

Biofertilizante a partir de *Chlorella vulgaris*

Biofertilizer from *Chlorella vulgaris*

Natalia Romero Torres^{ac}, Juan Sandoval-Herrera^{bd}

^a Ingeniera Química de la Fundación Universidad de América, Colombia

^b Ingeniero Químico y Magister en Ingeniería Química. Profesor de la Fundación Universidad de América, Colombia

^c natalia.romero@estudiantes.uamerica.edu.co | <https://orcid.org/0009-0006-3237-3129>

^d juan.sandoval@profesores.uamerica.edu.co | <https://orcid.org/0000-0001-8957-1421>

Citation: Romero Torres, N., Sandoval-Herrera, J. (2024). Biofertilizante a partir de *Chlorella vulgaris*. *Mutis*, 14(1), 1- 12.
<https://doi.org/10.21789/22561498.2048>

Recibido: 24 de agosto de 2023
Aceptado: 25 de octubre de 2023

Copyright: © 2024 por los autores. Licenciado para *Mutis*. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RESUMEN

En este estudio se investigó el potencial de la microalga *Chlorella vulgaris* como materia prima para la producción de un biofertilizante, en respuesta a la necesidad de alternativas más sostenibles y menos perjudiciales para el ambiente y los cultivos, a diferencia de los fertilizantes sintéticos. Se cultivó la microalga en dos tipos de medio, empleando un medio de cultivo comercial (cultivo 1) y aguas residuales de la industria de alimentos (cultivo 2) a temperatura ambiente y condiciones controladas de iluminación y agitación, en donde se obtuvo un biofertilizante líquido a partir de su biomasa. Se realizaron pruebas de laboratorio para determinar el pH, la densidad y el contenido de nutrientes como fósforo, calcio, cobre, y nitrógeno para el cultivo 1 y para el cultivo 2. Además, se llevó a cabo una evaluación del desempeño del biofertilizante mediante el índice de germinación de semillas de berro y rábano. Se observó mayor crecimiento celular en el cultivo 1 con respecto al cultivo 2, y ninguna de las semillas mostró crecimiento en el periodo de tiempo evaluado.

Palabras clave: cultivo; horticultura; nutrientes; productividad; semillas; ciencias naturales.

ABSTRACT

In this study we researched the potential that the *Chlorella vulgaris* microalgae has as a raw material for the production of a biofertilizer, in response to the need for more sustainable alternatives that are less harmful to the environment and crops, unlike synthetic fertilizers. The microalgae was grown in two types of environments: a commercial culture (culture 1) and in wastewater from the food industry (culture 2) at room temperature and under controlled lighting and agitation conditions. Under these settings, a liquid biofertilizer was obtained from the biomass. Laboratory tests were performed to determine the pH, density and content of nutrients such as phosphorus, calcium, copper, and nitrogen in culture 1 and culture 2. In addition, an evaluation of the performance of the biofertilizer was conducted by calculating the germination index of watercress and radish seeds. Greater cell growth was observed in culture 1 compared to culture 2, and none of the seeds showed growth in the evaluated time period.

Keywords: Crop; Horticulture; Nutrients; Productivity; Seeds; Natural sciences.

INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes son fundamentales para el mantenimiento de los cultivos porque aportan los compuestos necesarios para su crecimiento y contenido nutricional. Sin embargo, su uso, especialmente el de fertilizantes sintéticos, contribuye a la emisión de gases de efecto invernadero como el óxido nitroso (N₂O), el dióxido de carbono (CO₂) y el metano, relacionados con el cambio climático (Walling & Vaneckhaute, 2020). El N₂O, en particular, tiene un potencial de calentamiento global significativo, incluso mayor al del CO₂; y una vida útil prolongada en la atmósfera, alrededor de 121 años (Kudeyarov, 2020). Por tanto, es crucial buscar alternativas sostenibles y amigables con el medio ambiente en la producción agrícola (Rodríguez et al., 2023).

