróficas no axénicas. En algunas realizaciones, puede estar presente al menos una especie de bacteria esporulante en el cultivo no axénico. La bacteria puede ser *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Brevibacillus* sp., o similar.

En algunas realizaciones en discordancia con la invención reivindicada, la administración de la composición puede ser mediante remojo de una semilla en la composición antes de plantarla; poniendo en contacto el suelo en una proximidad inmediata de una semilla plantada con una cantidad eficaz de la composición; poniendo en contacto las raíces de una

- planta con una cantidad eficaz de la composición de manera hidropónica; poniendo en contacto una cantidad eficaz de la composición con una porción accesible de la planta después de la emergencia; o similares.
- 5 En algunas realizaciones en discordancia con la invención reivindicada, la composición líquida se puede administrar a una tasa en el intervalo de 10-150 galones por acre al suelo o a las plantas emergidas en el suelo.
- En algunas realizaciones en discordancia con la invención reivindicada, la semilla se puede remojar durante 90-150 minutos.
- 10 En algunas realizaciones, la composición líquida puede incluir el 0,008-0,080 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* pasteurizada.
- En algunas realizaciones en discordancia con la invención reivindicada, las composiciones líquidas se pueden administrar por pulverización. Las composiciones se pueden administrar cada 3-28 días o cada 4-10 días o similar. En algunas realizaciones, la composición líquida se puede administrar en primer lugar 5-14 días después de la emergencia.
- 15 En algunas realizaciones en discordancia con la invención reivindicada, la composición líquida se puede administrar al suelo mediante un sistema de riego de bajo volumen, una aplicación por empapado del suelo, un sistema de pulverización aérea o similar.
- 20 En algunas realizaciones, la planta puede ser miembro de una familia de plantas *Solanaceae*, *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Poaceae*, *Roasaceae*, *Vitaceae*, *Brassicaceae* (*Cruciferae*), *Caricaceae*, *Malvaceae*, *Sapindaceae*, *Anacardiaceae*, *Rutaceae*, *Moraceae*, *Convolvulaceae*, *Lamiaceae*, *Verbenaceae*, *Pedaliaceae*, *Asteraceae* (*Compositae*), *Apiaceae* (*Umbelliferae*), *Araliaceae*, *Oleaceae*, *Ericaceae*, *Actinidaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Polygonaceae*, *Theaceae*, *Lecythidaceae*, *Rubiaceae*, *Papveraceae*, *Illiciaceae* *Grossulariaceae*, *Myrtaceae*, *Juglandaceae*, *Bertulaceae*, *Cucurbitaceae*, *Asparagaceae* (*Liliaceae*), *Alliaceae* (*Liliceae*), *Bromeliaceae*, *Zingieraceae*, *Muscaceae*, *Areaceae*, *Dioscoreaceae*, *Myristicaceae*, *Annonaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lauraceae*, *Piperaceae*, *Proteaceae*, o similares.
- 25 En todas las realizaciones de la presente invención, las células enteras de *Chlorella* no se sometieron a un proceso de secado.
- En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición líquida puede incluir además al menos un estabilizador de cultivo adecuado para plantas. El estabilizador de cultivo puede ser sorbato de potasio, ácido fosfórico, ácido ascórbico, benzoato de sodio o similares, o cualquier combinación de los mismos.
- 35 En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición líquida no contiene ningún principio activo para mejorar la emergencia o la maduración, aparte del cultivo de células enteras de *Chlorella*.
- 40 En algunas realizaciones, la mejora se puede determinar mediante la comparación de una planta tratada con una planta no tratada sustancialmente idéntica. Se puede observar una diferencia cuantificable de al menos el 10 % en al menos una característica de la planta.
- 45 En algunas realizaciones, las características de la planta pueden ser la tasa de germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular,
- 50 el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares, o similares, o cualquier combinación de los mismos.
- En algunas realizaciones, el número de plantas que emergen del suelo se puede aumentar en al menos un 10 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, el número de plantas que demuestran maduración mediante la formación de hojas puede aumentar en al menos un 10 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar.
- 55 Las realizaciones de la divulgación proporcionan una composición líquida para la mejora de las plantas, incluyendo la composición células enteras de *Chlorella* pasteurizada. En algunas realizaciones, la composición puede ser un cultivo axénico pasteurizado, en donde puede estar presente al menos una especie de bacteria esporulante. En algunas realizaciones, la bacteria se puede seleccionar de *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Brevibacillus* sp., y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la flora bacteriana incluye al menos otras cinco bacterias, además de *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Brevibacillus* sp. La flora bacteriana también puede incluir una cualquiera o más de las bacterias que se enumeran a continuación:
- 60
- 65

- Paenibacillus* sp.
Bacillus sp.
Lactobacillus sp.
Brevibacillus sp.
5 *Massilia* sp.
Pseudomonas sp.
Bdellovibrio bacteriovorus
Stenotrophomonas sp.
Acinetobacter sp.
10 *Enterobacter* sp.
Flavobacterium sp.
Zoogloea sp. asociadas a las algas
Burkholderiaceae - fam
Xanthomonadaceae - fam
15 *Enterobacteriaceae* - fam
Comamonadaceae - fam
Oxalobacteraceae - fam
Chitinopagaceae - fam
Gammaproteobacteria - clase
20 *Burkholderiales* - orden
Proteobacterias - filo
Taxón singleton
Bacteria no clasificada
- 25 En algunas realizaciones de la invención, la composición puede contener el 0,0001 %-40 % de *Chlorella* en peso. En algunas realizaciones, puede contener el 10-11 % de *Chlorella* en peso. En algunas realizaciones, el cultivo pasteurizado puede estar a un pH de entre 3,5 y 4,5. En diversas realizaciones, la *Chlorella* puede ser un cultivo mixotrófico, cultivado con al menos una fuente de carbono orgánico, así como mediante fotosíntesis. En algunas realizaciones, la composición incluye además un medio adecuado para el crecimiento de la *Chlorella*. En algunas
- 30 realizaciones, la composición puede diluirse con agua. Asimismo, en algunas realizaciones, la composición puede incluir otros aditivos, como fertilizantes, ajustadores de pH, fitohormonas, insecticidas, minerales y detergentes. En algunas realizaciones, la composición no contiene ningún aditivo para mejorar la emergencia o la maduración, aparte del cultivo de células enteras de *Chlorella*.
- 35 Algunas realizaciones de la presente divulgación proporcionan un suelo que alberga una semilla de planta, incluyendo la composición, en donde la semilla presenta una característica mejorada. En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento una semilla de planta en contacto con la composición, en donde la semilla presenta una característica mejorada. Asimismo, en algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento raíces de una planta en contacto con una cantidad eficaz de la composición, de manera hidropónica o en el suelo, en donde la
- 40 raíz o la planta entera presenta una característica mejorada. En otras realizaciones, se proporciona en el presente documento una planta en contacto con la composición después de la emergencia, en donde la planta presenta una característica mejorada.
- 45 Algunas realizaciones de la divulgación incluyen un sistema de riego de bajo volumen que incluye la composición. En algunas realizaciones, se incluye en el presente documento un sistema de empapado del suelo y/o un sistema de pulverización aérea que incluye la composición.
- 50 En algunas realizaciones, la composición incluye además al menos un estabilizador de cultivo adecuado para plantas. En algunas realizaciones, el estabilizador de cultivo se puede seleccionar de: sorbato de potasio, ácido fosfórico, ácido ascórbico, benzoato de sodio y cualquier combinación de los mismos.
- 55 Algunas realizaciones de la divulgación proporcionan material cosechado de una planta en contacto con la composición, en donde la planta mostró una característica mejorada. En algunas realizaciones, la característica mejorada puede estar presente en el material cosechado.
- 60 Algunas realizaciones de la divulgación incluyen césped en contacto con la composición, el cual presenta una característica mejorada. En algunas realizaciones, se puede proporcionar un campo de dicho césped. En algunas realizaciones, se incluye en el presente documento un campo de golf con el césped.
- 65 **Descripción de los dibujos**

La figura 1 representa los resultados de una prueba para determinar el estado del ADN de células de *Chlorella* después de la pasteurización (DAPI).

5 La figura 2 representa los resultados de una prueba para determinar el estado de la membrana celular de células de *Chlorella* después de la pasteurización (yodo de propidio).

La figura 3 representa los resultados de diversas condiciones de pasteurización de la composición.

10 La figura 4 representa los resultados de diversas tasas de aplicación de la composición.

La figura 5 representa gráficos de los resultados de la composición en plantas sometidas a estrés salino.

La figura 6 representa los resultados de experimentos con la composición en césped.

15 La figura 7 representa los resultados de experimentos con la composición en cacahuets.

La figura 8 representa los resultados de experimentos con diferentes preparaciones de la composición.

20 Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La invención se refiere a un método para preparar una composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica para su aplicación en plantas que comprende: calentar una composición que comprende células enteras de *Chlorella* en un medio líquido; y enfriar la composición calentada, en donde las etapas de calentamiento y enfriamiento pasteurizan la composición, en donde las células enteras de *Chlorella* no se someten a un proceso de secado.

Muchas plantas pueden beneficiarse de la aplicación de composiciones líquidas que proporcionan un efecto bioestimulante. Los ejemplos no limitantes de familias de plantas que pueden beneficiarse de dichas composiciones pueden incluir: *Solanaceae*, *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Poaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Brassicaceae* (*Cruciferae*),
 30 *Caricaceae*, *Malvaceae*, *Sapindaceae*, *Anacardiaceae*, *Rutaceae*, *Moraceae*, *Convolvulaceae*, *Lamiaceae*,
Verbenaceae, *Pedaliaceae*, *Asteraceae* (*Compositae*), *Apiaceae* (*Umbelliferae*), *Araliaceae*, *Oleaceae*, *Ericaceae*,
Actinidaceae, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Polygonaceae*, *Theaceae*, *Lecythidaceae*, *Rubiaceae*, *Papveraceae*,
Illiciaceae *Grossulariaceae*, *Myrtaceae*, *Juglandaceae*, *Bertulaceae*, *Cucurbitaceae*, *Asparagaceae* (*Liliaceae*),
 35 *Alliaceae* (*Liliceae*), *Bromeliaceae*, *Zingieraceae*, *Muscaceae*, *Areaceae*, *Dioscoreaceae*, *Myristicaceae*, *Annonaceae*,
Euphorbiaceae, *Lauraceae*, *Piperaceae* y *Proteaceae*.

La familia de plantas *Fabaceae* (también conocida como *Leguminosae*) comprende la tercera familia más grande de plantas, con más de 18.000 especies, incluyendo varias plantas agrícolas y alimentarias importantes. Clasificada taxonómicamente en el reino *Plantae*, *Tracheobionta* (subreino), *Spermatophyta* (superdivisión), *Magnoliophyta* (división), *Manoliopsida* (clase), *Rosidae* (subclase) y *Fabales* (orden), la familia *Fabaceae* incluye, pero sin limitación, soja, judías, judías verdes, guisantes, garbanzos, alfalfa, cacahuets, guisantes de olor, algarrobo y regaliz. Las plantas de la familia *Fabaceae* varían en tamaño y tipo, incluyendo, pero sin limitación, árboles, pequeñas hierbas anuales, arbustos y vides, y típicamente desarrollan leguminosas. Las plantas de la familia *Fabaceae* se pueden encontrar en todos los continentes, excepto en la Antártida, y por lo tanto tienen una gran importancia en la agricultura mundial. Además de ser alimentos, las plantas de la familia *Fabaceae* se pueden usar para producir gomas naturales, colorantes y plantas ornamentales.

La familia de plantas *Solanaceae* incluye una gran cantidad de cultivos agrícolas, plantas medicinales, especias y plantas ornamentales en sus más de 2.500 especies. Clasificada taxonómicamente en el reino *Plantae*, *Tracheobionta* (subreino), *Spermatophyta* (superdivisión), *Magnoliophyta* (división), *Manoliopsida* (clase), *Asteridales* (subclase) y *Solanales* (orden), la familia *Solanaceae* incluye, pero sin limitación, patatas, tomates, berenjenas, diversos pimientos, tabaco y petunias. Las plantas de la familia *Solanaceae* se pueden encontrar en todos los continentes, excepto en la Antártida, y por lo tanto tienen una gran importancia en la agricultura mundial.

55 La familia *Poaceae* proporciona alimentos, materiales de construcción y materia prima para el procesamiento de combustibles. Clasificada taxonómicamente en el reino *Plantae*, *Tracheobionta* (subreino), *Spermatophyta* (superdivisión), *Magnoliophyta* (división), *Liliopsida* (clase), *Commelinidae* (subclase) y *Cyperales* (orden), la familia *Poaceae* incluye, pero sin limitación, plantas con flores, gramíneas y cultivos de cereales tales como cebada, maíz, hierba limón, mijo, avena, centeno, arroz, trigo, caña de azúcar y sorgo. Los tipos de césped que se encuentran en Arizona incluyen, pero sin limitación, los híbridos de Bermuda (por ejemplo, 328 Tifgran, 419 Tifway, Tif sport).

65 La familia de plantas *Rosaceae* incluye plantas con flores, hierbas, arbustos y árboles. Clasificada taxonómicamente en el reino *Plantae*, *Tracheobionta* (subreino), *Spermatophyta* (superdivisión), *Magnoliophyta* (división), *Magnoliopsida* (clase), *Rosidae* (subclase) y *Rosales* (orden), la familia *Rosaceae* incluye, pero sin limitación, almendras, manzanas, albaricoques, moras, cerezas, nectarinas, melocotones, ciruelas, frambuesas, fresas y membrillos.

La familia *Vitaceae* incluye plantas con flores y vides. Clasificada taxonómicamente en el reino *Plantae*, *Tracheobionta* (subreino), *Spermatophyta* (superdivisión), *Magnoliophyta* (división), *Magnoliopsida* (clase), *Rosidae* (subclase) y *Rhammales* (orden), la familia *Vitaceae* incluye, pero sin limitación, las uvas.

5 De particular importancia para la producción vegetal es la etapa inicial de crecimiento, donde la planta emerge y madura hasta su establecimiento. Un método para tratar una semilla, plántula o planta para mejorar directamente la germinación, la emergencia y la maduración de la planta, o para mejorar indirectamente la comunidad microbiana del suelo que rodea la semilla o plántula, resulta, por lo tanto, valioso para iniciar la producción comercial de la planta. El estándar que se usa típicamente para evaluar la emergencia es la consecución de la etapa de hipocótilo, donde un tallo sobresale visiblemente del suelo. El estándar que se usa típicamente para evaluar la maduración es la consecución de la etapa de cotiledón, donde se forman visiblemente dos hojas en el tallo emergido.

También son importantes en la producción de fruta a partir de plantas el rendimiento y la calidad de la fruta, que pueden expresarse, por ejemplo, en términos de número, peso, color, firmeza, madurez, humedad, grado de infestación por insectos, grado de enfermedad o podredumbre, y/o grado de quemadura solar del fruto. Un método para tratar una planta para mejorar directamente sus características, o para mejorar indirectamente su bioquímica para mejorar su capacidad fotosintética y la salud de sus hojas, raíces y brotes, a fin de permitir una producción robusta de fruta, resulta valioso para aumentar la eficiencia de la producción comercializable. Las denominaciones de comercializable y no comercializable pueden aplicarse tanto a la planta como al fruto, y se pueden definir de forma diferente según el uso final del producto, tal como, pero sin limitación, el producto de mercado fresco y el procesamiento para su inclusión como ingrediente en una composición. La determinación de comercializable puede evaluar cualidades como, pero sin limitación, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura y la quemadura solar. El término producción total puede incluir plantas y frutos comercializables y no comercializables. La relación de plantas o frutos comercializables con respecto a las plantas o frutos no comercializables se puede denominar utilización y expresar como porcentaje. La utilización se puede usar como indicador de la eficiencia del proceso agrícola, ya que muestra la producción exitosa de plantas o frutos comercializables, que obtendrán el mayor rendimiento financiero para el agricultor, mientras que la producción total no necesariamente proporcionará tal indicación. Además, las mejoras y las mediciones de la salud de las plantas pueden incluir la resistencia de las plantas al estrés. El estrés puede ser abiótico, tal como, por ejemplo, el estrés térmico (altas temperaturas, así como heladas), el estrés salino, el estrés por metales pesados, el estrés hídrico (ya sea sequía o exceso de riego), y similares. Asimismo, el estrés puede ser biótico, tal como, por ejemplo, el estrés causado por hongos, bacterias, insectos, malezas, virus y similares. Las medidas de la salud de las plantas mejoradas pueden ser cualitativas o cuantitativas. Cuando son cuantitativas, las realizaciones de mejora en la salud de las plantas pueden ser una mejora relativa en cualquier característica en comparación con una planta sin tratar, en donde la mejora es de al menos el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 %, 750 %, 1000 %, o más.

Para lograr dichas mejoras en la salud, la emergencia, la maduración, el rendimiento y la calidad de las plantas, las realizaciones del presente documento proporcionan composiciones a base de microalgas (no reivindicadas), métodos para preparar composiciones líquidas a base de microalgas y métodos para aplicar las composiciones a base de microalgas a las plantas (no reivindicadas). De acuerdo con el método de preparación reivindicado, las microalgas de la composición líquida preparada comprenden *Chlorella* sp. cultivada en condiciones mixotróficas, que comprende un medio de cultivo compuesto principalmente por agua con oligonutrientes (por ejemplo, nitratos, fosfatos, vitaminas y metales presentes en la receta BG-11 (disponible en UTEX, The Culture Collection of Algae at the University of Texas en Austin, Austin, Texas)), luz como fuente de energía para la fotosíntesis y carbono orgánico (por ejemplo, acetato, ácido acético) tanto como fuente de energía como una fuente de carbono. En algunas realizaciones, la *Chlorella* se puede cultivar en condiciones mixotróficas no axénicas en presencia de organismos contaminantes, tales como, pero sin limitación, bacterias. Los métodos para cultivar dichas microalgas en condiciones mixotróficas no axénicas se pueden encontrar en el documento WO2014/074769A2 (Ganuza, *et al.*).

En un ejemplo no limitante de cultivo mixotrófico de *Chlorella* para el método descrito de preparación de una composición para su aplicación en plantas, la *Chlorella* se cultiva en un medio de cultivo BG-11 o en un medio procedente del medio de cultivo BG-11 (por ejemplo, en el que se añaden uno o más componentes adicionales al medio y/o uno o más elementos del medio aumentan en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 33 %, 50 % o más con respecto al medio BG-11 sin modificar) durante un período de cultivo de 7-14 días en un recipiente de cultivo abierto. La temperatura puede variar entre 20-30 °C y el pH entre 6,5-8,5. La concentración de oxígeno disuelto puede variar entre 0,1-4 mg/l. El cultivo recibe ácido acético o acetato como fuente de carbono orgánico, que aporta tanto como una fuente de carbono a las células de *Chlorella*, y se suministra al cultivo en una alimentación con una concentración en el intervalo del 10-90 % mediante un sistema de auxostato de pH. El cultivo recibe luz solar natural (que comprende radiación fotosintéticamente activa) como fuente de energía. La mezcla se realiza mediante la aspersión de aire a través de un aerotubo y la propulsión del fluido mediante propulsores sumergidos en el cultivo líquido.

Al controlar artificialmente aspectos del proceso de cultivo de *Chlorella*, tal como la alimentación de carbono orgánico, los niveles de oxígeno, el pH y la luz, el proceso de cultivo difiere del proceso de cultivo que la *Chlorella* experimenta en la naturaleza. Además de controlar diversos aspectos del proceso de cultivo, la intervención por operadores humanos o sistemas automatizados tiene lugar durante el cultivo mixotrófico no axénico de *Chlorella* mediante

métodos de control de la contaminación para evitar que la *Chlorella* sea invadida y desplazada por organismos contaminantes (por ejemplo, hongos y bacterias). Los métodos de control de la contaminación para cultivos de microalgas son conocidos en la técnica, y dichos métodos de control de la contaminación adecuados para cultivos de microalgas mixotróficos no axénicos se divulgan en el documento WO2014/074769A2 (Ganuzza, *et al.*). Al intervenir en el proceso de cultivo de microalgas, se puede mitigar el impacto de los microorganismos contaminantes, suprimiendo la proliferación de las poblaciones de organismos que las contienen y su efecto sobre las células microalgales (por ejemplo, lisis, infección, muerte, aglutinación). Por lo tanto, mediante el control artificial de aspectos del proceso de cultivo y la intervención en el proceso de cultivo con métodos de control de la contaminación, el cultivo de *Chlorella* producido en su conjunto y usado en las composiciones de la invención descritas difiere del cultivo resultante de un proceso de cultivo de *Chlorella* que tiene lugar en la naturaleza.

Como alternativa, el método para cultivar *Chlorella* de manera mixotrófica puede comprender otras fuentes conocidas de carbono orgánico o combinaciones de fuentes de carbono orgánico, tales como: linoleato de amonio, arabinosa, arginina, ácido aspártico, ácido butírico, celulosa, ácido cítrico, etanol, fructosa, ácidos grasos, galactosa, glucosa, glicerol, glicina, ácido láctico, lactosa, ácido maleico, maltosa, manosa, metanol, melaza, peptona, hidrolizado de origen vegetal, prolina, ácido propiónico, ribosa, sacarosa, hidrolizados parciales o completos de almidón, sacarosa, tartárico, ácidos orgánicos del ciclo del TCA, vinaza fina, urea, soluciones de desechos industriales y extracto de levadura; así como otros métodos conocidos de mezcla, métodos de suministro de carbono orgánico, iluminación, medios de cultivo, reservas de nutrientes, recipientes de cultivo y optimización de los parámetros de cultivo tales como, pero sin limitación, temperatura, pH, oxígeno disuelto y dióxido de carbono disuelto. El cultivo de *Chlorella* mixotrófica se puede recoger del recipiente de cultivo y/o concentrarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitación, sedimentación, centrifugación, filtración y electrodeshidratación para formar la composición a base de *Chlorella* mixotrófica que se usa en la composición del producto final.

Durante el proceso de cultivo mixotrófico, el cultivo de *Chlorella* también puede contener restos celulares y compuestos excretados de las células de *Chlorella* al medio de cultivo. El resultado del proceso de cultivo mixotrófico de *Chlorella* proporciona el principio activo para una composición que se aplica a las plantas para mejorar al menos una característica de su rendimiento, tal como, por ejemplo, la emergencia, la maduración, el rendimiento, la calidad, etc. Típicamente, la composición se aplica sin adición separada o complementación de la composición con otros principios activos que no se encuentran en las células enteras de *Chlorella* mixotrófica y el medio de cultivo adjunto del proceso de cultivo mixotrófico tales como, pero sin limitación: células de microalgas diferentes de *Chlorella*, extractos de microalgas, macroalgas, extractos de macroalgas, fertilizantes líquidos, fertilizantes granulares, complejos minerales (por ejemplo, calcio, sodio, cinc, manganeso, cobalto, silicio), hongos, bacterias, nematodos, protozoos, sólidos de digestato, productos químicos (por ejemplo, etanolamina, bórax, ácido bórico), ácido húmico, nitrógeno y derivados del nitrógeno, roca de fósforo, plaguicidas, herbicidas, insecticidas, enzimas, fibra vegetal (por ejemplo, fibra de coco); sin embargo, en algunas realizaciones se contempla el aumento de la composición base con cualquiera de los anteriores. Como alternativa, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se puede complementar con nitrógeno, fósforo o potasio para aumentar los niveles en la composición hasta al menos el 1 % de la composición total (es decir, añadir N, P o K para aumentar los niveles al menos en 1-0-0, 0-1-0, 0-0-1 o combinaciones de los mismos). En algunas realizaciones, el nutriente complementado no se capta, que ni absorbe por las microalgas.

La *Chlorella* mixotrófica es la especie de microalga dominante en la composición líquida. En algunas realizaciones, la población de microalgas de la composición líquida es sustancialmente de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 90 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 91 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 92 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 93 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 94 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 95 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 96 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 97 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 98 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos el 99 % de la población de microalgas de la composición líquida. Las composiciones líquidas con al menos el 99 % de una cepa de microalga de *Chlorella* (por ejemplo, al menos el 99,3 %, al menos el 99,5 % o incluso al menos el 99,9 %), tal como *Chlorella* mixotrófica, se pueden considerar como si tuvieran una sola especie de alga. En un aspecto, la composición líquida carece de cualquier cantidad detectable de cualquier otra especie de microalga. En otro aspecto, la composición líquida carece de cualquier otra cantidad de cualquier otro microorganismo (por ejemplo, bacterias) en la composición líquida, salvo la microalga de *Chlorella* deseada, que supere el 1 % en peso de la composición.

La *Chlorella* mixotrófica resultante de la etapa de cultivo consiste en células completas con el análisis proximal que se muestra en la Tabla 1, el perfil de ácidos grasos se muestra en la Tabla 2 y los resultados de análisis adicionales se muestran en los Ejemplos 1-3. Se encontró que el perfil nutricional (es decir, el análisis proximal) de las células de

Chlorella mixotrófica antes y después de la pasteurización, así como durante el almacenamiento posterior, presentó poca variación en la mayoría de las realizaciones.

Tabla 1

	Intervalo
Humedad y volátiles	1-2 %
Contenido de cenizas	3-4,5 %
Hidratos de carbono (calculados)	30-36 %
% de proteína (Leco)	15-45 %
% de lípidos (AOAC)	5-20 %

5

Tabla 2

Analito	Intervalo (%)
Ácido palmítico C16	0,1-4
Ácido oleico C18:1n9c (Omega-9)	0,1-2
Ácido linoleico C18:2n6c (Omega-6)	0,1-5
Ácido alfa-linoleico C18:3n3 (Omega-3)	0,1-2
Otros	0,1-4
Total	0,5-17

10

Las células de *Chlorella* mixotrófica también pueden contener niveles detectables de fitohormonas, tales como, pero sin limitación: ácido abscísico y metabolitos, que se sabe que están relacionados con la función del aparato estomal, la inhibición del crecimiento y la dormancia de las semillas; citoquininas, que se sabe que están relacionadas con la división celular, el desarrollo de las yemas, el desarrollo de la lámina foliar y el retraso de la senescencia; auxinas, que se sabe que están relacionadas con el crecimiento en longitud, la diferenciación de elementos del floema, la dominancia apical, el tropismo y la formación inicial de raíces; y giberelinas, que se sabe que están relacionadas con el alargamiento del tallo y el inicio de la germinación de las semillas.

