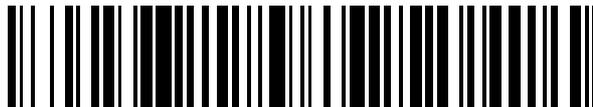


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 334**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)

A01N 65/03 (2009.01)

A01N 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2015 PCT/US2015/066160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16100550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2015 E 15871011 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 3232790**

54 Título: **Composición basada en *Chlorella mixotrófica*, y métodos de su preparación y aplicación a plantas**

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:
24.09.2020

73 Titular/es:

HELIAE DEVELOPMENT LLC (100.0%)

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:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 784 334 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

Composición basada en *Chlorella* mixotrófica, y métodos de su preparación y aplicación a plantas

Antecedentes

5 La brotación de las semillas ocurre cuando una planta inmadura sale de la cubierta de su semilla, normalmente seguida por la salida de un tallo fuera de la tierra. Las primeras hojas que aparecen en muchas plántulas son las llamadas hojas de semilla, o cotiledones, que frecuentemente se parecen poco a las hojas posteriores. Poco después de la aparición de las verdaderas hojas, que son más o menos las típicas de la planta, los cotiledones se caen. La germinación de las semillas es un complejo proceso fisiológico desencadenado por la absorción de agua después de que hayan sido liberados los posibles mecanismos de inactividad por los desencadenantes adecuados. En condiciones favorables, el rápido crecimiento del embrión culmina en la rotura de las capas envolventes y la brotación de la radícula. Se han propuesto varios agentes como moduladores de la brotación de las semillas. La modulación mediante temperatura y humedad son métodos comunes para afectar la brotación de las semillas. También se ha propuesto que la adición de nutrientes al suelo fomenta la brotación de las semillas de ciertas plantas.

15 Similarmente, el crecimiento y la producción de frutos de una planta madura también son un complejo proceso fisiológico que implica entradas y vías en las raíces, los brotes y las hojas. Sea a una escala de cultivo comercial o doméstico, los productores están constantemente procurando optimizar el rendimiento y la calidad de una cosecha para garantizar una alta rentabilidad de la inversión hecha en cada periodo vegetativo. A medida que aumenta la población y aumenta la necesidad de materiales de plantas en bruto para los mercados de los alimentos y de las tecnologías renovables, se intensifica la importancia de la producción agrícola eficiente. La influencia del entorno en la salud y producción de una planta ha producido la necesidad de estrategias durante el periodo vegetativo que permitan a las plantas compensar la influencia del entorno y maximizar la producción. También se han propuesto la adición de nutrientes al suelo o su aplicación al follaje para promover el rendimiento y la calidad en ciertas plantas. La eficacia se puede atribuir a los ingredientes o el método de preparación del producto. Aumentar la eficacia de un producto puede reducir la cantidad necesaria de producto y aumentar la eficiencia del proceso agrícola.

25 Faheed, F. A. et al. (2008) Journal of Agriculture & Social Sciences describe el uso de microalgas secas de *Chlorella vulgaris* en la germinación de semillas de plantas de lechuga.

El documento de patente US 3.889.418 describe un método de preparación y aplicación de *Chlorella pyrenoidosa* recogida durante la fase de crecimiento logarítmico. También se describe en su interior el producto resultante que tiene propiedades reguladoras del crecimiento de las plantas.

30 El documento de patente US 4.551.164 describe una composición y un método de preparación de una composición que comprende un cultivo bacteriano cultivado en un primer medio de crecimiento mezclado con un cultivo de algas cultivado en un segundo medio de crecimiento, e incubado adicionalmente con un tercer medio de crecimiento.

Compendio

35 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de mejora del crecimiento de una planta que comprende administrar un tratamiento de composición líquida que comprende un cultivo de *Chlorella* al suelo de la planta, comprendiendo la composición células completas pasteurizadas de *Chlorella*, en donde la composición se administra en una concentración en el intervalo de 0,003-0,080 % de sólidos en peso.

40 Las realizaciones de la presente invención proporcionan métodos de preparación de una composición mixotrófica líquida basada en *Chlorella*. La composición incluye pasteurización y estabilización de una baja concentración de células completas de *Chlorella* mixotrófica que no han sido sometidas a un proceso de secado. La composición líquida se puede usar para potenciar la brotación y el crecimiento de plantas en aplicaciones al suelo y foliares de baja concentración y baja frecuencia.

Algunas realizaciones incluyen un método de mejora de la planta que incluye administrar a una planta un tratamiento de composición líquida que incluye un cultivo de *Chlorella*.

45 En algunas realizaciones de la descripción, 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 a 11 % en peso de *Chlorella*, a entre 55 y 65 °C durante entre 90 y 150 minutos. En algunas realizaciones, el cultivo se puede diluir entonces hasta 10-11 % de *Chlorella* en peso y enfriar hasta entre 35 y 45 °C. En algunas realizaciones, el cultivo pasteurizado se puede ajustar hasta un pH entre 3,5 y 4,5.

50 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 una duración de cultivo de 7-14 días, a una temperatura entre 20 y 30 °C, a un pH 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

ES 2 784 334 T3

algunas realizaciones, al menos una especie de bacteria esporulante puede estar presente en el cultivo no axénico. La bacteria puede ser *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Brevibacillus* sp., o similar.

5 En algunas realizaciones, la administración de la composición puede ser poniendo en remojo una semilla en la composición antes de la siembra; poniendo en contacto el suelo en una vecindad inmediata de una semilla plantada con una cantidad eficaz de la composición; poniendo en contacto hidropónicamente las raíces de una planta con una cantidad eficaz de la composición; poniendo en contacto una cantidad eficaz de la composición con una porción accesible de la planta después de la brotación; o similar.

En algunas realizaciones, la composición líquida se puede administrar a una tasa en el intervalo de 93,5-1403 litros por hectárea (10-150 galones por acre) al suelo o a las plantas brotadas del suelo.

10 En algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo durante 90-150 minutos.

En algunas realizaciones, la composición líquida puede incluir 0,008-0,080 % de sólidos en peso de células completas pasteurizadas de *Chlorella*.

15 En algunas realizaciones, las composiciones líquidas se pueden administrar pulverizando. 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 por primera vez 5-14 días después de la brotación.

En algunas realizaciones, la composición líquida se puede administrar al suelo por un sistema de riego de bajo volumen, una aplicación por inundación del suelo, un sistema de pulverización aéreo, o similares.

20 En algunas realizaciones, la planta puede ser un miembro de la familia de plantas Solanaceae, Fabaceae (Leguminosae), Poaceae, Rosaceae, 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 algunas realizaciones, las células completas de *Chlorella* no se han sometido a un proceso de secado.

En algunas realizaciones, el tratamiento de composición líquida puede incluir adicionalmente 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.

30 En algunas realizaciones, el tratamiento de composición líquida no contiene un principio activo para potenciar la brotación o maduración distinta del cultivo de células completas de *Chlorella*.

En algunas realizaciones, la mejora se puede determinar por comparación de una planta tratada con una planta sin tratar sustancialmente idéntica. Se puede observar una diferencia cuantificable de al menos 10 % para al menos una característica de la planta.

35 En algunas realizaciones, la característica de la planta puede ser tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotación de las plántulas, tiempo de brotación de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar, o similares, o cualquier combinación de los mismos.

40 En algunas realizaciones, el número de plantas brotadas del suelo puede aumentar en al menos 10 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, el número de plantas que demuestran maduración por formación de hojas puede aumentar en al menos 10 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar.

45 Las realizaciones de la invención proporcionan una composición líquida para la mejora de las plantas, incluyendo la composición células completas pasteurizadas de *Chlorella*. En algunas realizaciones de la descripción, 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 cinco otras bacterias, además de todas las de *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Brevibacillus* sp. La flora bacteriana también puede incluir una cualquiera o más de las bacterias enumeradas a continuación:

50 *Paenibacillus* sp.

- Bacillus sp.
- Lactobacillus sp.
- Brevibacillus sp.
- Massilia sp.
- 5 Pseudomonas sp.
- Bdellovibrio bacteriovorus
- Stenotrophomonas sp.
- Acinetobacter sp.
- Enterobacter sp.
- 10 Flavobacterium sp.
- Zoogloea sp. asociada a algas
- Burkholderiaceae - fam
- Xanthomonadaceae - fam
- Enterobacteriaceae - fam
- 15 Comamonadaceae - fam
- Oxalobacteraceae - fam
- Chitinopagaceae - fam
- Gamma-proteobacterium - clase
- Burkholderiales - orden
- 20 Proteobacteria - phy
- Taxones de aparición única
- Bacteria no clasificada

25 En algunas realizaciones de la descripción, la composición puede ser desde 0,0001 %-40 % de *Chlorella* en peso. En algunas realizaciones, el cultivo pasteurizado puede ser 10-11 % de *Chlorella* en peso. En algunas realizaciones, el cultivo pasteurizado puede estar a un pH entre 3,5 y 4,5. En diversas realizaciones, la *Chlorella* puede ser un cultivo mixotrófico, cultivado en al menos una fuente de carbono orgánico, así como por fotosíntesis. En algunas realizaciones, la composición adicional incluye un medio adecuado para el crecimiento de *Chlorella*. En algunas realizaciones, la composición se puede diluir con agua. Asimismo, en algunas realizaciones, la composición puede incluir otros aditivos que incluyen fertilizantes, agentes de ajuste del pH, fitohormonas, insecticidas, minerales, detergentes. En algunas realizaciones, la composición no contiene un aditivo para potenciar la brotación o maduración distinta del cultivo de células completas de *Chlorella*.

35 En el presente documento también se proporciona un suelo que acoge una semilla de planta, que incluye la composición, en donde la semilla tiene una característica mejorada. En algunas realizaciones, la descripción proporciona una semilla de planta, puesta en contacto con la composición, en donde la semilla tiene una característica mejorada. Asimismo, en algunas realizaciones, la descripción proporciona raíces de una planta puestas en contacto con una cantidad eficaz de la composición, hidropónicamente o en el suelo, en donde la raíz o toda la planta tienen una característica mejorada. En otras realizaciones más, la descripción proporciona una planta puesta en contacto con la composición después de la brotación, en donde la planta tiene una característica mejorada.

40 Algunas realizaciones de la invención incluyen un sistema de riego de bajo volumen que incluye la composición. En algunas realizaciones, la invención incluye un sistema de inundación del suelo, y/o un sistema de pulverización aéreo que incluye la composición.

En algunas realizaciones, la composición adicional incluye 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.

45 Algunas realizaciones de la descripción proporcionan material recogido de una planta puesta en contacto con la

composición, en donde la planta presentó una característica mejorada. La característica mejorada puede estar presente en el material recogido.

5 Algunas realizaciones de la descripción incluyen césped puesto en contacto por la composición, teniendo el césped una característica mejorada. En algunas realizaciones, se puede proporcionar un campo de dicho césped como parte de la descripción. En algunas realizaciones, la descripción incluye un campo de golf con el césped.

Algunas realizaciones de la descripción proporcionan una planta que se ha vuelto resistente al estrés por contacto con la composición. Asimismo, algunas realizaciones de la descripción proporcionan suelo que se ha vuelto cultivable pulverizando o poniendo en remojo con la composición en presencia de semillas o plantas que se han hecho suficientemente resistentes al estrés como para ser capaces de crecer en el suelo.

10 **Descripción de los dibujos**

La Figura 1 representa los resultados de una prueba para la condición del ADN de células de *Chlorella* después de la pasteurización (DAPI).

La Figura 2 representa los resultados de una prueba para la condición de membrana celular de células de *Chlorella* después de la pasteurización (yoduro de propidio).

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

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 con estrés salino.

La Figura 6 representa los resultados de experimentos usando la composición en césped.

La Figura 7 representa los resultados de experimentos usando la composición en cacahuetes.

20 La Figura 8 representa los resultados de experimentos que implican diferentes preparaciones de la composición.

Descripción detallada

25 Muchas plantas se pueden beneficiar de la aplicación de composiciones líquidas que proporcionan un efecto bioestimulante. Los ejemplos de familias de plantas que se pueden beneficiar de dichas composiciones pueden incluir: Solanaceae, Fabaceae (Leguminosae), Poaceae, Rosaceae, 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, Lecythydaceae, Rubiaceae, Papveraceae, Illiciaceae, Grossulariaceae, Myrtaceae, Juglandaceae, Bertulaceae, Cucurbitaceae, Asparagaceae (Liliaceae), Alliaceae (Liliceae), Bromeliaceae, Zingieraceae, Muscaceae, Areaceae, Dioscoreaceae, Myristicaceae, Annonaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Piperaceae y Proteaceae.

30 La familia de plantas Fabaceae (también conocida como Leguminosae) comprende la tercera mayor familia de plantas con más de 18.000 especies, incluyendo varias plantas agrícolas y alimenticias importantes. Clasificada taxonómicamente en el reino Plantae, Tracheobionta (subreino), Spermatophyta (superdivisión), Magnoliophyta (división), Manoliopsida (clase), Rosidae (subclase) y Fabales (orden), la familia Fabaceae incluye sojas, judías, judías verdes, guisantes, garbanzos, alfalfa, cacahuetes, guisantes de olor, algarroba y regaliz. Las plantas de la familia Fabaceae pueden variar en tamaño y tipo, que incluyen árboles, hierbas anuales pequeñas, arbustos y vides, y normalmente desarrollan legumbres. Las plantas de la familia Fabaceae se pueden encontrar en todos los continentes, excluyendo la Antártida, y así tienen una gran importancia en la agricultura en todo el globo. Además de alimento, las plantas de la familia Fabaceae se pueden usar para producir gomas naturales, tintes y ornamentos.

35 La familia de plantas Solanaceae incluye un gran número de cultivos agrícolas, plantas medicinales, especias y ornamentos en sus más de 2.500 especies. Clasificada taxonómicamente en el reino Plantae, Tracheobionta (subreino), Spermatophyta (superdivisión), Magnoliophyta (división), Manoliopsida (clase), Asteridae (subclase) y Solanales (orden), la familia Solanaceae incluye patatas, tomates, berenjenas, diversos pimientos, tabaco y petunias. Las plantas de Solanaceae se pueden encontrar en todos los continentes, excluyendo la Antártida, y así tienen una gran importancia en la agricultura en todo el globo.

40 La familia de plantas Poaceae suministra alimentos, materiales de construcción y materias primas 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 plantas con flor, pastos y cultivos de cereal tales como cebada, maíz, citronela, mijo, avena, centeno, arroz, trigo, caña de azúcar y sorgo. Los tipos de hierba de césped encontrados en Arizona incluyen, pero no se limitan a, pastos híbridos Bermuda (por ejemplo, 328 tifgrn, 419 tifway, tif sport).

La familia de plantas Rosaceae incluye plantas con flor, 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 almendra, manzana, albaricoque, mora, cereza, nectarina, melocotón, ciruela, frambuesa, fresa y membrillo.

5 La familia de plantas Vitaceae incluye plantas con flor 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 uvas.

10 Es particularmente importante para la producción de plantas la etapa inicial de crecimiento donde la planta brota y madura para establecerse. Un método de tratamiento de una semilla, plántula o planta para mejorar directamente la germinación, brotadura y maduración de la planta; o para potenciar indirectamente la comunidad microbiana del suelo que rodea la semilla o plántula es, por tanto, valioso para que la planta inicie su camino hacia la producción comercializable. La norma normalmente usada para evaluar la brotadura es el logro de la etapa de hipocótilo, donde un tallo sobresale visiblemente del suelo. La norma normalmente usada para evaluar la maduración es el logro de la etapa de cotiledón, donde dos hojas se forman visiblemente en el tallo que está brotando.

15 También es importante en la producción de fruto de plantas el rendimiento y la calidad del fruto, que se puede expresar en términos de, por ejemplo, el número, peso, color, firmeza, madurez, humedad, grado de infestación por insectos, grado de enfermedad o pudrición, y/o grado de quemadura solar del fruto. Un método de tratamiento de una planta para mejorar directamente las características de la planta, o para potenciar indirectamente la bioquímica de la planta para sus capacidades fotosintéticas y la salud de las hojas, raíces y brotes de la planta para permitir la robusta producción de fruto, es, por tanto, valioso en aumentar la eficiencia de producción comercializable. Las designaciones comercializable y no comercializable se pueden aplicar tanto a la planta como al fruto, y se pueden definir de manera diferente basándose en el uso final del producto, tal como productos para el mercado fresco y procesamiento para inclusión como un ingrediente en una composición. La determinación comercializable puede evaluar dichas calidades como, pero no se limitan a, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura y quemadura solar. El término producción total puede incorporar tanto plantas y fruto comercializable como no comercializable. La relación entre plantas o fruto comercializable y plantas o fruto no comercializable se puede denominar utilización y se expresa como un porcentaje. La utilización se puede usar como un indicador de la eficiencia del proceso agrícola, ya que muestra la producción satisfactoria de plantas o frutos comercializables, que obtendrá la mayor rentabilidad financiera para el productor, mientras que la producción total no proporcionará necesariamente dicha indicación. Además, las mejoras en y las medidas de salud de la planta pueden incluir resistencia de la planta al estrés. Los estreses pueden ser abióticos, tales como, por ejemplo, estrés a la temperatura (alta temperatura, así como congelación), estrés salino, estrés por metales pesados y estrés por agua (tanto sequía como exceso de agua). Asimismo, los estreses pueden ser bióticos, tales como, por ejemplo, estreses provocados por hongos, bacterias, insectos, malas hierbas y virus. Las medidas de salud mejorada de la planta pueden ser cualitativas o cuantitativas. Cuando son cuantitativas, las realizaciones de mejora en la salud de la planta pueden ser una mejora relativa en cualquier característica en comparación con una planta sin tratar, en donde la mejora es al menos 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.

40 Para lograr dichas mejoras en la salud, brotadura, maduración, rendimiento y calidad de las plantas, las realizaciones de la invención proporcionan composiciones basadas en microalgas, métodos de preparación de composiciones líquidas basadas en microalgas, y métodos de aplicación de las composiciones basadas en microalgas a las plantas. Las microalgas de la composición líquida pueden comprender *Chlorella* sp. cultivada en condiciones mixotróficas, que comprende un medio de cultivo que consiste principalmente en agua con oligonutrientes (por ejemplo, nitratos, fosfatos, vitaminas, metales encontrados en la formulación BG-11 (disponible de UTEX The Culture Collection of Algae en la Universidad de Texas en Austin, Austin, Texas)), luz como fuente de energía para la fotosíntesis, carbono orgánico (por ejemplo, acetato, ácido acético) como tanto fuente de energía como fuente de carbono. En algunas realizaciones, la *Chlorella* se puede cultivar en condiciones mixotróficas no axénicas en presencia de organismos contaminantes, tales como, pero no se limitan a, bacterias. Los métodos de cultivo de dichas microalgas en condiciones mixotróficas no axénicas se pueden encontrar en el documento de patente WO2014/074769A2 (Ganuz, et al.).

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

60 Controlando artificialmente los aspectos del proceso de cultivo de *Chlorella*, tales como la alimentación de carbono

orgánico, los niveles de oxígeno, pH y luz, el proceso de cultivo se diferencia del proceso de cultivo que experimenta la *Chlorella* en la naturaleza. Además de controlar diversos aspectos del proceso de cultivo, la intervención de operadores humanos o sistemas automatizados ocurre durante el cultivo mixotrófico no axénico de *Chlorella* mediante métodos de control de la contaminación para prevenir que la *Chlorella* sean invadida y vencida por organismos contaminantes (por ejemplo, hongos, bacterias). Se conocen en la técnica métodos de control de la contaminación para cultivos de microalgas y dichos métodos de control de la contaminación adecuados para cultivos mixotróficos no axénicos de microalgas se describen en el documento de patente WO2014/074769A2 (Ganuza, et al.). Al intervenir en el proceso de cultivo de microalgas, se puede mitigar el impacto de los microorganismos contaminantes suprimiendo la proliferación de poblaciones que contienen organismos y el efecto sobre las células de las microalgas (por ejemplo, lisis, infección, muerte, aglomeración). Así, 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 conjunto y usado en las composiciones inventivas descritas se diferencia del cultivo que resulta de un proceso de cultivo de *Chlorella* que ocurre en la naturaleza.

Alternativamente, el método de cultivo de *Chlorella* mixotróficamente puede comprender otras fuentes de carbono orgánico conocidas 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 basado en plantas, prolina, ácido propiónico, ribosa, sacarosa, hidrolizados parciales o completos de almidón, sacarosa, tartárico, ácidos orgánicos del ciclo TCA, vinazas ligeras, urea, disoluciones de desechos industriales, y extracto de levadura; así como otros métodos conocidos de mezcla, métodos de suministro de carbono orgánico, iluminación, medios de cultivo, caldos nutritivos, recipientes de cultivo, y optimización de los parámetros de cultivo tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto y dióxido de carbono disuelto. El cultivo de *Chlorella* mixotrófica se puede recoger del recipiente de cultivo y/o concentrar por medios conocidos en la técnica, tales como sedimentación, centrifugación, filtración y electrodeshidratación, para formar la composición basada en *Chlorella* mixotrófica que se usa en la composición de producto final.