Por otra parte, el crecimiento de la población mundial y el aumento de la demanda de recursos naturales y alimenticios que esto significa, han generado deficiencias y desafíos en la seguridad alimentaria a nivel global (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2021). Según la ONU (2022), se espera que la población humana alcance los 9 700 millones de habitantes para el año 2050, lo que aumentará la escasez de recursos. El aumento de población obliga a aumentar la producción de cultivos, lo que conlleva uso intensivo de fertilizantes perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana ya que algunos de sus componentes, como los nitritos, afectan la fertilidad del suelo alterando su pH y su estructura (Dávila et al., 2022), además de dejar trazas de sustancias nocivas en los productos agrícolas, que ponen en riesgo la salud de los consumidores y los agricultores, debido a que el contenido no se absorbe por las plantas en un 30 a 50% (Rashmi et al., 2021).

En este contexto, la industria química busca soluciones más ecológicas y económicas en donde los biofertilizantes han surgido como una opción prometedora. Estos, también llamados fertilizantes orgánicos, son productos compuestos a partir de organismos vivos, como las tan difundidas lombrices californianas (Cardona et al., 2021), o de microorganismos como los hongos micorrízicos (Reyes-Pérez et al., 2021) con propiedades benéficas que mejoran las características biológicas del suelo, aumentando la productividad de los cultivos y mejorando la calidad de los productos; asimismo, presentan bajos niveles de contaminación ambiental y representan una opción rentable para los agricultores (Collahuazo y Araujo, 2019). Una posible fuente para la producción de biofertilizantes son las microalgas, que ya han sido estudiadas como biofertilizantes o bioestimulantes para diferentes cultivos (Coppens et al., 2016; Ronga et al., 2019; Das et al., 2019).

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos con capacidad de captar y utilizar CO₂ en sus procesos metabólicos (Zheng et al., 2020). También contribuyen a la reducción de gases de efecto invernadero (Mountourakis et al., 2021), poseen una biomasa rica en nutrientes y pueden utilizarse en la agricultura porque controlan la deficiencia de nitrógeno en las plantas y favorecen el crecimiento de los cultivos (Collahuazo y Araujo, 2019). Específicamente, *Chlorella vulgaris* es una especie de microalga de forma circular con alto contenido lipídico y alta producción de biomasa que se produce fácilmente por fotosíntesis y con un ciclo de crecimiento corto, entre dos y cuatro semanas (Metsoviti et al., 2019a; Ward & Rehmann, 2019), lo que evita riesgos de contaminación y beneficia su uso en diferentes procesos por transformaciones químicas (Ru et al., 2020).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de un biofertilizante a partir de *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio para su uso en horticultura en Colombia, con el fin de determinar la cantidad de nutrientes que puede aportar al producto final, buscando su posible integración en un esquema de biorrefinería, en principio adoptando una estrategia de biorremediación de aguas residuales de la industria alimentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este estudio se realizó en las instalaciones de la Universidad de América en la ciudad de Bogotá. La cepa de microalgas, *Chlorella vulgaris*, utilizada fue recolectada del laboratorio del semillero ProCycles de la Universidad de América.

Métodos y población de estudio

El cultivo de las microalgas se llevó a cabo en dos fotobiorreactores esterilizados con un volumen de 500 mL cada uno. Durante el período de cultivo se mantuvieron condiciones controladas de luz y agitación. Se usó luz roja con una intensidad de 144 luxes en un ciclo de 12:12 horas (Chu et al., 2021; Katam et al., 2022). Se proporcionó agitación constante a los fotobiorreactores mediante una bomba con motor de aire, y la temperatura ambiente promedio durante el cultivo se mantuvo entre 14 y 20 °C, rango adecuado para el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* (Collahuazo y Araujo, 2019), monitoreado cada tres días.

En cuanto a los medios de cultivo, en primer lugar, el cultivo 1 consistió en que se utilizó el medio de cultivo tradicional del semillero mezcla de agua desionizada y medio comercial "Fertifoliar" del cual se destaca su concentración de nitrógeno total (103,8 g L⁻¹), fósforo asimilable (302,0 g L⁻¹) potasio soluble (96,8 g L⁻¹) de acuerdo con la ficha comercial del producto (Cenagro, s. f.) en una proporción de 2 a 1 para un volumen total de 200 mL y se agregaron 10 mL de la microalga *Chlorella vulgaris* (Soto et al., 2020). Por otro lado, se usó el agua residual proveniente de la industria de alimentos (Cultivo 2) como medio de cultivo alternativo con un volumen de 200 mL de agua residual y 10 mL de *Chlorella vulgaris* para determinar el potencial de reducir la generación de residuos (Soto et al., 2020).