15

En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender ácido abscísico y metabolitos de ácido abscísico en un intervalo de 5-45 ng/g de peso seco (PS). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender citoquininas en un intervalo de 60-300 ng/g de peso seco (PS). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender auxinas en un intervalo de 400-815 ng/g de peso seco (PS). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender giberelinas en un intervalo de 0,1-15 ng/g de peso seco (PS). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender fitohormonas específicas en los intervalos mostrados en la Tabla 3.

20

En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender ácido abscísico y metabolitos de ácido abscísico en un intervalo de 0,1-1 ng/g de peso fresco (PF). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender citoquininas en un intervalo de 10-30 ng/g de peso fresco (PF). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender auxinas en un intervalo de 1-30 ng/g de peso fresco (PF). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender giberelinas en un intervalo de 0,1-1 ng/g de peso fresco (PF).

25

Tabla 3

Metabolito	Intervalo (ng/g de PS)
Ácido <i>cis</i> -abscísico	0,1-13
Éster de glucosa del ácido abscísico	0,1-5
Ácido faseico	0,1-9
Ácido neo-faseico	0,1-5
Ácido <i>trans</i> -abscísico	0,1-8
(<i>trans</i>) zeatina	0,1-5
(<i>cis</i>) zeatina	0,1-16
(<i>trans</i>) zeatina ribósido	4-20
(<i>cis</i>) zeatina ribósido	30-250
Dihidrozeatina ribósido	0,1-2
Isopenteniladenina	0,1-8
Isopenteniladenosina	1-15
Ácido indol-3-acético	400-815
N-(indol-3-il-acetil)-alanina	0,1-5
giberelina 3	0,1-5

30

(continuación)

Metabolito	Intervalo (ng/g de PS)
giberelina 34	0,1-5
giberelina 44	0,1-5

5 Después de recoger la composición de *Chlorella* mixotrófica del recipiente de cultivo, la *Chlorella* mixotrófica se incorpora típicamente a una composición líquida para su aplicación en las plantas. Generalmente, la composición líquida se estabiliza mediante calentamiento y enfriamiento en un proceso de pasteurización, ajuste del pH y la adición de un inhibidor del crecimiento de levaduras y mohos.

10 En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica se puede congelar y descongelar previamente antes de su inclusión en la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica no se ha sometido a un proceso previo de congelación o descongelación. En todas las realizaciones, las células enteras de *Chlorella* mixotrófica no se han sometido a un proceso de secado. En algunas realizaciones, las paredes celulares de la *Chlorella* mixotrófica de la composición no se han lisado ni alterado, y las células de *Chlorella* mixotrófica no se han sometido a un proceso de extracción ni a un proceso que las pulverice. Las células enteras de *Chlorella* mixotrófica típicamente no se someten a un proceso de purificación para aislar las células enteras de *Chlorella* mixotrófica de los constituyentes adjuntos del proceso de cultivo (por ejemplo, oligoelementos, carbono orgánico residual, bacterias, restos celulares y excreciones celulares) y, por lo tanto, todo el producto del proceso de cultivo de *Chlorella* mixotrófica, que comprende células enteras de *Chlorella*, medio de cultivo, excreciones celulares, restos celulares, bacterias, carbono orgánico residual y oligoelementos, se usa en la composición líquida para su aplicación a las plantas. En algunas realizaciones, las células enteras de *Chlorella* mixotrófica y los componentes adjuntos del proceso cultivo se concentran en la composición. En algunas realizaciones, las células enteras de *Chlorella* mixotrófica y los componentes adjuntos del proceso cultivo se diluyen en la composición a una baja concentración. Las células enteras de *Chlorella* mixotróficas de la composición típicamente no están fosilizadas. En algunas realizaciones, las células enteras de *Chlorella* mixotrófica típicamente no se mantienen en un estado viable en la composición para su crecimiento continuo después del método para usar la composición en una aplicación al suelo o foliar. En algunas realizaciones, la composición base de *Chlorella* mixotrófica puede estar biológicamente inactiva tras su preparación. En algunas realizaciones, la composición base de *Chlorella* mixotrófica puede estar biológicamente inactiva sustancialmente tras su preparación. En algunas realizaciones, la composición base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar en cuanto a su actividad biológica después de exponer al aire la composición preparada.

30 En un ejemplo no limitante para preparar la composición líquida con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica para su aplicación en plantas, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica recogida del sistema de cultivo se mantiene primero en un tanque de cosecha antes de centrifugar el cultivo. Una vez centrifugado el cultivo de *Chlorella* mixotrófica, la centrifuga descarga la fracción rica en sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica, que también contiene los componentes adjuntos del medio de cultivo, en un recipiente a una temperatura de aproximadamente 35 30 °C. La composición a base de *Chlorella* mixotrófica puede continuar (es decir, fresca) en el proceso de preparación de la composición líquida o almacenarse en un congelador y descongelarse posteriormente (es decir, almacenarse) para su procesamiento en la composición líquida. Cuando la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se almacena en un congelador, la temperatura de almacenamiento es de aproximadamente -10 °C y tarda aproximadamente 1-2 días en congelarse. Una vez retirada del congelador, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada se coloca al aire libre para su descongelación durante aproximadamente 7 días. A continuación, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica, fresca o almacenada, se coloca en un tanque y se calienta a una temperatura de aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 2 horas para iniciar el proceso de pasteurización. A continuación, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se diluye hasta una concentración de sólidos de células enteras de aproximadamente el 10-11 % en peso y se enfría a aproximadamente 40 °C para completar el proceso de pasteurización. A continuación, el pH de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se ajusta a un pH de aproximadamente 4 mediante la mezcla en una cantidad eficaz de ácido fosfórico para su estabilización. A continuación, se mezcla aproximadamente un 0,3 % de sorbato de potasio con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica para su estabilización. A continuación, la composición líquida resultante se transfiere a recipientes del tamaño deseado, que se almacenan a 3-5 °C hasta su envío.

50 Si bien se puede realizar un proceso similar para preparar una composición líquida con *Chlorella* cultivada de manera mixotrófica para su aplicación a plantas con una etapa adicional de secado de las microalgas después de la centrifugación, los inventores encontraron sorprendentemente que las composiciones líquidas que contenían microalgas que no se secaron produjeron mejores efectos cuando se aplicaron a las plantas. Dichos efectos que los inventores encontraron que aumentaban al no secar la *Chlorella* mixotrófica comprendían: una germinación acelerada, un mayor contenido de clorofila y un mayor peso de los brotes. Los inventores también encontraron que someter la *Chlorella* mixotrófica a un proceso de secado en tambor reducía los niveles detectables de fitohormonas en la biomasa de las microalgas.

60 Si bien no se añaden ni complementan principios activos separados a la composición a base de *Chlorella* mixotrófica, de acuerdo con la invención reivindicada, la composición líquida que comprende las células enteras de *Chlorella* mixotrófica y los componentes adjuntos del medio y el proceso de cultivo (por ejemplo, oligonutrientes, carbono orgánico residual, bacterias, restos celulares, excreciones celulares) se estabiliza mediante calentamiento y

enfriamiento en un proceso de pasteurización. Como se muestra en los Ejemplos, los inventores encontraron que los principios activos de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica mantuvieron la eficacia para mejorar la germinación, emergencia, maduración y crecimiento de las plantas cuando se aplicaron a las plantas después de someterse al calentamiento y enfriamiento de un proceso de pasteurización y también observaron diversas mejoras de rendimiento que surgieron de la pasteurización en comparación con una versión no pasteurizada de la formulación.

Si bien las células de *Chlorella* mixotrófica se encuentran intactas y son viables (es decir, físicamente aptas para vivir, capaces de tener mayor crecimiento o división celular) tras ser recogidas del cultivo, se confirmó que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización tenían paredes celulares intactas, pero no eran viables. Las células de *Chlorella* mixotrófica resultantes del proceso de pasteurización se observaron al microscopio para determinar el estado de sus paredes celulares tras someterse al calentamiento y enfriamiento del proceso y se confirmó visualmente que las paredes celulares de *Chlorella* estaban intactas y sin roturas. Para una investigación más profunda del estado celular, un cultivo de células vivas de *Chlorella* mixotrófica y las células de *Chlorella* mixotrófica resultantes del proceso de pasteurización se sometieron a yoduro de propidio, un colorante fluorescente de exclusión que marca el ADN si la membrana celular está dañada, y se compararon visualmente al microscopio. La comparación con yoduro de propidio mostró que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización contenían una alta cantidad de ADN teñido, lo que permitió concluir que las paredes celulares de *Chlorella* mixotrófica estaban intactas, pero las membranas celulares estaban dañadas (figura 2). Por lo tanto, la permeabilidad de las células de *Chlorella* pasteurizadas difiere de la permeabilidad de una célula de *Chlorella* con pared y membrana celulares intactas.

Además, un cultivo de células vivas de *Chlorella* mixotróficas y las células de *Chlorella* mixotróficas resultantes del proceso de pasteurización se sometieron al colorante fluorescente de unión DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)-ADN y se compararon visualmente al microscopio. La comparación del colorante de unión DAPI-ADN mostró que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización contenían una cantidad muy reducida de ADN viable en las células, lo que indica que las células de *Chlorella* mixotróficas no son viables después de la pasteurización (figura 1). Las dos comparaciones de teñido del ADN demuestran que el proceso de pasteurización transformó la estructura y función de las células de *Chlorella* desde su estado natural al cambiar: las células de viables a no viables, la condición de la membrana celular y la permeabilidad de las células.

En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar a una temperatura en el intervalo de 50-90 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar a una temperatura en el intervalo de 55-65 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar a una temperatura en el intervalo de 58-62 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar a una temperatura en el intervalo de 50-60 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar a una temperatura en el intervalo de 60-70 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar a una temperatura en el intervalo de 70-80 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar a una temperatura en el intervalo de 80-90 °C.

En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 90-150 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 110-130 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 90-100 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 100-110 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 110-120 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 120-130 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 130-140 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 140-150 minutos.

En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 15-360 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 15-30 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 30-60 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 60-120 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 120-180 minutos. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede calentar durante un período de tiempo en el intervalo de 180-360 minutos.

En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede enfriar a una temperatura en el intervalo de 35-45 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede enfriar a una temperatura en el intervalo de 36-44 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede enfriar a una temperatura en el intervalo de 37-43 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede enfriar a una temperatura en el intervalo de 38-42 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede enfriar a una temperatura en el intervalo de 39-41 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede enfriar a una temperatura adecuada para su procesamiento o manipulación adicional.

- Un método para preparar una composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración para su aplicación en plantas puede comprender: cultivar *Chlorella* en un medio de cultivo líquido y condiciones mixotróficas que comprenden el uso de una fuente de carbono orgánico y radiación fotosintéticamente activa como fuentes de energía en un recipiente de cultivo; recoger el cultivo de *Chlorella* mixotrófica del recipiente de cultivo; y mezclar el cultivo de *Chlorella* mixotrófica con un ácido y un inhibidor de levaduras y mohos para formar una composición con una concentración eficaz de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica para su aplicación a una planta para mejorar sus características, en donde las células enteras de *Chlorella* mixotróficas no se han sometido a un proceso de secado.
- En algunas realizaciones, un método para preparar una composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica para su aplicación en plantas puede comprender: calentar una composición que comprende células enteras de microalgas en un medio líquido a una temperatura en el intervalo de 50-70 °C; ajustar la concentración de las células enteras en la composición calentada a una concentración en el intervalo del 5-30 % de células enteras de microalgas en peso; enfriar la composición a una temperatura en el intervalo de 35-45 °C; ajustar el pH de la composición a un pH en el intervalo de 3-5; y poner en contacto la composición con un inhibidor de levaduras y mohos.
- En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 5-30 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 5-20 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 5-15 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 5-10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 10-20 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 10-20 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 20-30 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, puede tener lugar una dilución adicional del porcentaje de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica antes de la aplicación para aplicaciones de baja concentración de la composición.
- La composición se puede diluir a una concentración menor para obtener una cantidad eficaz en una aplicación foliar o al suelo mezclando un volumen de la composición en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica resultante en la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje original de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica en la composición por la relación del volumen de la composición con respecto al volumen de agua.
- En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 1 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,9 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,8 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,7 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,6 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,5 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,4 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,3 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,2 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,1 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida para la germinación, emergencia o maduración mejoradas de una planta puede comprender una concentración de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotróficas en el intervalo del 0,002642-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,003 % a aproximadamente el 0,080 %), equivalente a una concentración diluida de 0,53-2,64 ml/l (2-10 ml/galón) de una solución con un porcentaje original sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotróficas en el intervalo del 5-30 %.
- En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 0,26-13,21 ml/l (1-50 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,001321-0,396258 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,400 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 0,26-2,64 ml/l (1-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,001321-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 0,53-1,85 ml/l (2-7 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,002642-0,055476 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,003 % a aproximadamente el 0,055 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 2,64-5,28 ml/l (10-

20 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,013201-0,158503 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,013 % a aproximadamente el 0,160 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 5,28-7,92 ml/l (20-30 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,026417-0,237755 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,025 % a aproximadamente el 0,250 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 7,92-11,89 ml/l (30-45 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,039626-0,356631 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,040 % a aproximadamente el 0,360 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 7,92-10,57 ml/l (30-40 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,039626-0,317007 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,040 % a aproximadamente el 0,320 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 10,57-13,21 ml/l (40-50 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,052834-0,396258 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,055 % a aproximadamente el 0,400 %).

En algunas realizaciones, la composición líquida puede comprender bajas concentraciones de bacterias que contribuyen al porcentaje de sólidos de la composición, además de las células enteras de *Chlorella* mixotróficas. Se pueden encontrar ejemplos de bacterias presentes en condiciones mixotróficas no axénicas en el documento WO2014/074769A2 (Ganuza, *et al.*). Un recuento de bacterias vivas se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como recuentos en placa, recuentos en placa usando Petrifilm, disponible en 3M (St. Paul, Minnesota), mediciones espectrofotométricas (turbidimétricas), comparación visual de la turbidez con un estándar conocido, recuentos celulares directos al microscopio, determinación de la masa celular y medición de la actividad celular. El recuento de bacterias vivas en un cultivo de microalgas mixotróficas no axénicas puede variar de 10^4 a 10^9 UFC/ml, y puede depender de las medidas de control de la contaminación adoptadas durante el cultivo de las microalgas. El nivel de bacterias en la composición se puede determinar mediante un recuento aerobio en placa, que cuantifica las unidades formadoras de colonias (UFC) aerobias en un volumen designado. En algunas realizaciones, la composición comprende un recuento aerobio en placa de 40.000-400.000 UFC/ml. En algunas realizaciones, la composición comprende un recuento aerobio en placa de 40.000-100.000 UFC/ml. En algunas realizaciones, la composición comprende un recuento aerobio en placa de 100.000-200.000 UFC/ml. En algunas realizaciones, la composición comprende un recuento aerobio en placa de 200.000-300.000 UFC/ml. En algunas realizaciones, la composición comprende un recuento aerobio en placa de 300.000-400.000 UFC/ml.

Mediante QPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para analizar la población bacteriana en un cultivo de *Chlorella* mixotrófica antes y después de la pasteurización, se observó que el perfil de bacterias en el cultivo cambia después de la pasteurización. Particularmente, el perfil de bacterias postpasteurización incluye una mayor proporción de bacterias formadoras de esporas incluye, pero sin limitación, *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Brevibacillus* sp como los tipos de bacterias dominantes. Comparando los recuentos aerobios en placa de un cultivo de *Chlorella* mixotrófica antes y después de la pasteurización, también se observó que el número total de bacterias en el cultivo es menor después de la pasteurización. Las combinaciones de temperatura y tiempo para el proceso de pasteurización para los tiempos de 15, 30, 60, 120, 180 y 360 minutos, y a 50, 60, 70, 80 y 90 °C se ensayaron con un cultivo de *Chlorella* mixotrófica, y el recuento aerobio en placa resultante varió de $7,58 \times 10^6$ UFC a tan solo $1,74 \times 10^3$ UFC. También se demostró que la temperatura de almacenamiento varía el perfil de bacterias de un cultivo pasteurizado de *Chlorella* mixotrófica, variando las muestras almacenadas a temperaturas de 2-4 °C, 25 °C y 40 °C con el tiempo en el recuento aerobio en placa y el tipo de especie bacteriana dominante.

En algunas realizaciones, el pH de la composición a base de microalgas se puede ajustar a la baja a un pH en el intervalo de 3-5. En algunas realizaciones, el pH de la composición a base de microalgas se puede ajustar al alza a un pH en el intervalo de 3-5. En algunas realizaciones, el pH de la composición a base de microalgas se puede ajustar a un pH en el intervalo de 3,5-4,5. En algunas realizaciones, el pH de la composición a base de microalgas se puede ajustar a un pH en el intervalo de 3-3,5. En algunas realizaciones, el pH de la composición a base de microalgas se puede ajustar a un pH en el intervalo de 3,5-4. En algunas realizaciones, el pH de la composición a base de microalgas se puede ajustar a un pH en el intervalo de 4-4,5. En algunas realizaciones, el pH de la composición a base de microalgas se puede ajustar a un pH en el intervalo de 4,5-5.

En algunas realizaciones, los medios estabilizantes que no son activos en lo que respecta a la mejora de la germinación, emergencia y maduración de las plantas, sino que ayudan a estabilizar la composición a base de microalgas se pueden añadir para prevenir la proliferación de microorganismos no deseados (por ejemplo, levaduras y mohos) y prolongar su vida útil. Dichos medios estabilizantes, aunque inactivos, pueden comprender un ácido y un inhibidor de levaduras y mohos. En algunas realizaciones, los medios estabilizantes son adecuados para las plantas y no inhiben su crecimiento ni su salud. Como alternativa, los medios estabilizantes pueden contribuir a las propiedades nutricionales de la composición líquida, tal como, pero sin limitación, los niveles de nitrógeno, fósforo o potasio.

En algunas realizaciones, la etapa de ajustar el pH de la composición comprende poner en contacto la composición con medios estabilizantes que comprenden un ácido. En algunas realizaciones, tal ácido puede comprender ácido

fosfórico (H₃PO₄). En algunas realizaciones, la cantidad de ácido necesaria para ajustar el pH puede comprender diferentes cantidades de ácido dependiendo del pH inicial de la composición de microalgas, que puede variar según las condiciones de cultivo de las microalgas, las concentraciones residuales de carbono orgánico u otros nutrientes y el procesamiento previo de la composición. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas puede comprender menos del 0,3 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas puede comprender el 0,01-0,3 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas puede comprender el 0,05-0,25 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas puede comprender el 0,01-0,1 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas puede comprender el 0,1-0,2 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas puede comprender el 0,2-0,3 % de ácido fosfórico.

En algunas realizaciones, el inhibidor de levaduras y mohos puede comprender sorbato de potasio (C₆H₇KO₂). En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos del 0,5 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 0,01-0,5 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 0,05-0,4 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 0,01-0,1 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 0,1-0,2 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 0,2-0,3 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 0,3-0,4 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 0,4-0,5 % de sorbato de potasio. En otras realizaciones, la función estabilizante del sorbato de potasio o del ácido fosfórico puede lograrse mediante el uso de aditivos comparables con una función similar, tales como, por ejemplo, ácido ascórbico, benzoato de sodio o similares, en cantidades/concentraciones similares a las que se indican en el presente documento para el sorbato de potasio y el ácido fosfórico.

La composición a base de microalgas es líquida y está compuesta principalmente por agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 70-95 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 85-95 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 70-75 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 75-80 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 80-85 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 85-90 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender el 90-95 % de agua. La naturaleza líquida y el alto contenido de agua de la composición a base de microalgas facilitan la administración de la composición en una diversidad de maneras, tales como, pero sin limitación: fluyendo a través de un sistema de riego, fluyendo a través de un sistema de riego por goteo sobre el suelo, fluyendo a través de un sistema de riego por goteo enterrado, fluyendo a través de un sistema de riego de pivote central, rociadores, aspersores, regaderas y similares.

La composición a base de microalgas se puede usar inmediatamente después de su formulación o se puede almacenar en recipientes para su uso posterior. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede almacenar fuera de la luz solar directa. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede refrigerar. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede almacenar a 1-10 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede almacenar a 1-3 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede almacenar a 3-5 °C. En algunas realizaciones, la composición a base de microalgas se puede almacenar a 5-8 °C. En algunas realizaciones, la composición se puede almacenar a 8-10 °C.

En algunas realizaciones, no secar la composición a base de *Chlorella* mixotrófica durante la preparación puede aumentar la emergencia de semillas en un 40-4.000 %, o más, para aplicaciones al suelo. En algunas realizaciones, no secar la composición a base de *Chlorella* mixotrófica durante la preparación puede aumentar el contenido de clorofila en un 10-30 % para aplicaciones foliares. En algunas realizaciones, no secar la composición a base de *Chlorella* mixotrófica durante la preparación puede aumentar el peso de la planta entera en un 10-20 % para aplicaciones foliares. En algunas realizaciones, no secar la composición a base de *Chlorella* mixotrófica durante la preparación puede aumentar el peso de los brotes en un 20-30 % para aplicaciones foliares.

La administración del tratamiento con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica a una semilla o planta puede realizarse en una cantidad eficaz para producir una característica mejorada en la planta en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas no tratadas (no forma parte de la invención reivindicada). Tales características mejoradas pueden comprender una germinación acelerada de semillas, una emergencia acelerada de plántulas, una emergencia mejorada de plántulas, una formación mejorada de hojas, una formación acelerada de hojas, una maduración mejorada de las plantas, una maduración acelerada de las plantas, un mayor rendimiento de las plantas, un mayor crecimiento de las plantas, una mayor calidad de las plantas, una mayor salud de las plantas, un mayor rendimiento de los frutos, un mayor crecimiento de los frutos y una mayor calidad de los frutos. Los ejemplos no limitantes de tales características mejoradas pueden comprender el logro acelerado de la etapa de hipocótilo, la protrusión acelerada de un tallo del suelo, el logro acelerado de la etapa de cotiledón, la formación acelerada de hojas, el aumento del peso de la planta comercializable, el aumento del rendimiento de la planta comercializable, el aumento del peso del fruto comercializable, el aumento del peso de la planta de producción, el aumento del peso del fruto de producción, el aumento de la utilización (indicador de eficiencia en el proceso agrícola basado en la relación del fruto comercializable con respecto al fruto no comercializable), el aumento del contenido de clorofila (indicador de la salud de la planta), el aumento del peso de la planta (indicador de la salud de la planta), el aumento del peso de la raíz

(indicador de la salud de la planta) y el aumento del peso de los brotes (indicador de la salud de la planta). Estas características mejoradas pueden tener lugar individualmente en una planta o en combinaciones de múltiples características mejoradas.

- 5 Sorprendentemente, los inventores encontraron que la administración de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica descrita en aplicaciones de baja concentración fue eficaz para producir características mejoradas en las plantas. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se administra antes de plantar la semilla. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se administra en el momento de plantar la semilla. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se administra después de plantar la semilla, incluyendo, por ejemplo, en diversas etapas de crecimiento y maduración posemergencia de la planta.

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en un 20-160 %, o más, en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 20 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 40 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 60 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 80 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 100 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 120 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 140 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 150 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar.

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en un 25-2000 %, o más, en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 25 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 30 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 40 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 50 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 60 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 70 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 80 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 90 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar.

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 100 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 200 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas emergidas en al menos un 300 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración

impacto ambiental que puede ser resultado de una aplicación excesiva y una mayor eficiencia en el método de uso de la composición líquida al requerir una pequeña cantidad de material para producir el efecto deseado. En algunas realizaciones, el uso de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica con un sistema de riego de bajo volumen en aplicaciones al suelo permite que la baja concentración de la composición líquida mantenga su eficacia y no se diluya hasta el punto de que la composición ya no esté en una concentración capaz de producir el efecto deseado en las plantas, a la vez que aumenta la eficiencia del uso del agua por parte del agricultor. La posibilidad de usar bajas concentraciones de células enteras de *Chlorella* mixotrófica y la ausencia de procesos de purificación para aislar las células también reducen la necesidad de deshidratación y procesamiento de las microalgas, que pueden producirse a bajas concentraciones en la etapa de cultivo, aumentando así la eficiencia energética en el método para preparar el producto.

Junto con las bajas concentraciones de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica en la composición líquida, necesarias para mejorar las características descritas en las plantas, la composición líquida no requiere una administración continua ni frecuente (por ejemplo, varias veces al día, a diario). La eficacia de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en bajas concentraciones y con una baja frecuencia de aplicación fue un resultado inesperado, debido a la creencia tradicional de que, a medida que disminuye la concentración de principios activos, debe aumentarse la frecuencia de aplicación para proporcionar cantidades adecuadas de los principios activos. La eficacia a baja concentración y la frecuencia de aplicación aumenta la eficiencia del uso del material del método para usar la composición líquida, a la vez que aumenta la eficiencia del rendimiento del proceso agrícola. El uso de una composición de células enteras de *Chlorella* mixotrófica que no requiere procesamiento para secar, extraer, lisar ni alterar la pared celular, también aumenta la eficiencia energética en el método para preparar el producto y permite que el producto se produzca más rápidamente.