Durante el proceso de cultivo mixotrófico, el cultivo de *Chlorella* también puede comprender residuos celulares y compuestos eliminados de las células de *Chlorella* en el medio de cultivo. La salida del proceso de cultivo mixotrófico de *Chlorella* proporciona el principio activo para una composición que se aplica a plantas para mejorar al menos una característica de rendimiento de la planta tal como, por ejemplo, brotación, maduración, rendimiento y calidad. Normalmente, la composición se aplica sin adición separada a o suplementación de la composición con otros principios activos no encontrados en las células completas de *Chlorella* mixotrófica y medio de cultivo acompañante del proceso de cultivo mixotrófico, tal como: células de microalgas no de *Chlorella*, extractos de microalgas, macroalgas, extractos de macroalgas, fertilizantes líquidos, fertilizantes granulados, complejos minerales (por ejemplo, calcio, sodio, cinc, manganeso, cobalto, silicio), hongos, bacterias, nematodos, protozoos, sólidos producto de la digestión, productos químicos (por ejemplo, etanolamina, bórax, ácido bórico), ácido húmico, nitrógeno y derivados de nitrógeno, roca fosfórica, pesticidas, 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. Alternativamente, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se puede complementar con nitrógeno, fósforo o potasio para aumentar los niveles dentro de la composición hasta al menos 1 % de la composición total (es decir, adición de N, P o K para aumentar los niveles a al menos 1-0-0, 0-1-0, 0-0-1, o combinaciones de los mismos). En algunas realizaciones, el nutriente complementado no es captado, quelado o absorbido por las microalgas.

La *Chlorella* mixotrófica es la especie dominante de microalgas en la composición líquida. En algunas realizaciones, la población de microalgas de la composición líquida es sustancialmente *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 90 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 91 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 92 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 93 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 94 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 95 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 96 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 97 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 98 % de la población de microalgas de la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica o no mixotrófica comprende al menos 99 % de la población de microalgas de la composición líquida. Se puede considerar que las composiciones líquidas que tienen al menos 99 % de una cepa de microalgas de *Chlorella* (por ejemplo, al menos 99,3 %, al menos 99,5 %, o incluso al menos 99,9 %), tal como *Chlorella* mixotrófica, tienen una única especie de algas en la composición líquida. En un aspecto, la composición líquida carece de cualquier cantidad detectable de cualquier otra especie de microalgas. En otro aspecto, la composición líquida carece de cualquier cantidad de cualquier otro microorganismo (por ejemplo, bacterias) en la composición líquida distinta de las microalgas *Chlorella* deseadas que sea superior a 1 % de la composición en peso.

La *Chlorella* mixotrófica resultante de la etapa de cultivo consiste en células completas con el análisis aproximado

mostrado en la Tabla 1, el perfil de ácidos grasos mostrado en la Tabla 2, y los resultados de análisis adicionales mostrados en los Ejemplos 1-3. Se encontró que el perfil de nutrientes (es decir, análisis aproximado) de las células de *Chlorella* mixotrófica antes y después de la pasteurización, así como durante el almacenamiento posterior, tenía poca variación en la mayoría de las realizaciones.

5

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 %

Tabla 2

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

10

Las células de *Chlorella* mixotrófica también pueden contener niveles detectables de fitohormonas, tales como: ácido abscísico y metabolitos, que se conocen por estar relacionados con la función del aparato estomal, inhibición del crecimiento e inactividad de la semilla; citoquininas, que se conocen por estar relacionadas con la división celular, desarrollo de yemas, desarrollo del limbo y retardo de la senescencia; auxinas, que se conocen por estar relacionadas con el crecimiento por elongación, diferenciación de elementos del floema, dominancia apical, tropismo y formación de raíces iniciales; y giberelinas, que se conocen por estar relacionadas con la elongación del tallo y el inicio de semilla germinación.

15

20

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 (DW). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender citoquininas en un intervalo de 60-300 ng/g de peso seco (abreviadamente en lo sucesivo DW por la expresión inglesa *Dry Weight*). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender auxinas en un intervalo de 400-815 ng/g de peso seco (DW). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender giberelinas en un intervalo de 0,1-15 ng/g de peso seco (DW). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender fitohormonas específicas en los intervalos mostrados en la Tabla 3.

25

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 (abreviadamente en lo sucesivo FW por la expresión inglesa *Fresh Weight*). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender citoquininas en un intervalo de 10-30 ng/g de peso fresco (FW). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender auxinas en un intervalo de 1-30 ng/g de peso fresco (FW). En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica puede comprender giberelinas en un intervalo de 0,1-1 ng/g de peso fresco (FW).

Tabla 3

Metabolito	Intervalo (ng/g de DW)
Ácido cis-abscísico	0,1-13
Éster de glucosa de ácido abscísico	0,1-5
Ácido faséico	0,1-9
Ácido neofaséico	0,1-5
Ácido trans-abscísico	0,1-8
(trans) Zeatina	0,1-5

(cis) Zeatina	0,1-16
(trans) Zeatina ribósido	4-20
(cis) 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
giberelina 34	0,1-5
giberelina 44	0,1-5

Después de la recogida de la composición de *Chlorella* mixotrófica del recipiente de cultivo, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se incorpora normalmente en una composición líquida para aplicación a las plantas. En general, la composición líquida se estabiliza calentando y enfriando en un proceso de pasteurización, ajuste de pH, y la adición de un inhibidor del crecimiento de levaduras y mohos.

En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica se puede haber congelado y descongelado antes de la inclusión en la composición líquida. En algunas realizaciones, la *Chlorella* mixotrófica no se ha sometido a un proceso previo de congelación o descongelación. En algunas realizaciones, las células completas 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 o roto, y las células de *Chlorella* mixotrófica no se han sometido a un proceso de extracción o proceso que pulveriza las células. Las células completas de *Chlorella* mixotrófica no se someten normalmente a un proceso de purificación para aislar las células completas de *Chlorella* mixotrófica de los constituyentes acompañantes del proceso de cultivo (por ejemplo, oligonutrientes, carbono orgánico residual, bacterias, residuos celulares, excreciones celulares), y así la salida completa del proceso de cultivo de *Chlorella* mixotrófica, que comprende células completas de *Chlorella*, medio de cultivo, excreciones celulares, residuos celulares, bacterias, carbono orgánico residual y oligonutrientes, se usa en la composición líquida para aplicación a las plantas. En algunas realizaciones, las células completas de *Chlorella* mixotrófica y los constituyentes acompañantes del proceso de cultivo se concentran en la composición. En algunas realizaciones, las células completas de *Chlorella* mixotrófica y los constituyentes acompañantes del proceso de cultivo se diluyen en la composición hasta una baja concentración. Las células completas de *Chlorella* mixotrófica de la composición no se fosilizan normalmente. En algunas realizaciones, las células completas de *Chlorella* mixotrófica no se mantienen normalmente en un estado viable en la composición para el crecimiento continuado después del método de uso de la composición en una aplicación al suelo o foliar. En algunas realizaciones, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica puede estar biológicamente inactiva después de preparar la composición. En algunas realizaciones, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica puede estar sustancialmente biológicamente inactiva después de preparar la composición. En algunas realizaciones, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar en actividad biológica después de que la composición preparada se exponga al aire.

En un ejemplo de preparación de la composición líquida con la composición basada en *Chlorella* mixotrófica para aplicación a las plantas, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica recogida del sistema de cultivo se mantiene primero en un tanque de recogida antes de centrifugar el cultivo. Una vez se centrifuga el cultivo de *Chlorella* mixotrófica, la centrifugadora descarga la fracción rica en sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica, pero que también contienen los constituyentes acompañantes del medio de cultivo, en un recipiente a una temperatura de aproximadamente 30 °C. La composición basada en *Chlorella* mixotrófica puede continuar (es decir, fresca) en el proceso de preparación de la composición líquida o se almacena en un congelador y se descongela en un momento posterior (es decir, se almacena) para procesamiento en la composición líquida. Cuando la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se almacena en un congelador, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente -10 °C y necesita aproximadamente 1-2 días para que la composición se congele. Una vez sacada del congelador, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada se pone fuera para descongelarse durante aproximadamente 7 días. La composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca o almacenada se pone entonces en un tanque y se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 2 horas para empezar el proceso de pasteurización. La composición basada en *Chlorella* mixotrófica se diluye entonces hasta una concentración de sólidos de células completas de aproximadamente 10-11 % en peso y se enfría hasta aproximadamente 40 °C para completar el proceso de pasteurización. El pH de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se ajusta entonces hasta un pH de aproximadamente 4 mezclando en una cantidad eficaz de ácido fosfórico para fines de estabilización. Entonces se mezclan aproximadamente 0,3 % de sorbato de potasio con la composición basada en *Chlorella* mixotrófica para fines de estabilización. La composición líquida resultante se transfiere entonces a recipientes de un tamaño deseado que se almacenan a 3-5 °C hasta que se expiden.

Aunque se puede realizar un proceso similar de preparación de una composición líquida con la *Chlorella* mixotróficamente cultivada para su aplicación a las plantas con una etapa adicional de secado de las microalgas después de la centrifugación, los inventores encontraron sorprendentemente que las composiciones líquidas que contienen microalgas que no se secaron produjeron mejores efectos cuando se aplicaron a las plantas. Los inventores encontraron que dichos efectos que aumentaban cuando la *Chlorella* mixotrófica no se secaba comprendían: germinación acelerada, contenido de clorofila y peso de los brotes. Los inventores también encontraron que el someter la *Chlorella* mixotrófica a un proceso de secado en tambor redujo los niveles detectables de fitohormonas en la biomasa de microalgas.

Aunque no se añaden o suplementan principios activos separados en la composición basada en *Chlorella* mixotrófica, la composición líquida que comprende las células completas de *Chlorella* mixotrófica y los componentes acompañantes del medio y proceso de cultivo (por ejemplo, oligonutrientes, carbono orgánico residual, bacterias, residuos celulares, excreciones celulares) se puede estabilizar calentando y enfriando en un proceso de pasteurización. Como se muestra en los ejemplos, los inventores encontraron que los principios activos de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica mantenían la eficacia en mejorar la germinación, brotación, maduración y crecimiento de las plantas cuando se aplicaron a plantas después de ser sometidas al calentamiento y enfriamiento de un proceso de pasteurización y también observaron diversas mejoras en el rendimiento que surgieron de la pasteurización en comparación con una versión no pasteurizada de la formulación.

Aunque las células de *Chlorella* mixotrófica están intactas y son viables (es decir, físicamente aptas para vivir, capaces de más crecimiento o división celular) después de ser recogidas del cultivo, se confirmó que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización tenían paredes celulares intactas, pero no eran viables. Se observaron con un microscopio células de *Chlorella* mixotrófica resultantes del proceso de pasteurización para determinar la condición de las paredes celulares después de haberse sometido al proceso de calentamiento y enfriamiento, y se confirmó visualmente que las paredes celulares de *Chlorella* estaban intactas y no abiertas. Para una mayor investigación de la condición de la célula, 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 ADN si la membrana celular está comprometida, y se comparó visualmente con un microscopio. La comparación de yoduro de propidio mostró que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización contenían una alta cantidad de ADN teñido, llegando a la conclusión que las paredes celulares de *Chlorella* mixotrófica estaban intactas, pero las membranas celulares estaban comprometidas (Figura 2). Así, la permeabilidad de las células pasteurizadas de *Chlorella* se diferencia de la permeabilidad de una célula de *Chlorella*, con tanto una pared celular como una membrana celular intacta.

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

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

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

En algunas realizaciones de la descripción, la composición basada en microalgas se puede calentar durante un periodo

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

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

En algunas realizaciones, un método de preparación de una composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica de baja concentración para aplicación a las plantas puede comprender: cultivar *Chlorella* en un medio de cultivo líquido y condiciones mixotróficas que comprenden utilización de una fuente de carbono orgánico y radiación fotosintéticamente activa como fuentes de energía en un recipiente de cultivo; recogida del cultivo de *Chlorella* mixotrófica del recipiente de cultivo; y mezcla del cultivo de *Chlorella* mixotrófica con un ácido y un inhibidor de levaduras y mohos para formar una composición con una concentración de una cantidad eficaz de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica para aplicación a una planta para características potenciadas, en donde las células completas de *Chlorella* mixotrófica no se han sometido a un proceso de secado.

En algunas realizaciones de la descripción, un método de preparación de una composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica para aplicación a las plantas puede comprender: calentar una composición que comprende células completas de microalgas en un medio líquido a una temperatura en el intervalo de 50-70 °C; ajustar la concentración de las células completas en la composición calentada hasta una concentración en el intervalo de 5-30 % de células completas de microalgas en peso; enfriar la composición hasta una temperatura en el intervalo de 35-45 °C; ajustar el pH de la composición hasta un pH en el intervalo de 3-5; y poner en contacto la composición con un inhibidor de levaduras y mohos.

En algunas realizaciones de la descripción, la composición puede comprender 5-30 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones de la descripción, la composición puede comprender 5-20 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones de la descripción, la composición puede comprender 5-15 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones de la descripción, la composición puede comprender 5-10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones de la descripción, la composición puede comprender 10-20 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones de la descripción, la composición puede comprender 10-20 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones de la descripción, la composición puede comprender 20-30 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, puede ocurrir la dilución adicional del porcentaje de sólidos en peso de las células completas de *Chlorella* mixotrófica antes de la aplicación para aplicaciones a baja concentración de la composición.

La composición se puede diluir hasta una concentración más baja para una cantidad eficaz en un suelo o aplicación foliar mezclando un volumen de la composición en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica que da como resultado la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje de sólidos original de células completas de *Chlorella* mixotrófica en la composición por la relación entre el volumen de la composición y el volumen de agua.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 1 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,9 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,8 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,7 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,6 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,5 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,4 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,3 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,2 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,1 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de

la composición líquida para germinación, brotación o maduración potenciada de una planta puede comprender una concentración de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica en el intervalo de 0,002642-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,003 % a aproximadamente 0,080 %), equivalente a una concentración diluida de 0,5-2,6 mL/litro (2-10 mL/galón) de una disolución con un porcentaje de sólidos original de células completas de *Chlorella* mixotrófica en el intervalo de 5-30 %.

En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 0,26-13,2 mL/litro (1-50 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,001321-0,396258 % (por ejemplo, aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,400 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 0,26-2,6 mL/litro (1-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,001321-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,080 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 0,5-1,8 mL/litro (2-7 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,002642-0,055476 % (por ejemplo, aproximadamente 0,003 % a aproximadamente 0,055 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 2,6-5,3 mL/litro (10-20 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,013201-0,158503 % (por ejemplo, aproximadamente 0,013 % a aproximadamente 0,160 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 5,3-7,9 mL/litro (20-30 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,026417-0,237755 % (por ejemplo, aproximadamente 0,025 % a aproximadamente 0,250 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 114-171 mL/litro (30-45 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,039626-0,356631 % (por ejemplo, aproximadamente 0,040 % a aproximadamente 0,360 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 7,9-10,5 mL/litro (30-40 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,039626-0,317007 % (por ejemplo, aproximadamente 0,040 % a aproximadamente 0,320 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de la composición líquida puede comprender una concentración en el intervalo de 10,5-13,2 mL/litro (40-50 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,052834-0,396258 % (por ejemplo, aproximadamente 0,055 % a aproximadamente 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 completas de *Chlorella* mixotrófica. Los ejemplos de bacterias encontradas en condiciones mixotróficas no axénicas se pueden encontrar en el documento de patente WO2014/074769A2 (Ganuza, et al.). Se puede determinar una cifra de bacterias vivas usando métodos conocidos en la técnica, tales como recuentos en placa, recuentos en placa usando Petrifilm disponible de 3M (St. Paul, Minnesota), mediciones espectrofotométricas (turbidimétricas), comparación visual de turbidez con un patrón conocido, recuentos directos de células con un microscopio, determinación de la masa de células y medición de la actividad celular. Los recuentos de bacterias vivas en un cultivo mixotrófico no axénico de microalgas pueden variar de 10^4 a 10^9 UFC/mL, y pueden depender de las medidas de control de la contaminación tomadas durante el cultivo de las microalgas. El nivel de bacterias en la composición se puede determinar por 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.

Usando Q-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para analizar la población de bacterias en un cultivo de *Chlorella* mixotrófica antes de la pasteurización y después de la pasteurización, se observó que el perfil de bacterias en el cultivo cambiaba después de la pasteurización. Particularmente, el perfil post-pasteurización de las bacterias incluye una mayor proporción de bacterias formadoras de esporas e incluye, pero no se limita a, *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Brevibacillus* sp. como los tipos dominantes de bacterias. Comparando los recuentos aerobios en placa de un cultivo de *Chlorella* mixotrófica antes de la pasteurización y después de la pasteurización, también se observó que el número total de bacterias en el cultivo era más bajo después de la pasteurización. Se probaron combinaciones de temperatura y tiempo para el proceso de pasteurización para los tiempos de 15, 30, 60, 120, 180 y 360 minutos, y 50, 60, 70, 80 y 90 °C, con un cultivo de *Chlorella* mixotrófica, y los recuentos aerobios en placa resultantes variaron desde $7,58 \times 10^6$ UFC hasta tan solo $1,74 \times 10^3$ UFC. También se mostró que la temperatura de almacenamiento variaba 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 en los números de recuentos aerobios

en placa y el tipo de especies bacterianas dominantes con el tiempo.

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

En algunas realizaciones, se pueden añadir medios estabilizantes que no son activos con respecto a la mejora de la germinación, brotación y maduración de las plantas, pero que, en su lugar, ayudan a estabilizar la composición basada en microalgas, para prevenir la proliferación de microorganismos no deseados (por ejemplo, levadura, moho) y prolongar la estabilidad en almacén. Dichos medios inactivos pero estabilizantes pueden comprender un ácido, y un inhibidor de levaduras y mohos. En algunas realizaciones, los medios estabilizantes son adecuados para plantas y no inhiben el crecimiento o la salud de la planta. Alternativamente, los medios estabilizantes pueden contribuir a las propiedades nutricionales de la composición líquida, tal como 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, dicho ácido puede comprender ácido fosfórico (H_3PO_4). En algunas realizaciones, la cantidad de ácido necesaria para ajustar el pH puede comprender diferentes cantidades de ácido dependiendo del pH de partida de la composición de microalgas, que puede variar basándose en las condiciones de cultivo de las microalgas, concentraciones residuales de carbono orgánico u otros nutrientes, y procesamiento previo de la composición. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas puede comprender menos de 0,3 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas puede comprender 0,01-0,3 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas puede comprender 0,05-0,25 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas puede comprender 0,01-0,1 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas puede comprender 0,1-0,2 % de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas puede comprender 0,2-0,3 % de ácido fosfórico.

En algunas realizaciones, el inhibidor de levaduras y mohos puede comprender sorbato de potasio ($C_6H_7KO_2$). En algunas realizaciones, la composición puede comprender menos de 0,5 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 0,01-0,5 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 0,05-0,4 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 0,01-0,1 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 0,1-0,2 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 0,2-0,3 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 0,3-0,4 % de sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 0,4-0,5 % de sorbato de potasio. En otras realizaciones, la función estabilizadora del sorbato de potasio y/o ácido fosfórico se puede lograr usando aditivos comparables con función similar tal como, por ejemplo, ácido ascórbico, benzoato de sodio, o similares, en cantidades/concentraciones similares a las enumeradas en el presente documento para el sorbato de potasio y el ácido fosfórico.

La composición basada en microalgas es un líquido y está compuesta sustancialmente de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 70-95 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 85-95 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 70-75 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 75-80 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 80-85 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 85-90 % de agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender 90-95 % de agua. La naturaleza de líquido y el alto contenido de agua de la composición basada en microalgas facilita la administración de la composición en una variedad de formas, tales como: circulación a través de un sistema de riego, circulación a través de un sistema de riego por goteo aéreo, circulación a través de un sistema de riego por goteo enterrado, circulación a través de un sistema de riego con pivote central, pulverizadores, aspersores y regaderas.

La composición basada en microalgas se puede usar inmediatamente después de la formulación, o se puede almacenar en recipientes para su uso posterior. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas se puede almacenar alejada de la luz solar directa. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas puede ser refrigerada. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas se puede almacenar a 1-10 °C. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas se puede almacenar a 1-3 °C. En algunas realizaciones, la composición basada en microalgas se puede almacenar a 3-5 °C. En algunas realizaciones, la composición basada en 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 basada en *Chlorella* mixotrófica durante la preparación puede aumentar la brotación de las semillas en 40-4.000 %, o más, para aplicaciones al suelo. En algunas realizaciones, no secar la composición basada en *Chlorella* mixotrófica durante la preparación puede aumentar el contenido de clorofila

en 10-30 % para aplicaciones foliares. En algunas realizaciones, no secar la composición basada en *Chlorella* mixotrófica durante la preparación puede aumentar el peso de la planta completa en la brotación en 10-20 % para aplicaciones foliares. En algunas realizaciones, no secar la composición basada en *Chlorella* mixotrófica durante la preparación puede aumentar el peso de los brotes en 20-30 % para aplicaciones foliares.