El tiempo de cultivo planificado para 2 semanas se extendió hasta 37 días para obtener un mayor crecimiento de biomasa microalgal, con mediciones periódicas de pH y medidas de absorción en espectrofotómetro de luz visible Genesys a una longitud de onda de 640 nm para determinar la actividad fotosintética de las microalgas (Soto et al., 2020) y calcular la tasa de crecimiento (d⁻¹) en ambos cultivos, utilizando la siguiente ecuación (Metsoviti et al., 2019b):

$$\mu_{exp} = \ln \frac{\left(\frac{\alpha_2}{\alpha_1}\right)}{(t_2 - t_1)} \quad (\text{Ec. 1})$$

En donde α_1, α_2 son las lecturas de absorbancias al principio y al final de la fase de crecimiento exponencial, respectivamente; t_1, t_2 son los tiempos de lectura inicial y final de cultivo, respectivamente.

Por otro lado, se midió pH, cloro libre residual (mg L^{-1}) y demanda química de oxígeno (mg^{-1}) utilizando equipos Hach para evaluar la calidad del agua residual en el cultivo 2; y el contenido de sólidos totales (g) por medio de un método gravimétrico (Instituto de Hidrología, meteorología y Estudios Ambientales [IDEAM], 2021).

Separación de biomasa microalgal

Para separar la biomasa del medio de cultivo líquido se usó centrifugación a 3000 RPM durante 15 minutos (Alam et al., 2020), dejando el producto líquido como el biofertilizante de interés, que se transfirió cuidadosamente a un recipiente adecuado y se mantuvo a una temperatura de $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$, para detener el crecimiento de las microalgas y prevenir la pérdida de nutrientes en el producto.

Determinación de nutrientes

Se consideró la clasificación 4.2.7 de enmiendas orgánicas no húmicas de la Norma Técnica Colombiana 5167 (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación [ICONTEC], 2011) que establece los parámetros que se deben caracterizar, así como los componentes principales del biofertilizante, que en este caso se trata de un producto orgánico líquido obtenido a partir de microalgas y residuos. Dentro de los parámetros de la norma se determinó pH, densidad (g mL^{-1}), conductividad eléctrica (dS m^{-1}), fósforo (mg L^{-1}), calcio (mg L^{-1}), nitrógeno (mg L^{-1}) y cobre (mg L^{-1}) (ICONTEC, 2011).

Cultivo de semillas

Se realizó un diseño de experimentos de dos factores con réplica $[2(3*2)]$ para evaluar el efecto del biofertilizante en el crecimiento de dos tipos de semillas (rábano y berro) y tres tipos de fertilizantes (el biofertilizante obtenido a partir del cultivo 1, el biofertilizante obtenido a partir del cultivo 2 y un fertilizante sintético), para un total de 3 ensayos con duplicado para cada tipo de semilla, además de incluir un ensayo con agua como control. Finalmente, se calculaba el índice de germinación.

Tabla 1. Diseño de experimentos $[2(3*2)]$ cultivo de semillas.

Biofertilizante	Semilla	
	Rábano (R)	Berro (B)
Cultivo 1 (C1)	C1 – R	C1 – B
Cultivo 2 (C1)	C2 – R	C2 – B
Fertilizante sintético (FS)	FS – R	FS – B

Fuente: elaboración propia

Este índice de germinación, desarrollado por Zucconi, (Pluschke et al., 2023) está directamente relacionado con el contenido de sustancias fitotóxicas en un abono, las cuales pueden interferir en el crecimiento de las semillas al degradar la materia orgánica fresca. Por consiguiente, se obtiene el porcentaje de germinación a partir del número de semillas que germinaron y la longitud de germinación, pues según la literatura, un porcentaje de germinación superior al 70 % se considera un indicador de un buen abono (Yang et al., 2021). En el marco de este estudio, se utilizaron cajas de Petri como recipientes de cultivo, con un papel filtro humedecido con 3 mL de extracto de biofertilizante.