Aplicación de remojo de semillas

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En una realización no limitante, la administración del tratamiento con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender remojar la semilla en una cantidad eficaz de la composición líquida antes de plantar la semilla. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica comprende además retirar la semilla de la composición líquida después del remojo, y secar la semilla antes de plantarla. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante un período de tiempo en el intervalo de 90-150 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante un período de tiempo en el intervalo de 110-130 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante un período de tiempo en el intervalo de 90-100 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante un período de tiempo en el intervalo de 100-110 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante un período de tiempo en el intervalo de 110-120 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante un período de tiempo en el intervalo de 120-130 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante un período de tiempo en el intervalo de 130-140 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante un período de tiempo en el intervalo de 140-150 minutos.

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La composición se puede diluir a una concentración menor para obtener una cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas mezclando un volumen de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotróficas resultante en la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje original de sólidos en la composición por la relación del volumen de la composición con respecto al volumen de agua. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,59-2,64 ml/l (6-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,007925-0,0079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,008 % a aproximadamente el 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,85-2,38 ml/l (7-9 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,009245-0,071327 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,009 % a aproximadamente el 0,070 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,59-1,85 ml/l (6-7 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,007925-0,05547 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,008 % a aproximadamente el 0,055 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,85-2,11 ml/l (7-8 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,009246-0,063401 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,009 % a aproximadamente el 0,065 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,11-2,38 ml/l (8-9 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de

sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,010567-0,071327 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,010 % a aproximadamente el 0,070 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,38-2,64 ml/l (9-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,011888-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,012 % a aproximadamente el 0,080 %).

Aplicación al suelo

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En otra realización no limitante, la administración del tratamiento con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender poner en contacto el suelo en las inmediaciones de la semilla o planta plantada con una cantidad eficaz de la composición líquida. En algunas realizaciones, la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se puede suministrar al suelo mediante inyección en un sistema de riego de bajo volumen, tal como, pero sin limitación, un sistema de riego por goteo que suministra agua bajo el suelo a través de conductos perforados o a nivel del suelo mediante conductos de fluido que cuelgan por encima del suelo o sobresalen del mismo. En algunas realizaciones, la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se puede suministrar al suelo mediante un método de empapado del suelo en donde la composición líquida se vierte en el suelo.

La composición a base de *Chlorella* mixotrófica (no reivindicada *per se*) se puede diluir a una concentración menor para obtener una cantidad eficaz en una aplicación al suelo mezclando un volumen de la composición en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotróficas resultante en la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje original de sólidos en la composición por la relación del volumen de la composición con respecto al volumen de agua. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,93-2,64 ml/l (3,5-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,004623-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,004 % a aproximadamente el 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,93-1,05 ml/l (3,5-4 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,004623-0,031701 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,004 % a aproximadamente el 0,032 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,05-1,32 ml/l (4-5 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,005283-0,039626 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,040 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,32-1,59 ml/l (5-6 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,006604-0,047551 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,006 % a aproximadamente el 0,050 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,59-1,85 ml/l (6-7 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,0007925-0,055476 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,008 % a aproximadamente el 0,055 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,85-2,11 ml/l (7-8 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,009246-0,063401 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,009 % a aproximadamente el 0,065 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,11-2,38 ml/l (8-9 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,010567-0,071327 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,010 % a aproximadamente el 0,075 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,39-2,64 ml/l (9-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,011888-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,012 % a aproximadamente el 0,080 %).

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,26-13,21 ml/l (1-50 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,001321-0,396258 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,400 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,26-2,64 ml/l (1-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,001321-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,53-

1,85 ml/l (2-7 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,002642-0,055476 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,003 % a aproximadamente el 0,055 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,64-5,28 ml/l (10-20 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,013201-0,158503 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,013 % a aproximadamente el 0,160 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 5,28-7,92 ml/l (20-30 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,026417-0,237755 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,025 % a aproximadamente el 0,250 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 7,92-11,89 ml/l (30-45 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,039626-0,356631 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,040 % a aproximadamente el 0,360 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 7,92-10,57 ml/l (30-40 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,039626-0,317007 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,040 % a aproximadamente el 0,320 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 10,57-13,21 ml/l (40-50 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,052834-0,396258 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,055 % a aproximadamente el 0,400 %).

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La tasa de aplicación de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a la concentración deseada se puede expresar como volumen por área. En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo 467,7-1403,1 l/ha (50-150 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 701,55-1169,25 l/ha (75-125 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 467,7-701,55 l/ha (50-75 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 701,55-935,4 l/ha (75-100 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 935,4-1169,25 l/ha (100-125 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 1169,25-1403,1 l/ha (125-150 galones/acre).

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La frecuencia de la aplicación de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se puede expresar como el número de aplicaciones por período de tiempo (por ejemplo, dos aplicaciones al mes), o por el período de tiempo entre aplicaciones (por ejemplo, una aplicación cada 21 días). En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo cada 3-28 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida en una aplicación al suelo cada 4-10 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo cada 18-24 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida en una aplicación al suelo cada 3-7 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo cada 7-14 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo cada 14-21 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo cada 21-28 días.

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La una o más aplicaciones al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica generalmente comienzan después del establecimiento de la planta, pero pueden comenzar antes del establecimiento, en un período definido después de la plantación o en un período definido después de la emergencia del suelo en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 5-14 días después de la emergencia de la planta del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 5-7 días después de la emergencia de la planta del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 7-10 días después de la emergencia de la planta del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 10-12 días después de la emergencia de la planta del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 12-14 días después de la emergencia de la planta del suelo.

Aplicación por capilaridad

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En otra realización no limitante, la administración del tratamiento con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender remojar en primer lugar la semilla en agua, retirar la semilla del agua, secar la semilla, aplicar una cantidad eficaz de la composición líquida por debajo del nivel de siembra de semillas en el suelo, y plantar la semilla, en donde la composición líquida se suministra a la semilla desde abajo por capilaridad. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en agua durante un período de tiempo en el intervalo de 90-150 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en agua durante un período de tiempo en el intervalo de 110-130 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en agua durante un período de tiempo en el intervalo de 90-100 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en agua durante un período de tiempo en el intervalo de 100-110 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en agua durante un período de tiempo en el intervalo de 110-120 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en agua durante un período de tiempo en el intervalo de 120-130 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en agua durante un período de tiempo en el intervalo de 130-140 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede remojar en agua durante un período de tiempo en el intervalo de 140-150 minutos.

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La composición a base de *Chlorella* mixotrófica se puede diluir a una concentración menor para obtener una cantidad eficaz en una aplicación por capilaridad mezclando un volumen de la composición en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotróficas resultante en la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje original de sólidos en la composición por la relación del volumen de la composición con respecto al volumen de agua. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación por capilaridad de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,59-2,64 ml/l (6-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,007925-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,008 % a aproximadamente el 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación por capilaridad de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,85-2,38 ml/l (7-9 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,009245-0,071327 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,009 % a aproximadamente el 0,075 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación por capilaridad de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,59-1,85 ml/l (6-7 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,007925-0,05547 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,008 % a aproximadamente el 0,055 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación por capilaridad de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,85-2,11 ml/l (7-8 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,009246-0,063401 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,009 % a aproximadamente el 0,065 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación por capilaridad de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,11-2,38 ml/l (8-9 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,010567-0,071327 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,010 % a aproximadamente el 0,075 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación por capilaridad de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,38-2,64 ml/l (9-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,011888-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,012 % a aproximadamente el 0,080 %).

Aplicación foliar

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En una realización no limitante, la administración del tratamiento con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender poner en contacto el follaje de la planta con una cantidad eficaz de la composición líquida. En algunas realizaciones, la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se puede pulverizar sobre el follaje mediante un rociador manual, un rociador en un implemento agrícola, un aspersor, un sistema de distribución amplio tal como un fumigador o similar.

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La composición a base de *Chlorella* mixotrófica se puede diluir a una concentración menor para obtener una cantidad eficaz en una aplicación foliar mezclando un volumen de la composición en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotróficas resultante en la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje original de sólidos en la composición por la relación del volumen de la composición con respecto al volumen de agua. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,53-2,64 ml/l (2-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,002642-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,003 % a aproximadamente el 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una

concentración en el intervalo de 0,53-0,79 ml/l (2-3 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,002642-0,023775 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,003 % a aproximadamente el 0,025 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,79-1,05 ml/l (3-4 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,003963-0,031701 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,004 % a aproximadamente el 0,035 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,05-1,32 ml/l (4-5 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,005283-0,039626 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,040 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,32-1,59 ml/l (5-6 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,006604-0,047551 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,007 % a aproximadamente el 0,050 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,59-1,85 ml/l (6-7 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,007925-0,055476 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,008 % a aproximadamente el 0,055 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,85-2,11 ml/l (7-8 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,009246-0,063401 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,009 % a aproximadamente el 0,065 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,11-2,38 ml/l (8-9 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,010567-0,071327 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,010 % a aproximadamente el 0,070 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,38-2,64 ml/l (9-10 ml/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica del 5-30 % al 0,011888-0,079252 % (por ejemplo, de aproximadamente el 0,012 % a aproximadamente el 0,080 %).

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La tasa de aplicación de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a la concentración deseada se puede expresar como volumen por área. En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 93,54-467,7 l/ha (10-50 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 93,54-140,31 l/ha (10-15 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 140,31-187,08 l/ha (15-20 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 187,08-233,85 l/ha (20-25 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 233,85-280,62 l/ha (25-30 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 280,62-327,39 l/ha (30-35 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 327,39-374,16 l/ha (35-40 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 374,16-420,93 l/ha (40-45 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 420,93-467,7 l/ha (45-50 galones/acre).

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La frecuencia de la aplicación de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se puede expresar como el número de aplicaciones por período de tiempo (por ejemplo, dos aplicaciones al mes), o por el período de tiempo entre aplicaciones (por ejemplo, una aplicación cada 21 días). En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 3-28 días, o más. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 4-10 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 18-24 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 3-7 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 7-14 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 14-21 días. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 21-28 días.

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: La una o más aplicaciones foliares de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica generalmente comienzan después del establecimiento de la planta, pero pueden comenzar antes del establecimiento, en un período definido después de la plantación o en un período definido después de la emergencia del suelo en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 5-14 días después de la emergencia de la planta del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 5-7 días después de la emergencia de la planta del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 7-10 días después de la emergencia de la planta del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 10-12 días después de la emergencia de la planta del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner en contacto en primer lugar con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 12-14 días después de la emergencia de la planta del suelo.

15 **Aplicación hidropónica**

Realizaciones adicionales que no forman parte de la invención reivindicada: En otra realización no limitante, la administración de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica a una semilla o planta puede comprender aplicar la composición junto con un medio nutritivo a semillas dispuestas en, y plantas que crecen en, un medio de crecimiento hidropónico o un medio de crecimiento inerte (por ejemplo, cáscaras de coco). La composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se puede aplicar múltiples veces al día, a la semana o por temporada de cultivo.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

30 Las muestras de células enteras de *Chlorella* cultivadas de manera mixotrófica se analizaron para determinar el contenido. Los resultados del análisis de las muestras y los intervalos extrapolados basados en desviaciones estándar se muestran en la Tabla 4, indicando NA niveles que eran demasiado bajos para la detección. Los resultados del análisis de proteínas se presentan en una base de peso seco, mientras que los resultados restantes se presentan en una base húmeda.

35 **Tabla 4**

	N.º de muestra				Intervalo
	1	2	3	4	
% de proteína (Leco)	34,89	35,04	29,4	24,5	15-45
% de lípidos (AOAC)	14,6	15,3	10,75	12,9	5-20
Fósforo (ppm)	2000	2300	2700	2800	1.600-3.200
Potasio (ppm)	6208	6651	7088	8008	5.400-9.000

ES 3 016 752 T3

(continuación)

	N.º de muestra				Intervalo
	1	2	3	4	
Calcio (ppm)	2100	2000	1500	1200	750-2.600
Hierro (ppm)	130	160	140	110	80-200
Magnesio (ppm)	1500	1500	1200	970	700-1.800
Manganeso (ppm)	31	32	25	21	10-40
Cinc (ppm)	<25	29	<25	<25	0,1-40
Arsénico (ppm)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	0,1-2,5
Cadmio (ppm)	<0,5	1,8	<0,5	<0,5	0,1-2,0
Cobalto (ppm)	2,2	1,6	1,4	1,3	0,1-5,0
Cromo (ppm)	ND	<1,0	<1,0	<1,0	0,1-1,0
Cobre (ppm)	ND	180	18	14	1-300
Mercurio (ppm)	ND	<2,0	<2,0	<2,0	0,1-2,0
Molibdeno (ppm)	ND	<2,5	<2,5	<2,5	0,1-2,5
Sodio (ppm)	2500	5400	3300	2400	1.000-6.800
Níquel (ppm)	ND	<2,5	<2,5	<2,5	0,1-2,5
Plomo (ppm)	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	0,1-5,0
Selenio (ppm)	ND	<5,0	<5,0	<5,0	0,1-5,0

Ejemplo 2

- 5 Las muestras de células enteras de *Chlorella* cultivadas de manera mixotrófica se analizaron para determinar el contenido de aminoácidos. Los resultados del análisis de las muestras y los intervalos extrapolados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Analito	% en biomasa	Intervalo (%)
Ácido aspártico	3,88	2,0-5,0
Treonina	1,59	0,1-3,0
Serina	2,3	0,1-4,0
Ácido glutámico	6,01	4,0-8,0
Prolina	2,73	0,1-5,0
Glicina	2,45	0,1-4,0
Alanina	3,34	1,0-5,0
Cisteína	0,56	0,1-2,0
Valina	1,99	0,1-4,0
Metionina	0,85	0,1-2,0
Isoleucina	1,39	0,1-3,0
Leucina	3,13	1,0-5,0
Tirosina	1,50	0,1-3,0
Fenilalanina	1,77	0,1-4,0
Lisina	1,87	0,1-3,0
Histidina	0,96	0,1-2,0
Arginina	4,42	2,0-6,0
Triptófano	0,95	0,1-2,0
Total	41,69	11,3-70

10

Ejemplo 3

Las muestras de células enteras de *Chlorella* cultivadas de manera mixotrófica se analizaron para determinar el contenido de hidratos de carbono. Los resultados del análisis de las muestras y los intervalos extrapolados se muestran en las Tablas 6-7.

15

Tabla 6

Analito	% en hidratos de carbono	% en biomasa	Intervalo (% en biomasa)
Polisacárido	81,61	32,6	20-40
Rafinosa	1,47	0,6	0,1-2,0
Celobiosa	1,89	0,8	0,1-2,0
Maltosa	5,18	2,1	0,1-4,0
Glucosa	5	2	0,1-4,0
Xilosa	0,7	0,3	0,1-1,0
Galactosa	1,21	0,5	0,1-1,0

ES 3 016 752 T3

(continuación)

Analito	% en hidratos de carbono	% en biomasa	Intervalo (% en biomasa)
Manosa	0,86	0,3	0,1-1,0
Fructosa	0,41	0,2	0,1-1,0
Ácido glucurónico	1,67	0,7	0,1-2,0
Total	100	40,1	20,9-58,0

Tabla 7

Analito	% en hidratos de carbono	% en biomasa	Intervalo (% en biomasa)
Glucosa	54,5	21,8	10-30
Xilosa	4,5	1,8	0,1-4
Galactosa	16,5	6,6	4,0-8,0
Arabinosa	5,2	2,1	0,1-4,0
Manosa	5,6	2,2	0,1-4,0
Fructosa	2,7	1,1	0,1-2,0
Ácido glucurónico	10	4	2,0-6,0
Total	99	39,6	16,4-58,0

5 Ejemplo 4

Las muestras de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración que comprenden el 10 % en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica, <0,1 % de ácido fosfórico, 0,3 % de sorbato de potasio, y el resto de agua se analizaron para determinar el contenido. Los resultados del análisis de las muestras y los intervalos extrapolados basados en desviaciones estándar se muestran en la Tabla 8, indicando NA niveles que eran demasiado bajos para la detección. Los resultados del análisis de proteínas se presentan en una base de peso seco, mientras que los resultados restantes se presentan en una base húmeda.

Tabla 8

	N.º de muestra				Intervalo
	1	2	3	4	
% de proteína (Leco)	31,1	28,7	23,4	22	17-35
% de lípidos (AOAC)	10,12	8,82	13,15	12,2	6-16
Nitrógeno (ppm)	4976	4592	3744	3520	3.000-7.000
Fósforo (ppm)	1600	1300	1500	1400	1.200-1.700
Potasio (ppm)	979,4	961,8	1385,5	1319,6	700-1700
Boro (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Calcio (ppm)	160	100	120	130	65-200
Hierro (ppm)	11	9,9	9,6	9,3	8-12
Magnesio (ppm)	130	94	95	86	70-160
Manganeso (ppm)	2,5	2,0	2,1	1,8	1,5-3,0
Azufre (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Cinc (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Arsénico (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Cadmio (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Cobalto (ppm)	1,2 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻⁵	1,2 x 10 ⁻⁵	0,00001-0,000013
Cromo (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Cobre (ppm)	5,5 x 10 ⁻⁴	2,5 x 10 ⁻⁴	ND	3,9 x 10 ⁻⁴	0,00002-0,00006
Mercurio (ppm)	ND	ND	ND	ND	0,1-2,0
Molibdeno (ppm)	ND	ND	ND	ND	0,1-2,5
Sodio (ppm)	0,047	0,028	0,028	0,022	0,017-0,058
Níquel (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Plomo (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Selenio (ppm)	ND	ND	ND	ND	
Recuento aerobio en placa FSNS N.º 1.1 (FDA-BAM) (UFC est./ml)	380.000	130.000	91.000	56.000	80.000-400.000
Salmonella FSNS N.º 32.2 (ELFA-AOAC)	(-) 25 gramos	(-) 25 gramos	(-) 25 gramos	(-) 25 gramos	0
<i>Staphylococcus aureus</i> FSNS N.º 11.1 (FDA-BAM) (UFC/ml)	<10	<10	<10	<10	0,1-10

15

(continuación)

	N.º de muestra				Intervalo
	1	2	3	4	
NMP de recuento de coliformes FSNS N.º 7.1 (FDA-BAM) (NMP/ml)	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	0,1-3,0
NMP de <i>E. coli</i> FSNS N.º 7.1 (FDA-BAM) (NMP/ml)	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	0,1-3,0
Recuento de mohos FSNS N.º 4.1 (FDA-BAM) (UFC/ml)	<10	<10	<10	<10	0,1-10
Recuento de levaduras FSNS N.º 4.1 (FDA-BAM) (UFC/ml)	<10	<10	10	<10	0,1-15

Ejemplo 5

5 Las muestras de células enteras de *Chlorella* mixotrófica y composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración que comprenden el 10 % en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica, <0,1 % de ácido fosfórico, 0,3 % de sorbato de potasio, y el resto de agua se analizaron por el National Research Council Canada (Ottawa, Ontario) para determinar el contenido de fitohormonas. Las composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica usadas en este Ejemplo no se analizaron para cuantificar las bacterias en las composiciones, sin embargo, los recuentos aerobios en placa para las composiciones anteriores preparadas con los mismos componentes de la misma manera contenían 40.000-400.000 UFC/ml. Todas las muestras de células enteras de *Chlorella* mixotrófica debían secarse para su análisis, y los resultados se notifican con respecto al peso seco (PS). Dos muestras de células enteras de *Chlorella* mixotrófica analizadas contenían *Chlorella* mixotrófica que se había secado mediante un secador de tambor antes del análisis, que consistían en una muestra donde las células enteras de *Chlorella* mixotrófica se habían almacenado previamente en un congelador (vieja) y una muestra donde las células enteras de *Chlorella* mixotrófica no se habían almacenado previamente (fresca). Una muestra de células enteras de *Chlorella* mixotrófica que se liofilizó antes del análisis se usó como la aproximación más cercana del contenido de células de *Chlorella* mixotrófica que no se habían sometido a un proceso de secado. Se obtuvieron muestras de *Chlorella vulgaris* cultivada fototróficamente seca en Hoosier Hill Farm LLC (Angola, Indiana).

10 Las muestras de composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración se analizaron como muestras líquidas, y los resultados se notifican con respecto al peso fresco (PF). Una muestra contenía una composición a base de *Chlorella* mixotrófica que se había almacenado previamente en un congelador (vieja) y otra muestra contenía una composición a base de *Chlorella* mixotrófica que no se había almacenado previamente (fresca). Los resultados del análisis de las muestras se muestran en las Tablas 9-12, con n.d. indicando donde no se detectó el metabolito. Los ng/g informados equivalen a niveles de partes por mil millones (ppb).

Tabla 9

Muestra sólida	ABA y metabolitos de ABA (ng/g de PS)				
	ABA	ABAGE	PA	Neo-PA	t-ABA
<i>Chlorella vulgaris</i> fototrófica	<4	n.d.	<4	n.d.	<4
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (almacenada)	8	n.d.	n.d.	<3,9	11
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (fresca)	<3,9	<3,9	<3,9	n.d.	<3,9
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Liofilizada (almacenada)	11	<3,9	7	<3,9	15
Muestra líquida	ABA y metabolitos de ABA (ng/g de PF)				
Composición de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	<0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Composición de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	n.d.	<0,4	n.d.	n.d.	<0,4

30 Las fitohormonas en la Tabla 9 se abrevian de la siguiente manera: ABA = Ácido *cis*-abscísico; ABAGE = Éster de glucosa del ácido abscísico; PA = Ácido faseico; Neo-PA = Ácido neofaseico; y t-ABA = Ácido *trans*-abscísico. Como se muestra en la Tabla 9, ambas muestras secadas en tambor mostraron niveles más bajos de ABA y metabolitos de ABA que la muestra liofilizada. Las células de *Chlorella* mixotrófica mostraron niveles comparables de ABA y metabolitos de ABA a los de las muestras de células de *Chlorella* fototrófica. Ninguna de las muestras de composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración mostró niveles detectables de ABA y metabolitos de ABA.

Tabla 10

Muestra sólida	Citoquininas (ng/g de PS)							
	t-ZOG	t-Z	c-Z	t-ZR	c-ZR	dhZR	iP	iPR
<i>Chlorella vulgaris</i> fototrófica	n.d.	n.d.	2	<1	12	4	3	5
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (almacenada)	n.d.	<1,3	7	17	238	n.d.	3	13

ES 3 016 752 T3

<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (fresca)	n.d.	n.d.	<1,2	6	233	1	<1	4
--	------	------	------	---	-----	---	----	---

(continuación)

Muestra sólida	Citoquininas (ng/g de PS)							
	t-ZOG	t-Z	c-Z	t-ZR	c-ZR	dhZR	iP	iPR
	Citoquininas (ng/g de PF)							
Muestra líquida	t-ZOG	t-Z	c-Z	t-ZR	c-ZR	dhZR	iP	iPR
Composición de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	n.d.	n.d.	0	<0,1	13	n.d.	<0,1	0,4
Composición de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	2	n.d.	14	n.d.	6	n.d.	4	1

- Las fitohormonas en la Tabla 10 se abrevian de la siguiente manera: t-ZOG = (*trans*) Zeatina-O-glucósido; t-Z = (*trans*) Zeatina; c-Z = (*cis*) Zeatina; t-ZR = (*trans*) Zeatina ribósido; c-ZR = (*cis*) Zeatina ribósido; dhZR = Dihidrozeatina ribósido; iP = Isopenteniladenina; e iPR = Isopenteniladenosina. Como se muestra en la Tabla 10, ambas muestras secadas en tambor mostraron niveles más bajos de t-Z, c-Z e iP que la muestra liofilizada. Las muestras de composiciones mostraron niveles detectables de t-ZOG, c-Z, c-ZR, iP e iPR, lo que indica que someter la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a un proceso de secado en tambor puede reducir el contenido de c-Z e iP de la composición. Las muestras de células de *Chlorella* mixotróficas mostraron un contenido más alto de t-ZR que la muestra de células de *Chlorella* fototróficas. Las muestras de composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración mostraron niveles detectables de t-ZOG, c-Z, c-ZR, iP e iPR.

Tabla 11

Muestra sólida	Auxinas (ng/g de PS)				
	IAA	IAA-Ala	IAA-Asp	IAA-Glu	IAA-Leu
<i>Chlorella vulgaris</i> fototrófica	70	n.d.	<4	n.d.	n.d.
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (almacenada)	412	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (fresca)	414	<3,9	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Liofilizada (almacenada)	794	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Auxinas (ng/g de PF)				
Muestra líquida	IAA	IAA-Ala	IAA-Asp	IAA-Glu	IAA-Leu
Composición de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Composición de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

- Las fitohormonas en la Tabla 11 se abrevian de la siguiente manera IAA = Ácido indol-3-acético; IAA-Ala = N-(Indol-3-il-acetil)-alanina; IAA-Asp = Ácido N-(indol-3-il-acetil)-aspártico; IAA-Glu = Ácido N-(indol-3-il-acetil)-glutámico; y IAA-Leu = N-(Indol-3-il-acetil)-leucina. Como se muestra en la Tabla 11, ambas muestras secadas en tambor mostraron niveles más bajos de IAA que la muestra liofilizada, y las muestras de células de *Chlorella* mixotróficas mostraron niveles de IAA mayores que las muestras de células de *Chlorella* fototróficas. Las muestras de composiciones mostraron niveles detectables de IAA, lo que indica que someter la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a un proceso de secado en tambor puede reducir el contenido de IAA de la composición.