5 La administración del tratamiento con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica a una semilla o planta puede ser en una cantidad eficaz para producir una característica potenciada en la planta en comparación con una población sustancialmente idéntica de planta sin tratar. Dichas características potenciadas pueden comprender germinación acelerada de las semillas, brotación acelerada de las plántulas, brotación mejorada de las plántulas, formación mejorada de hojas, formación acelerada de hojas, maduración mejorada de las plantas, maduración acelerada de las plantas, aumento del rendimiento de las plantas, aumento del crecimiento de las plantas, aumento de la calidad de las plantas, aumento de la salud de las plantas, aumento del rendimiento de los frutos, aumento del crecimiento de los frutos y aumento de la calidad de los frutos. Los ejemplos de dichas características potenciadas pueden comprender logro acelerado de la etapa de hipocótilo, protuberancia acelerada de un tallo del suelo, logro acelerado de la etapa de cotiledón, formación acelerada de hojas, aumento del peso de plantas comercializables, aumento del rendimiento de plantas comercializables, aumento del peso de frutos comercializables, aumento del peso de plantas de producción, aumento del peso de frutas de producción, aumento de la utilización (indicador de eficiencia en el proceso agrícola basado en la relación entre fruto comercializable y fruto no comercializable), aumento del contenido de clorofila (indicador de salud de la planta), aumento del peso de las plantas (indicador de salud de la planta), aumento del peso de las raíces (indicador de salud de la planta) y aumento del peso de los brotes (indicador de salud de la planta). Dichas características potenciadas pueden ocurrir individualmente en una planta, o en combinaciones de múltiples características potenciadas.

25 Sorprendentemente, los inventores encontraron que la administración de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica descrita en aplicaciones de baja concentración fue eficaz en producir características potenciadas en las plantas. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica se administra antes de sembrar la semilla. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica se administra en el momento en que se planta la semilla. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica se administra después de que se plante la semilla, que incluye, por ejemplo, en diversas etapas de crecimiento y maduración post-brotadura de la planta.

30 En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en 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 basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 20 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 40 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 60 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 80 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 100 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 120 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 140 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 150 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas o plantas sin tratar.

50 En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en 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 basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 25 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 30 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 40 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 50 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el número de plantas brotadas en al menos 60 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de semillas de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la

el contenido de clorofila en 15-40 %, o más, en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el contenido de clorofila en al menos 15 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el contenido de clorofila en al menos 20 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el contenido de clorofila en al menos 25 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el contenido de clorofila en al menos 30 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar.

En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la planta completa en 30-60 %, o más, en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la planta completa en al menos 30 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la planta completa en al menos 35 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la planta completa en al menos 40 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la planta completa en al menos 45 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la planta completa en al menos 50 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la planta completa en al menos 55 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar.

En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la raíz en 30-60 %, o más, en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la raíz en al menos 30 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la raíz en al menos 35 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la raíz en al menos 40 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la raíz en al menos 45 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de la raíz en al menos 50 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar.

En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de los brotes en 30-70 %, o más, en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de los brotes en al menos 30 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de los brotes en al menos 35 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de los brotes en al menos 40 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de los brotes en al menos 45 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de los brotes en al menos 50 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de los brotes en al menos 55 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar. En algunas realizaciones, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede aumentar el peso de los brotes en al menos 60 % en comparación con una población sustancialmente idéntica de plantas sin tratar.

Tanto en una aplicación de remojo de semillas, de acción capilar, al suelo, como foliar, el método de uso comprende concentraciones relativamente bajas de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica. Incluso a dichas bajas concentraciones, se ha mostrado que la composición descrita es eficaz en la producción de una característica potenciada en las plantas. La capacidad de uso de bajas concentraciones permite un reducido impacto sobre el entorno que puede resultar de la aplicación excesiva y un aumento de eficiencia en el método de uso de la composición líquida requiriendo una pequeña cantidad de material para producir el efecto deseado. En algunas realizaciones, el uso de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica con un sistema de riego de bajo volumen en aplicaciones al suelo permite que la baja concentración de la composición líquida siga siendo eficaz y no se diluya hasta un punto donde la

composición ya no está a una concentración capaz de producir el efecto deseado sobre las plantas, mientras que también aumenta la eficiencia del uso del agua del productor. La capacidad de usar bajas concentraciones de células completas de *Chlorella* mixotrófica y la ausencia de procesos de purificación para aislar las células también reduce las necesidades de desagüe y procesamiento de las microalgas que se pueden producir a bajas concentraciones en la etapa de cultivo, y aumentando así la eficiencia energética en el método de preparación del producto.

Junto con las bajas concentraciones de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica en la composición líquida necesarias para ser eficaces para potenciar las características descritas de las plantas, la lata de composición líquida no tiene que ser administrada continuamente o a una alta frecuencia (por ejemplo, múltiples veces al día, diariamente). La capacidad de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica para ser eficaz a bajas concentraciones y a baja frecuencia de aplicación era un resultado inesperado, debido al pensamiento tradicional de que a medida que disminuye la concentración de principios activos debe aumentar la frecuencia de aplicación para proporcionar cantidades adecuadas de los principios activos. La eficacia a baja concentración y frecuencia de aplicación aumenta la eficiencia de uso del material del método de uso de la composición líquida mientras que también aumenta la eficiencia de rendimiento del proceso agrícola. El uso de una composición de células completas de *Chlorella* mixotrófica que no requiere procesamiento para secar, extraer, lisar, o romper de otro modo la pared celular también aumenta la eficiencia energética en el método de preparación del producto y permite que el producto se produzca en un periodo de tiempo más rápido.

Aplicación de remojo de semillas

En una realización de la descripción, la administración del tratamiento con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender poner en remojo la semilla en una cantidad eficaz de la composición líquida antes de sembrar la semilla. En algunas realizaciones de la descripción, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica comprende además sacar la semilla de la composición líquida después de ponerla en remojo, y secar la semilla antes de sembrarla. En algunas realizaciones de la descripción, la semilla se puede poner en remojo en la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante un periodo de tiempo en el intervalo de 90-150 minutos. En algunas realizaciones de la descripción, la semilla se puede poner en remojo en la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante un periodo de tiempo en el intervalo de 110-130 minutos. En algunas realizaciones de la descripción, la semilla se puede poner en remojo en la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante un periodo de tiempo en el intervalo de 90-100 minutos. En algunas realizaciones de la descripción, la semilla se puede poner en remojo en la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante un periodo de tiempo en el intervalo de 100-110 minutos. En algunas realizaciones de la descripción, la semilla se puede poner en remojo en la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante un periodo de tiempo en el intervalo de 110-120 minutos. En algunas realizaciones de la descripción, la semilla se puede poner en remojo en la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante un periodo de tiempo en el intervalo de 120-130 minutos. En algunas realizaciones de la descripción, la semilla se puede poner en remojo en la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante un periodo de tiempo en el intervalo de 130-140 minutos. En algunas realizaciones de la descripción, la semilla se puede poner en remojo en la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante un periodo de tiempo en el intervalo de 140-150 minutos.

La composición se puede diluir hasta una concentración más baja para una cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas mezclando un volumen de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica que dan como resultado la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje de sólidos original en la composición por la relación entre el volumen de la composición y el volumen de agua. En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,6-2,6 mL/litro (6-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,007925-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,080 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,8-2,4 mL/litro (7-9 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,009245-0,071327 % (por ejemplo, aproximadamente 0,009 % a aproximadamente 0,070 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,6-1,8 mL/litro (6-7 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,007925-0,05547 % (por ejemplo, aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,055 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,8-2,1 mL/litro (7-8 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,009246-0,063401 % (por ejemplo, aproximadamente 0,009 % a aproximadamente 0,065 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,1-2,4 mL/litro (8-9 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,010567-0,071327 % (por ejemplo, aproximadamente 0,010 % a aproximadamente 0,070 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación de remojo de semillas de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración

en el intervalo de 2,4-2,6 mL/litro (9-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,011888-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,012 % a aproximadamente 0,080 %).

Aplicación al suelo

5 En otra realización, la administración del tratamiento con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender poner en contacto el suelo en la vecindad inmediata de la semilla sembrada o planta con una cantidad eficaz de la composición líquida. En algunas realizaciones, la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica se puede suministrar al suelo por inyección en un sistema de riego de bajo volumen, tal como un sistema de riego por goteo que suministra agua por debajo del suelo a través de conductos perforados o al nivel del suelo por conductos de fluido que cuelgan por encima del suelo o que sobresalen del suelo. En algunas realizaciones, la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica se puede suministrar al suelo por un método de inundación del suelo en donde la composición líquida se vierte sobre el suelo.

15 La composición basada en *Chlorella* mixotrófica se puede diluir hasta una concentración más baja para 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 completas de *Chlorella* mixotrófica que dan como resultado la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje de sólidos original en la composición por la relación entre el volumen de la composición y el volumen de agua. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,92-2,6 mL/litro (3,5-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,004623-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,004 % a aproximadamente 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,92-1,1 mL/litro (3,5-4 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,004623-0,031701 % (por ejemplo, aproximadamente 0,004 % a aproximadamente 0,032 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,1-1,3 mL/litro (4-5 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,005283-0,039626 % (por ejemplo, aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,040 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,3-1,6 mL/litro (5-6 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,006604-0,047551 % (por ejemplo, aproximadamente 0,006 % a aproximadamente 0,050 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,6-1,8 mL/litro (6-7 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,007925-0,055476 % (por ejemplo, aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,055 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,8-2,1 mL/litro (7-8 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,009246-0,063401 % (por ejemplo, aproximadamente 0,009 % a aproximadamente 0,065 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,1-2,4 mL/litro (8-9 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,010567-0,071327 % (por ejemplo, aproximadamente 0,010 % a aproximadamente 0,075 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,4-2,6 mL/litro (9-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,011888-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,012 % a aproximadamente 0,080 %).

50 En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,26-13,2 mL/litro (1-50 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,001321-0,396258 % (por ejemplo, aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,400 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,26-2,6 mL/litro (1-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,001321-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,52-1,8 mL/litro (2-7 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,002642-0,055476 % (por ejemplo, aproximadamente 0,003 % a aproximadamente 0,055 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,6-5,3 mL/litro (10-20 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 %

hasta 0,013201-0,158503 % (por ejemplo, aproximadamente 0,013 % a aproximadamente 0,160 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 5,3-7,9 mL/litro (20-30 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,026417-0,237755 % (por ejemplo, aproximadamente 0,025 % a aproximadamente 0,250 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 7,9-11,8 mL/litro (30-45 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,039626-0,356631 % (por ejemplo, aproximadamente 0,040 % a aproximadamente 0,360 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 7,9-10,5 mL/litro (30-40 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,039626-0,317007 % (por ejemplo, aproximadamente 0,040 % a aproximadamente 0,320 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación al suelo de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 10,5-13,2 mL/litro (40-50 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,052834-0,396258 % (por ejemplo, aproximadamente 0,055 % a aproximadamente 0,400 %).

La tasa de aplicación de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a la concentración deseada se puede expresar como un volumen por área. En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 468-1402,5 litros/hectárea (50-150 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 701,3-1168,8 litros/hectárea (75-125 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 468-701,3 litros/hectárea (50-75 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 701,3-935 litros/hectárea (75-100 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 935-1168,8 litros/hectárea (100-125 galones/acre). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo puede comprender una tasa en el intervalo de 1168,8-1402,5 litros/hectárea (125-150 galones/acre).

La frecuencia de la aplicación de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se puede expresar como el número de aplicaciones por periodo de tiempo (por ejemplo, dos aplicaciones por mes), o por el periodo 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 basada en *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 basada en *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 basada en *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 basada en *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 basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo cada 21-28 días.

La(s) aplicación (aplicaciones) al suelo de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica empiezan, en general, después de que la planta se haya establecido, pero pueden empezar antes del establecimiento, en un periodo de tiempo definido después de la siembra, o en un periodo de tiempo definido después de la brotación del suelo en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 5-14 días después de que la planta haya brotado del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 5-7 días después de que la planta haya brotado del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 7-10 días después de que la planta haya brotado del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 10-12 días después de que la planta haya brotado del suelo. En algunas realizaciones, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación al suelo 12-14 días después de que la planta haya brotado del suelo.

Aplicación de acción capilar

En otra realización, la administración del tratamiento con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender primero poner en remojo la semilla en agua, sacar la semilla del agua, secar la semilla, aplicar una cantidad eficaz de la composición líquida debajo del nivel de siembra de la semilla en el suelo, y sembrar la semilla, en donde la composición líquida se suministra a la semilla desde debajo por acción capilar. En algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo en agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 90-150 minutos. En

algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo en agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 110-130 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo en agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 90-100 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo en agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 100-110 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo en agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 110-120 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo en agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 120-130 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo en agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 130-140 minutos. En algunas realizaciones, la semilla se puede poner en remojo en agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 140-150 minutos.

La composición basada en *Chlorella* mixotrófica se puede diluir hasta una concentración más baja para una cantidad eficaz en una aplicación de acción capilar mezclando un volumen de la composición en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica que da como resultado la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje de sólidos original en la composición por la relación entre el volumen de la composición y el volumen de agua. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de acción capilar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,6-2,6 mL/litro (6-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,007925-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,080 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de acción capilar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,8-2,4 mL/litro (7-9 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,009245-0,071327 % (por ejemplo, aproximadamente 0,009 % a aproximadamente 0,075 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de acción capilar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,6-1,8 mL/litro (6-7 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,007925-0,05547 % (por ejemplo, aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,055 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de acción capilar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,8-2,1 mL/litro (7-8 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,009246-0,063401 % (por ejemplo, aproximadamente 0,009 % a aproximadamente 0,065 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de acción capilar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,1-2,4 mL/litro (8-9 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,010567-0,071327 % (por ejemplo, aproximadamente 0,010 % a aproximadamente 0,075 %). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz en una aplicación de acción capilar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,4-2,6 mL/litro (9-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,011888-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,012 % a aproximadamente 0,080 %).

Aplicación foliar

En una realización de la descripción, la administración del tratamiento con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender poner en contacto el follaje de la planta con una cantidad eficaz de la composición líquida. En algunas realizaciones de la descripción, la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica se puede pulverizar sobre el follaje por un pulverizador manual, un pulverizador en una herramienta de agricultura, un aspersor, un sistema de amplia distribución tal como un avión fumigador, o similares.

La composición basada en *Chlorella* mixotrófica se puede diluir hasta una concentración más baja para una cantidad eficaz en una aplicación foliar mezclando un volumen de la composición en un volumen de agua. El porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica que da como resultado la composición diluida se puede calcular multiplicando el porcentaje de sólidos original en la composición por la relación entre el volumen de la composición y el volumen de agua. En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,53-2,6 mL/litro (2-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,002642-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,003 % a aproximadamente 0,080 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,53-0,79 mL/litro (2-3 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,002642-0,023775 % (por ejemplo, aproximadamente 0,003 % a aproximadamente 0,025 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 0,79-1,1 mL/litro (3-4 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,003963-0,031701 % (por ejemplo, aproximadamente 0,004 % a aproximadamente 0,035 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,1-1,3 mL/litro (4-5 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de

Chlorella mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,005283-0,039626 % (por ejemplo, aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,040 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,3-1,6 mL/litro (5-6 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,006604-0,047551 % (por ejemplo, aproximadamente 0,007 % a aproximadamente 0,050 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,6-1,8 mL/litro (6-7 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,007925-0,055476 % (por ejemplo, aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,055 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 1,8-2,1 mL/litro (7-8 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,009246-0,063401 % (por ejemplo, aproximadamente 0,009 % a aproximadamente 0,065 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,1-2,4 mL/litro (8-9 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,010567-0,071327 % (por ejemplo, aproximadamente 0,010 % a aproximadamente 0,070 %). En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad eficaz en una aplicación foliar de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica puede comprender una concentración en el intervalo de 2,4-2,6 mL/litro (9-10 mL/galón), dando como resultado una reducción del porcentaje de sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica desde 5-30 % hasta 0,011888-0,079252 % (por ejemplo, aproximadamente 0,012 % a aproximadamente 0,080 %).

La tasa de aplicación de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a la concentración deseada se puede expresar como un volumen por área. En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 93,5-467,5 litros/hectárea (10-50 galones/acre). En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 93,5-140,3 litros/hectárea (10-15 galones/acre). En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 140,3-187 litros/hectárea (15-20 galones/acre). En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 187-233,8 litros/hectárea (20-25 galones/acre). En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 233,8-280,5 litros/hectárea (25-30 galones/acre). En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 280,5-327,3 litros/hectárea (30-35 galones/acre). En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 327,3-374 litros/hectárea (35-40 galones/acre). En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 374-420,8 litros/hectárea (40-45 galones/acre). En algunas realizaciones de la descripción, la tasa de aplicación de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar puede comprender una tasa en el intervalo de 420,8-467,5 litros/hectárea (45-50 galones/acre).

La frecuencia de la aplicación de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se puede expresar como el número de aplicaciones por periodo de tiempo (por ejemplo, dos aplicaciones por mes), o por el periodo de tiempo entre aplicaciones (por ejemplo, una aplicación cada 21 días). En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 3-28 días, o más. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 4-10 días. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 18-24 días. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 3-7 días. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 7-14 días. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 14-21 días. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar cada 21-28 días.

La(s) aplicación (aplicaciones) foliar(es) de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica empiezan, en general, después de que la planta se haya establecido, pero pueden empezar antes del establecimiento, en un periodo de tiempo definido después de la siembra, o en un periodo de tiempo definido después de la brotación del suelo en algunas realizaciones. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 5-14 días después de que la planta haya brotado del suelo. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 5-7 días después de que la planta haya

5 brotado del suelo. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 7-10 días después de que la planta haya brotado del suelo. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 10-12 días después de que la planta haya brotado del suelo. En algunas realizaciones de la descripción, la planta se puede poner primero en contacto con la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en una aplicación foliar 12-14 días después de que la planta haya brotado del suelo.

Aplicación hidropónica

10 En otra realización de la descripción, la administración de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica a una semilla o planta puede comprender aplicar la composición en combinación con un medio nutritivo a las semillas dispuestas y a plantas que crecen en un medio de crecimiento hidropónico o un medio de crecimiento inerte (por ejemplo, cáscaras de coco). La composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica se puede aplicar múltiples veces al día, por semana, o por periodo vegetativo.

15 Se ejemplifican realizaciones de la invención y se describen realizaciones adicionales con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 (no según la invención)

20 Se analizaron para contenido muestras de células completas de *Chlorella* mixotróficamente cultivadas. Los resultados del análisis de muestras y los intervalos extrapolados basados en desviaciones estándar se muestran en la Tabla 4, indicando NA niveles que fueron demasiado bajos para la detección. Los resultados del análisis de proteínas se presentan en una base en peso seco, mientras que los restantes resultados se presentan en una base húmeda.

Tabla 4

	Muestra Nº				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
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)	NA	< 1,0	< 1,0	< 1,0	0,1-1,0
Cobre (ppm)	NA	180	18	14	1-300
Mercurio (ppm)	NA	< 2,0	< 2,0	< 2,0	0,1-2,0
Molibdeno (ppm)	NA	< 2,5	< 2,5	< 2,5	0,1-2,5
Sodio (ppm)	2500	5400	3300	2400	1.000-6.800
Níquel (ppm)	NA	< 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)	NA	< 5,0	< 5,0	< 5,0	0,1-5,0

Ejemplo 2 (no según la invención)

25 Se analizaron para contenido de aminoácidos muestras de células completas de *Chlorella* mixotróficamente cultivadas. Los resultados del análisis de 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

Ejemplo 3 (no según la invención)

Se analizaron para contenido de hidratos de carbono muestras de células completas de *Chlorella* mixotróficamente cultivadas. Los resultados del análisis de muestras y los intervalos extrapolados se muestran en las Tablas 6-7.

5

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
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

Ejemplo 4 (no según la invención)

5

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

10

Tabla 8

	Muestra N°				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)	NA	NA	NA	NA	
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)	NA	NA	NA	NA	
Cinc (ppm)	NA	NA	NA	NA	
Arsénico (ppm)	NA	NA	NA	NA	
Cadmio (ppm)	NA	NA	NA	NA	
Cobalto (ppm)	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$	0,00001-0,000013
Cromo (ppm)	NA	NA	NA	NA	
Cobre (ppm)	$5,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	NA	$3,9 \times 10^{-4}$	0,00002-0,00006
Mercurio (ppm)	NA	NA	NA	NA	0,1-2,0
Molibdeno (ppm)	NA	NA	NA	NA	0,1-2,5
Sodio (ppm)	0,047	0,028	0,028	0,022	0,017-0,058
Níquel (ppm)	NA	NA	NA	NA	
Plomo (ppm)	NA	NA	NA	NA	
Selenio (ppm)	NA	NA	NA	NA	
Recuento aerobio en placa FSNS N° 1.1	380.000	130.000	91.000	56.000	80.000-400.000

	Muestra N°				Intervalo
	1	2	3	4	
(FDA-BAM) (Est UFC/mL)					
Salmonella FSNS N° 32.2 (ELFA-AOAC)	(-) 25 gramos	(-) 25 gramos	(-) 25 gramos	(-) 25 gramos	0
Staphylococcus aureus FSNS N° 11.1 (FDA-BAM) (UFC/mL)	<10	<10	<10	<10	0,1-10
Recuento de coliformes MPN FSNS N° 7.1 (FDA-BAM) (MPN/mL)	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	0,1-3,0
E. coli MPN FSNS N° 7.1 (FDA-BAM) (MPN/mL)	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	0,1-3,0
Recuento de mohos FSNS N° 4.1 (FDA-BAM) (UFC/mL)	<10	<10	<10	<10	0,1-10
Recuento de levaduras FSNS N° 4.1 (FDA-BAM) (UFC/mL)	<10	<10	10	<10	0,1-15

Ejemplo 5 (no según la invención)

Se analizaron muestras de células completas de *Chlorella* mixotrófica y composiciones basadas en *Chlorella* mixotrófica de baja concentración que comprendían 10 % en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica, <0,1 % de ácido fosfórico, 0,3 % de sorbato de potasio, y el resto agua, por el National Research Council Canada (Ottawa, Ontario) para contenido de fitohormonas. Las composiciones basadas en *Chlorella* mixotrófica usadas en este ejemplo no se analizaron para cuantificar bacterias en las composiciones, sin embargo, recuentos aerobios en placa para composiciones previas preparadas con los mismos componentes del mismo modo contuvieron 40.000-400.000 UFC/mL. Todas las muestras de células completas de *Chlorella* mixotrófica se tuvieron que secar para el análisis, y los resultados se informan con respecto al peso seco (DW). Dos muestras de células completas de *Chlorella* mixotrófica analizadas contuvieron *Chlorella* mixotrófica que había sido secada por un secador de tambor antes del análisis, que consistió en una muestra donde las células completas de *Chlorella* mixotrófica se habían almacenado previamente en un congelador (antiguas) y una muestra donde las células completas de *Chlorella* mixotrófica no se habían almacenado previamente (nuevas). Se usó una muestra de células completas de *Chlorella* mixotrófica que se liofilizó antes del análisis como la aproximación más cercana del contenido de células de *Chlorella* mixotrófica que no habían sido sometidas a un proceso de secado. Se obtuvieron muestras de *Chlorella vulgaris* secadas fototróficamente cultivadas de Hoosier Hill Farm LLC (Angola, Indiana).