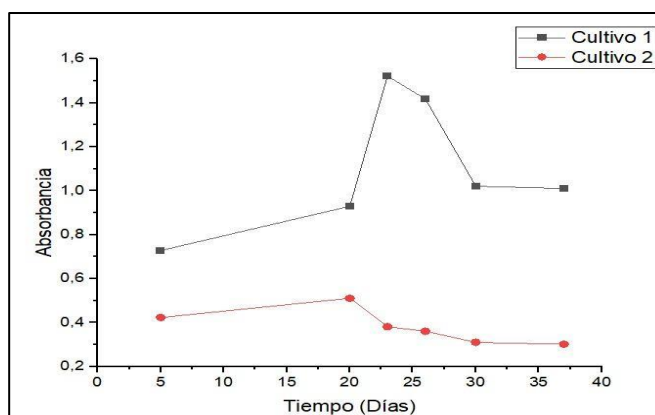
A continuación, se agregaron 10 semillas y se añadieron otros 10 mL de extracto. Con el propósito de evitar pérdidas de extracto y minimizar la entrada de aire,

cada una de las cajas de Petri se selló. Posteriormente, se incubaron las cajas a temperatura ambiente durante 72 horas en oscuridad para simular las condiciones naturales de germinación (Magrini et al., 2022; Pluschke et al., 2023).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de crecimiento de los cultivos de microalgas, relacionados con la absorbancia medida en el espectrofotómetro, se muestran en la Figura 1.

Figura 1. Evolución de absorbancia durante el periodo de 37 días para el cultivo 1 y 2.



Fuente: Elaboración propia.

Como se mencionó, el tiempo de cultivo se extendió por 37 días, debido a que pasados los 15 días iniciales no se presentó un cambio representativo en la producción de biomasa. En la Figura 1 se puede observar, para el cultivo 1, que la fase de crecimiento exponencial se da entre el día 20, con 0.929 unidades de absorbancia y el día 23 con 1.522 unidades de absorbancia, para una tasa de crecimiento de 0.164 d^{-1} . Sin embargo, para el cultivo 2 no se presentó fase de crecimiento exponencial; al contrario, se podría considerar que entra en una fase de muerte celular (Metsoviti et al., 2019b). Una posible causa de esta situación se encuentra en la formación de espuma, la cual afectaría la capacidad de mezclado efectivo, conduciendo a la formación de gradientes de exposición de las células a la luz, concentración de nutrientes y pH, entre otros (Soto-Sánchez et al., 2023).

Después de la separación de la biomasa en el cultivo 1, se obtuvo un volumen de 268 mililitros de producto líquido y 1.559 gramos de biomasa, mientras que en el cultivo 2 se obtuvo un volumen de 255 mililitros de producto líquido y 0.034 gramos de biomasa. La explicación del aumento de volumen se debe a que por efectos del tiempo se dio evaporación del medio acuoso, por lo cual se debía reponer ese volumen con agua desionizada.

La formación de espuma afecta la absorción de nutrientes para el crecimiento, la producción de biomasa y nutrientes por parte de la microalga (Robalino, 2020). Esta espuma se debe a los tensoactivos presentes en el agua residual de la industria de alimentos en la que se utilizan este tipo de compuestos como detergentes para garantizar la calidad de los productos (Robalino, 2020). En la Tabla 2 se muestran los resultados de la caracterización del agua residual.

Tabla 2. Resultados de la caracterización del agua residual de la industria de alimentos.

pH	6
Cloro libre residual (mg L ⁻¹)	0.1
DQO (mg L ⁻¹)	5935
Sólidos totales (g)	0.043

Fuente: Elaboración propia.

El agua residual utilizada como medio de cultivo presenta concentraciones mínimas de cloro libre residual y sólidos totales. Pero, el valor de la demanda química de oxígeno (DQO), 5935 mg L⁻¹, indica que tiene carga contaminante significativa. Todo lo anterior se ve reflejado en la fase de separación de biomasa microalgal, ya que se redujo la cantidad de biomasa obtenida en el cultivo 2 en comparación con la biomasa obtenida en el cultivo 1.

En la Tabla 3, se presentan los resultados de la determinación del contenido de nutrientes en el biofertilizante obtenido a partir del cultivo 1 y el biofertilizante obtenido a partir del cultivo 2.

Tabla 3. Resultados del análisis de los biofertilizantes obtenidos.