Tabla 12

Muestra sólida	Giberelinas (ng/g de PS)							
	GA3	GA4	GA7	GA8	GA34	GA44	GA51	GA53
<i>Chlorella vulgaris</i> fototrófica	<4	<4	n.d.	n.d.	n.d.	<4	n.d.	n.d.
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (almacenada)	<3,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (fresca)	<3,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<3,9	n.d.	n.d.
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Liofilizada (almacenada)	7	n.d.	n.d.	n.d.	<3,9	n.d.	n.d.	n.d.
	Giberelinas (ng/g de PF)							
Muestra líquida	GA3	GA4	GA7	GA8	GA34	GA44	GA51	GA53
Composición de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	n.d.	<0,4	n.d.	n.d.	<0,4	n.d.	n.d.	n.d.
Composición de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	n.d.	<0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

- Las fitohormonas en la Tabla 12 se abrevian de la siguiente manera: GA = Giberelinas. Como se muestra en la Tabla 12, ambas muestras secadas en tambor mostraron niveles más bajos de GA3 que la muestra liofilizada. Ninguna de las muestras de composiciones mostró niveles detectables de giberelinas.

Ejemplo 6

- Se realizó un experimento para determinar si la aplicación de una baja concentración de a composición a base de *Chlorella* mixotrófica a semillas de tomate plantadas en el suelo afectó a la velocidad a la que las plántulas emergen del suelo. Los tomates pertenecen a la familia *Solanaceae*. Se sembraron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en bandejas con mezcla de sustrato estándar para macetas sin tierra. Se compararon diez tratamientos con un control sin tratar (UTC) y se enumeran en la Tabla 13, duplicándose los tratamientos 3 y 9. Los tratamientos consistieron en un tratamiento donde la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se secó en un secador de tambor (DD, por sus

siglas en inglés) antes de su formulación, y dos tratamientos donde la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no se había secado (húmeda). La composición a base de *Chlorella* mixotrófica en los tratamientos 3 y 9 no se sometió a un proceso de secado ni de lisis. La biomasa extraída de *Haematococcus pluvialis* se lisó mecánicamente antes de someterse a un proceso de extracción con dióxido de carbono supercrítico. Las células lisadas de *Galidieria* sp. cultivadas de manera mixotrófica se lisaron mecánicamente. El tratamiento con el medio de cultivo BG-11 consistió en el mismo medio de cultivo usado en el proceso de cultivo de *Chlorella* mixotrófica. El tratamiento con el medio centrifugado consistió en el medio cultivado separado de un cultivo de *Chlorella* mixotrófica mediante centrifugación al final del proceso de cultivo (es decir, una vez recogida la *Chlorella* mixotrófica). Para fines comparativos, se adquirió un producto comercial a base de extracto de macroalgas en Acadian Seaplants Limited (30 Brown Avenue, Dartmouth, Nueva Escocia, Canadá, B3B 1X8). También se ensayó el producto disponible comercialmente Transit Soil de FBSciences, Inc. (153 N Main Street, Ste 100, Collierville, TN 38017).

Tabla 13

N.º de tratamiento	Descripción del tratamiento
1	UTC - control de agua sin tratar
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras secadas en tambor (DD)
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras (terreno húmedo 1)
4	<i>Haematococcus pluvialis</i> fototrófica - Biomasa extraída
5	<i>Galdieria</i> sp. mixotrófica - Células enteras
6	<i>Galdieria</i> sp. mixotrófica - Células lisadas
7	Medio centrifugado de cultivo de <i>Chlorella</i> sp. mixotrófica
8	Medio de cultivo BG-11
9	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras (terreno húmedo 2)
10	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian
11	Producto estándar para agricultores - Transit Soil

Los tratamientos se pasteurizaron, se normalizaron al 10 % de sólidos (para tratamientos con sólidos de microalgas) y se estabilizaron con ácido fosfórico (H₃PO₄) y sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), consistiendo el en agua. Las composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica se congelaron y se descongelaron previamente y se incorporaron a los tratamientos formulados usados en este experimento después del almacenamiento en frío después de recogerse del sistema de cultivo de microalgas. Las composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica usadas en los tratamientos de este experimento no se analizaron para cuantificar las bacterias en las composiciones, sin embargo, los recuentos aerobios en placa para las composiciones anteriores preparadas con los mismos componentes de la misma manera contenían 40.000-400.000 UFC/ml.

Todos los tratamientos se aplicaron a las semillas a la baja concentración de 1,25 ml/l (4,73 ml/galón). El método de tratamiento consistió en empapar el suelo a una tasa de 100 galones/acre usando una regadera. Los tratamientos se aplicaron inmediatamente después de plantar las semillas. La concentración ensayada de 1,25 ml/l (4,73 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,012495 %.

Cada tratamiento se aplicó a 100 semillas plantadas con un patrón de 10 x 10 en bandejas de siembra, donde cada hilera de diez se consideraba una réplica (10 réplicas en total). Se realizaron observaciones visuales diarias para registrar el porcentaje de plantas que habían emergido del suelo. El estándar usado para evaluar la emergencia fue el estadio de hipocótilo, donde era visible un tallo sobresaliendo de la mezcla de sustrato. El experimento se realizó en un invernadero con todas las semillas y tratamientos sometidos a las mismas condiciones controladas, incluyendo temperatura e iluminación. Todas las bandejas se trataron con la misma cantidad de agua durante todo el experimento. No se proporcionaron nutrientes adicionales a las plantas durante el experimento. Todos los datos considerados significativos se obtuvieron utilizando el rango de prueba múltiple de New Duncan con un nivel de confianza del 90 %, de modo que los valores con la misma letra como identificador de significación estadística no difieran significativamente.

Los resultados se muestran en la Tabla 14-18, junto con los identificadores de agrupación de significación estadística.

Tabla 14

Emergencia de las plantas (% promedio de plantas emergidas en la fecha)												
	Día 1				Día 2				Día 3			
	AM		PM		AM		PM		AM		PM	
1	0	a	0	c	0	d	2	f	3	d	16	d
2	0	a	0	c	0	d	1	f	2	d	21	d
3	0	a	3	c	6	c	24	d	23	bcd	60	b
4	0	a	3	c	4	c	24	d	26	bcd	60	b
5	0	a	0	c	0	d	5	f	6	d	45	c
6	0	a	0	c	0	d	5	f	5	d	44	c

(continuación)

Emergencia de las plantas (% promedio de plantas emergidas en la fecha)												
	Día 1				Día 2				Día 3			
	AM		PM		AM		PM		AM		PM	
7	0	a	0	c	0	d	7	f	10	d	43	c
8	0	a	0	c	0	d	10	ef	10	d	49	be
9	0	a	8	ab	10	ab	42	b	45	ab	72	a
10	0	a	0	c	0	d	18	de	19	cd	6	b
11	0	a	0	c	0	d	16	de	44	ab	44	c

Tabla 15

Emergencia de las plantas (% promedio de plantas emergidas en la fecha)												
	Día 4				Día 5				Día 6		Día 7	
	AM		PM		AM		PM		PM		PM	
1	17	g	47	g	55	e	76	a	83	a	84	A
2	24	g	55	fg	56	e	77	a	84	a	87	A
3	65	abc	70	b-e	79	abc	83	a	82	a	78	A
4	61	bcd	73	a-e	79	abc	84	a	84	a	85	A
5	44	ef	64	def	64	de	82	a	83	a	88	A
6	43	f	61	ef	66	cde	77	a	80	a	80	A
7	44	ef	64	def	73	a-d	82	a	81	a	83	A
8	56	cde	64	def	66	cde	77	a	74	a	77	a
9	73	ab	80	ab	83	ab	85	a	88	a	87	a
10	62	bcd	79	abc	79	abc	85	a	89	a	88	a
11	47	ef	68	cde	72	a-d	79	a	83	a	84	a

- 5 Como se muestra en las Tablas 14-15, los tratamientos 3 y 9 que comprenden la composición a base de *Chlorella* mixotrófica emergieron del suelo antes que el UTC, los productos comerciales estándar para agricultores en los tratamientos 10 y 11, y los tratamientos 5-8, mostrando una diferencia estadísticamente significativa el Día 2 AM. El porcentaje de plantas emergidas para todos los tratamientos convergió al final del experimento.

10

Tabla 16

Emergencia de las plantas (% promedio de plantas emergidas en el momento de la observación)					
	Control de agua sin tratar (UTC)	Células enteras de <i>Chlorella</i> sp. mixotrófica (Tratamiento 3)	% de aumento sobre el UTC	Células enteras de <i>Chlorella</i> sp. mixotrófica (Tratamiento 9)	% de aumento sobre el UTC
Día 1 AM	0 a	0 a		0 a	
Día 1 PM	0 c	3 c		8 ab	
Día 2 AM	0 d	6d		10 ab	
Día 2 PM	2 f	24 d	1100 %	42 b	2000 %
Día 3 AM	3 d	23 bcd	667 %	45 ab	1400 %
Día 3 PM	16 d	60 b	275 %	72 a	350 %
Día 4 AM	17 g	65 abc	282 %	73 ab	329 %
Día 4 PM	47 g	70 b-e	49 %	80 ab	70 %
Día 5 AM	55 e	79 abc	44 %	83 ab	51 %
Día 5 PM	76 a	83 a	9 %	85 a	12 %
Día 6 PM	83 a	82 a	-1 %	88 a	6 %
Día 7 PM	84 a	78 a	-7 %	87 a	4 %

- 15 La Tabla 16 muestra los tratamientos 3 y 9 que comprenden la composición a base de *Chlorella* mixotrófica con respecto al UTC. Como se muestra en la Tabla 16, los tratamientos 3 y 9 comenzaron a emerger del suelo el Día 1 PM, mientras que el tratamiento con UTC no comentó la emergencia hasta el Día 2 PM y quedó rezagado con respecto a los tratamientos 3 y 9 por un margen estadísticamente significativo en la mayoría de los días hasta el Día 5 PM. De los terrenos que recibieron tratamientos que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica, el tratamiento 3 demostró una diferencia estadísticamente significativa del UTC el Día 2 PM, Día 3 PM, Día 4 AM, Día 4 PM y el Día 5 AM, y el tratamiento 9 demostró una diferencia estadísticamente significativa del UTC del Día 1 PM al Día 5 AM. Los tratamientos 3 y 9 también alcanzaron al menos un 70 % de emergencia un día antes del UTC y mantuvieron un aumento numérico de al menos un 27 % durante el UTC hasta el Día 5 AM.
- 20

Tabla 17

Emergencia de las plantas (% promedio de plantas emergidas en el momento de la observación)				
	Control sin tratar (UTC)	DD de <i>Chlorella</i> mixotrófica (Tratamiento 2)	<i>Chlorella</i> mixotrófica, terreno húmedo 1 (Tratamiento 3)	<i>Chlorella</i> mixotrófica, terreno húmedo 2 (Tratamiento 9)
Día 1 AM	0 a	0 a	0 a	0 a
Día 1 PM	0 c	0 c	3 c	8 ab
Día 2 AM	0 d	0 d	6d	10 ab
Día 2 PM	2 f	1 f	24 d	42 b
% sobre el UTC		-50 %	1100 %	2000 %
% sobre el DD			2300 %	4100 %
Día 3 AM	3 d	2 d	23 bcd	45 ab
% sobre el UTC		-33 %	667 %	1400 %
% sobre el DD			1050 %	2150 %
Día 3 PM	16 d	21 d	60 b	72 a
% sobre el UTC		31 %	275 %	350 %
% sobre el DD			186 %	242 %
Día 4 AM	17 g	24 g	65 abc	73 ab
% sobre el UTC		41 %	282 %	329 %
% sobre el DD			171 %	204 %
Día 4 PM	47 g	55 fg	70 b-e	80 ab
% sobre el UTC		17 %	49 %	70 %
% sobre el DD			27 %	45 %
Día 5 AM	55 e	56 e	79 abc	83 ab
% sobre el UTC		2 %	44 %	51 %
% sobre el DD			41 %	48 %
Día 5 PM	76 a	77 a	83 a	85 a
% sobre el UTC		1 %	9 %	12 %
% sobre el DD			8 %	10 %
Día 6 PM	83 a	84 a	82 a	88 a
% sobre el UTC		1 %	-1 %	6 %
% sobre el DD			-2 %	5 %
Día 7 PM	84 a	87 a	78 a	87 a
% sobre el UTC		4 %	-7 %	4 %
% sobre el DD			-10 %	0 %

Como se muestra en la Tabla 17, los dos tratamientos que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda emergieron del suelo más rápido que el UTC y el tratamiento que comprendía la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD. De los terrenos que recibieron tratamientos que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda, el primer terreno demostró una diferencia estadísticamente significativa del UTC y el tratamiento que comprendía la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD el Día 2 PM, Día 3 PM, Día 4 AM, Día 4 PM y el Día 5 AM, y el segundo terreno demostró una diferencia estadísticamente significativa del UTC y el tratamiento que comprendía la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD del Día 1 PM al Día 5 AM. Los tratamientos que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda también alcanzaron al menos un 70 % de emergencia el día antes del UTC y el tratamiento que comprendía la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD, y mantuvieron un aumento numérico de al menos el 27 % sobre el UTC y el tratamiento que comprendía la composición a base de *Chlorella* DD hasta el Día 5 AM. El rendimiento del tratamiento que comprendía la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD reflejó en gran medida el rendimiento del UTC, sin diferencias estadísticamente significativas a lo largo del experimento y aumentos numéricos superiores al 10 % solo del Día 3 PM al Día 4 PM. Por lo tanto, los resultados indican que el secado de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica con un secador de tambor en el proceso de preparación redujo la eficacia de las composiciones para acelerar la emergencia de las plantas de tomate cuando se aplicaron como empapado del suelo.

Tabla 18

Emergencia de las plantas (% promedio de plantas emergidas el Día 4 AM)			
	22 de mayo AM		% de aumento sobre el UTC
UTC - control de agua sin tratar	17	f	
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras secadas en tambor (DD)	24	f	41 %
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras (Promedio de terrenos húmedos 1 y 2)	69	ab	306 %

(continuación)

Emergencia de las plantas (% promedio de plantas emergidas el Día 4 AM)			
	22 de mayo AM		% de aumento sobre el UTC
<i>Haematococcus pluvialis</i> fototrófica - Biomasa extraída	61	bcd	259 %
<i>Galdieria</i> sp. mixotrófica - Células enteras	44	e	159 %
<i>Galdieria</i> sp. mixotrófica - Células lisadas	43	e	153 %
Medio centrifugado de cultivo de <i>Chlorella</i> sp. mixotrófica	44	e	159 %
Medio de cultivo BG-11	56	cde	229 %
Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian	62	abc	265 %
Producto estándar para agricultores - Transit Soil	47	de	176 %

La Tabla 18 muestra los datos del Día 4 AM con los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica duplicados promediados para su comparación con los demás tratamientos, y muestra una diferencia estadísticamente significativa para la composición a base de *Chlorella* mixotrófica que no se había secado (es decir, húmeda) en comparación con el UTC, que asciende a un aumento numérico del 306 %. La Tabla 18 también muestra que el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica que no se había secado superó a los productos disponibles comercialmente y fue significativamente diferente de los tratamientos con las composiciones a base de *Galdieria* mixotrófica y *Chlorella* mixotrófica secadas en tambor.

Ejemplo 7

Se realizó un experimento para determinar si el método de aplicación de una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica a semillas de tomate plantadas en el suelo afectó a la velocidad a la que las plántulas emergen del suelo y maduran. Se plantaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en bandejas con una mezcla de sustrato de musgo sphagnum, perlita y vermiculita (2: 1: 1). Se compararon tres tratamientos que comprendían una composición a base de *Chlorella* mixotrófica con un control sin tratar (UTC). Los tratamientos se pasteurizaron, se normalizaron al 10 % de sólidos y se estabilizaron con ácido fosfórico (H_3PO_4) y sorbato de potasio ($C_6H_7KO_2$), consistiendo el resto en agua. La composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada se congeló después de recogerse del sistema de cultivo de microalgas y se descongeló antes de la formulación en la composición líquida para los tratamientos usados en el experimento. La composición a base de *Chlorella* mixotrófica fresca no se congeló previamente, y se incorporó a la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento, directamente después de recogerse del sistema de cultivo de microalgas. La composición usada en los tratamientos de este experimento no se analizaron para cuantificar las bacterias en las composiciones, sin embargo, los recuentos aerobios en placa para las composiciones anteriores preparadas con los mismos componentes de la misma manera contenían 40.000-400.000 UFC/ml.

Los tratamientos con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicaron a las semillas a través de dos métodos de tratamiento diferentes. El primer método de tratamiento comprendía remojar las semillas en la baja concentración de 2,11 ml/l (8 ml/galón) de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante dos horas con aspersión de aire constante para evitar la falta de oxígeno, retirar las semillas de la composición, secar las semillas durante una noche y a continuación plantar las semillas en la mezcla de sustrato. El segundo método de tratamiento comprendía remojar las semillas en agua durante dos horas con aspersión de aire constante para evitar la falta de oxígeno, retirar las semillas del agua, secar las semillas durante una noche, plantar las semillas en la mezcla de sustrato con la baja concentración de 2,11 ml/l (8 ml/galón) de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en la base de la bandeja de siembra para permitir que las semillas se trataran con la composición líquida por capilaridad. La concentración ensayada de 2,11 ml/l (8 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,021134 %.

Cada uno de los tres tratamientos se aplicó a 72 semillas. Se realizaron observaciones visuales diarias del suelo y las plantas los días 6 y 7 para registrar cuántas semillas habían emergido y madurado, como se explica a continuación. El estándar usado para evaluar la emergencia fue la consecución de la etapa de hipocótilo, donde un tallo sobresalía visiblemente de la mezcla de sustrato. El estándar usado para evaluar la maduración fue la consecución de la etapa de cotiledón, donde dos hojas se habían formado de manera visible en el tallo emergido. El experimento se realizó en interiores, con todas las semillas y tratamientos sujetos a las mismas condiciones controladas, incluyendo temperatura, iluminación y suministro de agua. No se suministraron otros nutrientes durante el experimento. La luz fue artificial y se proporcionó por lámparas fluorescentes las 24 horas del día. Los resultados del experimento se presentan en las Tablas 19-24.

Tabla 19

	Número de plantas emergidas al día	
	Día 6	Día 7
Control sin tratar (UTC)	28	42
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	22	46
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	26	47
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	43	58

Tabla 20

	% de plantas totales emergidas al día	
	Día 6	Día 7
Control sin tratar (UTC)	39	58
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	31	64
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	36	65
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	60	81

5

Tabla 21

	% de aumento de plantas emergidas al día sobre el UTC	
	Día 6	Día 7
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	-21 %	10 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	-7 %	12 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	54 %	38 %

10

Como se muestra en las Tablas 19-21, el tratamiento por capilaridad y los tratamientos de remojo de semillas mostraron un mayor rendimiento el día siete que el UTC en cuanto a la emergencia de las plantas. El día siete, el tratamiento por capilaridad mostró un aumento del 38 %, el tratamiento de remojo de semillas con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada mostró un aumento del 12 % y el tratamiento de remojo de semillas con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fresca mostró un aumento del 10 % sobre el UTC. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica es eficaz para aumentar la emergencia de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación por capilaridad.

15

Tabla 22

	Número de plantas maduradas al día	
	Día 6	Día 7
Control sin tratar (UTC)	11	37
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	18	41
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	18	39
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	23	47

Tabla 23

	% de plantas totales maduradas al día	
	Día 6	Día 7
Control sin tratar (UTC)	15	51
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	25	57
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	25	54
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	32	65

20

Tabla 24

	% de aumento de plantas maduradas al día sobre el UTC	
	Día 6	Día 7
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	64 %	11 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	64 %	5 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	109 %	27 %

Como se muestra en las Tablas 22-24, el tratamiento por capilaridad y los tratamientos de remojo de semillas mostraron un mayor rendimiento los días 6 y 7 que el UTC en cuanto a la maduración de las plantas. El tratamiento por capilaridad mostró un aumento de al menos el 27 %, el tratamiento de remojo de semillas con la composición a

base de *Chlorella* mixotrófica almacenada mostró un aumento de al menos el 5 %, y el tratamiento de remojo de semillas con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fresca mostró un aumento de al menos el 11 % sobre el UTC. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica es eficaz para aumentar la maduración de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación por capilaridad.

Ejemplo 8

Se realizó un experimento para determinar si el método de aplicación de una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica a semillas de tomate plantadas en el suelo afectó a la velocidad a la que las plántulas emergen del suelo y maduran. Se plantaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en bandejas con una mezcla de sustrato de musgo sphagnum, perlita y vermiculita (2:1:1). Se compararon dos tratamientos que comprendían una composición a base de *Chlorella* mixotrófica cultivada de manera mixotrófica con un control sin tratar (UTC). Los tratamientos se pasteurizaron, se normalizaron al 10 % de sólidos y se estabilizaron con ácido fosfórico (H₃PO₄) y sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), consistiendo el resto en agua. La composición a base de *Chlorella* mixotrófica no se congeló previamente, y se incorporó a la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento, directamente después de recogerse del sistema de cultivo de microalgas. La composición usada en los tratamientos de este experimento no se analizó para cuantificar las bacterias en la composición, sin embargo, los recuentos aerobios en placa para las composiciones anteriores preparadas con los mismos componentes de la misma manera contenían 40.000-400.000 UFC/ml.

La composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicó a las semillas a dos concentraciones diferentes, 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) o 2,11 ml/l (8 ml/galón), usando el mismo método de tratamiento. La concentración ensayada de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,012416 %. La concentración ensayada de 2,11 ml/l (8 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,021134 %. El método de tratamiento consistió en empapar el suelo desde la parte superior con 2,84 l (0,75 galones) de la composición líquida (equivalente a una tasa de aplicación de 935,4 l/ha (100 galones/acre)) a las concentraciones identificadas después de plantar las semillas.

Cada uno de los dos tratamientos se aplicó a dos bandejas de 72 semillas. Se realizaron observaciones visuales diarias del suelo y las plantas para registrar cuántas semillas habían emergido y madurado, como se explica a continuación. El estándar usado para evaluar la emergencia fue la consecución de la etapa de hipocótilo, donde un tallo sobresalía visiblemente de la mezcla de sustrato. El estándar usado para evaluar la maduración fue la consecución de la etapa de cotiledón, donde dos hojas se habían formado de manera visible en el tallo emergido. El experimento se realizó en interiores, con todas las semillas y tratamientos sujetos a las mismas condiciones controladas, incluyendo temperatura, iluminación y suministro de agua. No se suministraron otros nutrientes durante el experimento. La luz fue artificial y se proporcionó por lámparas fluorescentes las 24 horas del día. Los resultados del experimento se presentan en las Tablas 25-30 (donde ml indica ml/galón).

Tabla 25

	Número de plantas emergidas al día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sin tratar (UTC)	-	-	0	0	0	10	40	43	69
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	-	-	0	0	0	20	57	62	87
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	-	-	0	0	0	39	59	65	88

Tabla 26

	% de plantas totales emergidas al día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sin tratar (UTC)	0	0	0	0	0	7	28	30	48
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	0	0	0	0	0	14	40	43	60
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	0	0	0	0	0	27	41	45	61

Tabla 27

	% de aumento de plantas emergidas al día sobre el UTC								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	-	-	-	-	-	100 %	43 %	44 %	26 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	-	-	-	-	-	290 %	48 %	51 %	28 %

Como se muestra en las Tablas 25-27, las aplicaciones de 1,24 y 2,11 ml/l (4,7 y 8 ml/galón) mostraron consistentemente un mayor rendimiento que el UTC en cuanto a la emergencia de las plantas, teniendo consistentemente la aplicación de 2,11 ml/l (8 ml/galón) un rendimiento mejor que el de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón). La aplicación de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) mostró al menos un aumento del 26 % y hasta el 100 % sobre el UTC los días

comparativos, y la aplicación de 2,11 ml/l (8 ml/galón) demostró al menos un aumento del 28 % y hasta el 290 % sobre el UTC. La mayor diferencia entre las aplicaciones de 1,24 y 2,11 ml/l (4,7 y 8 ml/galón) tuvo lugar el día 6. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica es eficaz para aumentar la emergencia de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación por empapado del suelo.

Tabla 28

	Número de plantas maduradas al día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sin tratar (UTC)	-	-	0	0	0	2	22	45	65
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	-	-	0	0	0	9	42	69	83
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	-	-	0	0	0	8	46	68	79

Tabla 29

	% de plantas totales maduradas al día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sin tratar (UTC)	0	0	0	0	0	1	15	31	45
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	0	0	0	0	0	6	29	48	58
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	0	0	0	0	0	6	32	47	55

Tabla 30

	% de aumento de plantas maduradas al día sobre el UTC								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	-	-	-	-	-	350 %	91 %	53 %	28 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	-	-	-	-	-	300 %	109 %	51 %	22 %

Como se muestra en las Tablas 28-30, las aplicaciones de 1,24 y 2,11 ml/l (4,7 y 8 ml/galón) mostraron consistentemente un mayor rendimiento que el UTC en cuanto a la maduración de las plantas, teniendo la aplicación de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) un rendimiento mejor que el de 2,11 ml/l (8 ml/galón) los días 6, 8 y 9. La aplicación de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) mostró al menos un aumento del 28 % y hasta el 350 % sobre el UTC los días comparativos, y la aplicación de 2,11 ml/l (8 ml/galón) demostró al menos un aumento del 22 % y hasta el 300 % sobre el UTC. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica es eficaz para aumentar la maduración de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación por empapado del suelo.

Ejemplo 9

Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de composición a base de *Chlorella* mixotrófica a plantas de tomate reliquia (cv alemán rayado) mediante aplicación foliar afectó al crecimiento inicial y al tamaño de las plantas. Se sembraron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en bandejas con mezcla de sustrato estándar para macetas y se dejaron crecer en un invernadero de vivero. Los tratamientos de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica y un producto de referencia disponible comercialmente se compararon con un control sin tratar (UTC) y se enumeran en la Tabla 31, ensayándose tratamientos duplicados de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica. Para fines comparativos, se adquirió un producto comercial a base de extracto de macroalgas en Acadian Seaplants Limited (30 Brown Avenue, Dartmouth, Nueva Escocia, Canadá, B3B 1X8).