Las muestras de composición basada en *Chlorella* mixotrófica de baja concentración se analizaron como muestras líquidas, y los resultados se informan con respecto al peso fresco (FW). Una muestra contuvo composición basada en *Chlorella* mixotrófica que había sido previamente almacenada en un congelador (antigua) y una muestra contuvo composición basada en *Chlorella* mixotrófica que no había sido previamente almacenada (fresca). Los resultados del análisis de muestras se muestran en las Tablas 9-12, con n.d. indicado donde no se detectó el metabolito. ng/g indicado es equivalente a niveles de partes por billón (ppb).

Tabla 9

Muestra sólida	ABA y metabolitos de ABA (ng/g DW)				
	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 FW)				
	ABA	ABAGE	PA	Neo-PA	t-ABA
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

Las fitohormonas en la Tabla 9 se abrevian del siguiente modo: ABA = ácido cis-abscísico; ABAGE = éster de glucosa de ácido abscísico; PA = ácido faséico; Neo-PA = ácido neo-faséico; 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 las muestras de células de *Chlorella* fototrófica. Ninguna de las muestras de composición basada en *Chlorella* mixotrófica de baja concentración mostró niveles detectables de ABA y metabolitos de ABA.

Tabla 10

Muestra sólida	Citoquininas (ng/g DW)							
	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
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Secada en tambor (fresca)	n.d.	n.d.	<1,2	6	233	1	<1	4
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Liofilizada (almacenada)	n.d.	3	14	11	42	<1	6	3
Muestra líquida	Citoquininas (ng/g FW)							
	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 del siguiente modo: 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 composición mostraron niveles detectables de t-ZOG, c-Z, c-ZR, iP e iPR, que indica que someter la composición basada en *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* mixotrófica mostraron mayor contenido de t-ZR que las muestras de células de *Chlorella* fototrófica. Las muestras de composición basada en *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 DW)				
	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.
Muestra líquida	Auxinas (ng/g FW)				
	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 del siguiente modo 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; e 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* mixotrófica mostraron niveles de IAA superiores a las muestras de células de *Chlorella* fototrófica. Las muestras de composición mostraron niveles detectables de IAA, que indica que someter la composición basada en *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 DW)							
	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.						
<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.
Muestra líquida	Giberelinas (ng/g FW)							
	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 del siguiente modo: 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 composición mostró niveles detectables de giberelinas.

Ejemplo 6

Se realizó un experimento para determinar si la aplicación de una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica a semillas de tomate plantadas en el suelo afectó a la tasa a la que las plántulas brotan del suelo. Los tomates son parte de la familia *Solanaceae*. Se sembraron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en bandejas con una mezcla estándar de tierra para macetas para plantas sin suelo. Se compararon diez tratamientos con un control no tratado (abreviadamente en lo sucesivo UTC por la expresión inglesa *Untreated Control*) y se enumeran en la Tabla 13, siendo duplicados los tratamientos 3 y 9. Los tratamientos consistieron en un tratamiento donde la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se había secado por un secador de tambor (abreviadamente en lo sucesivo DD por la expresión inglesa *Drum Drier*) antes de la formulación para el tratamiento, y dos tratamientos donde la composición basada en *Chlorella* mixotrófica no se había secado (húmeda). La composición basada en *Chlorella* mixotrófica en los tratamientos 3 y 9 no se sometió a un proceso de secado o lisis. Se lisó mecánicamente biomasa extraída de *Haematococcus pluvialis* antes de someterse a un proceso de extracción con dióxido de carbono supercrítico. Se lisaron mecánicamente las células lisadas de *Galdieria* sp. mixotróficamente cultivadas. El tratamiento con medio de cultivo BG-11 consistió en el mismo medio de cultivo usado en el proceso de cultivo de *Chlorella* mixotrófica. El tratamiento con medio centrifugado consistió en medios cultivados separados de un cultivo de *Chlorella* mixotrófica por centrifugadora al final del proceso de cultivo (es decir, una vez se recogió la *Chlorella* mixotrófica). Se obtuvo un producto basado en extracto de macroalgas comercialmente disponible de Acadian Seaplants Limited (30 Brown Avenue, Dartmouth, Nueva Escocia, Canadá, B3B 1X8) para comparación. También se probó el producto comercialmente disponible Transit Soil de FBSciences, Inc. (153 N Main Street, Ste 100, Collierville, TN 38017).

Tabla 13

Tratamiento N°	Descripción del tratamiento
1	UTC - control no tratado de agua
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas secadas en tambor (DD)
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas (Terreno húmedo 1)
4	<i>Haematococcus pluvialis</i> fototrófica - Biomasa extraída
5	<i>Galdieria</i> sp. mixotrófica - Células completas
6	<i>Galdieria</i> sp. mixotrófica - Células lisadas
7	Medio centrifugado de cultivo de <i>Chlorella</i> sp. mixotrófica
8	Medio de cultivo de BG-11
9	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas (Terreno húmedo 2)
10	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian
11	Producto estándar para agricultores - Transit Soil

Se pasteurizaron los tratamientos, se normalizaron a 10 % de sólidos (para los tratamientos con sólidos de microalgas),

y se estabilizaron con ácido fosfórico (H₃PO₄) y sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), consistiendo el resto en agua. Se congelaron y descongelaron previamente las composiciones basadas en *Chlorella* mixotrófica, y se incorporaron en los tratamientos formulados usados en este experimento después del almacenamiento en frío tras ser recogidas del sistema de cultivo de microalgas. Las composiciones basadas en *Chlorella* mixotrófica usadas en los tratamientos de este experimento no se analizaron para cuantificar bacterias en las composiciones, sin embargo, recuentos aerobios en placa para composiciones previas preparadas con los mismos componentes del mismo modo contuvieron 40.000-400.000 UFC/mL.

Todos los tratamientos se aplicaron a las semillas a la baja concentración de 1,24 mL/litro (4,73 mL/galón). El método de tratamiento consistió en inundar el suelo a una tasa de 935 litros/hectárea (100 galones/acre) usando una regadera. Los tratamientos se aplicaron inmediatamente después de sembrar las semillas. La concentración probada de 1,24 mL/litro (4,73 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,012495 %.

Cada tratamiento se aplicó a 100 semillas plantadas en un patrón de 10 por 10 en bandejas de siembra, contando cada fila de diez como réplica (10 réplicas totales). Se hicieron diariamente observaciones visuales para registrar el porcentaje de plantas que habían brotado del suelo. La norma usada para evaluar la brotación fue la etapa de hipocótilo donde era visible un tallo que sobresalía de la mezcla de tierra para macetas. El experimento se realizó dentro de un invernadero con todas las semillas y tratamientos sometidos a las mismas condiciones controladas que incluyeron temperatura y luz. 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 clasificados como significativos se establecieron así utilizando el intervalo múltiple de la nueva prueba de Duncan a un nivel de confianza del 90 %, de forma que valores con un identificador significativo estadístico de la misma letra no son significativamente diferentes.

Los resultados se muestran en la Tabla 14-18 con identificadores complementarios de agrupamiento por significación estadística.

Tabla 14

Brotadura de plantas (% promedio de plantas brotadas 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
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	bc
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

Brotadura de plantas (% promedio de plantas brotadas 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

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

5

Tabla 16

Brotadura de plantas (% promedio de plantas brotadas en el tiempo de observación)					
	Control no tratado de agua (UTC)	Células completas de <i>Chlorella</i> sp. mixotrófica (Tratamiento 3)	% de aumento con respecto al UTC	Células completas de <i>Chlorella</i> sp. mixotrófica (Tratamiento 9)	% de aumento con respecto a UTC
Día 1 AM	0 a	0 a		0 a	
Día 1 PM	0 c	3 c		8 ab	
Día 2 AM	0 d	6 d		10 ab	
Día 2 PM	2 f	24 d	1100 %	42 b	2000 %
Día 3 AM	3d	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 %

La Tabla 16 muestra los tratamientos 3 y 9 que comprenden la composición basada en *Chlorella* mixotrófica con respecto al UTC. Como se muestra en la Tabla 16, los tratamientos 3 y 9 empezaron a brotar del suelo en el día 1 PM, mientras que el tratamiento UTC no empezó la brotadura hasta el Día 2 PM y se quedó atrás de los tratamientos 3 y 9 por un margen estadísticamente significativo en la mayoría de los días hasta el Día 5 PM. De las parcelas que recibieron tratamientos que comprendían la composición basada en *Chlorella* mixotrófica, el tratamiento 3 demostró una diferencia estadísticamente significativa del UTC en el Día 2 PM, Día 3 PM, Día 4 AM, Día 4 PM y Día 5 AM, y el tratamiento 9 demostró una diferencia estadísticamente significativa del UTC desde el Día 1 PM hasta el Día 5 AM. Los tratamientos 3 y 9 también alcanzaron al menos 70 % de brotadura un día antes que el UTC, y mantuvieron un aumento numérico de al menos 27 % con respecto al UTC hasta el Día 5 AM.

10

15

Tabla 17

Brotadura de plantas (% promedio de plantas brotadas en el tiempo de observación)				
	Control no tratado (UTC)	<i>Chlorella</i> mixotrófica DD (Tratamiento 2)	Terreno húmedo 1 con <i>Chlorella</i> mixotrófica (Tratamiento 3)	Terreno húmedo 2 con <i>Chlorella</i> mixotrófica (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	6 d	10 ab
Día 2 PM	2 f	1 f	24 d	42 b
% con respecto a UTC		-50 %	1100 %	2000 %
% con respecto a DD			2300 %	4100 %
Día 3 AM	3d	2d	23 bcd	45 ab
% con respecto a UTC		-33 %	667 %	1400 %
% con respecto a DD			1050 %	2150 %
Día 3 PM	16 d	21 d	60 b	72 a
% con respecto a UTC		31 %	275 %	350 %
% con respecto a DD			186 %	242 %
Día 4 AM	17 g	24 g	65 abc	73 ab
% con respecto a UTC		41 %	282 %	329 %
% con respecto a DD			171 %	204 %
Día 4 PM	47 g	55 fg	70 b-e	80 ab
% con respecto a UTC		17 %	49 %	70 %
% con respecto a DD			27 %	45 %
Día 5 AM	55 e	56 e	79 abc	83 ab
% con respecto a UTC		2 %	44 %	51 %
% con respecto a DD			41 %	48 %
Día 5 PM	76 a	77 a	83 a	85 a
% con respecto a UTC		1 %	9 %	12 %
% con respecto a DD			8 %	10 %
Día 6 PM	83 a	84 a	82 a	88 a
% con respecto a UTC		1 %	-1 %	6 %
% con respecto a DD			-2 %	5 %
Día 7 PM	84 a	87 a	78 a	87 a
% con respecto a UTC		4 %	-7 %	4 %
% con respecto a DD			-10 %	0 %

Como se muestra en la Tabla 17, los dos tratamientos que comprendían composición húmeda basada en *Chlorella* mixotrófica brotaron del suelo más rápido que el UTC y el tratamiento que comprendía composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD. De las parcelas que recibieron tratamientos que comprendían composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda, la primera parcela demostró una diferencia estadísticamente significativa del UTC y el tratamiento que comprendía composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD en el Día 2 PM, Día 3 PM, Día 4 AM, Día 4 PM y Día 5 AM, y la segunda parcela demostró una diferencia estadísticamente significativa del UTC y el tratamiento que comprendía composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD desde el Día 1 PM hasta el Día 5 AM. Los tratamientos que comprendían composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda también alcanzaron al menos 70 % de brotadura un día antes que el UTC y el tratamiento que comprendía composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD, y mantuvieron un aumento numérico de al menos 27 % con respecto al UTC y el tratamiento que comprendía composición basada en *Chlorella* DD hasta el Día 5 AM. El rendimiento del tratamiento que comprendía composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD reprodujo en gran medida el rendimiento del UTC, sin diferencia estadísticamente significativa durante el transcurso del experimento y aumento numérico por encima de 10 % en solo el Día 3 PM hasta el Día 4 PM. Así, los resultados indican que secar la composición basada en *Chlorella* mixotrófica

con un secador de tambor en el proceso de preparación redujo la eficacia de las composiciones para acelerar la brotación de las plantas de tomate cuando se aplicó como inundación del suelo.

Tabla 18

Brotadura de plantas (% promedio de plantas brotadas en el día 4 AM)			
	22-Mayo AM		% de aumento con respecto al UTC
UTC - control no tratado de agua	17	f	
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas secadas en tambor (DD)	24	f	41 %
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas (promedio de los Terrenos húmedos 1 y 2)	69	ab	306 %
<i>Haematococcus pluvialis</i> fototrófica - Biomasa extraída	61	bcd	259 %
<i>Galdieria</i> sp. mixotrófica - Células completas	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 de BG-11	56	cde	229 %
Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian	62	abc	265 %
Producto estándar para agricultores - Transit Soil	47	de	176 %

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

Ejemplo 7

15 Se realizó un experimento para determinar si el método de aplicación de una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica a semillas de tomate plantadas en suelo afectó a la tasa a la que las plántulas brotan del suelo y maduran. Se plantaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en bandejas con una mezcla de tierra para macetas de musgo blanco, perlita y vermiculita (2:1:1). Se compararon tres tratamientos que comprendían una composición basada en *Chlorella* mixotrófica con un control no tratado (UTC). Se pasteurizaron los tratamientos, se normalizaron a 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. Se congeló la composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada después de ser recogida del sistema de cultivo de microalgas y se descongeló antes de la formulación en la composición líquida para los tratamientos usados en el experimento. No se congeló previamente la composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca, y se incorporó en la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento directamente después de ser recogida del sistema de cultivo de microalgas. No se analizó la composición usada en los tratamientos de este experimento para cuantificar bacterias en las composiciones, sin embargo, recuentos aerobios en placa para composiciones previas preparadas con los mismos componentes del mismo modo contuvieron 40.000-400.000 UFC/mL.

20 Se aplicaron los tratamientos de composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica a las semillas a través de dos métodos de tratamiento diferentes. El primer método de tratamiento comprendió poner en remojo las semillas en la concentración baja de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante dos horas con burbujeo constante de aire para evitar la privación de oxígeno, sacar las semillas de la composición, secar las semillas durante la noche, y luego plantar las semillas en la mezcla de tierra para macetas. El segundo método de tratamiento comprendió poner en remojo las semillas en agua durante dos horas con burbujeo constante de aire para evitar la privación de oxígeno, sacar las semillas del agua, secar las semillas durante la noche, plantar las semillas en la mezcla de tierra para macetas con la concentración baja de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en la base de la bandeja de siembra para permitir tratar las semillas con la composición líquida a través de acción capilar. La concentración probada de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,021134 %.

Se aplicaron cada uno de los tres tratamientos a 72 semillas. Se hicieron diariamente observaciones visuales del suelo

5 y las plantas en los días 6 y 7 para registrar cuántas semillas habían alcanzado la brotadura y maduración, como se explica a continuación. La norma usada para evaluar la brotadura fue el logro de la etapa de hipocótilo, donde era visible un tallo que sobresalía de la mezcla de tierra para macetas. La norma usada para evaluar la maduración fue el logro de la etapa de cotiledón, donde se habían formado visiblemente dos hojas en el tallo brotado. El experimento se realizó en el interior con todas las semillas y tratamientos sometidos a las mismas condiciones controladas que incluyeron temperatura, luz y suministro de agua. No se suministraron otros nutrientes durante el experimento. La luz suministrada fue artificial y se proporcionó por bombillas fluorescentes 24 horas al día. Los resultados del experimento se presentan en las Tablas 19-24.

Tabla 19

	Número de plantas brotadas por día	
	Día 6	Día 7
Control no tratado (UTC)	28	42
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Empapada fresca	22	46
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Remojada almacenada	26	47
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Capilar fresca	43	58

Tabla 20

	% de plantas totales brotadas por día	
	Día 6	Día 7
Control no tratado (UTC)	39	58
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Empapada fresca	31	64
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Remojada almacenada	36	65
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Capilar fresca	60	81

Tabla 21

	% de aumento de plantas brotadas por día con respecto a UTC	
	Día 6	Día 7
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Empapada fresca	-21 %	10 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Remojada almacenada	-7 %	12 %
10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica Capilar fresca	54 %	38 %

15 Como se muestra en las Tablas 19-21, el tratamiento por acción capilar y los tratamientos por remojo de semillas mostraron mayor rendimiento en el día siete que el UTC en lo que respecta a la brotadura de las plantas. En el día siete el tratamiento por acción capilar mostró un aumento de 38 %, el tratamiento por remojo de semilla con composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada mostró un aumento de 12 %, y el tratamiento por remojo de semilla con composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca mostró un aumento de 10 % con respecto al UTC.

20 Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica es eficaz en aumentar la brotadura de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación por acción capilar.

Tabla 22

	Número de plantas maduras por día	
	Día 6	Día 7
Control no tratado (UTC)	11	37
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	18	41
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	18	39
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	23	47

Tabla 23

	% de plantas totales maduradas por día	
	Día 6	Día 7
Control no tratado (UTC)	15	51
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	25	57
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	25	54
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	32	65

Tabla 24

	% de aumento de plantas maduradas por día con respecto al UTC	
	Día 6	Día 7
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	64 %	11 %
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	64 %	5 %
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	109 %	27 %

5 Como se muestra en las Tablas 22-24, el tratamiento por acción capilar y los tratamientos por remojo de semillas mostraron mayor rendimiento en los días 6 y 7 que el UTC en lo que respecta a la maduración de las plantas. El tratamiento por acción capilar mostró un aumento de al menos 27 %, el tratamiento por remojo de semilla con composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada mostró un aumento de al menos 5 %, y el tratamiento por remojo de semilla con composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca mostró un aumento de al menos 11 % con respecto al UTC. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica es eficaz en aumentar la maduración de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación por acción capilar.

Ejemplo 8

15 Se realizó un experimento para determinar si el método de aplicación de una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica a semillas de tomate plantadas en suelo afectó a la tasa a la que las plántulas brotaban del suelo y maduraban. Se plantaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en bandejas con una mezcla de tierra para macetas de musgo blanco, perlita y vermiculita (2:1:1). Se compararon dos tratamientos que comprendían una composición basada en *Chlorella* mixotrófica mixotróficamente cultivada con un control no tratado (UTC). Se pasteurizaron los tratamientos, se normalizaron a 10 % de sólidos y se estabilizaron con ácido fosfórico (H₃PO₄) y sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), consistiendo el resto en agua. No se congeló previamente la composición basada en *Chlorella* mixotrófica, y se incorporó en la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento directamente después de ser recogida del sistema de cultivo de microalgas. La composición usada en los tratamientos de este experimento no se analizó para cuantificar bacterias en la composición, sin embargo, recuentos aerobios en placa para composiciones previas preparadas con los mismos componentes del mismo modo contuvieron 40.000-400.000 UFC/mL.

20 Se aplicó la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica a las semillas a dos concentraciones diferentes, 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) o 2,1 mL/litro (8 mL/galón), usando el mismo método de tratamiento. La concentración probada de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,012416 %. La concentración probada de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,021134 %. El método de tratamiento consistió en inundar el suelo desde arriba con 2,9 litros (0,75 galones) de la composición líquida (equivalente a una tasa de aplicación de 935 litros/hectárea (100 galones/acre)) a las concentraciones identificadas después de plantar las semillas.

30 Se aplicaron cada uno de los dos tratamientos a dos bandejas de 72 semillas. Se hicieron diariamente observaciones visuales del suelo y las plantas para registrar cuántas semillas habían alcanzado la brotación y maduración, como se explica a continuación. La norma usada para evaluar la brotación fue el logro de la etapa de hipocótilo donde era visible un tallo que sobresalía de la mezcla de tierra para macetas. La norma usada para evaluar la maduración fue el logro de la etapa de cotiledón donde se habían formado visiblemente dos hojas en el tallo brotado. El experimento se realizó en el interior con todas las semillas y tratamientos sometidos a las mismas condiciones controladas que

incluyeron temperatura, luz y suministro de agua. No se suministraron otros nutrientes durante el experimento. La luz suministrada fue artificial y se proporcionó por bombillas fluorescentes 24 horas al día. Los resultados del experimento se presentan en las Tablas 25-30.