Parámetro*	Cultivo 1	Cultivo 2
pH (16,6 °C)	7	6.5
Densidad (g mL ⁻¹)	0.85	0.88
Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹)	1	1
Fósforo (mg L ⁻¹)	>5	>5
Calcio (mg L ⁻¹)	39	20
Nitrógeno (mg L ⁻¹)	0.6	0.5
Cobre (mg L ⁻¹)	3.5	3.27

*Métodos de análisis empleados: pH: potenciómetro; densidad: picnómetro; conductividad eléctrica: conductímetro; fósforo: colorimetría-fotómetro; calcio: colorimetría-fotómetro; nitrógeno: colorimetría-fotómetro; cobre: colorimetría-fotómetro.

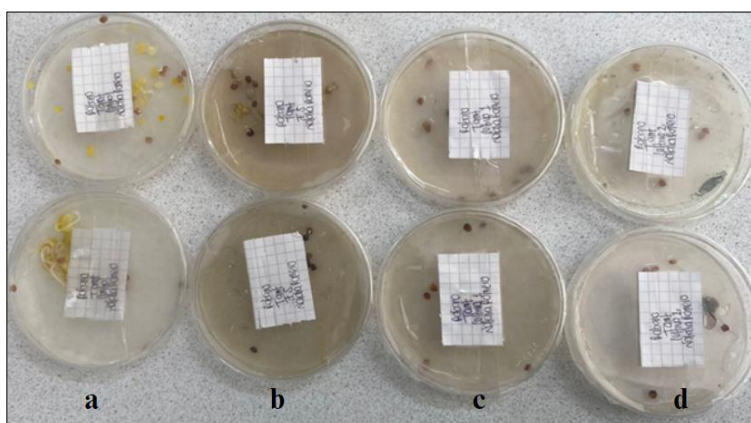
Fuente: Elaboración propia.

Para la determinación de nutrientes los resultados muestran diferencias significativas entre ambos cultivos. En el caso del pH, el cultivo 1 está dentro de un rango óptimo para el crecimiento de las plantas, con un valor de 7 (Collahuazo y Araujo, 2019). Sin embargo, para el cultivo 2, el pH se sale del rango indicado, con un valor de 6.5. En cuanto a la conductividad eléctrica (CE), contenido de fósforo, nitrógeno, calcio y cobre, los valores en ambos biofertilizantes fueron similares, pero se evidenció que son más bajos en comparación con los reportados por Soto et al. (2020) en su propuesta para la obtención de un fertilizante orgánico a partir de microalgas, pues su conductividad eléctrica alcanzó 3 012 dS m⁻¹, el contenido de nitrógeno fue de 1 000 mg L⁻¹, 1 300 mg L⁻¹ de fósforo y 900 mg L⁻¹ de calcio; sin embargo, el valor de 3.2 mg/L de cobre si coincide con los biofertilizantes obtenidos del cultivo 1 y 2. Aunque los

autores utilizaron la microalga *Scenedesmus*, además de la *Chlorella*, lo que pudo influir en sus resultados.

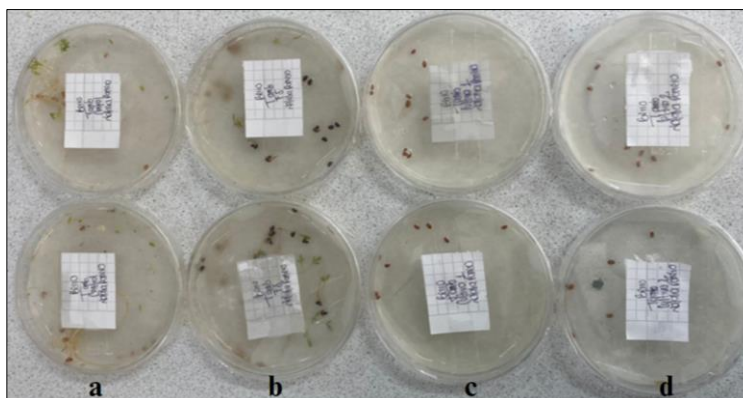
En cuanto a las pruebas de germinación, luego de tres días no se observaron cambios significativos en las semillas de berro y rábano. Por lo tanto, se decidió prolongar el tiempo de germinación otras 72 horas. Al finalizar este período ampliado, no se obtuvieron resultados positivos para los dos biofertilizantes, como se puede observar en las figuras 2 y 3. En el caso del cultivo 2, esto podría atribuirse al alto contenido de DQO en el agua residual, ya que no se presentó crecimiento celular de la microalga durante el tiempo de cultivo, como se puede evidenciar en las figuras 4 y 5 por la presencia de moho.