Tabla 31

N.º de tratamiento	Descripción del tratamiento
1	UTC - control de agua sin tratar
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras secadas en tambor (DD)
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras (terreno húmedo 1)
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras (terreno húmedo 2)
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian

La composición a base de *Chlorella* mixotrófica se pasteurizó, se normalizó al 10 % de sólidos y se estabilizó con ácido fosfórico (H_3PO_4) y sorbato de potasio ($C_6H_7KO_2$), consistiendo el resto en agua. Las células enteras de *Chlorella* mixotrófica no se sometieron previamente a un proceso de purificación para aislar las células del medio de cultivo de microalgas, ni tampoco se sometieron previamente a un proceso de secado, extracción u otro proceso que pueda lisar o alterar las paredes celulares, excepto lo indicado para el tratamiento de secado en tambor. La composición que comprende *Chlorella* mixotrófica usada en los tratamientos de este experimento no se analizaron para cuantificar las bacterias en las composiciones, sin embargo, los recuentos aerobios en placa para las composiciones anteriores preparadas con los mismos componentes de la misma manera contenían 40.000-400.000 UFC/ml. La composición de *Chlorella* mixotrófica se congeló y se descongeló previamente, y se incorporó a la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento después del almacenamiento en frío después de recogerse del sistema de

cultivo de microalgas.

Los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicaron a las plantas a una concentración de 1,05 ml/l (4 ml/galón). La concentración ensayada de 1,05 ml/l (4 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,010567 %. El tratamiento Acadian se aplicó a las plantas a una concentración de 2,5 ml/l (9,46 ml/galón). El método de tratamiento de baja concentración y baja frecuencia consistió en pulverizar directamente el follaje de las plantas a una tasa de 233,85 l/ha (25 galones/acre) usando un pulverizador. Se realizaron un total de tres aplicaciones, la primera de ellas tres semanas después de la siembra (7-10 días después de la emergencia). La segunda aplicación se realizó cinco días después de la primera, y la tercera aplicación se realizó seis días después de la segunda.

Cada tratamiento se aplicó a bandejas de siembra de 35,56 cm por 35,56 cm (14 pulgadas por 14 pulgadas) que contenían plantas resultantes de 25-30 semillas. Se realizaron ocho réplicas de cada tratamiento. Todas las semillas se plantaron en una mezcla de sustrato estándar para macetas sin tierra. Cada planta analizada se contabilizó como una réplica, considerándose ocho réplicas para cada evaluación de tratamiento. El análisis se realizó después del segundo y del tercer tratamiento. El contenido de clorofila se estimó mediante el valor SPAD (desarrollo del análisis suelo-planta), un valor numérico proporcionado por un medidor SPAD de Minolta que analiza la cantidad de luz en un espectro específico que atraviesa una hoja y convierte esa lectura en un valor numérico como indicador de la densidad de clorofila en la hoja. El experimento se realizó en un invernadero con todas las semillas y tratamientos sometidos a las mismas condiciones controladas, incluyendo temperatura e iluminación. Todas las bandejas se trataron con la misma cantidad de agua durante todo el experimento. No se proporcionaron nutrientes adicionales a las plantas durante el experimento. Todos los datos considerados significativos se obtuvieron utilizando el rango de prueba múltiple de New Duncan con un nivel de confianza del 90 %, de modo que los valores con la misma letra como identificador de significación estadística no difieran significativamente. Los resultados se muestran en las Tablas 32-37 designados con una F para aplicación foliar, junto con los identificadores de agrupación de significación estadística.

Ejemplo 10

Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de composición a base de *Chlorella* mixotrófica a plantas de tomate reliquia (cv alemán rayado) (*Solanum lycopersicum*) mediante aplicación al suelo afectó al crecimiento inicial y al tamaño de las plantas. El ensayo de aplicación al suelo tuvo lugar en la misma ubicación, con los mismos tratamientos, y con el mismo diseño que el experimento del Ejemplo 9.

Los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicaron a las plantas a una baja concentración de 1,25 ml/l (4,73 ml/galón). La concentración ensayada de 1,25 ml/l (4,73 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,012495 %. El tratamiento Acadian se aplicó a las plantas a una concentración de 2,5 ml/l (9,46 ml/galón). El método de tratamiento de baja concentración y baja frecuencia consistió en empapar el suelo a una tasa de 935,4 l/ha (100 galones/acre). Se aplicaron un total de tres tratamientos, teniendo lugar la primera aplicación dos semanas después de la siembra (7-10 días después de la emergencia). El segundo tratamiento se aplicó nueve días después del primero, y el tercer tratamiento se aplicó cinco días después del segundo. Todos los datos considerados significativos se obtuvieron utilizando el rango de prueba múltiple de New Duncan con un nivel de confianza del 90 %, de modo que los valores con la misma letra como identificador de significación estadística no difieran significativamente. Los resultados se muestran en las Tablas 32-37 designados con una S para aplicación al suelo, junto con los identificadores de agrupación de significación estadística.

Tabla 32

Dimensionamiento de plantas de tomate de vivero - Altura de las plantas (pulgadas)					
		Prom.		Aumento sobre UTC	Aumento sobre DD
1	UTC - control de agua sin tratar F	6,00	cde		
	UTC - control de agua sin tratar S	5,85	ab		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD F	6,48	ab	8 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD S	5,53	bcd	-5 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 F	5,27	fg	-12 %	-18 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 S	5,20	def	-11 %	-6 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 F	6,13	abcd	2 %	-5 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 S	5,52	bcd	-6 %	0 %

(continuación)

Dimensionamiento de plantas de tomate de vivero - Altura de las plantas (pulgadas)					
		Prom.		Aumento sobre UTC	Aumento sobre DD
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	5,94	de	-1 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	5,67	abc	-3 %	

- 5 Como se muestra en la Tabla 32, los tratamientos que comprendían composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron un aumento estadísticamente significativo o numérico sobre el UTC en cuanto a la altura de la planta. Además, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostró un aumento estadísticamente significativo o numérico sobre el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD.

Tabla 33

Dimensionamiento de plantas de tomate de vivero - Número de hojas					
		Prom.		Aumento sobre UTC	Aumento sobre DD
1	UTC - control de agua sin tratar F	5,1	a		
	UTC - control de agua sin tratar S	4,5	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD F	5,2	a	2 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD S	4,6	a	3 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 F	4,9	a	-2 %	-6 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 S	4,5	a	0 %	-2 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 F	5,3	a	4 %	2 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 S	4,4	a	-3 %	-4 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	4,9	a	-2 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	4,6	a	1 %	

- 10 Como se muestra en la Tabla 33, los tratamientos que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron una significación estadísticamente significativa sobre el UTC o el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD en cuanto al número de hojas.

Tabla 34

Contenido de clorofila en tomates de vivero (SPAD)					
		Prom.		Aumento sobre UTC	Aumento sobre DD
1	UTC - control de agua sin tratar F	25,9	f		
	UTC - control de agua sin tratar S	30,4	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD F	27,8	ef	7 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD S	29,1	a	-4 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 F	32,1	bcd	24 %	15 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 S	30,7	a	1 %	5 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 F	34,0	ab	31 %	22 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 S	32,7	a	8 %	12 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	34,5	ab	33 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	30,6	a	1 %	

- 15 Como se muestra en la Tabla 34, los tratamientos foliares que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda mostraron un aumento estadísticamente significativo sobre el UTC y el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD en cuanto al contenido de clorofila. Los tratamientos foliares también mostraron aumentos numéricos sobre el UTC del 24 % y del 31 %, así como aumentos numéricos sobre el tratamiento

con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD del 15 % y del 22 %. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces para mejorar el contenido de clorofila en las plantas al aplicarse al follaje. Los resultados también indican que secar la composición a base de *Chlorella* mixotrófica con un secador de tambor en el proceso de preparación redujo la eficacia de las composiciones para mejorar el contenido de clorofila de las plantas de tomate cuando se aplicaron en una aplicación foliar. Las aplicaciones al suelo que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron un aumento estadísticamente significativo o numérico sobre el UTC o el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* DD.

Tabla 35

Dimensionamiento de plantas de tomate de vivero - Peso de las plantas enteras (gramos)					
		Prom.		Aumento sobre UTC	Aumento sobre DD
1	UTC - control de agua sin tratar F	6,8	d		
	UTC - control de agua sin tratar S	7,1	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD F	9,2	ab	36 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD S	6,3	abc	-11 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 F	6,2	d	-8 %	-33 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 S	5,3	cdefg	-26 %	-16 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 F	10,6	ab	56 %	15 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 S	6,5	ab	-8 %	3 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	8,9	abc	31 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	4,6	efgh	-35 %	

Como se muestra en la Tabla 35, el tratamiento foliar que comprendía composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda en el terreno 2 mostró un aumento estadísticamente significativo sobre el UTC y un aumento numérico del 56 % en cuanto al peso de la planta entera. La aplicación foliar del producto de Acadian tuvo un rendimiento menor, mostrando solo un aumento del 31 % sobre el UTC. El tratamiento foliar que comprendía la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda en el terreno 2 no mostró una diferencia estadísticamente significativa sobre el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD, pero mostró un aumento numérico del 15 %. El tratamiento foliar en el terreno 1 y las aplicaciones al suelo que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron un aumento estadísticamente significativo sobre el UTC o el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces para mejorar el peso de las plantas enteras al aplicarse al follaje.

Tabla 36

Dimensionamiento de plantas de tomate de vivero - Peso de las raíces (gramos)					
		Prom.		Aumento sobre UTC	Aumento sobre DD
1	UTC - control de agua sin tratar F	2,2	bc		
	UTC - control de agua sin tratar S	2,8	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD F	3,5	a	57 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD S	2,4	ab	-11 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 F	1,9	c	-12 %	-46 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 S	2,1	bc	-24 %	-13 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 F	3,3	a	51 %	-6 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 S	1,9	cd	-30 %	-21 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	2,8	ab	28 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	1,5	ef	-47 %	

Como se muestra en la Tabla 36, la aplicación foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en el tratamiento 4 (terreno húmedo 2) dio como resultado una diferencia significativa del UTC en cuanto al peso de las raíces,

mostrando un aumento del 51 % sobre el UTC. La aplicación foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica secada en tambor también dio como resultado una diferencia significativa del UTC, con un aumento numérico del 57 %. La aplicación foliar del producto de Acadian tuvo un rendimiento menor, mostrando solo un aumento del 28 % sobre el UTC. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces para mejorar el peso de las raíces en las plantas al aplicarse al follaje.

Tabla 37

Dimensionamiento de plantas de tomate de vivero - Peso de los brotes (gramos)					
		Prom.		Aumento sobre UTC	Aumento sobre DD
1	UTC - control de agua sin tratar F	4,6	cde		
	UTC - control de agua sin tratar S	4,3	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD F	5,9	bc	29 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras DD S	3,9	abc	-10 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 F	4,3	e	-6 %	-27 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 1 S	3,2	cde	-27 %	-18 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 F	7,3	a	60 %	24 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras, terreno húmedo 2 S	4,6	a	6 %	18 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	6,1	ab	33 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	3,1	cde	-28 %	

Como se muestra en la Tabla 37, el tratamiento foliar que comprendía la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda en el tratamiento 4 (terreno húmedo 2) mostró un aumento estadísticamente significativo sobre el UTC y un aumento numérico del 60 % en cuando al peso de los brotes. El producto de Acadian tuvo un menor rendimiento, mostrando solo un aumento del 33 % sobre el UTC en la aplicación foliar, y mostrando una disminución del 28 % en comparación con el UTC en la aplicación al suelo. El tratamiento foliar que comprendía la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda en el tratamiento 4 también mostró una diferencia estadísticamente significativa sobre el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD y un aumento numérico del 24 %. Por lo tanto, los resultados indican que secar la composición a base de *Chlorella* mixotrófica con un secador de tambor en el proceso de preparación redujo la eficacia de las composiciones para mejorar el peso de los brotes de las plantas de tomate cuando se aplicaron en una aplicación foliar. La aplicación foliar en el tratamiento 3 (terreno húmedo 1) y las aplicaciones al suelo que comprendían la composición a base de *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron un aumento estadísticamente significativo sobre el UTC o el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD, sin embargo, la aplicación al suelo en el tratamiento 4 mostró un aumento del 18 % sobre el tratamiento con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica DD. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces para mejorar el peso de los brotes en las plantas al aplicarse al follaje.

Ejemplo 11

Se realizó un experimento para determinar si el método de aplicación de una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica a semillas de judías verdes (*Phaseolus vulgaris*) plantadas en el suelo afectó a la velocidad a la que las plántulas emergen del suelo y maduran. Las judías verdes pertenecen a la familia *Fabaceae*. Se plantaron semillas de judías verdes en bandejas con una mezcla de sustrato de musgo sphagnum, perlita y vermiculita (2:1:1). Se compararon tres tratamientos que comprendían una composición a base de *Chlorella* mixotrófica con un control sin tratar (UTC). Los tratamientos se pasteurizaron, se normalizaron al 10 % de sólidos y se estabilizaron con ácido fosfórico (H₃PO₄) y sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), consistiendo el resto en agua. La composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada se congeló después de recogerse del sistema de cultivo de microalgas y se descongeló antes de la formulación en la composición líquida para los tratamientos usados en el experimento. La composición a base de *Chlorella* mixotrófica fresca no se congeló previamente, y se incorporó a la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento, directamente después de recogerse del sistema de cultivo de microalgas. La composición usada en los tratamientos de este experimento no se analizaron para cuantificar las bacterias en las composiciones, sin embargo, los recuentos aerobios en placa para las composiciones anteriores preparadas con los mismos componentes de la misma manera contenían 40.000-400.000 UFC/ml.

Los tratamientos con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicaron a las semillas a través de dos métodos de tratamiento diferentes. El primer método de tratamiento comprendía remojar las semillas en la baja concentración de 12,11 ml/l (8 ml/galón) de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica durante dos horas

con aspersión de aire constante para evitar la falta de oxígeno, retirar las semillas de la composición, secar las semillas durante una noche y a continuación plantar las semillas en la mezcla de sustrato. El segundo método de tratamiento comprendía remojar las semillas en agua durante dos horas con aspersión de aire constante para evitar la falta de oxígeno, retirar las semillas del agua, secar las semillas durante una noche, plantar las semillas en la mezcla de sustrato con la baja concentración de 12,11 ml/l (8 ml/galón) de la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica en la base de la bandeja de siembra para permitir que las semillas se trataran con la composición líquida por capilaridad. La concentración ensayada de 2,11 ml/l (8 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,021134 %.

Cada uno de los tres tratamientos se aplicó a 72 semillas. Se realizaron observaciones visuales diarias del suelo y las plantas para registrar cuántas semillas habían emergido y madurado, como se explica a continuación. El estándar usado para evaluar la emergencia fue la consecución de la etapa de hipocótilo, donde un tallo sobresalía visiblemente de la mezcla de sustrato. El estándar usado para evaluar la maduración fue la consecución de la etapa de cotiledón, donde dos hojas se habían formado de manera visible en el tallo emergido. El experimento se realizó en interiores, con todas las semillas y tratamientos sujetos a las mismas condiciones controladas, incluyendo temperatura, iluminación y suministro de agua. No se suministraron otros nutrientes durante el experimento. La luz fue artificial y se proporcionó por lámparas fluorescentes las 24 horas del día. Los resultados del experimento se presentan en las Tablas 38-43.

Tabla 38

	Número de plantas emergidas al día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control sin tratar (UTC)	0	0	0	2	23	30	31	33
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	0	0	0	10	36	41	43	45
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	0	0	0	3	33	40	42	42
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	0	0	0	0	10	15	25	34

Tabla 39

	% de plantas totales emergidas al día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control sin tratar (UTC)	0	0	0	3	32	42	43	46
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	0	0	0	14	50	57	60	63
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	0	0	0	4	46	56	58	58
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	0	0	0	0	14	21	35	47

Tabla 40

	% de aumento de plantas emergidas al día sobre el UTC							
	1	2	3	4	5	6	7	8
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	-	-	-	400 %	57 %	37 %	39 %	36 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	-	-	-	50 %	43 %	33 %	35 %	27 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	-	-	-	-100 %	-57 %	-50 %	-19 %	3 %

Como se muestra en las Tablas 38-40, el tratamiento de remojo de semillas para las composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica frescas y almacenadas mostró un rendimiento consistentemente mayor que el tratamiento por capilaridad y el UTC en cuanto a la emergencia de las plantas. El tratamiento de remojo de semillas con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada mostró al menos un aumento del 27 % y hasta el 50 % sobre el UTC los días comparativos, y el tratamiento de remojo de semillas con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fresca demostró al menos un aumento del 36 % y hasta el 400 % sobre el UTC. La emergencia de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fresca superó consistentemente a la composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada en los tratamientos de remojo de semillas; la diferencia entre los dos tratamientos fue mayor el día 4 y se redujo durante la duración del experimento. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica es eficaz para aumentar la emergencia de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación de remojo de semillas.

Tabla 41

	Número de plantas maduras al día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control sin tratar (UTC)	0	0	0	0	0	13	21	27
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	0	0	0	0	0	25	32	37

(continuación)

	Número de plantas maduras al día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	0	0	0	0	0	13	30	35
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	0	0	0	0	0	1	6	15

Tabla 42

	% de plantas totales maduras al día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control sin tratar (UTC)	0	0	0	0	0	18	29	38
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	0	0	0	0	0	35	44	51
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	0	0	0	0	0	18	42	49
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	0	0	0	0	0	1	8	21

5

Tabla 43

	% de aumento de plantas maduras al día sobre el UTC							
	1	2	3	4	5	6	7	8
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca en remojo	-	-	-	-	-	92 %	52 %	37 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada en remojo	-	-	-	-	-	0 %	43 %	30 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca por capilaridad	-	-	-	-	-	-92 %	-71 %	-44 %

Como se muestra en las Tablas 41-43, el tratamiento de remojo de semillas para las composiciones a base de *Chlorella* mixotrófica frescas y almacenadas mostró un rendimiento consistentemente mayor que el tratamiento por capilaridad y el UTC en cuanto a la maduración de las plantas. El tratamiento de remojo de semillas con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada mostró al menos un aumento del 30 % y hasta el 43 % sobre el control sin tratar los días comparativos, y el tratamiento de remojo de semillas con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fresca demostró al menos un aumento del 37 % y hasta el 92 % sobre el UTC. La maduración de la composición de *Chlorella* mixotrófica fresca superó consistentemente a la composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada en los tratamientos de remojo de semillas; la diferencia entre los dos tratamientos fue mayor el día 6 y se redujo durante la duración del experimento. El tratamiento por capilaridad fue superado consistentemente por el UTC en cuanto a la maduración de las plantas. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica es eficaz para aumentar la maduración de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación de remojo de semillas.

20 Ejemplo 12

Se realizó un experimento para determinar si el método de aplicación de una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica a semillas de judías verdes (*Phaseolus vulgaris*) plantadas en el suelo afectó a la velocidad a la que las plántulas emergen del suelo y maduran. Se plantaron semillas de judías verdes en bandejas con una mezcla de sustrato de musgo sphagnum, perlita y vermiculita (2:1:1). Se compararon dos tratamientos que comprendían una composición a base de *Chlorella* mixotrófica con un control sin tratar (UTC). Los tratamientos se pasteurizaron, se normalizaron al 10 % de sólidos y se estabilizaron con ácido fosfórico (H_3PO_4) y sorbato de potasio ($C_6H_7KO_2$), consistiendo el resto en agua. La composición a base de *Chlorella* mixotrófica no se congeló previamente, y se incorporó a la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento, directamente después de recogerse del sistema de cultivo de microalgas. La composición usada en los tratamientos de este experimento no se analizó para cuantificar las bacterias en la composición, sin embargo, los recuentos aerobios en placa para las composiciones anteriores preparadas con los mismos componentes de la misma manera contenían 40.000-400.000 UFC/ml.

Los tratamientos con la composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicaron a las semillas a dos concentraciones bajas diferentes, 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) o 2,11 ml/l (8 ml/galón), usando el mismo método de tratamiento. La concentración ensayada de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,012416 %. La concentración ensayada de 2,11 ml/l (8 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,021134 %. El método de tratamiento consistió en empapar el suelo desde la parte superior con 2,84 l (0,75 galones) de la composición líquida (equivalente a una tasa de aplicación de 935,4 l/ha (100 galones/acre)) a las concentraciones identificadas después de plantar las semillas.

Cada uno de los dos tratamientos se aplicó a dos bandejas de 72 semillas. Se realizaron observaciones visuales diarias del suelo y las plantas para registrar cuántas semillas habían emergido y madurado, como se explica a continuación. El estándar usado para evaluar la emergencia fue la consecución de la etapa de hipocótilo, donde un

tallo sobresalía visiblemente de la mezcla de sustrato. El estándar usado para evaluar la maduración fue la consecución de la etapa de cotiledón, donde dos hojas se habían formado de manera visible en el tallo emergido. El experimento se realizó en interiores, con todas las semillas y tratamientos sujetos a las mismas condiciones controladas, incluyendo temperatura, iluminación y suministro de agua. No se suministraron otros nutrientes durante el experimento. La luz fue artificial y se proporcionó por lámparas fluorescentes las 24 horas del día. Los resultados del experimento se presentan en las Tablas 44-49.

Tabla 44

	Número de plantas emergidas al día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sin tratar (UTC)	-	-	9	22	32	36	42	46	47
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	-	-	11	29	51	58	62	63	64
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	-	-	13	43	77	91	104	107	110

Tabla 45

	% de plantas totales emergidas al día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sin tratar (UTC)	0	0	6	15	22	25	29	32	33
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	0	0	8	20	35	40	43	44	44
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	0	0	9	30	53	63	72	74	76

Tabla 46

	% de aumento de plantas emergidas al día sobre el UTC								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	-	-	22 %	32 %	59 %	61 %	48 %	37 %	36 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	-	-	44 %	95 %	141 %	153 %	148 %	133 %	134 %

Como se muestra en las Tablas 44-46, las aplicaciones de 1,24 y 2,11 ml/l (4,7 y 8 ml/galón) mostraron consistentemente un mayor rendimiento que el UTC en cuanto a la emergencia de las plantas, teniendo consistentemente la aplicación de 2,11 ml/l (8 ml/galón) un rendimiento mejor que el de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón). La aplicación de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) mostró al menos un aumento del 22 % y hasta el 61 % sobre el UTC los días comparativos, y la aplicación de 2,11 ml/l (8 ml/galón) demostró al menos un aumento del 44 % y hasta el 153 % sobre el UTC. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica es eficaz para aumentar la emergencia de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación por empapado del suelo.

Tabla 47

	Número de plantas maduras al día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sin tratar (UTC)	-	-	0	0	2	14	26	31	34
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	-	-	0	0	2	26	52	57	58
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	-	-	0	0	0	29	60	76	94

Tabla 48

	% de plantas totales maduras al día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sin tratar (UTC)	0	0	0	0	1	10	18	22	24
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	0	0	0	0	1	18	36	40	40
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	0	0	0	0	0	20	42	53	65

Tabla 49

	% de aumento de plantas maduras al día sobre el UTC								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 4,7 ml	-	-	-	-	0 %	86 %	100 %	84 %	71 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica, 8 ml	-	-	-	-	-100 %	107 %	131 %	145 %	176 %

Como se muestra en las Tablas 47-49, las aplicaciones de 1,24 y 2,11 ml/l (4,7 y 8 ml/galón) mostraron consistentemente un mayor rendimiento que el UTC en cuanto a la maduración de las plantas, teniendo consistentemente la aplicación de 2,11 ml/l (8 ml/galón) un rendimiento mejor que el de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón). A partir del día 6, la aplicación de 1,24 ml/l (4,7 ml/galón) mostró al menos un aumento del 71 % y hasta el 100 % sobre el UTC los días comparativos y la aplicación de 2,11 ml/l (8 ml/galón) demostró al menos un aumento del 107 % y hasta el 176 % sobre el UTC. El aumento en el rendimiento de maduración para la aplicación de 2,11 ml/l (8 ml/galón) sobre el UTC también aumentó con el tiempo. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica es eficaz para aumentar la maduración de una plántula en comparación con una semilla

no tratada cuando se aplica en una aplicación por empapado del suelo.

Con las características que comparten las plantas dentro de la familia de plantas *Fabaceae*, los resultados mostrados en los Ejemplos 11-12 probablemente son representativos de la eficacia de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica como se describe en toda la memoria descriptiva en todas las plantas de la familia de plantas *Fabaceae*, así como en plantas de otras familias.

Ejemplo 13

Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica a plantas de pimiento morrón mediante aplicación al suelo afectó al rendimiento de las plantas. El pimiento morrón (*Capsicum annuum*) pertenece a la familia de plantas *Solanaceae* y las semillas se plantaron en un campo en el condado de Ventura, California. Se compararon dos tratamientos con un control sin tratar (UTC) y se enumeran en la Tabla 50. Para fines comparativos, se adquirió un producto comercial a base de extracto de macroalgas en Acadian Seaplants Limited (30 Brown Avenue, Dartmouth, Nueva Escocia, Canadá, B3B 1X8).

Tabla 50

N.º de tratamiento	Descripción del tratamiento
1	UTC - control de agua sin tratar
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian

La composición a base de *Chlorella* mixotrófica se pasteurizó, se normalizó al 10 % de sólidos y se estabilizó con ácido fosfórico (H₃PO₄) y sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), consistiendo el resto en agua. Las células enteras de *Chlorella* mixotrófica no se sometieron previamente a un proceso de purificación para aislar las células del medio de cultivo de microalgas, ni tampoco se sometieron previamente a un proceso de secado, extracción u otro proceso que pueda lisar o alterar las paredes celulares. La composición de *Chlorella* mixotrófica se congeló y se descongeló previamente, y se incorporó a la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento después del almacenamiento en frío después de recogerse del sistema de cultivo de microalgas. La composición que comprende *Chlorella* mixotrófica usada en los tratamientos de este experimento no se analizaron para cuantificar las bacterias en las composiciones, sin embargo, los recuentos aerobios en placa para las composiciones anteriores preparadas con los mismos componentes de la misma manera contenían 40.000-400.000 UFC/ml.