Tabla 25

	Número de plantas brotadas por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control no tratado (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

5

Tabla 26

	% de plantas totales brotadas por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control no tratado (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 brotadas por día con respecto al 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 %

10 Como se muestra en las Tablas 25-27, las aplicaciones de 2,1 (8) y 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mostraron un rendimiento coherentemente más alto que el UTC en lo que respecta a la brotadura de las plantas, rindiendo la aplicación de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) coherentemente mejor que la de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón). La aplicación de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mostró al menos un 26 % y tanto como un aumento del 100 % con respecto al UTC en los días comparativos, y la aplicación de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) demostró al menos un 28 % y tanto como un aumento del 290 % con respecto al UTC. La mayor diferencia entre las aplicaciones de 1,2 (4,7) y 2,1 mL/litro (8 mL/galón) ocurrieron en el día 6. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica es eficaz en aumentar la brotadura de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación al suelo por inundación.

15

Tabla 28

	Número de plantas maduras por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control no tratado (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

20

Tabla 29

	% de plantas totales maduras por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control no tratado (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 maduras por día con respecto al 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 %

5 Como se muestra en las Tablas 28-30, las aplicaciones de the 2,1 (8) y 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mostraron un rendimiento coherentemente más alto que el UTC en lo que respecta a la maduración de las plantas, rindiendo la aplicación de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mejor que la de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) en los días 6, 8 y 9. La aplicación de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mostró al menos un 28 % y tanto como un aumento del 350 % con respecto al UTC en los días comparativos y la aplicación de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) demostró al menos un 22 % y tanto como un aumento del 300 % con respecto al UTC. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica es eficaz en aumentar la maduración de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación al suelo por inundación.

Ejemplo 9

15 Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a plantas de tomate reliquia (cv alemán rayado) por aplicación foliar afectó al crecimiento inicial y el dimensionado de las plantas. Se plantaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en bandejas con una mezcla estándar de tierra para macetas para plantas sin suelo y se cultivaron en un vivero. Se compararon los tratamientos de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica y un producto de referencia comercialmente disponible con un control no tratado (UTC) y se enumeran en la Tabla 31, probándose tratamientos duplicados de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica. Se obtuvo un producto basado en extracto de macroalgas comercialmente disponible de Acadian Seaplants Limited (30 Brown Avenue, Dartmouth, Nueva Escocia, Canadá, B3B 1X8) para comparación.

Tabla 31

Tratamiento Nº	Descripción del tratamiento
1	UTC - control no tratado de agua
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas secadas en tambor (DD)
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas (Terreno húmedo 1)
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas (Terreno húmedo 2)
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian

25 Se pasteurizó la composición basada en *Chlorella* mixotrófica, se normalizó a 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 completas de *Chlorella* mixotrófica no se sometieron previamente a un proceso de purificación para aislar las células del medio de cultivo de microalgas, ni las células se sometieron previamente a un proceso de secado, extracción u otro proceso que pudiera lisar o romper las paredes celulares, excepto como se indica para el tratamiento de secado en tambor. No se analizó la composición que comprendía *Chlorella* mixotrófica usada en los tratamientos de este experimento para cuantificar bacterias en las composiciones, sin embargo, recuentos aerobios en placa para composiciones previas preparadas con los mismos componentes del mismo modo contuvieron 40.000-400.000 UFC/mL. Se congeló y descongeló previamente la composición de *Chlorella* mixotrófica, y se incorporó en la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento después del almacenamiento en frío tras ser recogida del sistema de cultivo de microalgas.

35 Se aplicaron los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica a las plantas a una concentración de 1,1 mL/litro (4 mL/galón). La concentración probada de 1,1 mL/litro (4 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,010567 %. Se aplicó el tratamiento de Acadian a las plantas a una concentración de 2,49 mL/litro (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 233,8 litros/hectárea (25 galones/acre) usando un atomizador. Se aplicaron un total de tres aplicaciones ocurriendo la primera aplicación tres semanas después de la siembra (7-10 días después de la brotación). La segunda aplicación se aplicó cinco días después de la primera, y la tercera aplicación se aplicó seis días después de la segunda.

5 Cada tratamiento se aplicó a una bandeja de siembra de 0,36 m (14 pulgadas) por 0,36 m (14 pulgadas) que contenía plantas resultantes de 25-30 semillas. Hubo ocho réplicas de cada tratamiento. Todas las semillas se plantaron en mezcla estándar para plantas para maceta sin suelo. Cada planta analizada se contó como una réplica considerándose ocho réplicas para cada evaluación del tratamiento. El análisis ocurrió después del segundo tratamiento y después del
 10 tercer tratamiento. Se estimó el contenido de clorofila por un valor de SPAD (desarrollo de análisis tierra-planta), un valor numérico proporcionado por un medidor de SPAD de Minolta que analiza la cantidad de luz en un espectro específico de luz que pasa a través de una hoja y convierte esa lectura en un valor numérico como un indicador de la densidad de clorofila en la hoja. El experimento se realizó dentro de un invernadero con todas las semillas y tratamientos sometidos a las mismas condiciones controladas que incluyeron temperatura y luz. 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 clasificados como significativos se establecieron así utilizando el intervalo múltiple de la nueva prueba de Duncan a un nivel de confianza del 90 %, de forma que valores con un
 15 identificador significativo estadístico de la misma letra no son significativamente diferentes. Los resultados se muestran en las Tablas 32-37 designados con una F para aplicación foliar, con identificadores complementarios de agrupamiento por significación estadística.

Ejemplo 10

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

25 Se aplicaron a las plantas los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una baja concentración de 1,23 mL/litro (4,73 mL/galón). La concentración probada de 1,23 mL/litro (4,73 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,012495 %. Se aplicó el tratamiento de Acadian a las plantas a una concentración de 2,49 mL/litro (9,46 mL/galón). El método de tratamiento de baja concentración y baja frecuencia consistió en inundar el suelo a una tasa de 935 litros/hectárea (100 galones/acre). Se aplicaron un total de tres tratamientos ocurriendo la primera aplicación dos semanas después de la siembra (7-10 días después de la brotación). El segundo tratamiento se aplicó nueve días después del primero, y el tercer tratamiento se aplicó cinco días después del segundo. Todos los datos clasificados como significativos se establecieron así utilizando el intervalo múltiple de la nueva prueba de Duncan a un nivel de confianza del 90 %, de forma que valores con un identificador significativo estadístico de la misma letra no son significativamente diferentes. Los resultados se muestran en las Tablas 32-37 designados con una S para aplicación al suelo, con identificadores complementarios de agrupamiento por significación estadística.

Tabla 32

Dimensionado de plantas de tomate de vivero - Altura de la planta (pulgadas)					
		Promedio		Aumento con respecto a UTC	Aumento con respecto a DD
1	UTC - control no tratado de agua F	6,00	cde		
	UTC - control no tratado de agua S	5,85	ab		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD F	6,48	ab	8 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD S	5,53	bcd	-5 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 F	5,27	fg	-12 %	-18 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 S	5,20	def	-11 %	-6 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 F	6,13	abcd	2 %	-5 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 S	5,52	bcd	-6 %	0 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	5,94	de	-1 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	5,67	abc	-3 %	

35 Como se muestra en la Tabla 32, los tratamientos que comprendían composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron un aumento estadísticamente significativo o numérico con respecto al UTC en lo que respecta a la altura de la planta. Adicionalmente, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostró un aumento estadísticamente significativo o numérico con respecto al tratamiento de composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD.

Tabla 33

Dimensionado de plantas de tomate de vivero - Número de hojas					
		Promedio		Aumento con respecto a UTC	Aumento con respecto a DD
1	UTC - control no tratado de agua F	5,1	a		
	UTC - control no tratado de agua S	4,5	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD F	5,2	a	2 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD S	4,6	a	3 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 F	4,9	a	-2 %	-6 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 S	4,5	a	0 %	-2 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 F	5,3	a	4 %	2 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 S	4,4	a	-3 %	-4 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	4,9	a	-2 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	4,6	a	1 %	

Como se muestra en la Tabla 33, los tratamientos que comprendían la composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron una significancia estadística significativa con respecto al UTC o el tratamiento de composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD en lo que respecta al número de hojas.

5

Tabla 34

Contenido de clorofila de tomates de vivero (SPAD)					
		Promedio		Aumento con respecto a UTC	Aumento con respecto a DD
1	UTC - control no tratado de agua F	25,9	f		
	UTC - control no tratado de agua S	30,4	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD F	27,8	ef	7 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD S	29,1	a	-4 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 F	32,1	bcd	24 %	15 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 S	30,7	a	1 %	5 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 F	34,0	ab	31 %	22 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 S	32,7	a	8 %	12 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	34,5	ab	33 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	30,6	a	1 %	

Como se muestra en la Tabla 34, los tratamientos foliares que comprendían la composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda mostraron un aumento estadísticamente significativo con respecto al UTC y el tratamiento de composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD en lo que respecta al contenido de clorofila. Los tratamientos foliares también mostraron un aumento numérico con respecto al UTC de 24 % y 31 %, así como un aumento numérico con respecto al tratamiento de composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD de 15 % y 22 %. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces en mejorar el contenido de clorofila en plantas cuando se aplica al follaje. Los resultados también indican que secar la composición basada en *Chlorella* mixotrófica con un secador de tambor en el proceso de preparación redujo la eficacia de las composiciones para potenciar el contenido de clorofila de las plantas de tomate cuando se aplican en una aplicación foliar. Las aplicaciones al suelo que comprenden la composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron un aumento estadísticamente significativo o numérico con respecto al UTC o tratamiento de composición basada en *Chlorella* DD.

10

15

Tabla 35

Dimensionado de plantas de tomate de vivero - Peso de la planta completa (gramos)					
		Promedio		Aumento con respecto a UTC	Aumento con respecto a DD
1	UTC - control no tratado de agua F	6,8	d		
	UTC - control no tratado de agua S	7,1	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD F	9,2	ab	36 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD S	6,3	abc	-11 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 F	6,2	d	-8 %	-33 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 S	5,3	cdefg	-26 %	-16 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 F	10,6	ab	56 %	15 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 S	6,5	ab	-8 %	3 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	8,9	abc	31 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	4,6	efgh	-35 %	

5

10

Como se muestra en la Tabla 35, el tratamiento foliar que comprendía composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda en la parcela 2 mostró un aumento estadísticamente significativo con respecto al UTC y un aumento numérico de 56 % en lo que respecta al peso de la planta completa. La aplicación foliar del producto Acadian rindió menos, mostrando solo un aumento del 31 % con respecto al UTC. El tratamiento foliar que comprendía la composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda en la parcela 2 no mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al tratamiento de composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD, pero mostró un aumento numérico de 15 %. El tratamiento foliar en la parcela 1 y las aplicaciones al suelo que comprendían composición basada en *Chlorella* mixotrófica húmeda no mostraron un aumento estadísticamente significativo con respecto al UTC o el tratamiento de composición basada en *Chlorella* mixotrófica DD. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces en mejorar el peso de la planta completa cuando se aplican al follaje.

Tabla 36

Dimensionado de planas de tomate de vivero – Peso de la raíz (gramos)					
		Promedio		Aumento con respecto a UTC	Aumento con respecto a DD
1	UTC - control no tratado de agua F	2,2	bc		
	UTC - control no tratado de agua S	2,8	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD F	3,5	a	57 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD S	2,4	ab	-11 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 F	1,9	c	-12 %	-46 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 S	2,1	bc	-24 %	-13 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 F	3,3	a	51 %	-6 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 S	1,9	cd	-30 %	-21 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	2,8	ab	28 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	1,5	ef	-47 %	

5 Como se muestra en la Tabla 36, la aplicación foliar de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica en el tratamiento 4 (parcela húmeda 2) produjo una diferencia significativa del UTC en lo que respecta al peso de la raíz, que muestra un aumento de 51 % con respecto al UTC. La aplicación foliar de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica secada en tambor también produjo una diferencia significativa del UTC, con un aumento numérico de 57 %. La aplicación foliar del producto Acadian rindió menos, mostrando solo un aumento del 28 % con respecto al UTC. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces en mejorar el peso de la raíz en plantas cuando aplican al follaje.

Tabla 37

Dimensionado de plantas de tomate de vivero - Peso de los brotes (gramos)					
		Promedio		Aumento con respecto a UTC	Aumento con respecto a DD
1	UTC - control no tratado de agua F	4,6	cde		
	UTC - control no tratado de agua S	4,3	a		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD F	5,9	bc	29 %	
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas DD S	3,9	abc	-10 %	
3	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 F	4,3	e	-6 %	-27 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 1 S	3,2	cde	-27 %	-18 %
4	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 F	7,3	a	60 %	24 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas Terreno húmedo 2 S	4,6	a	6 %	18 %
5	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	6,1	ab	33 %	
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	3,1	cde	-28 %	

10

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

Ejemplo 11

30 Se realizó un experimento para determinar si el método de aplicación de una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica a semillas de judía verde (*Phaseolus vulgaris*) plantadas en el suelo afectó a la tasa a la que las plántulas brotan del suelo y maduran. Las judías verdes son parte de la familia Fabaceae. Se plantaron semillas de judía verde en bandejas con una mezcla de tierra para macetas de musgo blanco, perlita y vermiculita (2:1:1). Se compararon tres tratamientos que comprendían una composición basada en *Chlorella* mixotrófica con un control no tratado (UTC). Se pasteurizaron los tratamientos, se normalizaron a 10 % de sólidos y se estabilizaron con ácido fosfórico (H₃PO₄) y sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), consistiendo el resto en agua. Se congeló la composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada después de ser recogida del sistema de cultivo de microalgas y se descongeló antes de la formulación en la composición líquida para los tratamientos usados en el experimento. No se congeló previamente la composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca, y se incorporó en la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento directamente después de ser recogida del sistema de cultivo de microalgas. No se analizó la composición usada en los tratamientos de este experimento para cuantificar bacterias en

35

las composiciones, sin embargo, recuentos aerobios en placa para composiciones previas preparadas con los mismos componentes del mismo modo contuvieron 40.000-400.000 UFC/mL.

5 Se aplicaron los tratamientos de composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica a las semillas a través de dos métodos de tratamiento diferentes. El primer método de tratamiento comprendió poner en remojo las semillas en la concentración baja de 8 mL/galón de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica durante dos horas con burbujeo constante de aire para evitar la privación de oxígeno, sacar las semillas de la composición, secar las semillas durante la noche, y luego plantar las semillas en la mezcla de tierra para macetas. El segundo método de tratamiento comprendió poner en remojo las semillas en agua durante dos horas con burbujeo constante de aire para evitar la privación de oxígeno, sacar las semillas de agua, secar las semillas durante la noche, plantar las semillas en la mezcla de tierra para macetas con la concentración baja de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) de la composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica en la base de la bandeja de siembra para permitir tratar las semillas con la composición líquida a través de acción capilar. La concentración probada de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,021134 %.

15 Se aplicaron cada uno de los tres tratamientos a 72 semillas. Se hicieron diariamente observaciones visuales del suelo y las plantas para registrar cuántas semillas habían alcanzado la brotadura y maduración, como se explica a continuación. La norma usada para evaluar la brotadura fue el logro de la etapa de hipocótilo, donde era visible un tallo que sobresalía de la mezcla de tierra para macetas. La norma usada para evaluar la maduración fue el logro de la etapa de cotiledón, donde se habían formado visiblemente dos hojas en el tallo brotado. El experimento se realizó en el interior con todas las semillas y tratamientos sometidos a las mismas condiciones controladas que incluyeron temperatura, luz y suministro de agua. No se suministraron otros nutrientes durante el experimento. La luz suministrada fue artificial y se proporcionó por bombillas fluorescentes 24 horas al día. Los resultados del experimento se presentan en las Tablas 38-43.

Tabla 38

	Número de plantas brotadas por día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control no tratado (UTC)	0	0	0	2	23	30	31	33
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	0	0	0	10	36	41	43	45
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	0	0	0	3	33	40	42	42
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	0	0	0	0	10	15	25	34

25

Tabla 39

	% de plantas totales brotadas por día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control no tratado (UTC)	0	0	0	3	32	42	43	46
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	0	0	0	14	50	57	60	63
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	0	0	0	4	46	56	58	58
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	0	0	0	0	14	21	35	47

Tabla 40

	% de aumento de plantas brotadas por día con respecto al UTC							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	-	-	-	400 %	57 %	37 %	39 %	36 %
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	-	-	-	50 %	43 %	33 %	35 %	27 %
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	-	-	-	-100 %	-57 %	-50 %	-19 %	3 %

30 Como se muestra en las Tablas 38-40, el tratamiento por remojo de semilla para las composiciones basadas en *Chlorella* mixotrófica frescas y almacenadas mostró un rendimiento coherentemente más alto que el tratamiento por acción capilar y el UTC en lo que respecta a la brotadura de las plantas. El tratamiento por remojo de semilla con composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada mostró al menos un 27 % y tanto como un aumento del

50 % con respecto al UTC en los días comparativos, y el tratamiento por remojo de semilla con composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca demostró al menos un 36 % y tanto como un aumento del 400 % con respecto al UTC. La brotación para la composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca superó coherentemente a la composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada en los tratamiento por remojo de semilla, siendo la diferencia entre los dos tratamientos la mayor en el día 4 y reduciéndose durante la duración del experimento. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica es eficaz en aumentar la brotación 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 por día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control no tratado (UTC)	0	0	0	0	0	13	21	27
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	0	0	0	0	0	25	32	37
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	0	0	0	0	0	13	30	35
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	0	0	0	0	0	1	6	15

Tabla 42

	% de plantas totales maduras por día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control no tratado (UTC)	0	0	0	0	0	18	29	38
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	0	0	0	0	0	35	44	51
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	0	0	0	0	0	18	42	49
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	0	0	0	0	0	1	8	21

Tabla 43

	% de aumento de plantas maduras por día con respecto al UTC							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	-	-	-	-	-	92 %	52 %	37 %
Remojo con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica almacenada	-	-	-	-	-	0 %	43 %	30 %
Capilar con 10 % de <i>Chlorella</i> mixotrófica fresca	-	-	-	-	-	-92 %	-71 %	-44 %

Como se muestra en las Tablas 41-43, el tratamiento por remojo de semilla para las composiciones basadas en *Chlorella* mixotrófica fresca y almacenada mostró un rendimiento coherentemente más alto que el tratamiento por acción capilar y el UTC en lo que respecta a la maduración de las plantas. El tratamiento por remojo de semilla con composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada mostró al menos un 30 % y tanto como un aumento del 43 % con respecto al control no tratado en los días comparativos, y el tratamiento por remojo de semilla con composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca demostró al menos un 37 % y tanto como un aumento del 92 % con respecto al UTC. La maduración para la composición de *Chlorella* mixotrófica fresca superó coherentemente a la composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada en los tratamiento por remojo de semilla, siendo la diferencia entre los dos tratamientos la mayor en el día 6 y estrechándose durante la duración del experimento. El tratamiento por acción capilar superó coherentemente al UTC en lo que respecta a la maduración de las plantas. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica es eficaz en aumentar la maduración de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación de remojo de semillas.

Ejemplo 12

Se realizó un experimento para determinar si el método de aplicación de una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica a semillas de judía verde (*Phaseolus vulgaris*) plantadas en el suelo afectó a la tasa a la que las plántulas brotan del suelo y maduran. Se plantaron semillas de judía verde en bandejas con una mezcla de tierra para macetas de musgo blanco, perlita y vermiculita (2:1:1). Se compararon dos tratamientos que comprendían una composición basada en *Chlorella* mixotrófica con un control no tratado (UTC). Se pasteurizaron los

tratamientos, se normalizaron a 10 % de sólidos y se estabilizaron con ácido fosfórico (H₃PO₄) y sorbato de potasio (C₆H₇KO₂), consistiendo el resto en agua. No se congeló previamente la composición basada en *Chlorella* mixotrófica, y se incorporó en la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento directamente después de ser recogida del sistema de cultivo de microalgas. La composición usada en los tratamientos de este experimento no se analizó para cuantificar bacterias en la composición, sin embargo, recuentos aerobios en placa para composiciones previas preparadas con los mismos componentes del mismo modo contuvieron 40.000-400.000 UFC/mL.

Se aplicaron los tratamientos de composición líquida basada en *Chlorella* mixotrófica a las semillas a dos concentraciones bajas diferentes, 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) o 2,1 mL/litro (8 mL/galón), usando el mismo método de tratamiento. La concentración probada de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,012416 %. La concentración probada de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,021134 %. El método de tratamiento consistió en inundar el suelo desde arriba con 2,85 litros (0,75 galones) de la composición líquida (equivalente a una tasa de aplicación de 935 litros/hectárea (100 galones/acre)) a las concentraciones identificadas después de plantar las semillas.

Se aplicaron cada uno de los dos tratamientos a dos bandejas de 72 semillas. Se hicieron diariamente observaciones visuales del suelo y las plantas para registrar cuántas semillas habían alcanzado la brotadura y maduración, como se explica a continuación. La norma usada para evaluar la brotadura fue el logro de la etapa de hipocótilo, donde era visible un tallo que sobresalía de la mezcla de tierra para macetas. La norma usada para evaluar la maduración fue el logro de la etapa de cotiledón, donde se habían formado visiblemente dos hojas en el tallo brotado. El experimento se realizó en el interior con todas las semillas y tratamientos sometidos a las mismas condiciones controladas que incluyeron temperatura, luz y suministro de agua. No se suministraron otros nutrientes durante el experimento. La luz suministrada fue artificial y se proporcionó por bombillas fluorescentes 24 horas al día. Los resultados del experimento se presentan en las Tablas 44-49.