Figura 2. Ensayo índice de germinación después de 6 días de incubación, en semillas de rábano utilizando como extracto agua como control (a), un fertilizante sintético comercial (b) y el biofertilizante obtenido del cultivo 1 (c) y el cultivo 2 (d).



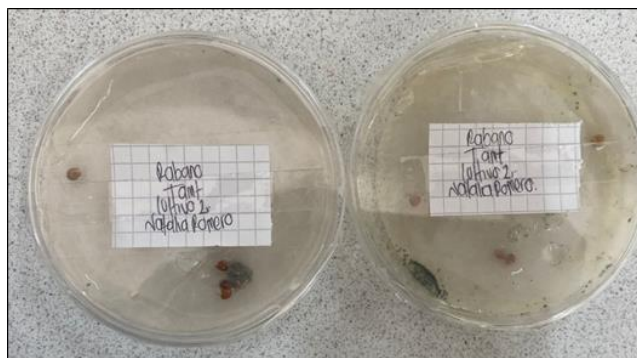
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. Ensayo índice de germinación después de 6 días de incubación, en semillas de berro utilizando como extracto agua como control (a), un fertilizante sintético comercial (b) y el biofertilizante obtenido del cultivo 1 (c) y el cultivo 2 (d).



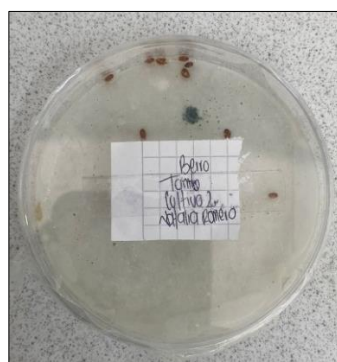
Fuente: Elaboración propia.

Figura 4. Ensayo índice de germinación en semillas de rábano utilizando como extracto el biofertilizante obtenido del cultivo 2, después de 6 días de incubación.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 5. Ensayo índice de germinación en semillas de berro y rábano utilizando como extracto el biofertilizante obtenido del cultivo 2, después de 6 días de incubación.



Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, para el cultivo de las semillas, debido a que no se presentó crecimiento, no se realizaron los cálculos del índice de germinación, pues no se obtuvieron semillas germinadas y tampoco longitud de germinación en el tiempo esperado. La falta de crecimiento sugiere una posible presencia de sustancias fitotóxicas en los biofertilizantes, como metales pesados, que se pueden acumular en los suelos, alterando su estructura y el rendimiento de los cultivos. Además de interferir con los procesos metabólicos de las plantas, como la fotosíntesis, lo que limita su crecimiento (Feng et al., 2021). Para verificar esta hipótesis se pueden utilizar técnicas como la espectrofotometría de absorción atómica, que permitiría detectar la presencia y concentración de estos metales en el biofertilizante (Zepeda et al., 2021).

CONCLUSIONES

Se evidenciaron diferencias significativas entre el cultivo 1 y el 2: mientras que el 1 exhibió una fase de crecimiento exponencial con una tasa de crecimiento de 0.164 d^{-1} , el cultivo 2 mostró una fase de muerte celular, con mínima cantidad de biomasa obtenida (0.034 g), demostrando que la presencia de espuma en el agua residual en este cultivo, así como su alto DQO (5935 mg L^{-1}) afectaron negativamente la

producción de biomasa. Asimismo, la falta de germinación en las semillas puede indicar presencia de sustancias fitotóxicas en el producto.

Debido a que se trata de organismos vivos, el comportamiento de los cultivos no es predecible; a pesar de esto, el uso de microalgas en la producción de biofertilizantes sigue siendo una opción favorable.

RECOMENDACIONES

Se sugiere continuar con los ensayos para desarrollar un biofertilizante más eficiente y ecoamigable. Reducir los tiempos de cultivo y de exposición a la luz, podría mejorar la absorción de nutrientes y el crecimiento celular de las microalgas. Se debería verificar la presencia de metales pesados en cualquier biofertilizante obtenido a partir de microalgas, que use agua residual como sustituyente parcial del medio de cultivo.