La composición a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicó a una baja concentración de 10 ml/l (37,85 ml/galón). La concentración ensayada de 10 ml/l (37,85 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,099989 %. El tratamiento Acadian se aplicó a una concentración de 5 ml/l (18,9 ml/galón). Se aplicaron cinco tratamientos en total a una baja frecuencia (es decir, con un promedio de aproximadamente 20 días entre aplicaciones), comenzando tres semanas después del establecimiento de la planta. Los tratamientos se realizaron con 20 días entre el primero y el segundo, 24 días entre el segundo y el tercero, 11 días entre el tercero y el cuarto, y 26 días entre el cuarto y el quinto. Los tratamientos de baja concentración y baja frecuencia se aplicaron mediante inyección en un sistema de riego por goteo de bajo volumen que suministraba agua a una tasa de 935,4 l/ha (100 galones/acre) usando una bomba Hypro que funcionaba a 172,4 kPa (25 psi).

El experimento se diseñó como un estudio diseñado en bloques con ocho réplicas de 30 semillas cada una. Se usaron observaciones visuales para evaluar el vigor de la planta en una escala de 0-5, donde 0 corresponde a la muerte de la planta y 5 a la salud completa. La producción se evaluó según la calidad en las dos categorías de comercializable y no comercializable. Se consideró fruta no comercializable aquella con daño grave por insectos, podredumbre apical, blandura y/o quemaduras solares intensas. El campo usado en el experimento cultivaba pimientos morrones para su procesamiento y, por lo tanto, la calidad necesaria para el mercado fresco no era el aprovechamiento objetivo. Además, los pimientos morrones se dejaron en el campo un tiempo determinado para asegurar el máximo enrojecimiento antes de la cosecha para su procesamiento. El contenido de clorofila se estimó mediante un valor SPAD (desarrollo del análisis suelo-planta), un valor numérico proporcionado por un medidor SPAD de Minolta que analiza la cantidad de luz en un espectro específico que atraviesa una hoja y convierte esa lectura en un valor numérico como indicador de la densidad de clorofila en la hoja. La producción se evaluó mediante muestreo basado en la recogida de todos los frutos presentes en dos plantas y repitiendo este proceso ocho veces por tratamiento. Todos los frutos se pesaron, se contaron e indicaron como peso total en gramos por dos plantas y peso total en gramos en promedio por fruto. Todos los datos considerados significativos se obtuvieron utilizando el análisis de diferencia mínima significativa con un nivel de confianza del 90 %, de modo que los valores con la misma letra como identificador de significación estadística no difieran significativamente. Los resultados se muestran en las Tablas 51-65 para los tratamientos designados con una S para aplicación al suelo, junto con los identificadores de significación estadística adjuntos.

Ejemplo 14

Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de composición

a base de *Chlorella* mixotrófica a plantas de pimiento morrón (*Capsicum annuum*) mediante aplicación foliar afectó al rendimiento de las plantas. El ensayo foliar tuvo lugar en la misma ubicación, con los mismos tratamientos, y con el mismo diseño que el experimento del Ejemplo 13.

5 La composición a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicó a una baja concentración de 1,85 ml/l (7 ml/galón). La concentración ensayada de 1,85 ml/l (7 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,018492 %. El tratamiento Acadian se aplicó a una concentración de 5 ml/l (18,9 ml/galón). Se aplicaron cinco tratamientos en total a una baja frecuencia (es decir, con un promedio de aproximadamente 21 días entre aplicaciones), comenzando tres semanas después del establecimiento de la planta. Los tratamientos se realizaron con 20 días entre el primero y el segundo, 23 días entre el segundo y el tercero, 15 días entre el tercero y el cuarto, y 27 días entre el cuarto y el quinto. Los tratamientos de baja concentración y baja frecuencia se aplicaron directamente al follaje a una tasa de 233,85 l/ha (25 galones/acre) con un pulverizador de mochilla que funcionaba a 275,8 kPa (40 psi) a través de una boquilla Hollow Co. de tamaño D-6.

15 Todos los datos considerados significativos se obtuvieron utilizando el análisis de diferencia mínima significativa con un nivel de confianza del 90 %, de modo que los valores con la misma letra como identificador de significación estadística no difieran significativamente. Los resultados se muestran en las Tablas 51-65 para los tratamientos designados con una F para aplicación foliar, junto con identificadores de significación estadística adjuntos. Se observó que en el momento de cosechar el campo ya se habían producido muchos de los problemas de calidad no comercializable mencionados anteriormente y, por lo tanto, la relación de fruta no comercializable era mayor en este campo de lo que se podría esperar.

Tabla 51

Dimensionamiento de las plantas - Planta entera (gramos) (A = anterior, B = posterior)							
		Prom. A		Aumento sobre UTC	Prom. B		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	4,3	a		31,2	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	4,4	a		24,8		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	4,6	a	6 %	30,9	a	-1 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	4,4	a	-1 %	26,7	a	8 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	4,5	a	4 %	35,6	a	14 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	5,1	a	17 %	32,7	a	32 %

25 La Tabla 51 muestra que no hubo una significación estadística con respecto a los resultados de los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en cuanto al peso de la planta entera. La aplicación foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica tuvo un mejor rendimiento que la aplicación al suelo en la primera medición y dio como resultado un aumento del 6 % sobre el UTC, pero no mantuvo la ventaja en la segunda medición. La aplicación al suelo tuvo un mejor rendimiento en la segunda medición que la aplicación foliar y dio como resultado un aumento del 8 % sobre el UTC.

Tabla 52

Dimensionamiento de las plantas - Raíz (gramos) (A = anterior, B = posterior)							
		Prom. A		Aumento sobre UTC	Prom. B		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	0,6	a		3,4	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	0,6	a		3,0		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	0,6	a	7 %	3,3	a	-4 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	0,7	a	8 %	3,3	a	9 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	0,6	a	0 %	4,0	a	17 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	0,7	a	8 %	3,6	a	21 %

35 La Tabla 52 muestra que no hubo una significación estadística con respecto a los resultados de los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en cuanto al peso de las raíces. Las aplicaciones foliar y al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica tuvieron un mejor rendimiento que el UTC en la primera medición, con aumentos del 7 % y del 8 % sobre el UTC. La aplicación foliar no mantuvo esta ventaja en la segunda medición, pero la aplicación al suelo mantuvo la ventaja mostrando un aumento del 9 % sobre

el UTC.

Tabla 53

Dimensionamiento de las plantas - Brotes (gramos) (A = anterior, B = posterior)							
		Prom. A		Aumento sobre UTC	Prom. B		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	3,8	a		27,7	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	3,7	a		24,0		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	4,0	a	6 %	27,6	a	0 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	3,7	a	-2 %	23,5	a	-2 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	3,9	a	5 %	31,6	a	14 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	4,4	a	18 %	29,1	a	21 %

5 La Tabla 53 muestra que no hubo una significación estadística con respecto a los resultados de los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en cuanto al peso de los brotes. La aplicación foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica tuvo un mejor rendimiento que el UTC y la aplicación al suelo en la primera medición, con un aumento del 6 % sobre el UTC. La aplicación foliar no mantuvo esta ventaja en la segunda medición.

Tabla 54

Contenido promedio de clorofila en las plantas (SPAD)							
		A		B		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	64,7	-	39,7	a	52,2	
	UTC - control de agua sin tratar S		-	69,7	ab	69,7	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	71,5	-	36,4	a	54,0	3 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S		-	70,2	ab	70,2	1 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	70,6	-	35,4	a	53,0	2 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S		-	64,5	a	64,5	-7 %

10 La Tabla 54 muestra que no hubo una significación estadística con respecto a los resultados de los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en cuanto al contenido de clorofila. Las aplicaciones foliar y al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica tuvieron un rendimiento dentro del 3 % del UTC.

15

Tabla 55

Vigor promedio de las plantas (Escala visual 0-5)									
		A		B		C		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	3,4	a	4,5	a	4,0	a	4,0	
	UTC - control de agua sin tratar S	3,5	a	4,5	a			4,0	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	3,2	a	4,1	a	4,0	a	3,8	-5 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	4,0	a	4,0	a			4,0	0 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	3,2	a	4,3	a	4,0	a	3,8	-3 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	3,5	a	4,0	a			3,8	-6 %

20 La Tabla 55 muestra que no hubo una significación estadística con respecto a los resultados de los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en cuanto al vigor de las plantas, ni hubo una ventaja numérica.

Tabla 56

Peso total de plantas no comercializables por terreno (gramos)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	1895,0	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	963,8	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	1803,1	a	-5 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	179,4	b	-81 %

(continuación)

Peso total de plantas no comercializables por terreno (gramos)				
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	1580,6	a	-17 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	66,9	b	-93 %

5 La Tabla 56 muestra que la aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica tuvo una disminución estadísticamente significativa en el peso de las plantas no comercializables en comparación con el UTC, y los resultados de la aplicación foliar no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC.

Tabla 57

Rendimiento total de plantas no comercializables por terreno (número)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	10,8	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	6,0	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	9,8	a	-9 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	1,9	b	-69 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	9,1	a	-15 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	1,1	b	-81 %

10 La Tabla 57 muestra que la aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica tuvo una disminución estadísticamente significativa en el rendimiento de las plantas no comercializables en comparación con el UTC, y los resultados de la aplicación foliar no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC.

Tabla 58

Peso total de frutos no comercializables por terreno (gramos)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	178,5	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	56,2	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	182,8	a	2 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	57,6	a	2 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	173,2	a	-3 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	35,3	a	-37 %

15 La Tabla 58 muestra que las aplicaciones al suelo y foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativas en comparación con el UTC para el peso de los frutos no comercializables, pero ambas mostraron un aumento numérico del 2 % sobre el UTC. La aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica también superó al producto de Acadian, que mostró una disminución del 37 % en comparación con el UTC.

20

Tabla 59

Peso total de plantas comercializables por terreno (gramos)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	120,6	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	317,5	c	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	386,3	a	220 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	1224,4	a	286 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	502,5	a	317 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	1233,1	a	288 %

25 La Tabla 59 muestra que los resultados de la aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el peso de las plantas comercializables, y tanto la aplicación al suelo como foliar mostró grandes aumentos numéricos del 286 % y del 220 % sobre el UTC, lo que era comparable con el producto de Acadian comercialmente exitoso. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia

son eficaces no solo para mejorar el peso de las plantas, sino también para mejorar el peso de las plantas en las plantas de mayor calidad (es decir, comercializables) cuando se aplican al suelo o al follaje.

Tabla 60

Rendimiento total de plantas comercializables por terreno (número)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	0,6	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	2,3	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	2,0	a	220 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	6,8	a	200 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	2,8	a	340 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	7,1	a	217 %

5 La Tabla 60 muestra que los resultados de las aplicaciones al suelo y foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica mostraron grandes aumentos numéricos del 200 % y del 220 % sobre el UTC, lo que era comparable con el producto de Acadian comercialmente exitoso. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces no solo para mejorar el rendimiento de las plantas, sino para mejorar el rendimiento de las plantas en las plantas de mayor calidad (es decir, comercializables) cuando se aplican al suelo o al follaje.

Tabla 61

Peso total de frutos comercializables por terreno (gramos)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	73,1	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	123,7	b	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	43,8	a	-40 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	182,9	a	48 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	115,8	a	58 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	66,9	a	-46 %

15 La Tabla 61 muestra que los resultados de la aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el peso de los frutos comercializables. La aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica también mostró un aumento numérico del 48 % sobre el UTC. La aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* también superó al producto de Acadian, que mostró una disminución del 46 % en comparación con el UTC. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces no solo para mejorar el peso de los frutos, sino también para mejorar el peso de los frutos en las plantas de mayor calidad (es decir, comercializables) cuando se aplican al suelo.

Tabla 62

Peso total de plantas de producción por terreno (gramos)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	2015,6	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	656,3	c	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	2189,4	a	9 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	1403,8	a	114 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	2083,1	a	3 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	1300,0	a	98 %

25 La Tabla 62 muestra que los resultados de la aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el peso de las plantas de producción. La aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica también mostró un aumento numérico del 114 % sobre el UTC, mostrando la aplicación foliar un aumento del 9 % sobre el UTC, ambas comparables con el producto de Acadian. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces no solo para el peso total de las plantas de

producción cuando se aplican al suelo.

Tabla 63

Rendimiento total de plantas producción por terreno (número)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	11,4	a
	UTC - control de agua sin tratar S	8,3	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	11,8	a 3 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	8,6	a 5 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	11,9	a 4 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	8,3	a 0 %

- 5 La Tabla 63 muestra que los resultados de las aplicaciones al suelo y foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el rendimiento de las plantas de producción, pero sí mostraron aumentos numéricos del 5 % y del 3 % sobre el UTC.

Tabla 64

Peso promedio de frutos de producción por terreno (gramos)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	179,0	a
	UTC - control de agua sin tratar S	80,5	b
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	189,6	a 6 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	167,0	a 107 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	174,1	a -3 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	159,8	a 98 %

- 10 La Tabla 64 muestra que los resultados de la aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el peso de los frutos de producción. La aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica también mostró un aumento numérico del 117 % sobre el UTC, mostrando la aplicación foliar un aumento del 6 % sobre el UTC, ambas de las cuales fueron comparables con el producto de Acadian. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces no solo para el peso total de los frutos de producción cuando se aplican al suelo o al follaje.

Tabla 65

Utilización (% , relación de fruto comercializable con respecto a fruto total producido en peso)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	6,5	a
	UTC - control de agua sin tratar S	45,0	b
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	11,8	a 81 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	88,3	a 96 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	18,3	a 181 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	94,6	a 110 %

- 20 La Tabla 65 muestra que los resultados de la aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el porcentaje de utilización (relación de fruto comercializable con respecto al fruto total producido en peso). La aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica también mostró un aumento numérico del 96 % sobre el UTC, mostrando la aplicación foliar un aumento del 81 % sobre el UTC. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces para mejorar la calidad total del campo cuando se aplican al suelo o al follaje.

Ejemplo 15

- 30 Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de una

composición a base de *Chlorella* mixotrófica a plantas de tomate gavián (*Solanum lycopersicum*) mediante aplicación al suelo afectó al rendimiento de las plantas. Los tomates también son miembros de la familia de plantas *Solanaceae*. El ensayo de aplicación al suelo tuvo lugar en la misma ubicación, con los mismos tratamientos, y con el mismo diseño que el experimento del Ejemplo 13. Para este experimento, las plantas de tomate se cultivaron como un arbusto en el

5
10
15
La composición a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicó a una baja concentración de 10 ml/l (37,75 ml/galón). La concentración ensayada de 10 ml/l (37,85 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,099989 %. El tratamiento Acadian se aplicó a una concentración de 5 ml/l (18,9 ml/galón). Se aplicaron cinco tratamientos en total a una baja frecuencia (es decir, con un promedio de aproximadamente 23 días entre aplicaciones), comenzando tres semanas después del establecimiento de la planta. Los tratamientos se realizaron con 19 días entre el primero y el segundo, 29 días entre el segundo y el tercero, 23 días entre el tercero y el cuarto, y 21 días entre el cuarto y el quinto. Los tratamientos de baja concentración y baja frecuencia se aplicaron mediante inyección en un sistema de riego por goteo de bajo volumen a una tasa de 935,4 l/ha (100 galones/acre) usando una bomba Hypro que funcionaba a 172,4 kPa (25 psi).

20
Todos los datos considerados significativos se obtuvieron utilizando el análisis de diferencia mínima significativa con un nivel de confianza del 90 %, de modo que los valores con la misma letra como identificador de significación estadística no difieran significativamente. Los resultados se muestran en las Tablas 66-78 para los tratamientos designados con una S para aplicación al suelo, junto con identificadores de significación estadística adjuntos.

Ejemplo 16

25
30
Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de composición a base de *Chlorella* mixotrófica a plantas de tomate gavián (*Solanum lycopersicum*) mediante aplicación foliar afectó al rendimiento de las plantas. El ensayo foliar tuvo lugar en la misma ubicación, con los mismos tratamientos, y con el mismo diseño que el experimento del Ejemplo 14. Para este experimento, las plantas de tomate se cultivaron en estacas.

35
40
La composición a base de *Chlorella* mixotrófica se aplicó a una baja concentración 1,85 ml/l (7 ml/galón). La concentración ensayada de 1,85 ml/l (7 ml/galón) diluyó la composición que contenía originalmente el 10 % de sólidos en peso de células enteras de *Chlorella* mixotrófica al bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo el 0,018492 %. El tratamiento Acadian se aplicó a una concentración de 5 ml/l (18,9 ml/galón). Se aplicaron cinco tratamientos en total a una baja frecuencia (es decir, con un promedio de aproximadamente 21 días entre aplicaciones), comenzando tres semanas después del establecimiento de la planta. Los tratamientos se realizaron con 19 días entre el primero y el segundo, 21 días entre el segundo y el tercero, 23 días entre el tercero y el cuarto, y 21 días entre el cuarto y el quinto. Los tratamientos de baja concentración y baja frecuencia se aplicaron directamente al follaje a una tasa de 233,85 l/ha (25 galones/acre), con un pulverizador de mochilla que funcionaba a 275,8 kPa (40 psi) a través de una boquilla Hollow Co. de tamaño D-6.

45
Todos los datos considerados significativos se obtuvieron utilizando el análisis de diferencia mínima significativa con un nivel de confianza del 90 %, de modo que los valores con la misma letra como identificador de significación estadística no difieran significativamente. Los resultados se muestran en las Tablas 66-78 para los tratamientos designados con una F para aplicación foliar, junto con identificadores de significación estadística adjuntos.

Tabla 66

Contenido promedio de clorofila en las plantas (SPAD)						
		A		B		Prom. Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	52,7	a	48,0	a	50,4
	UTC - control de agua sin tratar S	44,6	a			44,6
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	54,6	a	45,4	a	50,0 -1 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	44,5	a			44,5 0 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	53,9	a	46,2	a	50,1 -1 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	41,8	a			41,8 -6 %

50
La Tabla 66 muestra que no hubo una significación estadística con respecto a los resultados de los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en cuanto al contenido de clorofila, ni un aumento numérico.

Tabla 67

Vigor promedio de las plantas (Escala visual 0-5)							
		A		B		Prom. Aumento sobre UTC	
1	UTC - control de agua sin tratar F	4,9	a	3,9	a	4,4	
	UTC - control de agua sin tratar S	4,2	a			4,2	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	5,0	a	3,6	a	4,3	-2 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	4,5	a			4,5	7 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	4,9	a	4,1	a	4,5	2 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	4,1	a			4,1	-2 %

5 La Tabla 67 muestra que no hubo una significación estadística con respecto a los resultados de los tratamientos con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en cuanto al vigor de las plantas, sin embargo, la aplicación al suelo mostró un aumento del 7 % sobre el UTC.

Tabla 68

Peso total de plantas no comercializables por terreno (gramos)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	205,8	a
	UTC - control de agua sin tratar S	2156,0	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	139,2	a -32 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	2279,2	a 6 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	162,5	a -21 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	997,5	b -54 %

10 La Tabla 68 muestra que la aplicación de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no tuvo una disminución estadísticamente significativa en el peso de las plantas no comercializables en comparación con el UTC, sin embargo, la aplicación foliar mostró una disminución del 32 % sobre el UTC. La aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica mostró un aumento del 6 % sobre el UTC, mientras que la aplicación al suelo del producto de Acadian comercialmente exitoso mostró una disminución del 54 %.

15

Tabla 69

Rendimiento total de plantas no comercializables por terreno (número)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	5,8	a
	UTC - control de agua sin tratar S	49,3	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	3,0	a -49 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	47,7	a -3 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	3,0	a -49 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	28,5	bc -42 %

20 La Tabla 69 muestra que la aplicación de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no tuvo una disminución estadísticamente significativa en el rendimiento de las plantas no comercializables en comparación con el UTC, sin embargo, la aplicación foliar mostró una disminución del 49 % y la aplicación al suelo mostró una disminución del 3 % con respecto al UTC, que fue menor que la disminución del 42 % de la aplicación al suelo del producto de Acadian.

Tabla 70

Peso total de frutos no comercializables por terreno (gramos)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	29,6	a
	UTC - control de agua sin tratar S	45,8	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	27,5	a -7 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	47,4	a 3 %

(continuación)

Peso total de frutos no comercializables por terreno (gramos)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	35,5	a	20 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	34,8	a	-24 %

5 La Tabla 70 muestra que las aplicaciones al suelo y foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativas en comparación con el UTC para el peso de los frutos no comercializables, pero la aplicación al suelo mostró un aumento del 3 %, mientras que el producto de Acadian mostró una disminución del 24 %, y la aplicación foliar mostró una disminución del 7 % con respecto al UTC.

Tabla 71

Peso total de plantas comercializables por terreno (gramos)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	8702,5	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	7616,7	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	8317,5	a	-4 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	8160,8	a	7 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	7731,7	a	-11 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	7828,3	a	3 %

10 La Tabla 71 muestra que los resultados de la aplicación de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el peso de las plantas comercializables, sin embargo, la aplicación al suelo mostró un aumento del 7 % sobre el UTC.

Tabla 72

Rendimiento total de plantas comercializables por terreno (número)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	120,8	a	
	UTC - control de agua sin tratar S	103,5	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	103,0	a	-15 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	115,3	a	11 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	107,7	a	-11 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	118,0	a	14 %

15 La Tabla 72 muestra que los resultados de las aplicaciones al suelo y foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el rendimiento de las plantas comercializables, sin embargo, la aplicación al suelo mostró un aumento del 11 % sobre el UTC.

20

Tabla 73

Peso total de frutos comercializables por terreno (gramos)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	72,2	b	
	UTC - control de agua sin tratar S	74,5	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	80,5	a	11 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	70,1	a	-6 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	72,0	b	0 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	65,7	a	-12 %

La Tabla 73 muestra que los resultados de la aplicación foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC y el producto de Acadian para el peso de los frutos comercializables, y dieron como resultado un aumento del 11 % sobre el UTC. Estos resultados muestran que

pequeñas cantidades de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces no solo para mejorar el peso de los frutos, sino para mejorar el peso de los frutos en las plantas de mayor calidad (es decir, comercializables) al aplicarse al follaje.

5 **Tabla 74**

Peso total de plantas de producción por terreno (gramos)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	8908,3	a
	UTC - control de agua sin tratar S	9272,7	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	8456,7	a -5 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	10440,0	a 13 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	7894,2	a -11 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	8825,8	a -5 %

La Tabla 74 muestra que los resultados de la aplicación al suelo de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el peso de las plantas de producción, sin embargo, la aplicación al suelo dio como resultado un aumento numérico del 13 % sobre el UTC mientras que el producto de Acadian mostró una disminución del 5 %.

10

Tabla 75

Rendimiento total de plantas producción por terreno (número)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	126,7	a
	UTC - control de agua sin tratar S	152,8	ab
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	110,2	a -13 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	163,0	a 7 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	110,7	a -13 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	146,5	abc -4 %

La Tabla 75 muestra que los resultados de las aplicaciones al suelo y foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el rendimiento de las plantas de producción, pero la aplicación al suelo mostró un aumento del 7 % sobre el UTC, mostrando el producto de Acadian una disminución del 4 %.

15

Tabla 76

Peso promedio de frutos de producción por terreno (gramos)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	70,7	a
	UTC - control de agua sin tratar S	64,8	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	76,7	a 9 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	63,1	a -3 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	71,6	a 1 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	59,4	a -8 %

20

La Tabla 76 muestra que los resultados de la aplicación foliar de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el peso de los frutos de producción, sin embargo, la aplicación foliar mostró un aumento numérico del 9 % sobre el UTC.

25

Tabla 77

Utilización (% , la relación de fruto comercializable con respecto al fruto total producido en peso)			
		Prom.	Aumento sobre UTC
1	UTC - control de agua sin tratar F	97,5	a
	UTC - control de agua sin tratar S	76,8	c

(continuación)

Utilización (% , la relación de fruto comercializable con respecto al fruto total producido en peso)				
		Prom.		Aumento sobre UTC
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras F	98,3	a	1 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células enteras S	77,2	c	0 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian F	98,0	a	1 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas Acadian S	88,7	a	15 %

La Tabla 77 muestra que los resultados de la aplicación de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el porcentaje de utilización (relación de fruto comercializable con respecto al fruto total producido en peso).

5

Con las características que comparten las plantas dentro de la familia de plantas *Solanaceae*, los resultados mostrados en los Ejemplos 6-10 y 13-16, probablemente son representativos de la eficacia de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica como se describe en toda la memoria descriptiva en todas las plantas de la familia de plantas *Solanaceae*, así como en plantas de otras familias.

10

Ejemplo 17

Se realizó un experimento para determinar los efectos de diferentes tasas de aplicación de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración (designada "PT" o "PhycoTerra" en diversas leyendas de las figuras a lo largo de la presente divulgación) en las plantas. En condiciones hidropónicas, la composición se aplicó entre 0,79 ml/l-39,63 ml/l (3 ml/galón-150 ml/galón). También se ensayó probó una composición simulada que contenía solo nutrientes. La composición simulada contenía únicamente componentes no biológicos. Todos los tratamientos incluyeron fertilizante. El control fue un tratamiento solo con fertilizante (Veg solo). El experimento demostró que la composición tiene efectos biológicos en las plantas a bajas concentraciones. Los resultados del experimento se muestran en la figura 4.