Tabla 44

	Número de plantas brotadas por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control no tratado (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 brotadas por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control no tratado (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 brotadas por día con respecto al 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 2,1 (8) y 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mostraron un rendimiento coherentemente más alto que el UTC en lo que respecta a la brotadura de las plantas, rindiendo la aplicación de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) coherentemente mejor que la de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón). La aplicación de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mostró al menos un 22 % y tanto como un aumento del 61 % con respecto al UTC en los días comparativos, y la aplicación de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) demostró al menos un 44 % y tanto como un aumento del 153 % con respecto al UTC. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica es eficaz en aumentar la brotadura de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación al suelo por inundación.

Tabla 47

	Número de plantas maduras por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control no tratado (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 por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control no tratado (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

5

Tabla 49

	% de aumento de plantas maduras por día con respecto al 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 %

10

Como se muestra en las Tablas 47-49, las aplicaciones de 2,1 (8) y 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mostraron un rendimiento coherentemente más alto que el UTC en lo que respecta a la maduración de las plantas, rindiendo la aplicación de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) coherentemente mejor que la de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón). Empezando el día 6, la aplicación de 1,2 mL/litro (4,7 mL/galón) mostró al menos un 71 % y tanto como un aumento del 100 % con respecto al UTC en los días comparativos y la aplicación de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) demostró al menos un 107 % y tanto como un aumento del 176 % con respecto al UTC. El aumento en el rendimiento de maduración para la aplicación de 2,1 mL/litro (8 mL/galón) con respecto al UTC también aumentó con el tiempo. Estos resultados muestran que una baja concentración de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica es eficaz en aumentar la maduración de una plántula en comparación con una semilla no tratada cuando se aplica en una aplicación al suelo por inundación.

15

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

20

Ejemplo 13

25

Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica a plantas de pimiento morrón por aplicación al suelo afectó al rendimiento de las plantas. El pimiento morrón (*Capsicum annuum*) es parte de la familia de plantas *Solanaceae* y se plantaron semillas en un campo en Ventura County, California. Se compararon dos tratamientos con un control no tratado (UTC) y se enumeran en la Tabla 50. Se obtuvo un producto basado en extracto de macroalgas comercialmente disponible de Acadian Seaplants Limited (30 Brown Avenue, Dartmouth, Nueva Escocia, Canadá, B3B 1X8) para comparación.

Tabla 50

Tratamiento N°	Descripción del tratamiento
1	UTC - control no tratado de agua
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian

Se pasteurizó la composición basada en *Chlorella* mixotrófica, se normalizó a 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 completas de *Chlorella* mixotrófica no se sometieron previamente a un proceso de purificación para aislar las células del medio de cultivo de microalgas, ni las células se sometieron previamente a un proceso de secado, extracción u otro proceso que pudiera lisar o romper las paredes celulares. Se congeló y descongeló previamente la composición de *Chlorella* mixotrófica, y se incorporó en la composición líquida para los tratamientos usados en este experimento después del almacenamiento en frío tras ser recogida del sistema de cultivo de microalgas. No se analizó la composición que comprendía *Chlorella* mixotrófica usada en los tratamientos de este experimento para cuantificar bacterias en las composiciones, sin embargo, recuentos aerobios en placa para composiciones previas preparadas con los mismos componentes del mismo modo contuvieron 40.000-400.000 UFC/mL.

Se aplicó la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una baja concentración de 9,96 mL/litro (37,85 mL/galón). La concentración probada de 9,96 mL/litro (37,85 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,099989 %. Se aplicó el tratamiento de Acadian a una concentración de 4,97 mL/litro (18,9 mL/galón). Se aplicaron cinco tratamientos totales a una baja frecuencia (es decir, promediando aproximadamente 20 días entre aplicaciones), empezando tres semanas después del establecimiento de la planta. Los tratamientos ocurrieron 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 por inyección en un sistema de riego por goteo de bajo volumen que suministraba agua a una tasa de 935 litros/hectárea (100 galones/acre) usando una bomba Hypro funcionando a 172 kPa (25 psi).

El experimento se configuró como un estudio diseñado por bloques de ocho réplicas que consistieron en 30 semillas cada uno. Se usaron observaciones visuales para evaluar el vigor de la planta en una escala de 0-5, correspondiendo 0 a muerte de la planta y correspondiendo 5 a salud completa. La producción se evaluó por calidad en las dos categorías de comercializable y no comercializable. El fruto no comercializable consideró fruto que tenía graves daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura y/o grave quemadura solar. El campo usado en el experimento estaba cultivando pimientos morrones para procesamiento, y así la calidad necesaria para el producto de mercado fresco no era el logro objetivo. Además, los pimientos morrones se dejaron en el campo una duración de tiempo para garantizar la máxima cantidad de enrojecimiento antes de la recogida para procesamiento. Se estimó el contenido de clorofila por un valor de SPAD (desarrollo de análisis tierra-planta), un valor numérico proporcionado por un medidor de SPAD de Minolta que analiza la cantidad de luz en un espectro específico de luz que pasa a través de una hoja y convierte esa lectura en un valor numérico como un indicador de la densidad de clorofila en la hoja. La producción se evaluó por muestreo basado en recoger todo el fruto que se encontrara en dos plantas y repetir este proceso ocho veces por tratamiento. Se pesó todo el fruto, se contó y se informó como gramos de peso total por dos plantas y gramos de peso total en promedio por fruto. Todos los datos clasificados como significativos se establecieron así utilizando el análisis de diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 90 %, de forma que valores con un identificador significativo estadístico de la misma letra no son significativamente diferentes. Los resultados se muestran en las Tablas 51-65 para los tratamientos designados con una S para aplicación al suelo, junto con identificadores complementarios de significación estadística.

Ejemplo 14

Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a plantas de pimiento morrón (*Capsicum annuum*) por aplicación foliar afectó al rendimiento de las plantas. El ensayo foliar ocurrió en la misma localización, con los mismos tratamientos, y con el mismo diseño que el experimento del Ejemplo 13.

Se aplicó la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una baja concentración de 1,8 mL/litro (7 mL/galón). La concentración probada de 1,8 mL/litro (7 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,018492 %. Se aplicó el tratamiento de Acadian a una concentración de 4,97 mL/litro (18,9 mL/galón). Se aplicaron cinco tratamientos totales a una baja frecuencia (es decir, promediando aproximadamente 21 días entre aplicaciones), empezando tres semanas después del establecimiento de la planta. Los tratamientos ocurrieron 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 233,8 litros/hectárea (25 galones/acre) con un pulverizador de mochila funcionando a 275,8 kPa (40 psi) a través de un tamaño de boquilla D-6 de Hollow Co.

Todos los datos clasificados como significativos se establecieron así utilizando el análisis de diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 90 %, de forma que valores con un identificador significativo estadístico de la misma letra no son significativamente diferentes. Los resultados se muestran en las Tablas 51-65 para los tratamientos designados con una F para aplicación foliar, junto con identificadores complementarios de significación estadística. Para cuando se recogió el campo se observó que ocurrieron muchos de los problemas de calidad no comercializable anteriormente mencionados y así la relación de fruto no comercializable fue más alta en este campo de lo que cabría esperar.

Tabla 51

Dimensionado de plantas – Planta completa (gramos) (A=previo, B=posterior)							
		Promedio A		Aumento con respecto a UTC	Promedio B		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	4,3	a		31,2	a	
	UTC - control no tratado de agua S	4,4	a		24,8		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	4,6	a	6 %	30,9	a	-1 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	4,4	a	-1 %	26,7	a	8 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	4,5	a	4 %	35,6	a	14 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	5,1	a	17 %	32,7	a	32 %

5 La Tabla 51 muestra que no hubo significación estadística para los resultados de los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en lo que respecta al peso de la planta completa. La aplicación foliar de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica rindió mejor que la aplicación al suelo en la primera medición y produjo un aumento del 6 % con respecto al UTC, pero no mantuvo la ventaja en la segunda medición. La aplicación al suelo rindió mejor en la segunda medición que la aplicación foliar y produjo un aumento del 8 % con respecto al UTC.

Tabla 52

Dimensionado de plantas - Raíz (gramos) (A=previo, B=posterior)							
		Promedio A		Aumento con respecto a UTC	Promedio B		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	0,6	a		3,4	a	
	UTC - control no tratado de agua S	0,6	a		3,0		
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	0,6	a	7 %	3,3	a	-4 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	0,7	a	8 %	3,3	a	9 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	0,6	a	0 %	4,0	a	17 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	0,7	a	8 %	3,6	a	21 %

10
15 La Tabla 52 muestra que no hubo significación estadística de los resultados de los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en lo que respecta al peso de la raíz. Las aplicaciones foliares y al suelo de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica rindió mejor que el UTC en la primera medición, con un aumento del 7 % y 8 % con respecto al 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 % con respecto al UTC.

Tabla 53

Dimensionado de plantas - Brotes (gramos) (A=previo, B=posterior)							
		Promedio A		Aumento con respecto a UTC	Promedio B		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	3,8	a		27,7	a	
	UTC - control no tratado de agua S	3,7	a		24,0		

2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	4,0	a	6 %	27,6	a	0 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	3,7	a	-2 %	23,5	a	-2 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	3,9	a	5 %	31,6	a	14 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	4,4	a	18 %	29,1	a	21 %

La Tabla 53 muestra que no hubo significación estadística de los resultados de los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en lo que respecta al peso de los brotes. La aplicación foliar de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica rindió mejor que el UTC y la aplicación al suelo en la primera medición, con un aumento del 6 % con respecto al UTC. La aplicación foliar no mantuvo esta ventaja en la segunda medición.

5

Tabla 54

Contenido promedio de clorofila de la planta (SPAD)							
		A		B		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	64,7	-	39,7	a	52,2	
	UTC - control no tratado de agua S		-	69,7	ab	69,7	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	71,5	-	36,4	a	54,0	3 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S		-	70,2	ab	70,2	1 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	70,6	-	35,4	a	53,0	2 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S		-	64,5	a	64,5	-7 %

La Tabla 54 muestra que no hubo significación estadística de los resultados de los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en lo que respecta al contenido de clorofila. Las aplicaciones foliares y al suelo de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica rindió dentro del 3 % del UTC.

10

Tabla 55

Vigor promedio de la planta (Escala visual 0-5)									
		A		B		C		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	3,4	a	4,5	a	4,0	a	4,0	
	UTC - control no tratado de agua S	3,5	a	4,5	a			4,0	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	3,2	a	4,1	a	4,0	a	3,8	-5 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	4,0	a	4,0	a			4,0	0 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	3,2	a	4,3	a	4,0	a	3,8	-3 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	3,5	a	4,0	a			3,8	-6 %

La Tabla 55 muestra que no hubo significación estadística de los resultados de los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en lo que respecta al vigor de la planta, ni hubo una ventaja numérica.

15

Tabla 56

Peso total de plantas no comercializables en la parcela (gramos)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	1895,0	a
	UTC - control no tratado de agua S	963,8	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	1803,1	a -5 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	179,4	b -81 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	1580,6	a -17 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	66,9	b -93 %

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

5

Tabla 57

Rendimiento total de plantas no comercializables en la parcela (número)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	10,8	a
	UTC - control no tratado de agua S	6,0	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	9,8	a -9 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	1,9	b -69 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	9,1	a -15 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	1,1	b -81 %

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

10

Tabla 58

Peso total de frutos no comercializables por parcela (gramos)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	178,5	a
	UTC - control no tratado de agua S	56,2	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	182,8	a 2 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	57,6	a 2 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	173,2	a -3 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	35,3	a -37 %

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

15

con el UTC.

Tabla 59

Peso total de plantas comercializables en la parcela (gramos)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	120,6	a
	UTC - control no tratado de agua S	317,5	c
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	386,3	a 220 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	1224,4	a 286 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	502,5	a 317 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	1233,1	a 288 %

La Tabla 59 muestra que los resultados de la aplicación al suelo de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el peso de plantas comercializables, y tanto las aplicaciones al suelo como foliares mostraron un gran aumento numérico de 286 % y 220 % con respecto al UTC, que fue comparable con el producto Acadian comercialmente satisfactorio. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces no solo para mejorar el peso de la planta, sino también mejorar el peso de la planta en las plantas de mayor calidad (es decir, comercializables) cuando se aplican al suelo o el follaje.

Tabla 60

Rendimiento total de plantas comercializables en la parcela (número)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	0,6	a
	UTC - control no tratado de agua S	2,3	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	2,0	a 220 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	6,8	a 200 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	2,8	a 340 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	7,1	a 217 %

La Tabla 60 muestra que los resultados de las aplicaciones al suelo y foliares de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica mostraron un gran aumento numérico de 200 % y 220 % con respecto al UTC, que era comparable con el producto Acadian comercialmente satisfactorio. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces no solo para mejorar el rendimiento de la planta, sino también mejorar el rendimiento de la planta en las plantas de mayor calidad (es decir, comercializables) cuando se aplican al suelo o el follaje.

Tabla 61

Peso total de frutos comercializables en la parcela (gramos)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	73,1	a
	UTC - control no tratado de agua S	123,7	b
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	43,8	a -40 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	182,9	a 48 %

3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	115,8	a	58 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	66,9	a	-46 %

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

Tabla 62

Peso total de plantas de producción por parcela (gramos)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	2015,6	a	
	UTC - control no tratado de agua S	656,3	c	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	2189,4	a	9 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	1403,8	a	114 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	2083,1	a	3 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	1300,0	a	98 %

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

Tabla 63

Rendimiento total de plantas de producción por parcela (número)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	11,4	a	
	UTC - control no tratado de agua S	8,3	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	11,8	a	3 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	8,6	a	5 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	11,9	a	4 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	8,3	a	0 %

La Tabla 63 muestra que los resultados de las aplicaciones al suelo y foliares de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para el rendimiento de plantas de producción, pero mostró un aumento numérico de 5 % y 3 % con respecto al UTC.

Tabla 64

Peso promedio de frutos de producción en la parcela (gramos)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	179,0	a
	UTC - control no tratado de agua S	80,5	b
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	189,6	a 6 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	167,0	a 107 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	174,1	a -3 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	159,8	a 98 %

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

Tabla 65

Utilización (% , relación entre fruto comercializable y fruto total producido en peso)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	6,5	a
	UTC - control no tratado de agua S	45,0	b
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	11,8	a 81 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	88,3	a 96 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	18,3	a 181 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	94,6	a 110 %

La Tabla 65 muestra que los resultados de la aplicación al suelo de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC para porcentaje de utilización (relación entre fruto comercializable y fruto total producido en peso). La aplicación al suelo de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica también mostró un aumento numérico de 96 % con respecto al UTC, mostrando la aplicación foliar un aumento del 81 % con respecto al UTC. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición basada en *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 el follaje.

Ejemplo 15

Se realizó un experimento para determinar si una aplicación de baja concentración y baja frecuencia de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica a plantas de tomate gavián (*Solanum lycopersicum*) por 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 ocurrió en la misma localización, con los mismos tratamientos, y con el mismo diseño que el experimento del Ejemplo 13. Las plantas de tomate se cultivaron como un arbusto en el suelo para este experimento.

Se aplicó la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una baja concentración de 9,96 mL/litro (37,85 mL/galón). La concentración probada de 9,96 mL/litro (37,85 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,099989 %. Se aplicó el tratamiento de Acadian a una concentración de 4,97 mL/litro (18,9 mL/galón). Se aplicaron cinco tratamientos totales a una baja frecuencia (es decir, promediando aproximadamente 23 días entre

aplicaciones), empezando tres semanas después del establecimiento de la planta. Los tratamientos ocurrieron 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 por inyección en un sistema de riego por goteo de bajo volumen a una tasa de 100 galones/acre usando una bomba de Hypro funcionando a 172,4 kPa (25 psi).

Todos los datos clasificados como significativos se establecieron así utilizando el análisis de diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 90 %, de forma que valores con un identificador significativo estadístico de la misma letra no son significativamente diferentes. Los resultados se muestran en las Tablas 66-78 para los tratamientos designados con una S para aplicación al suelo, junto con identificadores complementarios de significación estadística.

Ejemplo 16

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

Se aplicó la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una baja concentración de 1,8 mL/litro (7 mL/galón). La concentración probada de 1,8 mL/litro (7 mL/galón) diluyó la composición que originalmente contenía 10 % de sólidos en peso de células completas de *Chlorella* mixotrófica hasta el bajo porcentaje de contenido de sólidos de solo 0,018492 %. Se aplicó el tratamiento de Acadian a una concentración de 4,97 mL/litro (18,9 mL/galón). Se aplicaron cinco tratamientos totales a una baja frecuencia (es decir, promediando aproximadamente 21 días entre aplicaciones), empezando tres semanas después del establecimiento de la planta. Los tratamientos ocurrieron 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 233,8 litros/hectárea (25 galones/acre) con un pulverizador de mochila funcionando a 275,8 kPa (40 psi) a través de un tamaño de boquilla D-6 de Hollow Co.

Todos los datos clasificados como significativos se establecieron así utilizando el análisis de diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 90 %, de forma que valores con un identificador significativo estadístico de la misma letra no son significativamente diferentes. Los resultados se muestran en las Tablas 66-78 para los tratamientos designados con una F para aplicación foliar, junto con identificadores complementarios de significación estadística.

Tabla 66

Contenido promedio de clorofila de la planta (SPAD)							
		A		B		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	52,7	a	48,0	a	50,4	
	UTC - control no tratado de agua S	44,6	a			44,6	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	54,6	a	45,4	a	50,0	-1 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	44,5	a			44,5	0 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	53,9	a	46,2	a	50,1	-1 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	41,8	a			41,8	-6 %

La Tabla 66 muestra que no hubo significación estadística de los resultados de los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en lo que respecta al contenido de clorofila, ni un aumento numérico.

Tabla 67

Vigor promedio de la planta (Escala visual 0-5)							
		A		B		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	4,9	a	3,9	a	4,4	
	UTC - control no tratado de agua S	4,2	a			4,2	

2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	5,0	a	3,6	a	4,3	-2 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	4,5	a			4,5	7 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	4,9	a	4,1	a	4,5	2 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	4,1	a			4,1	-2 %

La Tabla 67 muestra que no hubo significación estadística de los resultados de los tratamientos de composición basada en *Chlorella* mixotrófica en comparación con el UTC en lo que respecta al vigor de la planta, sin embargo, la aplicación al suelo mostró un aumento del 7 % con respecto al UTC.

5

Tabla 68

Peso total de plantas no comercializables en la parcela (gramos)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	205,8	a	
	UTC - control no tratado de agua S	2156,0	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	139,2	a	-32 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	2279,2	a	6 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	162,5	a	-21 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	997,5	b	-54 %

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

10

Tabla 69

Rendimiento total de plantas no comercializables en la parcela (número)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	5,8	a	
	UTC - control no tratado de agua S	49,3	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	3,0	a	-49 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	47,7	a	-3 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	3,0	a	-49 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	28,5	bc	-42 %

La Tabla 69 muestra que la aplicación de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica no tuvo una disminución estadísticamente significativa en el rendimiento de 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 más pequeña que la disminución del 42 % de la aplicación al suelo del producto Acadian.

15

Tabla 70

Peso total de frutos no comercializables por parcela (gramos)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	29,6	a
	UTC - control no tratado de agua S	45,8	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	27,5	a -7 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	47,4	a 3 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	35,5	a 20 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	34,8	a -24 %

5

La Tabla 70 muestra que las aplicaciones al suelo y foliares de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica no fueron estadísticamente significativas en comparación con el UTC para el peso de frutos no comercializables, pero la aplicación al suelo mostró un aumento del 3 %, mientras que el producto 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 en la parcela (gramos)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	8702,5	a
	UTC - control no tratado de agua S	7616,7	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	8317,5	a -4 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	8160,8	a 7 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	7731,7	a -11 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	7828,3	a 3 %

10

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

Tabla 72

Rendimiento total de plantas comercializables en la parcela (número)			
		Promedio	Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	120,8	a
	UTC - control no tratado de agua S	103,5	a
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	103,0	a -15 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	115,3	a 11 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	107,7	a -11 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	118,0	a 14 %

15

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

Tabla 73

Peso total de frutos comercializables en la parcela (gramos)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	72,2	b	
	UTC - control no tratado de agua S	74,5	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	80,5	a	11 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	70,1	a	-6 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	72,0	b	0 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	65,7	a	-12 %

5

La Tabla 73 muestra que los resultados de la aplicación foliar de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica fueron estadísticamente significativos en comparación con el UTC y el producto Acadian para el peso de frutos comercializables, y produjeron un aumento del 11 % con respecto al UTC. Estos resultados muestran que pequeñas cantidades de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica a una aplicación de baja concentración y baja frecuencia son eficaces no solo para mejorar el peso del fruto, sino también para mejorar el peso del fruto en las plantas de mayor calidad (es decir, comercializables) cuando se aplican al follaje.