AGRADECIMIENTOS [T1]

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad de América por su apoyo y la oportunidad de realizar esta investigación. También desean extender su más sincera gratitud a los laboratorios y al personal académico que brindó su valiosa colaboración en este proyecto.

REFERENCIAS

Alam, A., Wang, Y., Liu, F., Kang, H., Tang, S. W., Wang, Y., ... & Peng, L. (2020). Modeling of optimal green liquor pretreatment for enhanced biomass saccharification and delignification by distinct alteration of wall polymer features and biomass porosity in *Miscanthus*. *Renewable Energy*, 159, 1128-1138. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.06.013>

Cardona, A., De La Cruz, O., Matta, Y., Porta, Y., Bolívar, R. y Verdeza, A. (2021). Estudio de mercado del uso del fertilizante humus de lombriz roja californiana en la Región Caribe. *Investigación y desarrollo en TIC*, 12(2), 13-30.

Cenagro. (s.f.). Fertifoliar. <https://cenagro.com.co/bionutricion-foliar-cenagro/fertifoliar/>

Chu, B., Zhao, J., Zheng, H., Gong, J., Chen, K., Zhang, S., ... & He, Y. (2021). Performance of LED with mixed wavelengths or two-phase culture on the growth and lipid accumulation of *Chlorella pyrenoidosa*. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 14(1), 90-96. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20211401.6098>

Collahuazo, Y. y Araujo, S. (2019). Producción de biofertilizantes a partir de microalgas. *Revista del Centro de Estudio y Desarrollo de la Amazonia*, 10(02), 75-80.

Coppens, J., Grunert, O., Van Den Hende, S., Vanhoutte, I., Boon, N., Haesaert, G. & De Gelder, L. (2016). The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels. *Journal of applied phycology*, 28, 2367-2377. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0775-2>

Das, P., Khan, S., Chaudhary, A. K., AbdulQuadir, M., Thaher, M. I. & Al-Jabri, H. (2019). Potential applications of algae-based bio-fertilizer. *Biofertilizers for sustainable agriculture and environment*, 41-65. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_3

Dueñas, J.P. y Intrigo, F.G. (2022). Contenido de metales pesados (Cu, Pb, Ni, Cd) en abonos orgánicos y las materias primas para su elaboración. *La Técnica*, (37), 26-35. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i27.3674

Dávila, E. L., Castro, Y. M. & Romero, O. R. (2022). Características y consecuencias adversas a la salud humana de agroquímicos usados en la agricultura cubana. *Revista Cubana de Salud Pública*, 48.

Feng, Z., Ji, S., Ping, J. & Cui, D. (2021). Recent advances in metabolomics for studying heavy metal stress in plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116402. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116402>

Instituto de Hidrología, meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. (2021). *Instructivo de ensayo determinación sólidos totales secados a 103° - 105°c. SM 2540 B*.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC. (2011). *Productos para la industria agrícola. Productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y enmiendas o acondicionadores de suelo (NTC 5167)*.

Katam, K., Ananthula, R., Anumala, S., Sriariyanun, M. & Bhattacharyya, D. (2022). *The impact of light intensity and wavelength on the performance of algal-bacterial culture treating domestic wastewater*. In E3S Web of Conferences (Vol. 355, p. 02003). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202235502003>

Kudeyarov, V. N. (2020). Nitrous oxide emission from fertilized soils: an analytical review. *Eurasian Soil Science*, 53(10), 1396-1407. <https://doi.org/10.1134/S1064229320100105>

Magrini, S., Simón, A. A., Fiorucci, E., Pennuzzi, E., Superchi, S. & Zucconi, L. (2022). Seed germination protocols for three coastal dune plants in central Italy. *Flora*, 32, 201. <https://doi.org/10.7320/FIMedit32.201>

Metsoviti, M. N., Katsoulas, N., Karapanagiotidis, I. T. & Papapolymerou, G. (2019a). Effect of nitrogen concentration, two-stage and prolonged cultivation on growth rate, lipid and protein content of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(5), 1466-1473. <https://doi.org/10.1002/jctb.5899>