15

20

Ejemplo 18

Se realizaron experimentos para determinar si la aplicación de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración a plantas que estaban bajo estrés salino en el momento de la siembra afectó al rendimiento de las plantas. Los resultados de dichos experimentos se muestran en las figuras 5A-5F. En un experimento, se remojaron judías trepadoras en agua potable o 18 ml/galón de la composición a base de microalgas durante cuatro horas. Las semillas se plantaron en coco (un medio inerte de fibra de coco) y se cultivaron en una plataforma hidropónica. Las semillas se plantaron (sin lavar) de forma aleatoria y se trataron con sal 80 mMol el primer día. Para evaluar la importancia de la escorrentía (RO), la mitad de cada tipo de remojo de semillas se regó con 57 ml de agua de OI (saturación completa) o 171 ml de una solución de sal 80 mMol (escorrentía abundante). Algunas celdas contenían solo coco y se cosecharon para observar el perfil de salinidad del coco con y sin escorrentía. Los efectos de los tratamientos se evaluaron midiendo el peso seco, la circunferencia y el rendimiento fotosintético (Y_{ii}) (figura 5A). También se evaluaron el peso fresco total (figura 5B) y el peso de los brotes (figura 5C). Los resultados también muestran que las semillas remojadas en la composición a base de *Chlorella* mixotrófica antes de la siembra tenían un aumento del 40 % en la tasa de germinación (figura 5D). Además, las semillas remojadas en la composición a base de *Chlorella* mixotrófica germinaron antes que las semillas remojadas en agua potable, y las semillas regadas con agua de OI hasta su saturación completa tuvieron una disminución en la germinación en comparación con las semillas regadas con una solución de sal 80 mMol con abundante escorrentía (figura 5E).

25

30

35

40

Ejemplo 19

Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración (PT) a plantas que estaban bajo estrés por sequía en el momento de la siembra afectó al rendimiento de las plantas. Las condiciones fueron: (1) controles: calor exterior pero saturado, (2) sin agua + calor exterior, y (3) sin agua + calor exterior + 1 hora de sol. Los resultados del experimento muestran que las plantas tratadas con PT no mostraron efectos perjudiciales al exponerse a la sequía y al sol, mientras que las plantas sin tratamiento con PT sí reaccionaron a la sequía y al sol.

45

50

Ejemplo 20

Se realizaron experimentos para determinar si una aplicación de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración (denominada "PhycoTerra" o "PT" en las leyendas de las figuras) a césped afectó al rendimiento de las plantas. En los experimentos, la composición se aplicó al césped en 6 concentraciones diferentes con urea. Las concentraciones variaron de 0,3-15 l/acre, y el césped se trató a intervalos de 14 o 21 días. Estos tratamientos se

55

compararon con muestras de césped tratadas (1) sin tratamiento (UTC), (2) con Acadian (una composición de extracto de algas) y (2) urea solo. Los resultados del experimento se muestran en la figura 6. Se demostró que el peso de los brotes respondió significativamente al tratamiento: A una tasa de aplicación de 15 l/acre con un intervalo de 14 días, se encontró que el peso de los brotes era <30 % mayor que el del control sin tratar (UTC) y todas las tasas de aplicación dieron como resultado un peso de los brotes significativamente mayor que el logrado con la aplicación de Acadian con un intervalo de aplicación de 21 días.

Ejemplo 21

Se realizaron experimentos para determinar si la aplicación de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración (PT) a cacahuets afectó al rendimiento de las plantas. En los experimentos, la composición se aplicó en 5 concentraciones diferentes. Estos tratamientos se compararon con plantas sin tratar (UTC) y con plantas tratadas con Acadian (una composición de extracto de algas). En los experimentos, se ensayó el suelo alrededor de las plantas para determinar el pH y el ácido húmico. Como se sabe en la técnica, un intervalo de pH del suelo de 5,5-6,5 es ideal para el cultivo de cacahuete. El ácido húmico es un indicador de descomposición en el suelo. Los experimentos muestran que el peso del terreno aumentó significativamente con la PT administrada a 20 ml/l-79,25 ml/l (75,7 ml/galón-300 ml/galón) y que el peso de las semillas también aumentó significativamente con la PT administrada a 79,25 ml/l (300 ml/galón). Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 78 y la figura 7.

Tabla 78

Nivel		media de min. cuad.
PT (150ml/gal)	A	8743,0288
PT (75,7ml/gal)	A	8555,8791
PT (300ml/gal)	A	8181,6657
Acadian (18,9 ml/gal)	A B	7739,4135
PT (37,8ml/gal)	A B	7636,0155
PT (18,9ml/gal)	A B	7268,8118
UTC	B	6367,2977
Nivel		media de min. cuad.
PT (300ml/gal)	A	1259,7500
Acadian (18,9 ml/gal)	A B	1167,2500
PT (150ml/gal)	A B	1127,0000
PT (75,7ml/gal)	A B	1112,2500
PT (37,8ml/gal)	A B	1096,5000
PT (18,9ml/gal)	A B	1028,5000
UTC	B	916,2500

Ejemplo 22

Se realizaron experimentos para determinar si una aplicación de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración a plantas de albahaca afectó al rendimiento de las plantas. En los experimentos, la composición se aplicó después/además de la aplicación de un fertilizante hidropónico comercial. Este tratamiento se comparó con el fertilizante solo como control. En estos experimentos, las plantas expuestas al tratamiento y otras plantas expuestas al control se compararon basándose en las mediciones del diámetro del tallo y el peso fresco de las plantas. Aunque el diámetro del tallo no mostró diferencias significativas entre el tratamiento y el control, la medida del peso fresco sí demostró que la composición tiene un efecto positivo en el crecimiento de las plantas, en comparación con el fertilizante solo.

Ejemplo 23 - Fabaceae (Leguminosae)

Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Fabaceae* (*Leguminosae*). La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al

menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 24 - Poaceae

5 Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Poaceae*. La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 25 - Rosaceae

25 Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Rosaceae*. La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 26 - Vitaceae

45 Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Vitaceae*. La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 27 - Brassicaceae (Cruciferae)

60 Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Brassicaceae (Cruciferae)*. La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las

hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 28 - *Caricaceae*

Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Caricaceae*. La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 29 - *Malvaceae*

Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Malvaceae*. La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 30 - *Sapindaceae*

Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Sapindaceae*. La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la

composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 31 - *Anacardiaceae*

5 Se realizan experimentos para ensayar los efectos de la aplicación de una composición a base de microalgas a cultivos de la familia *Anacardiaceae*. La aplicación se realiza como en otros ejemplos del presente documento, de modo que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se remojan en la composición; (b) la composición se aplica al suelo antes de la germinación; (c) la composición se aplica al suelo después de la germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante la temporada de cultivo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante la temporada de cultivo. Los resultados son medidas de las características apropiadas de las plantas, incluyendo: germinación de las semillas, el tiempo de germinación de las semillas, la emergencia de las plántulas, el tiempo de emergencia de las plántulas, el tamaño de las plántulas, el peso fresco de la planta, el peso seco de la planta, la utilización, la producción de frutos, la producción de hojas, la formación de hojas, la altura del mantillo, la salud de la planta, la resistencia de la planta al estrés salino, la resistencia de la planta al estrés térmico, la resistencia de la planta al estrés por metales pesados, la resistencia de la planta a la sequía, el tiempo de maduración, el rendimiento, la longitud de la raíz, la masa radicular, el color, el daño por insectos, la podredumbre apical, la blandura, la calidad del fruto y las quemaduras solares. Los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 10 % en al menos una característica, en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran una mejora cuantitativa de al menos un 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 32

25 Se realizaron experimentos para ensayar variaciones en la población bacteriana entre diferentes lotes de una composición a base de *Chlorella* mixotrófica de baja concentración (PT Brown, PT Field, PT Fresh, PT Hydro, PT New y PT Texas). En todos los lotes, los taxones dominantes incluían *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Brevibacillus*. Se sabe que *Paenibacillus* y *Bacillus* secretan una gran cantidad de compuestos beneficiosos en la rizosfera de las plantas (fitohormonas, compuestos nitrogenados, antibióticos). También se sabe que mitigan patógenos. *Lactobacillus* es una bacteria fermentativa productora de ácido láctico que se usa en la práctica agrícola del ensilado. *Brevibacillus* es menos conocida como un género común promotor del crecimiento vegetal; sin embargo, existe bibliografía que demuestra su capacidad para lixiviar metales pesados de la rizosfera. Si bien existió cierta variabilidad cuantitativa de cada población bacteriana entre lotes, estos cuatro taxones bacterianos esporulantes fueron predominantes. Se cree que el tratamiento de pasteurización de la composición suprimió de forma diferencial otros taxones no esporulantes, que se encontraron presentes, pero en cantidades significativamente menores.

Ejemplo 33

40 Se realizaron experimentos para evaluar la estabilidad de las variaciones en lotes de una composición a base de microalgas *Chlorella* a diferentes temperaturas de almacenamiento. Las muestras se ensayaron mensualmente a diversas temperaturas (2-5 °C, 35 °C o 40 °C) durante seis meses. Se determinaron los recuentos bacterianos, así como los niveles totales de nitrógeno, fósforo y potasio. Los resultados de los experimentos demostraron que, en diferentes condiciones, los recuentos bacterianos variaban, pero los niveles de nutrientes se mantenían prácticamente estables.

Ejemplo 34

50 Se realizaron experimentos para ensayar diferentes métodos de preparación de una composición a base de microalgas *Chlorella* (PT). La *Chlorella* es susceptible a heterotrofismo (consumir una fuente externa de carbono), fototrofismo (fotosíntesis para convertir el CO₂ en una fuente de carbono útil) y también mixotrofismo (recibir simultáneamente nutrición/carbono mediante la fotosíntesis y también consumir fuentes externas de carbono disponibles). Las composiciones de *Chlorella* puramente heterotrófica, cultivada con dos fuentes de carbono diferentes (ácido acético o glucosa), se compararon con *Chlorella* fototrófica y con *Chlorella* mixotrófica, también cultivadas en dos lotes, cada uno con ácido acético o glucosa como fuente de carbono. Los resultados de los experimentos se muestran en la figura 8. Los cultivos mixotróficos crecieron más rápido, pero también mostraron mejores resultados al aplicarse a las plantas en comparación con otros cultivos.

Ejemplo 35

60 En un ejemplo no limitante de cultivo mixotrófico de *Chlorella* para el método descrito de preparación de una composición para su aplicación en plantas, la *Chlorella* se cultiva en un medio de cultivo BG-11 o en un medio procedente del medio de cultivo BG-11 (por ejemplo, en el que se añaden uno o más componentes adicionales al medio y/o uno o más elementos del medio aumentan en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 33 %, 50 % o más con respecto al medio BG-11 sin modificar) durante un período de cultivo de 7-14 días en un recipiente de cultivo abierto. La temperatura puede variar entre 20-30 °C, o más, y el pH varía entre 6,5-8,5. La concentración de oxígeno disuelto puede variar entre 0,1-4 mg/l. El cultivo recibe ácido acético o acetato como fuente de carbono orgánico, que aporta

carbono como fuente de energía a las células de *Chlorella*, y que también regula el pH, y se suministra al cultivo en una alimentación con una concentración en el intervalo del 10-90 % mediante un sistema de auxostato de pH. El cultivo recibe luz solar natural (que comprende radiación fotosintéticamente activa) como fuente de energía. La mezcla se realiza mediante la aspersión de aire a través de un aerotubo y la propulsión del fluido mediante propulsores sumergidos en el cultivo líquido. Las fuentes alternativas de carbono orgánico pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de: linoleato de amonio, arabinosa, arginina, ácido aspártico, ácido butírico, celulosa, ácido cítrico, etanol, fructosa, ácidos grasos, galactosa, glucosa, glicerol, glicina, ácido láctico, lactosa, ácido maleico, maltosa, manosa, metanol, melaza, peptona, hidrolizado vegetal, prolina, ácido propiónico, ribosa, sacarosa, hidrolizados parciales o completos de almidón, sacarosa, ácido tartárico, ácidos orgánicos del ciclo del TCA, vinaza fina, urea, soluciones de residuos industriales, extracto de levadura, cualquier combinación de los anteriores, u otras fuentes de carbono orgánico.

Ejemplo 36

En una realización alternativa a la realización descrita en el Ejemplo 40, se pueden usar aireadores como alternativa a los burbujeadores y propulsores sumergidos para proporcionar tanto la infusión de gases (por ejemplo, oxígeno) en el cultivo acuoso de microalgas como la mezcla turbulenta del cultivo de microalgas. Un ejemplo no limitante de aireador para su uso como alternativa a la combinación de burbujeadores y propulsores sumergidos es el aspirador aireador Aire-O2® Serie 275 (Aeration Industries International, Chaska, MN EE. UU.). Dichos aireadores incluyen un motor eléctrico accionado por encima de la superficie del medio de cultivo, montado sobre un flotador, un eje hueco que se extiende en ángulo desde la superficie del medio de cultivo hacia el cultivo, y una hélice dispuesta en el extremo del eje, que se sumerge en el medio de cultivo. El motor está acoplado al eje y a la hélice, los cuales acciona. La hélice impulsa el medio de cultivo acuoso más allá de un difusor en el extremo del eje para inducir un diferencial de presión en el eje hueco, aspirando aire a través de orificios de entrada en el eje por encima de la superficie del medio de cultivo hacia abajo a través del eje hueco giratorio y el difusor hacia el cultivo de microalgas. Si bien los aireadores contribuyen a la mezcla turbulenta y a la infusión de oxígeno, los dispositivos y métodos descritos previamente para el suministro de nutrientes, el suministro de carbono orgánico y el control del pH se pueden usar junto con dichos aireadores.

Ejemplo 37

En un ejemplo no limitante para preparar la composición líquida con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica para su aplicación en plantas, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica recogida del sistema de cultivo se mantiene primero en un tanque de cosecha antes de centrifugar el cultivo. Una vez centrifugado el cultivo de *Chlorella* mixotrófica, la centrifuga descarga la fracción rica en sólidos de células enteras de *Chlorella* mixotrófica, que también contiene los componentes adjuntos del medio de cultivo, en un recipiente a una temperatura de aproximadamente 30 °C. La composición a base de *Chlorella* mixotrófica puede continuar (es decir, fresca) en el proceso de preparación de la composición líquida o almacenarse en un congelador y descongelarse posteriormente (es decir, almacenarse) para su procesamiento en la composición líquida. Cuando la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se almacena en un congelador, la temperatura de almacenamiento es de aproximadamente -10 °C y se requieren aproximadamente 1-2 días en congelarse. Una vez retirada del congelador, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica almacenada se coloca al aire libre para su descongelación durante aproximadamente 7 días. A continuación, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica, fresca o almacenada, se coloca en un tanque y se calienta a una temperatura de aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 2 horas para iniciar el proceso de pasteurización. A continuación, la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se diluye hasta una concentración de sólidos de células enteras de aproximadamente el 10-11 % en peso y se enfría a aproximadamente 40 °C para completar el proceso de pasteurización. A continuación, el pH de la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se ajusta a un pH de aproximadamente 4 mediante la mezcla en una cantidad eficaz de ácido fosfórico para su estabilización. A continuación, se mezcla aproximadamente un 0,3 % de sorbato de potasio con la composición a base de *Chlorella* mixotrófica para su estabilización. A continuación, la composición líquida resultante se transfiere a recipientes del tamaño deseado, que se almacenan a 3-5 °C hasta su envío.

Ejemplo 38

Mediante QPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para analizar la población bacteriana en un cultivo de *Chlorella* mixotrófica antes y después de la pasteurización, se observó que el perfil de bacterias en el cultivo cambia después de la pasteurización. Particularmente, el perfil de bacterias postpasteurización incluye una mayor proporción de bacterias formadoras de esporas incluye, pero sin limitación, *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Brevibacillus* sp como los tipos de bacterias dominantes. Comparando los recuentos aerobios en placa de un cultivo de *Chlorella* mixotrófica antes y después de la pasteurización, también se observó que el número total de bacterias en el cultivo es menor después de la pasteurización. Las combinaciones de temperatura y tiempo para el proceso de pasteurización para los tiempos de 15, 30, 60, 120, 180 y 360 minutos, y a 50, 6-0, 70, 80 y 90 °C se ensayaron con un cultivo de *Chlorella* mixotrófica, y el recuento aerobio en placa resultante varió de 7,58 x 10⁶ UFC a tal solo 1,74 x 10³ UFC. También se demostró que la temperatura de almacenamiento varía el perfil de bacterias de un cultivo pasteurizado de *Chlorella* mixotrófica, variando las muestras almacenadas a temperaturas de 2-4 °C, 25 °C y 40 °C con el tiempo en el recuento aerobio en placa y el tipo de especie bacteriana dominante.

Si bien las células de *Chlorella* mixotrófica se encuentran intactas y son viables (es decir, físicamente aptas para vivir,

capaces de tener mayor crecimiento o división celular) tras ser recogidas del cultivo, se confirmó que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización tenían paredes celulares intactas, pero no eran viables. Las células de *Chlorella* mixotrófica resultantes del proceso de pasteurización se observaron al microscopio para determinar el estado de sus paredes celulares tras someterse al calentamiento y enfriamiento del proceso y se confirmó visualmente que las paredes celulares de *Chlorella* estaban intactas y sin roturas. Para una investigación más profunda del estado celular, un cultivo de células vivas de *Chlorella* mixotrófica y las células de *Chlorella* mixotrófica resultantes del proceso de pasteurización se sometieron a yoduro de propidio, un colorante fluorescente de exclusión que marca el ADN si la membrana celular está dañada, y se compararon visualmente al microscopio. La comparación con yoduro de propidio mostró que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización contenían una alta cantidad de ADN teñido, lo que permitió concluir que las paredes celulares de *Chlorella* mixotrófica estaban intactas, pero las membranas celulares estaban dañadas. Por lo tanto, la permeabilidad de las células de *Chlorella* pasteurizadas difiere de la permeabilidad de una célula de *Chlorella* con pared y membrana celulares intactas.

Además, un cultivo de células vivas de *Chlorella* mixotróficas y las células de *Chlorella* mixotróficas resultantes del proceso de pasteurización se sometieron al colorante fluorescente de unión DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)-ADN y se compararon visualmente al microscopio. La comparación del colorante de unión DAPI-ADN mostró que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización contenían una cantidad muy reducida de ADN viable en las células, lo que llevó a la conclusión de que las células de *Chlorella* mixotrófica no son viables después de la pasteurización. Las dos comparaciones de teñido del ADN demuestran que el proceso de pasteurización ha transformado la estructura y función de las células de *Chlorella* desde su estado natural al cambiar: las células de viables a no viables, la condición de la membrana celular y la permeabilidad de las células.

El uso de los términos "un", "una" y "el/la/los/las" y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención debe interpretarse que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente.

Salvo que se indique lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de los valores aproximados correspondientes (por ejemplo, todos los valores exactos de ejemplo proporcionados con respecto a un factor o medición en particular pueden considerarse también como una medición aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", cuando corresponda). Todos los intervalos de valores proporcionados pretenden incluir los puntos extremos de los intervalos, así como los valores entre los puntos extremos.

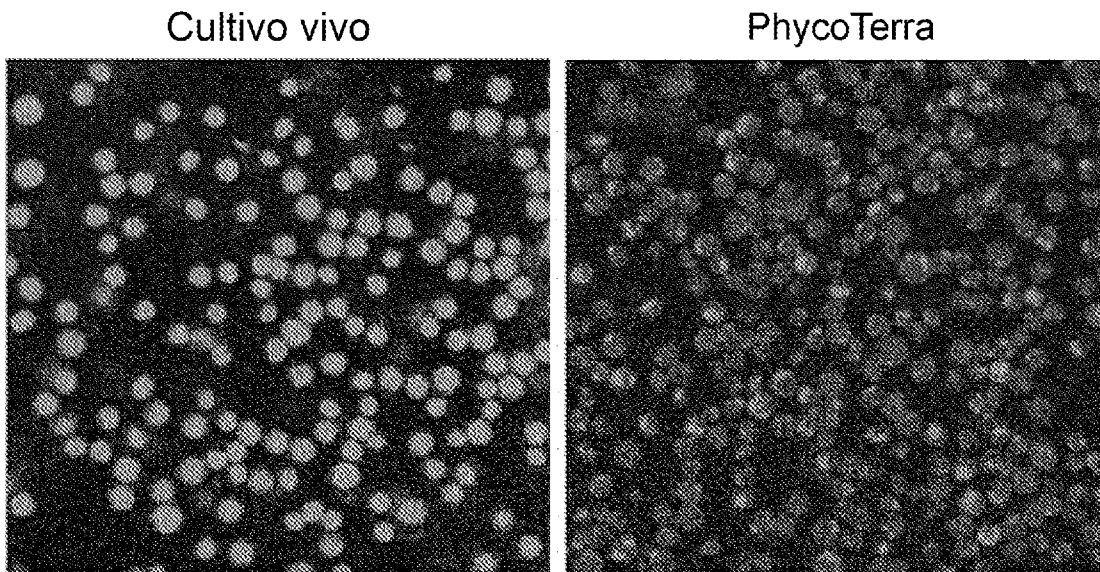
La descripción en el presente documento de cualquier aspecto o realización de la invención, usando expresiones tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene", con referencia a un elemento o elementos, tiene como objetivo respaldar un aspecto o realización similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos en particular, a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente (por ejemplo, una composición descrita en el presente documento como que comprende un elemento en particular debe entenderse como que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente).

Todos los títulos y subtítulos se usan en el presente documento solo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ningún modo.

El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, tiene como único fin ilustrar mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva ha de interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención. La invención se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas.

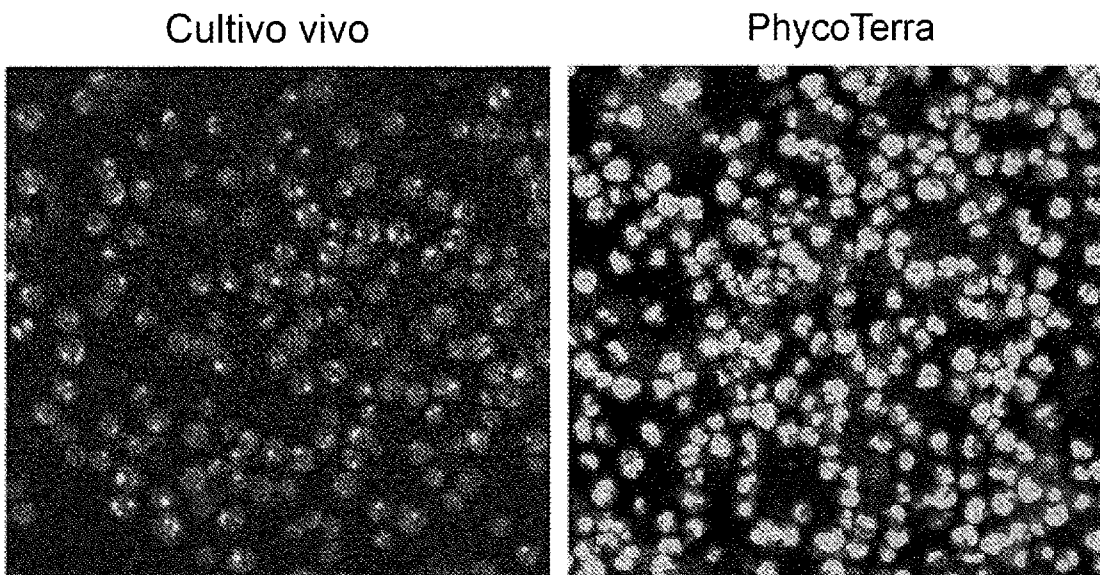
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición líquida a base de *Chlorella* mixotrófica para su aplicación en plantas que comprende:
 - 5 calentar una composición que comprende células enteras de *Chlorella* en un medio líquido; y
enfriar la composición calentada,
en donde las etapas de calentamiento y enfriamiento pasteurizan la composición, en donde las células enteras de *Chlorella* no se someten a un proceso de secado.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la composición se calienta durante un período de tiempo en el intervalo de 15-360 minutos.
- 15 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la concentración de la composición está en el intervalo del 5-20 % de células enteras de *Chlorella* en peso.
- 15 4. El método de una cualquiera de la reivindicación 1 a 3, que comprende además ajustar a un pH en el intervalo de 3-5, en donde el ajuste del pH comprende poner en contacto la composición con medios estabilizantes que comprenden un ácido.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en donde el ácido comprende ácido fosfórico (H₃PO₄).
- 25 6. El método de una cualquiera de la reivindicación 1 a 5, que comprende además poner en contacto la composición pasteurizada con un inhibidor de levaduras y mohos, en donde el inhibidor de levaduras y mohos comprende uno o más de sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), ácido ascórbico y benzoato de sodio.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en donde el inhibidor de levaduras y mohos comprende sorbato de potasio al 0,01-0,5 %.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, en donde, antes de calentar la composición, las células enteras de *Chlorella* se cultivan usando una fuente de carbono orgánico y radiación fotosintéticamente activa como fuentes de energía, en donde la fuente de carbono orgánico es ácido acético, acetato, linoleato de amonio, arabinosa, arginina, ácido aspártico, ácido butírico, celulosa, ácido cítrico, etanol, fructosa, ácidos grasos, galactosa, glucosa, glicerol, glicina, ácido láctico, lactosa, ácido maleico, maltosa, manosa, metanol, melaza, peptona, hidrolizado vegetal, prolina, ácido propiónico, ribosa, sacarosa, hidrolizados parciales o completos de almidón, sacarosa, ácido tartárico, ácidos orgánicos del ciclo del TCA, vinaza fina, urea, soluciones de residuos industriales, extracto de levadura o cualquier combinación de los mismos.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en donde, después de la etapa de cultivo y antes de la etapa de calentamiento, el método comprende además concentrar el cultivo de *Chlorella* mixotrófica mediante sedimentación, centrifugación, filtración o electrodeshidratación.
- 40 10. El método de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la composición a base de *Chlorella* mixotrófica se complementa con nitrógeno, fósforo o potasio para aumentar los niveles de los mismos en la composición hasta al menos el 1 % de la composición total.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en donde el nitrógeno, el fósforo o el potasio complementados no son captados, quelados ni absorbidos por la *Chlorella*.
- 50 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde la composición a base de *Chlorella* mixotrófica comprende ácido abscísico, citoquininas, auxinas y giberelinas.
- 50 13. El método de la reivindicación 12, en donde:
 - la composición a base de *Chlorella* mixotrófica comprende citoquininas en un intervalo de 60-300 ng/g de peso seco; y/o
 - 55 la composición a base de *Chlorella* mixotrófica comprende auxinas en un intervalo de 400-815 ng/g de peso seco; y/o
 - la composición a base de *Chlorella* mixotrófica comprende giberelinas en un intervalo de 0,1-15 ng/g de peso seco.
- 60 14. El método de la reivindicación 9, que comprende además ajustar la concentración de las células enteras de *Chlorella* en la composición a una concentración en el intervalo del 5-30 % de células enteras de *Chlorella* en peso después de la etapa de calentamiento.
- 65 15. El método de la reivindicación 1, en donde la composición se calienta a una temperatura en el intervalo de 50-90 °C.