Tabla 74

Peso total de plantas de producción por parcela (gramos)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	8908,3	a	
	UTC - control no tratado de agua S	9272,7	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	8456,7	a	-5 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	10440,0	a	13 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	7894,2	a	-11 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	8825,8	a	-5 %

10

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

15

Tabla 75

Rendimiento total de plantas de producción por parcela (número)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	126,7	a	
	UTC - control no tratado de agua S	152,8	ab	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	110,2	a	-13 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	163,0	a	7 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	110,7	a	-13 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	146,5	abc	-4 %

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

5

Tabla 76

Peso promedio de frutos de producción en la parcela (gramos)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	70,7	a	
	UTC - control no tratado de agua S	64,8	a	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	76,7	a	9 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	63,1	a	-3 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	71,6	a	1 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	59,4	a	-8 %

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

10

Tabla 77

Utilización (% , relación entre fruto comercializable y fruto total producida en peso)				
		Promedio		Aumento con respecto a UTC
1	UTC - control no tratado de agua F	97,5	a	
	UTC - control no tratado de agua S	76,8	c	
2	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas F	98,3	a	1 %
	<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica - Células completas S	77,2	c	0 %
3	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian F	98,0	a	1 %
	Producto estándar para agricultores - Concentrado líquido de algas marinas Acadian S	88,7	a	15 %

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

15

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

Ejemplo 17

20

Se realizó un experimento para determinar los efectos de diferentes tasas de aplicación de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica de baja concentración (designada "PT" o "PhycoTerra" en diversas leyendas de figuras en toda la presente descripción) en plantas. En condiciones hidropónicas, la composición se aplicó entre 0,79 mL/litro (3 mL/gal) - 39,5 mL/litro (150 mL/gal). También se probó una composición de simulación de solo nutriente. La composición de simulación solo contenía componentes no biológicos. Todas las condiciones de tratamiento incluyeron fertilizante. El control fue un tratamiento de solo fertilizante (Solo veg). El experimento demostró que la composición tiene efectos biológicos sobre las plantas a bajas concentraciones. Los resultados del experimento se muestran en la figura 4.

25

Ejemplo 18

Se realizaron experimentos para determinar si la aplicación de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica de baja concentración a plantas que se sometieron a estrés salino en el momento de la siembra afectó al rendimiento de las plantas. Los resultados de dichos experimentos se muestran en la Figura 5A-5F. En un experimento, se pusieron en remojo judías de enrame en agua de ciudad o 4,7 mL/litro (18 mL/galón) de la composición basada en microalgas durante cuatro horas. Las semillas se plantaron en coco (un medio de fibra de coco inerte) y se cultivaron en una plataforma hidropónica. Se plantaron las semillas (sin lavar) en un modo aleatorizado y se trataron con sal 80 mMol el primer día. Para probar la importancia del escurrimiento (abreviadamente en lo sucesivo RO por la expresión inglesa *Run-Off*), la mitad de cada tipo de semilla puesta en remojo o se regó con 57 mL de agua RO (saturación completa), o con 171 mL de disolución 80 mMol de sal (gran escurrimiento). Algunas células solo contuvieron el coco y se recogieron para analizar el perfil de salinidad en el coco con y sin escurrimiento. Se evaluaron los efectos de los tratamientos midiendo el peso seco, circunferencia y rendimiento fotosintético (Y_{iii}) (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 puestas en remojo en la composición basada en *Chlorella* mixotrófica antes de la siembra tuvieron un aumento del 40 % en la tasa de germinación (Figura 5D). Además, las semillas puestas en remojo en la composición basada en *Chlorella* mixotrófica germinaron antes que las semillas puestas en remojo en agua de ciudad, y las semillas regadas con agua RO hasta la saturación completa tuvieron una disminución en la germinación en comparación con las semillas regadas con disolución 80 mMol de sal con gran escurrimiento (Figura 5E).

Ejemplo 19

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

Ejemplo 20

Se realizaron experimentos para determinar si una aplicación de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica de baja concentración (designada "PhycoTerra" o "PT" en las leyendas de las figuras) al césped afectó al rendimiento de las plantas. En los experimentos, la composición se aplicó a hierba de césped a 6 concentraciones diferentes con urea. Las concentraciones variaron de 0,74-37 litros/hectárea (0,3-15L/acre) y el césped se trató a intervalos de 14 o 21 días. Estos tratamientos se compararon con muestras de césped que se administraron (1) sin tratamiento (UTC), (2) Acadian (una composición de extracto de algas marinas) y (2) urea solo. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 6. Se mostró que el peso de los brotes respondía 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 % superior al control no tratado (UTC) y todas las tasas de aplicación dieron peso de los brotes significativamente más alto que el que se logró con la aplicación de Acadian en un intervalo de 21 días de aplicación.

Ejemplo 21

Se realizaron experimentos para determinar si la aplicación de una composición basada en *Chlorella* mixotrófica de baja concentración (PT) a cacahuets afectó al rendimiento de las plantas. En los experimentos, la composición se aplicó a 5 concentraciones diferentes. Estos tratamientos se compararon con plantas a las que no se les dio tratamiento (UTC) y con plantas que se trataron con Acadian (una composición de extracto de algas marinas). En los experimentos, se analizó el suelo alrededor en las plantas para pH y ácido húmico. Como se conoce en la técnica, un intervalo de pH del suelo de 5,5-6,5 es ideal para los cacahuets. El ácido húmico es un indicador de descomposición en el suelo. Los experimentos muestran que el peso de parcela aumentó significativamente con PT suministrado a 19,9 mL/litro (75,7 mL/gal) - 78,9 mL/litro (300 mL/gal) y que asimismo el peso de semilla aumentó significativamente con PT suministrado a 78,9 mL/litro (300 mL/gal). Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 78 a continuación y la Figura 7.

Tabla 78

Nivel		Media de mínimos cuadrados
PT (150 mL/gal)	A	8743,0288
PT (75,7 mL/gal)	A	8555,8791
PT (300 mL/gal)	A	8181,6657
Acadian (18,9 mL/gal)	A B	7739,4135
PT (37,8 mL/gal)	A B	7626,0155
PT (18,9 mL/gal)	A B	7268,8118

Nivel		Media de mínimos cuadrados
UTC	B	6367,2977
Nivel		Media de mínimos cuadrados
PT (300 mL/gal)	A	1259,7500
Acadian (18,9 mL/gal)	A B	1167,2500
PT (150 mL/gal)	A B	1127,0000
PT (75,7 mL/gal)	A B	1112,2500
PT (37,8 mL/gal)	A B	1096,5000
PT (18,9 mL/gal)	A B	1028,5000
UTC	B	916,2500

Ejemplo 22 (no según la invención)

Se realizaron experimentos para determinar si una aplicación de una composición basada en *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 una aplicación de un fertilizante hidropónico comercial. Este tratamiento se comparó con fertilizante solo como control. En estos experimentos, se compararon las plantas expuestas al tratamiento, y otras plantas expuestas al control, basándose en las mediciones del diámetro del tallo y peso fresco de la planta. Mientras que el diámetro del tallo no mostró diferencia significativa entre el tratamiento y el control, la medida de peso fresco demostró que la composición tenía un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, en comparación con el fertilizante solo.

Ejemplo 23 - Fabaceae (Leguminosae) (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Fabaceae (Leguminosae). La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotadura de las plántulas, tiempo de brotadura de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 24 - Poaceae (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Poaceae. La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotadura de las plántulas, tiempo de brotadura de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 25 - Rosaceae (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Rosaceae. La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotación de las plántulas, tiempo de brotación de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 26 - Vitaceae (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Vitaceae. La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotación de las plántulas, tiempo de brotación de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 27 - Brassicaceae (Cruciferae) (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Brassicaceae (Cruciferae). La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotación de las plántulas, tiempo de brotación de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 28 - Caricaceae (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Caricaceae. La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotación de las plántulas, tiempo de brotación de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco

de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 29 - Malvaceae (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Malvaceae. La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotadura de las plántulas, tiempo de brotadura de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 30 - Sapindaceae (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Sapindaceae. La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotadura de las plántulas, tiempo de brotadura de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 31 - Anacardiaceae (no según la invención)

Se realizan experimentos para probar los efectos de la aplicación de una composición basada en microalgas a plantas de cultivo de la familia Anacardiaceae. La aplicación se hace como en otros ejemplos en el presente documento, de forma que, en diversos tratamientos, (a) las semillas se humedecen o se ponen en remojo en la composición; (b) la composición se aplica a suelo pre-germinación; (c) la composición se aplica a suelo post-germinación; (d) la composición se aplica periódicamente al suelo durante el periodo vegetativo; y/o (e) la composición se aplica a las hojas de las plantas una vez o periódicamente durante el periodo vegetativo. Los resultados son medidas de características apropiadas de las plantas que incluyen: tasa de germinación de las semillas, tiempo de germinación de las semillas, brotadura de las plántulas, tiempo de brotadura de las plántulas, tamaño de las plántulas, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, utilización, producción de frutos, producción de hojas, formación de hojas, altura de paja, salud de la planta, resistencia de la planta a estrés salino, resistencia de la planta a estrés térmico, resistencia de la planta a estrés por metales pesados, resistencia de la planta a la sequía, tiempo de maduración, rendimiento, longitud de la raíz, masa de la raíz, color, daño por insectos, pudrición de las puntas de las flores, blandura, calidad de los frutos y quemadura solar. Los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 10 % en cuanto a al menos una característica en al menos un modo de aplicación (a-e) de la composición. En algunas realizaciones, los resultados muestran al menos una mejora cuantitativa del 25 % en al menos una característica y/o una mejora estadísticamente significativa en al menos dos características.

Ejemplo 32

Se realizaron experimentos para probar variaciones en la población bacteriana entre diferentes lotes de una composición basada en *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 incluyeron *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Brevibacillus*. Se conoce que *Paenibacillus* y *Bacillus* secretan una gran cantidad de compuestos beneficiosos en la rizosfera de plantas (fitohormonas, compuestos nitrogenados, antibióticos). También se conocen por mitigar patógenos. *Lactobacillus* es una bacteria fermentativa productora de ácido láctico usada en la práctica agrícola del ensilaje. *Brevibacillus* es menos conocida como género promotor del crecimiento de plantas comunes, sin embargo, existe cierta bibliografía que demuestra su capacidad para lixiviar metales pesados de la rizosfera. Aunque existió cierta variabilidad cuantitativa de cada población bacteriana lote a lote, estos cuatro taxones bacterianos esporulantes fueron predominantes. Se cree que el tratamiento de pasteurización de la composición suprimió diferencialmente otros taxones no esporulantes, que se encontró que estaban presentes, pero en cantidades significativamente más bajas.

Ejemplo 33 (no según la invención)

Se realizaron experimentos para probar la estabilidad de variaciones en lotes de una composición de microalgas basada en *Chlorella* a diferentes temperaturas de almacenamiento. Se probaron mensualmente muestras a diversas temperaturas (2-5 °C, 35 °C o 40 °C) durante seis meses. Se determinaron los recuentos bacterianos, así como los niveles de nitrógeno total, fósforo y potasio. Los resultados de los experimentos demostraron que en diferentes condiciones, los recuentos bacterianos variaron, pero los niveles de nutrientes permanecieron esencialmente estables.

Ejemplo 34

Se realizaron experimentos para probar diferentes métodos de preparación de una composición de microalgas basada en *Chlorella* (PT). *Chlorella* es capaz de heterotrofia (consumir una fuente externa de carbono), fototrofia (fotosíntesis para convertir CO₂ en una fuente de carbono útil), y también mixotrofia (recibir simultáneamente nutrición/carbono por fotosíntesis y también por consumo de fuentes externas de carbono disponibles). Se compararon composiciones de *Chlorella* puramente heterotróficas obtenidas en dos fuentes de carbono diferentes (o ácido acético o glucosa) con *Chlorella* fototrófica y también con *Chlorella* mixotrófica, también cultivada en dos lotes obtenido cada uno o en ácido acético o glucosa como su fuente de carbono. Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 8. Los cultivos mixotróficos crecieron los más rápidos, pero también se mostraron mejores resultados cuando se aplicaron a plantas en comparación con otros cultivos.

Ejemplo 35 (no según la invención)

En un ejemplo de cultivo mixotrófico de *Chlorella* para el método de preparación descrito de una composición para aplicación a las plantas, la *Chlorella* se cultiva en un medio de cultivo BG-11 o un medio derivado de medio de cultivo BG-11 (por ejemplo, en el que se añaden componente(s) adicional(es) al medio y/o uno o más elementos del medio se aumenta en 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 33 %, 50 %, o más con respecto a medio BG-11 no modificado) durante una duración de cultivo de 7-14 días en un recipiente de cultivo abierto. La temperatura puede variar de 20-30 °C, o más, y los intervalos de pH de 6,5-8,5. La concentración de oxígeno disuelto puede variar de 0,1-4 mg/L. El cultivo recibe ácido acético o acetato como fuente de carbono orgánico que suministra 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 de 10-90 % por un sistema pH-auxostato. El cultivo recibe luz solar natural (que comprende radiación fotosintéticamente activa) como fuente de energía. La mezcla se proporciona por burbujeo de aire a través de un tubo de aire, y propulsión de fluido por propulsores sumergidos en el cultivo líquido. Las fuentes de carbono orgánico alternativas 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 basado en plantas, prolina, ácido propiónico, ribosa, sacarosa, hidrolizados parciales o completos de almidón, sacarosa, tartárico, ácidos orgánicos del ciclo TCA, vinazas ligeras, urea, disoluciones de desechos industriales, extracto de levadura, cualquier combinación de los anteriores, u otras fuentes de carbono orgánico.

Ejemplo 36 (no según la invención)

Se pueden usar aireadores como alternativas a los burbujeadores y propulsores sumergidos para proporcionar tanto infusión de gases (por ejemplo, oxígeno) en el cultivo acuoso de microalgas como mezcla turbulenta del cultivo de microalgas. Un ejemplo no limitante de un aireador para su uso como una 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 un ángulo desde la parte superior de la superficie del medio de cultivo, y una hélice dispuesta en el extremo del eje que se sumerge dentro del medio de cultivo. El motor se acopla y acciona el eje y la hélice. La hélice propulsa el medio de cultivo acuoso pasado un difusor en el extremo del eje para inducir un diferencial de presión en el eje hueco, succiona aire a través de los orificios de entrada en el eje por encima de la superficie del medio de cultivo hacia abajo a través del eje hueco y el difusor dentro del cultivo de microalgas. Aunque los aireadores contribuyen a la mezcla turbulenta y la infusión de oxígeno, los dispositivos y

métodos previamente descritos de suministro de nutrientes, suministro de carbono orgánico y control del pH se pueden usar junto con dichos aireadores.

Ejemplo 37

5 En un ejemplo de preparación de la composición líquida con la composición basada en *Chlorella* mixotrófica para aplicación a las plantas, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica recogida del sistema de cultivo se mantiene primero en un tanque de recogida antes de centrifugar el cultivo. Una vez se centrifuga el cultivo de *Chlorella* mixotrófica, la centrifugadora descarga la fracción rica en sólidos de células completas de *Chlorella* mixotrófica, pero que también contiene los constituyentes acompañantes del medio de cultivo, en un recipiente a una temperatura de aproximadamente 30 °C. La composición basada en *Chlorella* mixotrófica puede continuar (es decir, fresca) en el proceso de preparación de la composición líquida o se almacena en un congelador y se descongela en un momento posterior (es decir, almacenada) para procesamiento en la composición líquida. Cuando la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se almacena en un congelador, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente -10 °C y se requieren aproximadamente 1-2 días para congelar la composición. Una vez sacada del congelador, la composición basada en *Chlorella* mixotrófica almacenada se pone fuera para descongelarse durante aproximadamente 7 días. La composición basada en *Chlorella* mixotrófica fresca o almacenada se pone entonces en un tanque y se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 2 horas para empezar el proceso de pasteurización. La composición basada en *Chlorella* mixotrófica se diluye entonces hasta una concentración de sólidos de células completas de aproximadamente 10-11 % en peso y se enfría a aproximadamente 40 °C para completar el proceso de pasteurización. El pH de la composición basada en *Chlorella* mixotrófica se ajusta entonces hasta un pH de aproximadamente 4 mezclando en una cantidad eficaz de ácido fosfórico para fines de estabilización. Entonces se mezclan aproximadamente 0,3 % de sorbato de potasio con la composición basada en *Chlorella* mixotrófica para fines de estabilización. La composición líquida resultante entonces se transfiere a recipientes de un tamaño deseado que se almacenan a 3-5 °C hasta que se expiden.

Ejemplo 38

25 Usando Q-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para analizar la población de bacterias en un cultivo de *Chlorella* mixotrófica antes de la pasteurización y después de la pasteurización, se observó que el perfil de bacterias en el cultivo cambiaba después de la pasteurización. Particularmente, el perfil post-pasteurización de las bacterias incluye una mayor proporción de bacterias formadoras de esporas e incluye, pero no se limita a, *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Brevibacillus* sp. como los tipos dominantes de bacterias. Comparando los recuentos aerobios en placa de un cultivo de *Chlorella* mixotrófica antes de la pasteurización y después de la pasteurización, también se observó que el número total de bacterias en el cultivo era más bajo después de la pasteurización. Se probaron combinaciones de temperatura y tiempo para el proceso de pasteurización para los tiempos de 15, 30, 60, 120, 180 y 360 minutos, y 50, 60, 70, 80 y 90 °C, con un cultivo de *Chlorella* mixotrófica, y los recuentos aerobios en placa resultantes variaron desde 7,58 X 10⁶ UFC hasta tan solo 1,74 X 10³ UFC. También se mostró que la temperatura de almacenamiento variaba 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 en los números de recuentos aerobios en placa y el tipo de especies bacterianas dominantes con el tiempo.

40 Aunque las células de *Chlorella* mixotrófica están intactas y son viables (es decir, físicamente aptas para vivir, capaces de más crecimiento o división celular) después de ser recogidas del cultivo, se confirmó que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización tenían paredes celulares intactas, pero no eran viables. Se observaron con un microscopio células de *Chlorella* mixotrófica resultantes del proceso de pasteurización para determinar la condición de las paredes celulares después de haberse sometido al proceso de calentamiento y enfriamiento, y se confirmó visualmente que las paredes celulares de *Chlorella* estaban intactas y no abiertas. Para una mayor investigación de la condición de la célula, 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 ADN si la membrana celular está comprometida, y se comparó visualmente con un microscopio. La comparación de yoduro de propidio mostró que las células de *Chlorella* resultantes del proceso de pasteurización contenían una alta cantidad de ADN teñido, llegando a la conclusión que las paredes celulares de *Chlorella* mixotrófica estaban intactas, pero las membranas celulares estaban comprometidas. Así, la permeabilidad de las células pasteurizadas de *Chlorella* se diferencia de la permeabilidad de una célula de *Chlorella*, con tanto una pared celular como una membrana celular intacta.

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

60 Se debe interpretar que el uso de los términos "un", "una", "el" y "la" y referentes similares en el contexto de la

descripción cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

5 A menos que se establezca de otro modo, todos los valores exactos en el presente documento son representativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, se puede considerar que todos los valores exactos a modo de ejemplo proporcionados con respecto a un factor o medición particular también proporcionan 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 valores entre los puntos extremos.

10 La descripción en el presente documento de cualquier aspecto o realización de la invención usando términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye", o "que contiene", con referencia a un elemento o elementos, pretende proporcionar apoyo para un aspecto o realización similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se establezca de otro modo o se contradiga claramente por el contexto (por ejemplo, se debe entender que una composición descrita en el presente documento que comprende un elemento particular también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se establezca de otro modo o se contradiga claramente por el contexto).

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de mejora del crecimiento de una planta que comprende administrar un tratamiento de composición líquida que comprende un cultivo de *Chlorella* al suelo de la planta, comprendiendo la composición células completas pasteurizadas de *Chlorella*, en donde la composición se administra en una concentración en el intervalo de 0,003-0,080 % de sólidos en peso.
2. El método de la reivindicación 1, en donde las células de *Chlorella* se pasteurizan a entre 50 y 80 °C durante un tiempo entre 15 y 360 minutos.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, en donde las células de *Chlorella* se pasteurizan en un cultivo que tiene una concentración superior a 11 % en peso de *Chlorella*, a entre 55 y 65 °C durante entre 90 y 150 minutos, y en donde el cultivo se diluye luego hasta 10-11 % de *Chlorella* en peso y se enfría hasta entre 35 y 45 °C.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el cultivo pasteurizado se ajusta hasta un pH entre 3,5 y 4,5.
5. El método de la reivindicación 1, en donde las células de *Chlorella* se cultivan en condiciones mixotróficas.
- 15 6. El método de la reivindicación 5, en donde las condiciones mixotróficas comprenden cultivar las células de *Chlorella* en un medio adecuado durante una duración del cultivo de 7-14 días, a una temperatura entre 20 y 30 °C, a un pH entre 6,5 y 8,5, y una concentración del oxígeno disuelto puede variar entre 0,1 y 4 mg/L.
7. El método de la reivindicación 1, en donde las células de *Chlorella* se cultivan en condiciones mixotróficas no axénicas, y en donde al menos una especie de bacteria esporulante está presente en el cultivo no axénico.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la bacteria se selecciona de *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Brevibacillus* sp.
- 20 9. El método de la reivindicación 1, en donde el tratamiento de composición líquida comprende 0,008-0,080 % de sólidos en peso de células completas pasteurizadas de *Chlorella*.
10. El método de la reivindicación 1, en donde la composición líquida se administra cada 3-28 días.
- 25 11. El método de la reivindicación 1, en donde la planta es un miembro de una familia de plantas seleccionada de: Solanaceae, Fabaceae (Leguminosae), Poaceae, Rosaceae, 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 y Proteaceae.
- 30 12. El método de la reivindicación 1, en donde las células completas de *Chlorella* no se han sometido a un proceso de secado.
- 35 13. El método de la reivindicación 1, en donde el tratamiento de composición líquida comprende además al menos un estabilizador de cultivo adecuado para plantas, en donde el estabilizador de cultivo se selecciona de: sorbato de potasio, ácido fosfórico, ácido ascórbico, benzoato de sodio, y cualquier combinación de los mismos.