Metsoviti, M., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, L. y Katsoulas, N. (2019b). Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/plants9010031>

Mountourakis, F., Papazi, A. & Kotzabasis, K. (2021). The microalga *Chlorella vulgaris* as a natural bioenergetic system for effective CO2 mitigation—new perspectives against global warming. *Symmetry*, 13(6), 997. <https://doi.org/10.3390/sym13060997>

Organización de las Naciones Unidas, ONU (2022). *La población mundial llega a los 8000 millones de habitantes*. <https://www.un.org/es/desa/la-poblaci%C3%B3n-mundial-llega-los-8000-millones-de-habitantes>

Pluschke, J., Faßrinner, K., Hadrich, F., Loukil, S., Chamkha, M., Geißen, S. U. & Sayadi, S. (2023). Anaerobic digestion of olive mill wastewater and process derivatives—Biomethane potential, operation of a continuous fixed bed digester, and germination index. *Applied Sciences*, 13(17), 9613. <https://doi.org/10.3390/app13179613>

Robalino, D. E. (2020). *Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno en cultivos por lote de la bacteria (Bacillus subtilis DS23) en un biorreactor* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/30841>

Rashmi, I., Roy, T., Kartika, K. S., Pal, R., Coumar, V., Kala, S. & Shinoji, K. C. (2020). Organic and inorganic fertilizer contaminants in agriculture: Impact on soil and water resources. *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management*, 3-41. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_1

Reyes-Pérez, J. J., Rivero-Herrada, M., Solórzano-Cedeño, A. E., Carballo-Méndez, F. D. J., Lucero-Vega, G. y Ruiz-Espinoza, F. H. (2021). Aplicación de ácidos húmicos, quitosano y hongos micorrízicos como influyen en el crecimiento y desarrollo de pimiento. *Terra Latinoamericana*, 39. <https://doi.org/10.28940/terra.v39i0.833>

Rodríguez, K. A., Brenes, J. P. S., Amador, S. R., Fonseca, A. V. y López, D. T. (2023). Emisiones de óxido nitroso y metano en pasturas activas en la zona de vida bosque húmedo tropical en Costa Rica. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 21(2), 130-145. <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v21.n2.2023.2143>

Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E. & Tava, A. (2019). Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy*, 9(4), 192. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>

Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A. & Nagappan, T. (2020). Chlorella vulgaris: A perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Applied Phycology*, 1(1), 2-11. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1715256>

Soto, G., Monar, P., García, Y., Simbaña, A., Tello, E., Brito, J. y Torres, D. (2020). Propuesta de un protocolo para la obtención de fertilizante orgánico a partir de microalgas. *Agroindustria, Sociedad y Ambiente*, 1(14), 92-109

Soto-Sánchez, O., Hidalgo, P., González, A., Oliveira, P. E., Hernández Arias, A. J. & Dantagnan, P. (2023). Microalgae as raw materials for aquafeeds: Growth kinetics and improvement strategies of polyunsaturated fatty acids production. *Aqua-culture Nutrition*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/5110281>

Walling, E. y Vaneeckhaute, C. (2020). Greenhouse gas emissions from inorganic and organic fertilizer production and use: A review of emission factors and their variability. *Journal of Environmental Management*, 276. <https://doi-org.ezproxy.uamerica.edu.co/10.1016/j.jenvman.2020.111211>

Ward, V. C. & Rehmann, L. (2019). Fast media optimization for mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris*. *Scientific Reports*, 9(1), 19262. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55870-9>

Yang, Y., Wang, G., Li, G., Ruonan, M., Kong, Y. & Yuan, J. (2021). Selection of sensitive seeds for evaluation of compost maturity with the seed germination index. *Waste Management*, 136, 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.09.037>

Zepeda, M. Y. S., Herrera, M. L. y Bautista, L. R. (2021). Determinación de la capacidad de biacumulación de cadmio en *Vicia faba* L. y su efecto en la raíz y el crecimiento vegetativo. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 9(2), 46-60. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v9i2.358>

Zheng, M., Ji, X., He, Y., Li, Z., Wang, M., Chen, B., & Huang, J. (2020). Simultaneous fixation of carbon dioxide and purification of undiluted swine slurry by culturing *Chlorella vulgaris* MBFJNU-1. *Algal Research*, 47, 101866. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101866>