Colorante de unión DAPI-ADN

FIG. 1



El yoduro de propidio es un colorante de exclusión - Marca el ADN si la membrana celular se ve comprometida

FIG. 2

		Temperatura (°C)				
		50	60	70	80	90
Tiempo (min)	15	94700	253000	703000	240000	14100
	30	117000	213000	273000	240000	4830
	60	72700	159000	3030000	123000	6740
	120	367000	124000	168000	157000	6240
	180	156000	7580000	202000	43000	7470
	360	1030000	703000	257000	13500	1740

FIG. 3

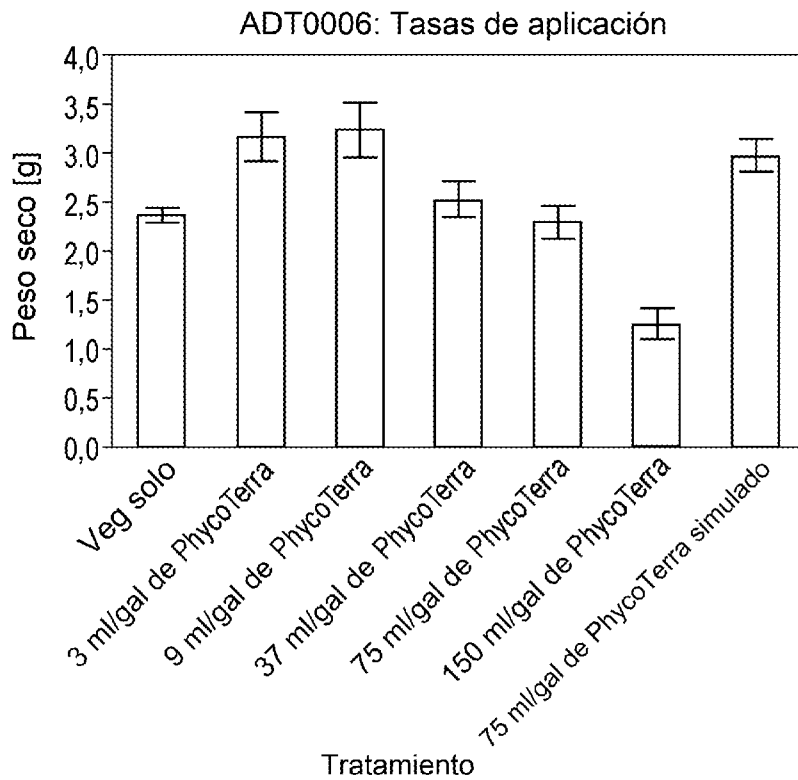


FIG. 4

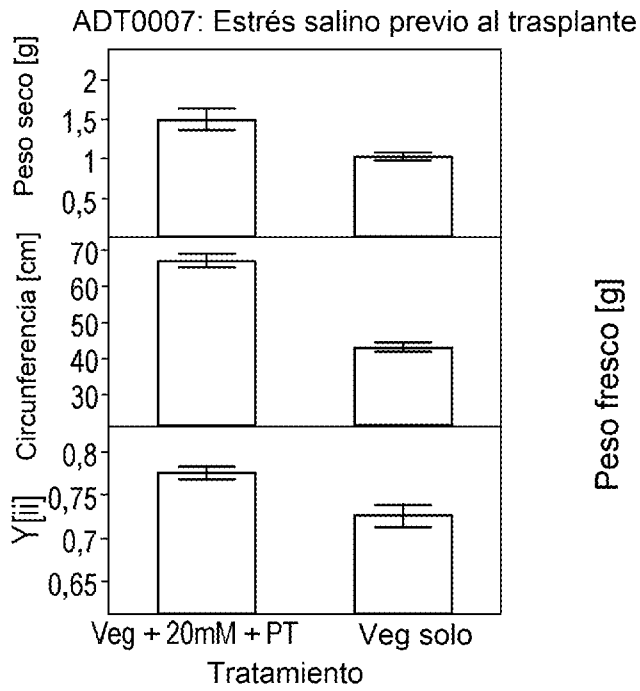


FIG. 5A

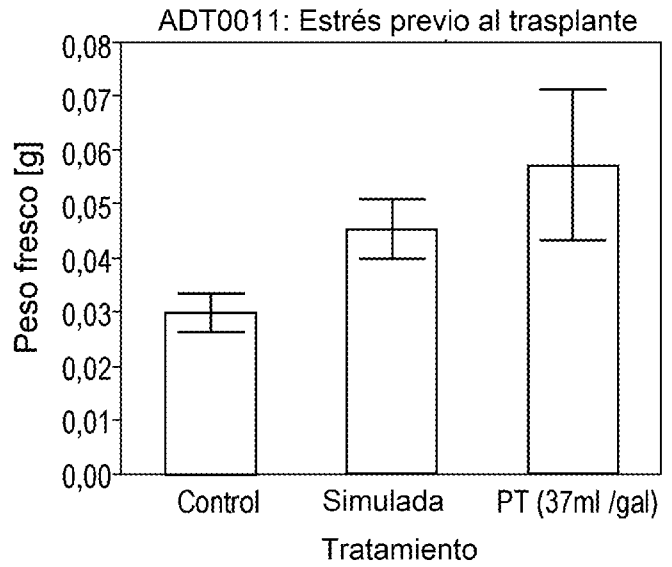


FIG. 5B

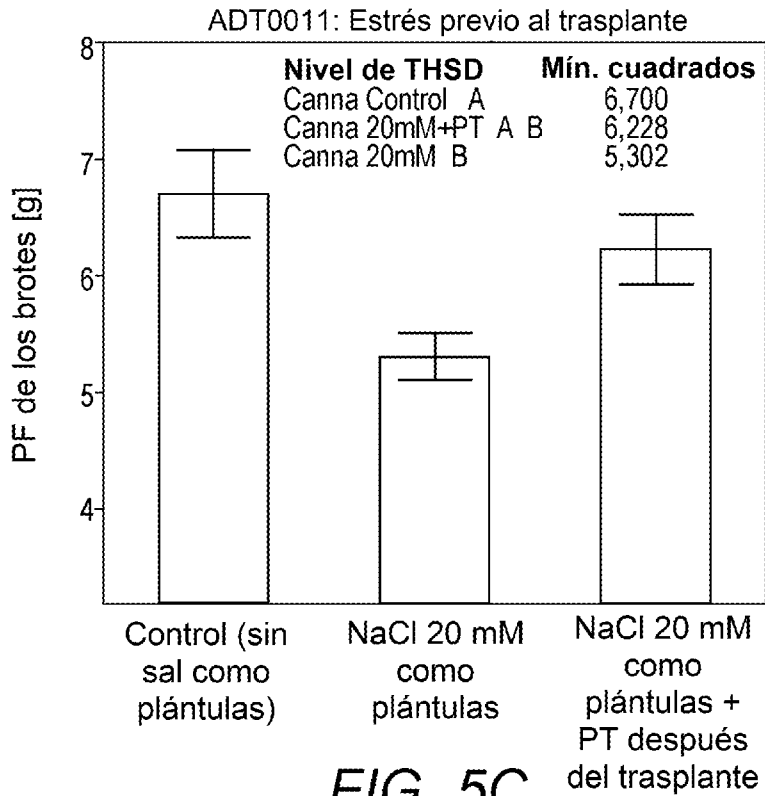


FIG. 5C

FIG. 5D

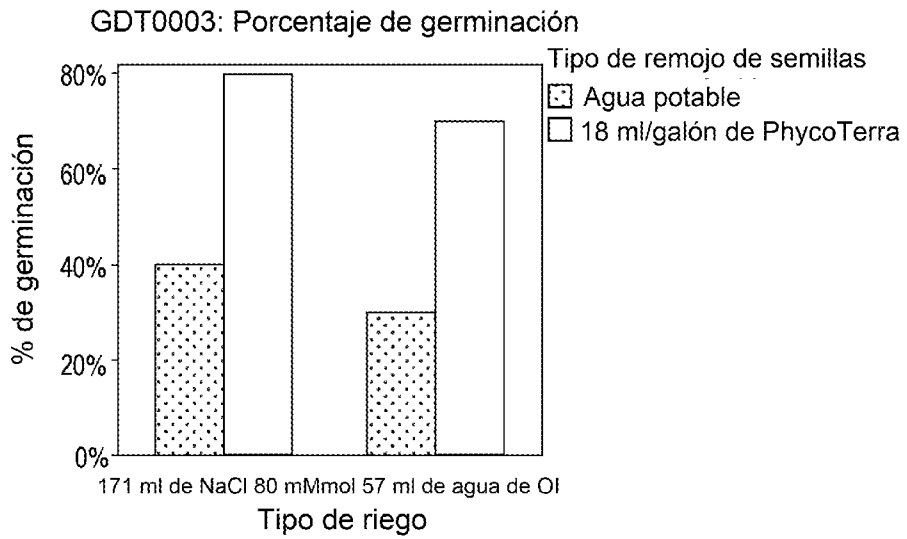


FIG. 5E

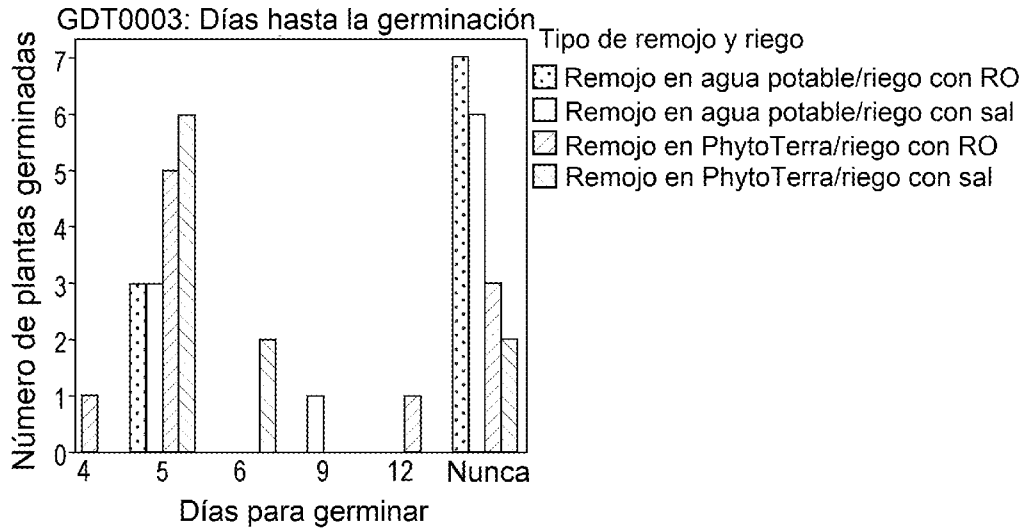
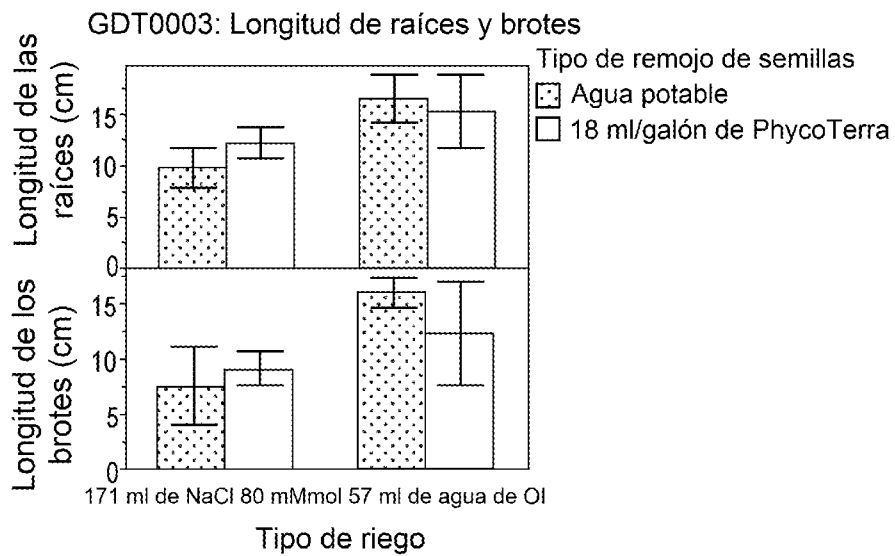
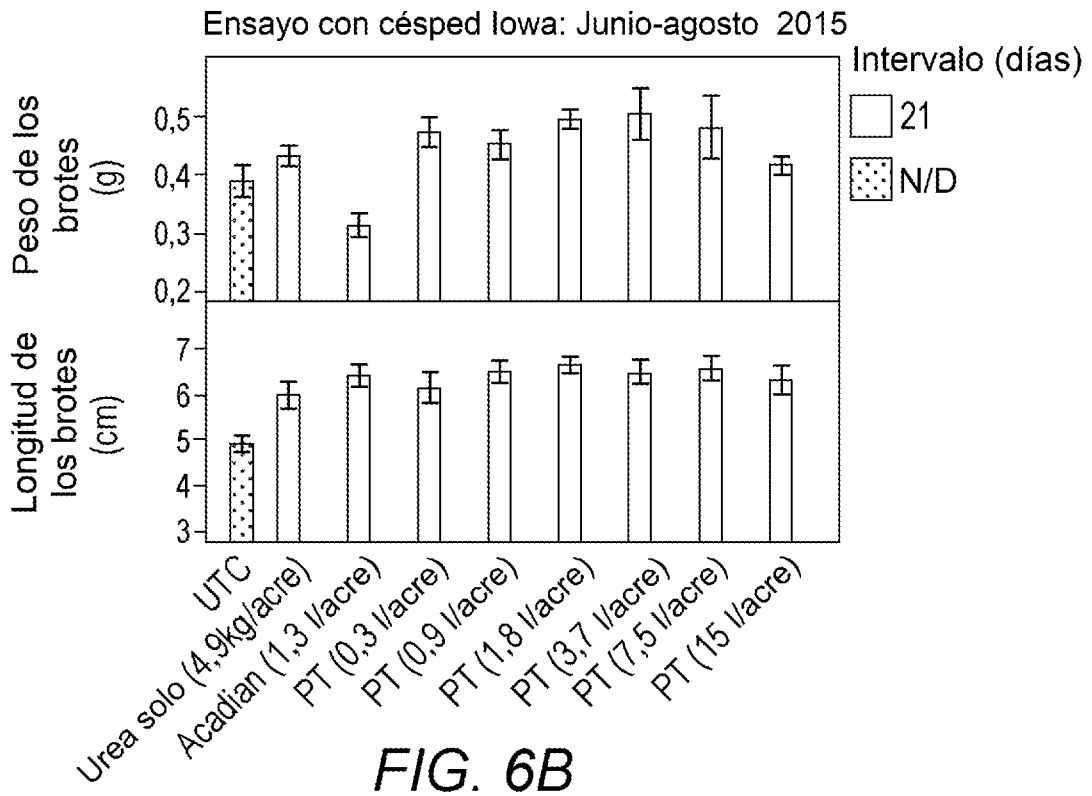
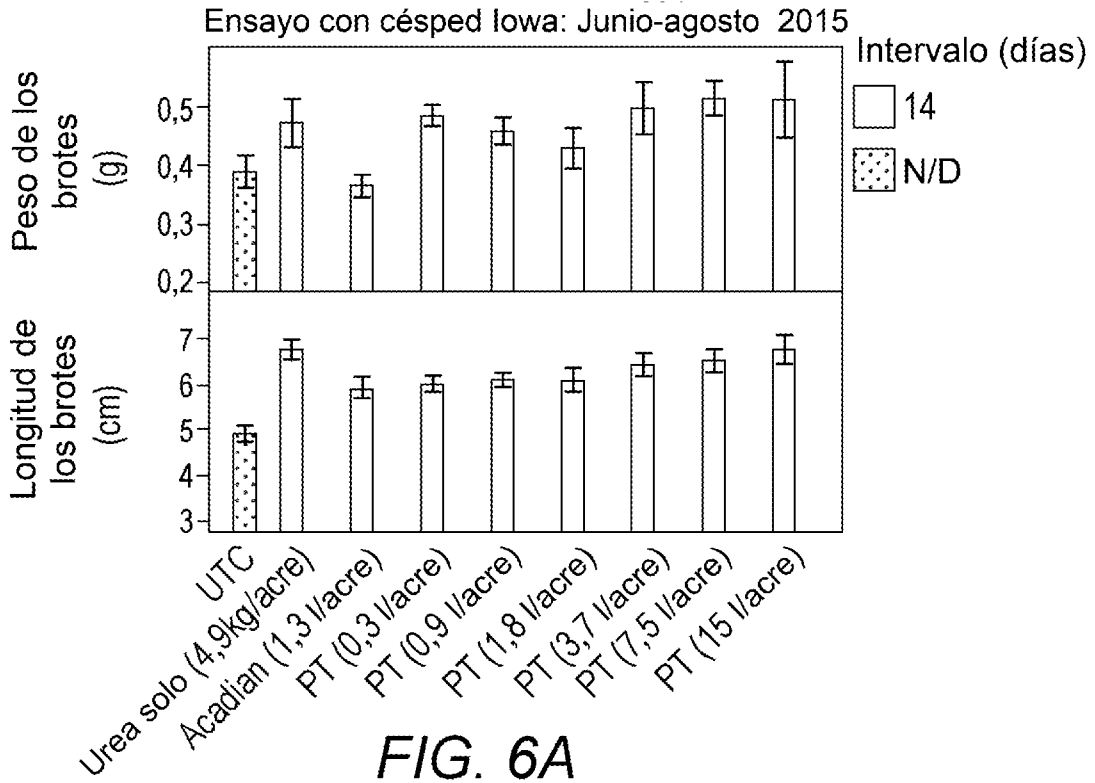


FIG. 5F





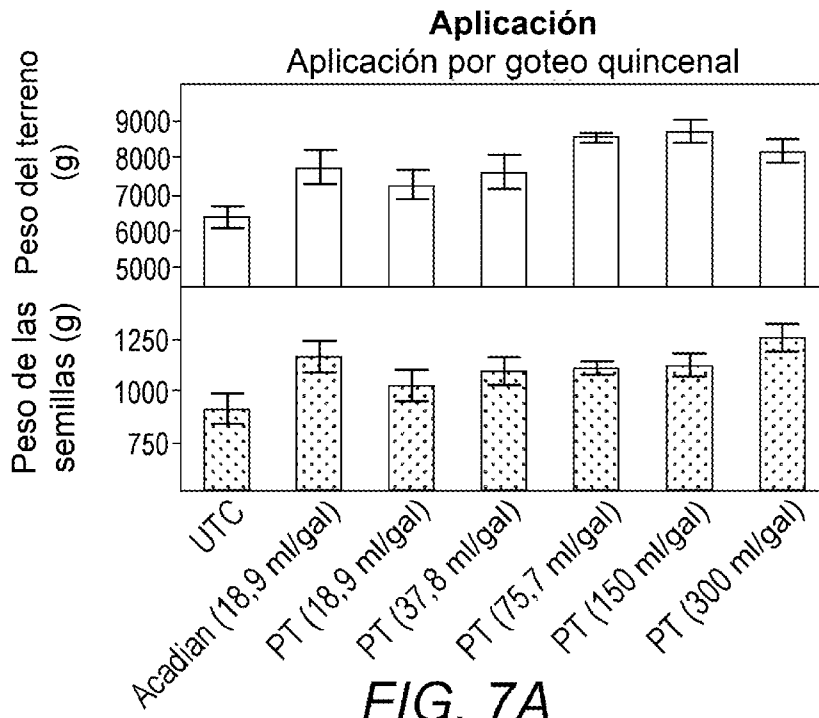


FIG. 7A

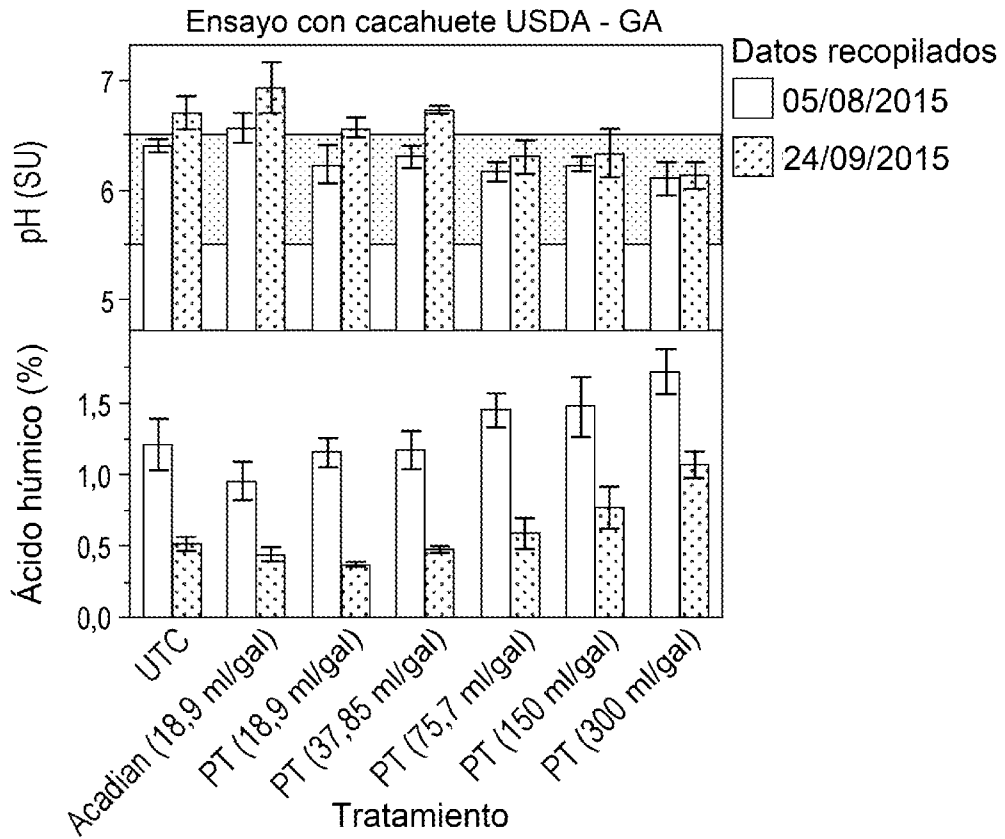


FIG. 7B

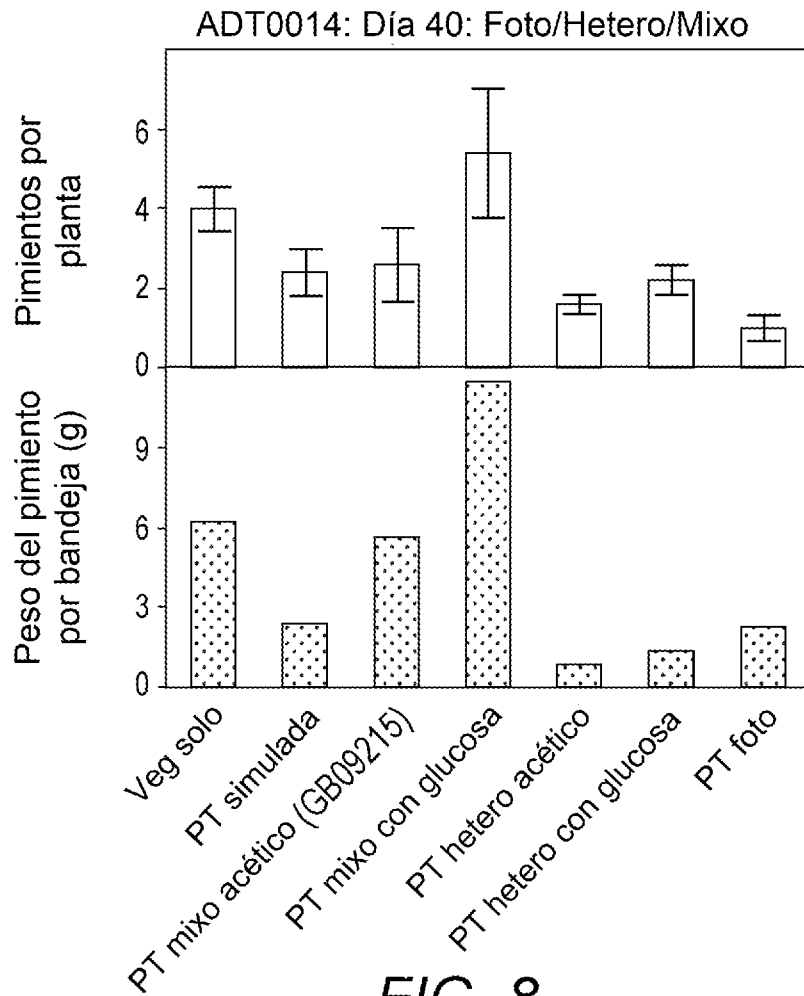


FIG. 8