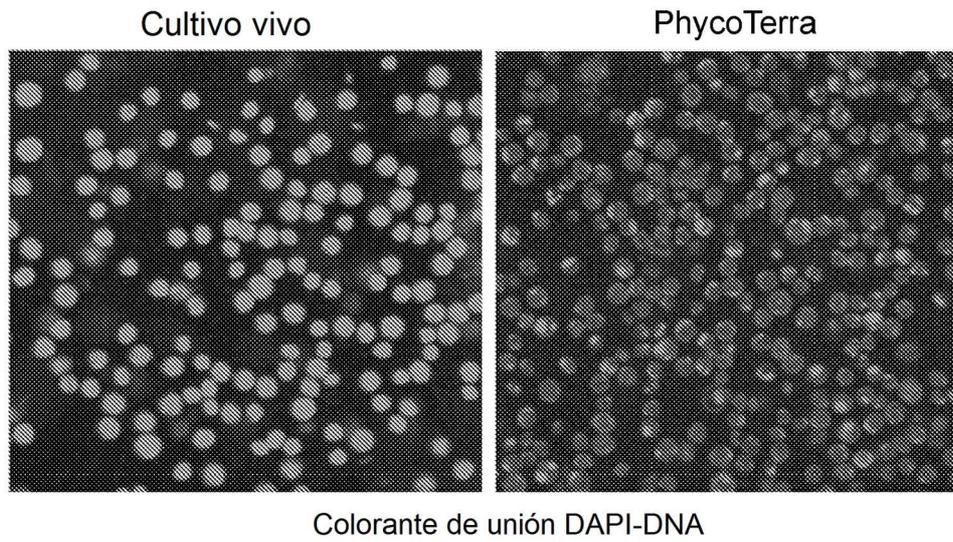
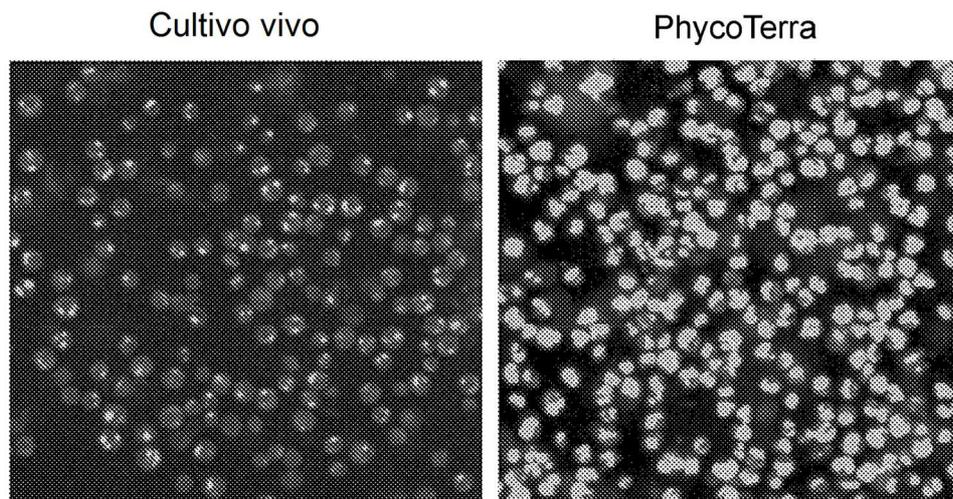


FIG. 1



El yoduro de propidio es un colorante de exclusión - marca ADN si la membrana celular está 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

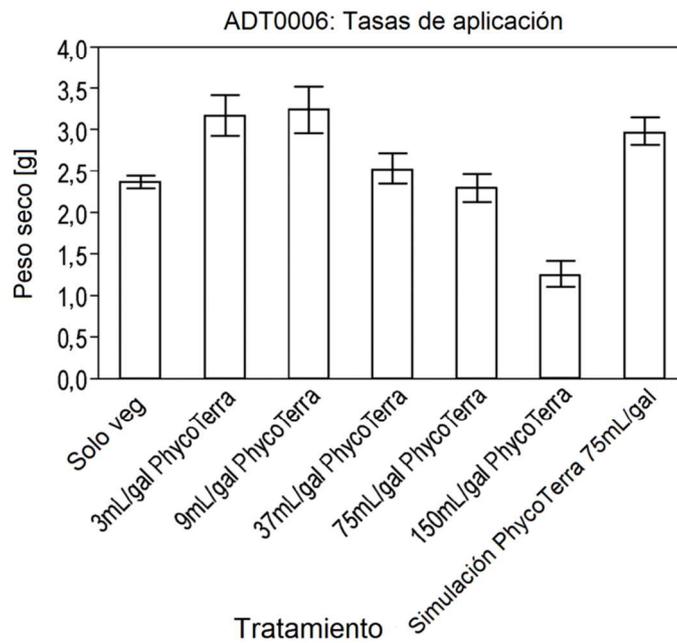


FIG. 4

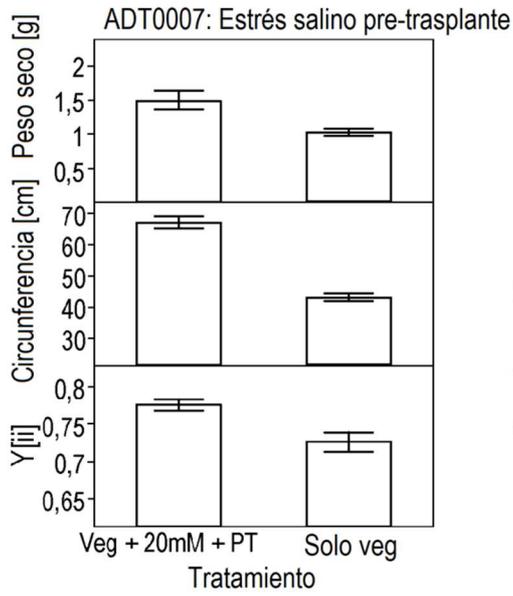


FIG. 5A

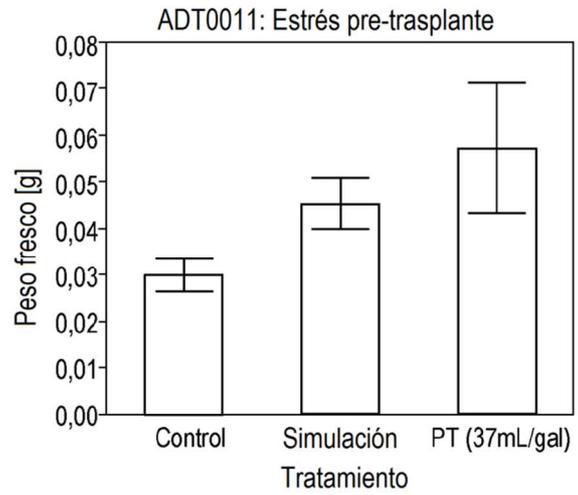


FIG. 5B

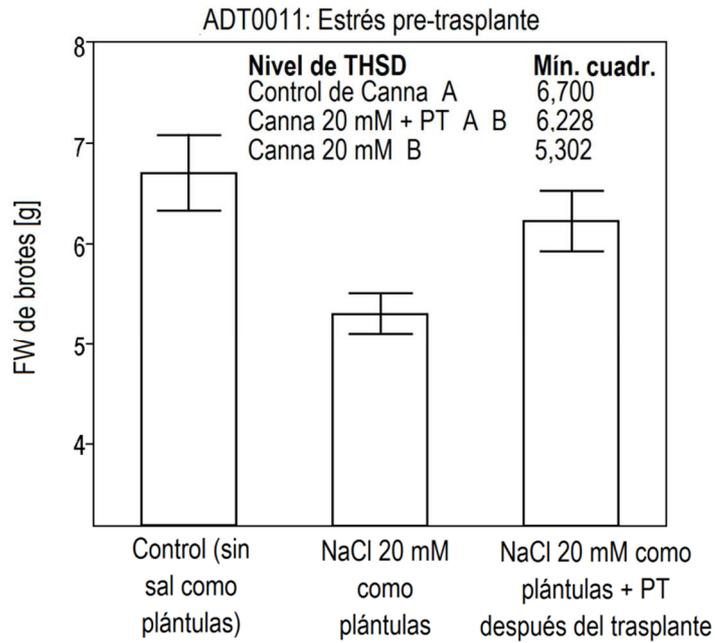


FIG. 5C

FIG. 5D

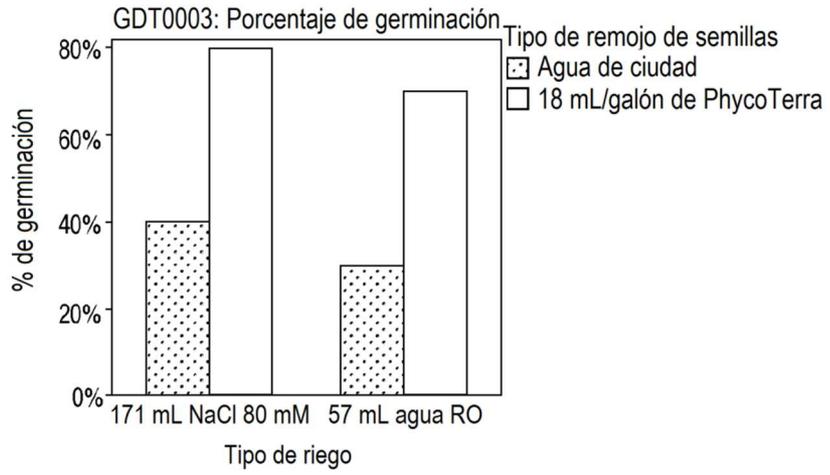


FIG. 5E

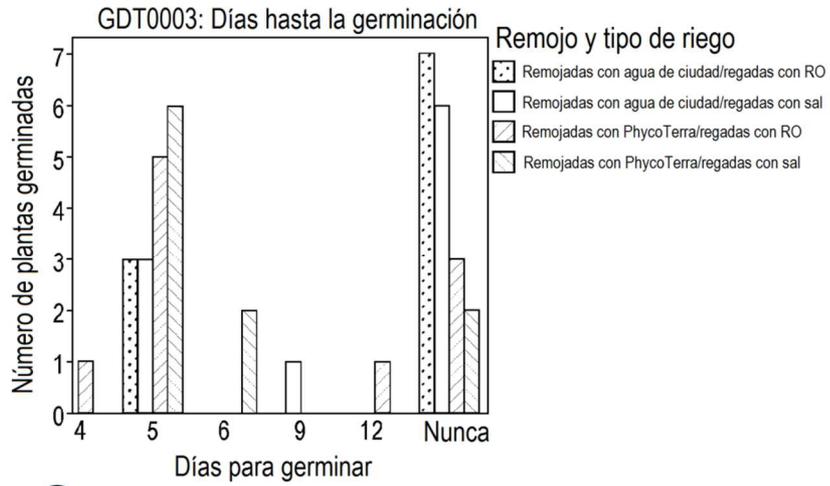
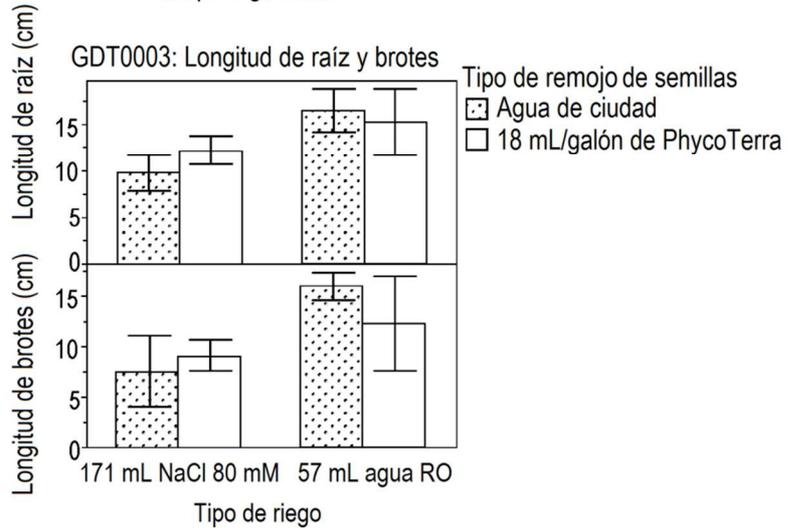
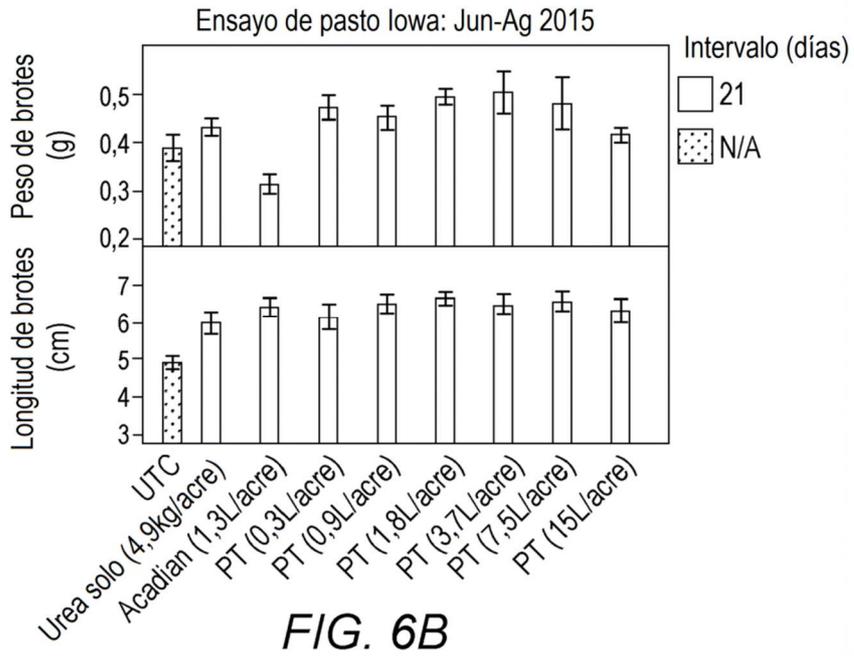
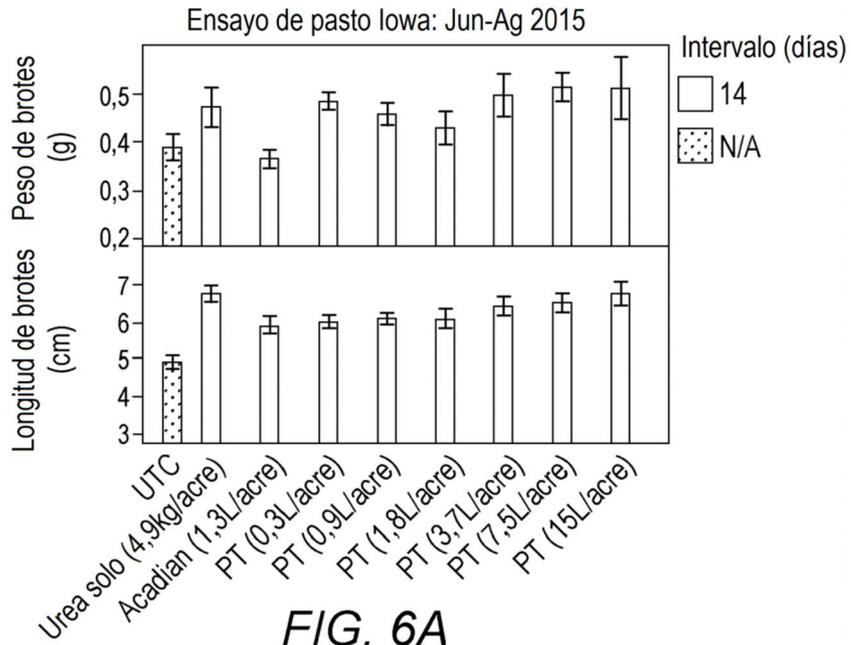


FIG. 5F





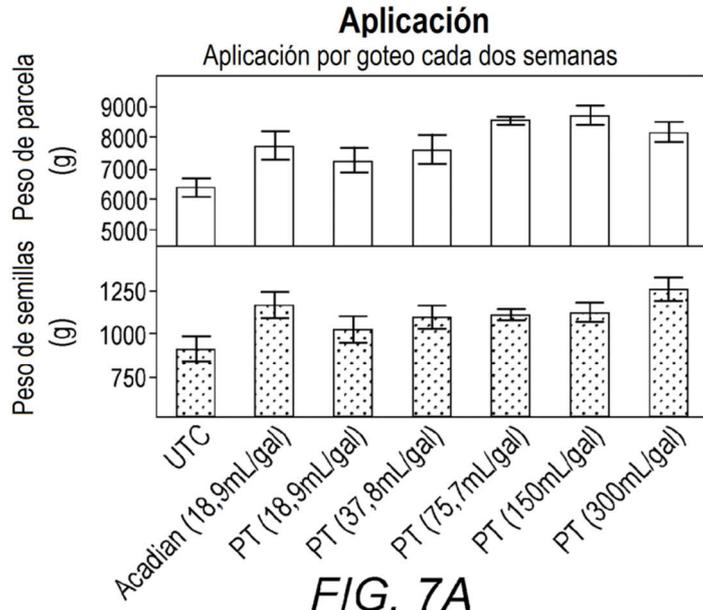


FIG. 7A

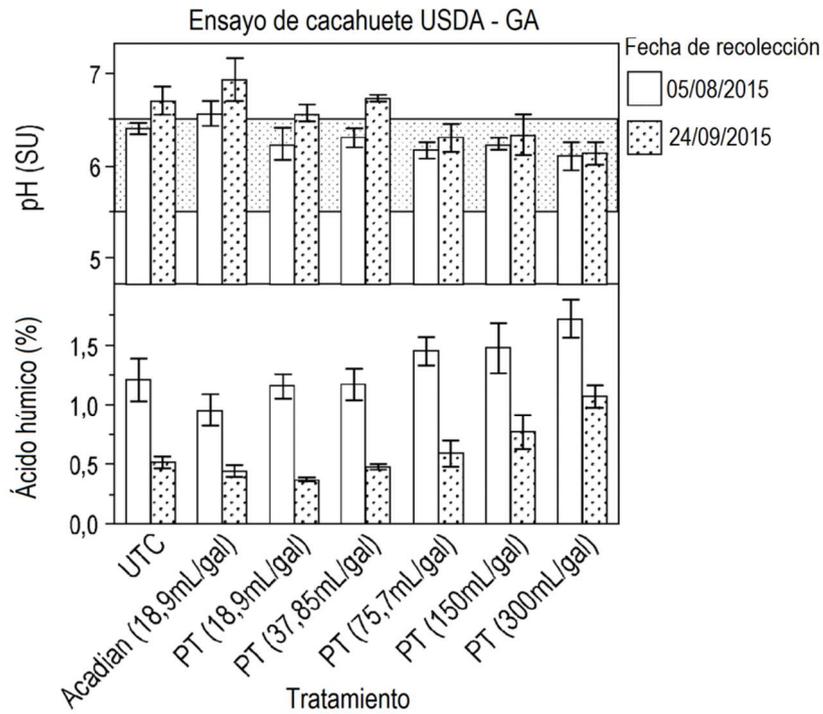


FIG. 7B

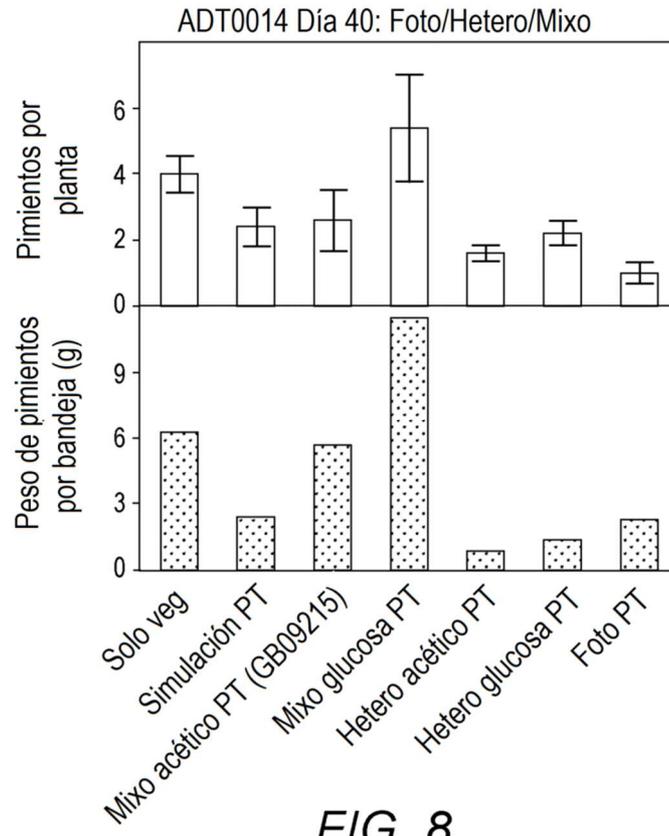


FIG. 8