

Panorama general, retos y oportunidades del uso de insumos agrícolas como fuentes alternativas de nutrientes en el cultivo mixotrófico de *Chlorella sp.*

Luisa F. Caicedo¹; Isabella Ocampo²; Claudia M. Sichel³

Resumen.

Para que la producción de biomasa microalgal sea un proceso económicamente viable resulta indispensable generar una enorme cantidad de esta por unidad de volumen, por lo que se deben diseñar medios de cultivo que contengan los nutrientes necesarios para el óptimo crecimiento de las microalgas. Sin embargo, incluir únicamente reactivos de grado analítico en la formulación de dichos medios conlleva a la inviabilidad económica del proceso. Es aquí donde resulta de gran importancia la búsqueda de fuentes de nutrientes alternativas como posible estrategia para minimizar el gasto relacionado a los medios de cultivo. Esta revisión presentó el panorama general de la producción científica sobre el cultivo de microalgas, seguido de esto, se detallaron los tipos y estrategias de cultivo más utilizados actualmente y los requerimientos nutricionales de *Chlorella sp.* Finalmente, se discutieron los obstáculos de escalamiento relacionados con los medios de cultivo y la oportunidad que representa el uso de insumos agrícolas en la formulación de estos. Se encontró que el cultivo mixotrófico de microalgas presenta tasas de crecimiento más altas que los cultivos autótrofos y heterótrofos debido a la presencia de compuestos orgánicos en el medio. Por otra parte, se determinó que el uso de fertilizantes no representa disminución en la productividad de la

biomasa microalgal; por el contrario, se reporta una producción de biomasa superior o comparable con la obtenida en medios convencionales lo que los convierte en una estrategia efectiva para la reducción de costos. Sin embargo, se recomienda llevar a cabo la evaluación experimental de estos enfocados a las necesidades específicas de cada especie, así como del objetivo productivo del proceso.

Palabras clave. *Chlorella sp.*, producción de biomasa, mixotrófico, insumos agrícolas, retos de escalado.

ABSTRACT

To produce microalgal biomass to be an economically viable process, it is essential to generate a huge quantity of it per volume unit, so culture media must be designed that contain the necessary nutrients for the optimal growth of microalgae. However, including only analytical grade reagents in the formulation of said media leads to the economic infeasibility of the process. This is where the search for alternative nutrient sources is of great importance as a possible strategy to minimize the expense related to culture media. This review presented the general panorama of the scientific production on the cultivation of microalgae, followed by the types and strategies of

¹ Estudiante de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ingeniería y Diseño, luisa.caicedo1@u.icesi.edu.co

² Estudiante, Facultad de Ingeniería y Diseño, isabella.ocampo1@u.icesi.edu.co.

³ Asistente de investigación y docencia del departamento de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ingeniería y Diseño, claudia.sichel@u.icesi.edu.co, Universidad Icesi, Calle 18 No. 122-135 Pance, Cali, Valle del Cauca, Colombia

cultivation most currently used and the nutritional requirements of *Chlorella* sp. Finally, the scaling obstacles related to culture media and the opportunity represented using agricultural inputs in the formulation of these were discussed. It was found that the mixotrophic culture of microalgae presents higher growth rates than autotrophic and heterotrophic cultures due to the presence of organic compounds in the medium. On the other hand, it was determined that the use of fertilizers does not represent a decrease in the productivity of the microalgal biomass; on the contrary, a higher or comparable biomass production is reported with that obtained in conventional media, which makes them an effective strategy for cost reduction. However, it is recommended to carry out the experimental evaluation of these focused on the specific needs of each species, as well as the productive objective of the process.

Keywords. *Chlorella* sp., biomass production, mixotrophic, agriculture inputs, scale challenges.

1. Introducción.

Debido a su gran potencial tecnológico, innovador y sostenible, las microalgas han estado en el centro de múltiples investigaciones a nivel mundial durante los últimos 50 años. La biomasa de estos microorganismos fotosintéticos se puede utilizar como materia prima para la obtención de una gran variedad de productos con alto valor agregado a base de fitoquímicos vitales como carotenoides, antioxidantes, ácidos grasos, vitaminas, polisacáridos y proteínas. Su creciente demanda ha resultado en el cultivo masivo de estas a nivel mundial; solo en Europa se

prevé que el mercado de productos a base de microalgas alcance los \$879,59 millones de dólares en 2028, con una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR) del 7,8% (The Insight Partners, 2020a). Por su parte, este mercado en los EE. UU se evaluó en US \$320,87 millones en 2020 y se proyecta que alcance los US \$591,56 millones en 2028 (The Insight Partners, 2020b).

Sin embargo, para obtener rendimientos de biomasa favorables y altas tasas de crecimiento celular en las microalgas es indispensable el suministro de los nutrientes necesarios en las cantidades adecuadas (Abalde Alonso et al., 1995; Grobbelaar, 2013). Con ello, la formulación de un medio de cultivo que permita suplir las necesidades nutricionales específicas de la especie toma una mayor relevancia. Entre los componentes más importantes en los medios de cultivo encontramos: macronutrientes como nitrógeno, carbono, fósforo, magnesio y potasio; elementos traza o micronutrientes necesarios para la activación de algunas enzimas como hierro, manganeso, cobre y cobalto, y algunas vitaminas como biotina, B12 y tiamina. Sin embargo, las concentraciones de estos compuestos y elementos necesarios varían principalmente dependiendo del objetivo productivo y de la especie de microalga trabajada (Richmond, 1999).

Además de los nutrientes, también es necesario considerar la estrategia o tipo de cultivo adecuado según el objetivo productivo del proceso. Existen diferentes estrategias de cultivo y estas varían según la(s) fuentes de carbono y energía suministradas, entre las principales se encuentran: el cultivo heterotrófico, el cual requiere de una fuente de carbono orgánica; el cultivo autotrófico, que contiene una fuente de carbono inorgánica y luz; y el cultivo mixotrófico que cuenta con una fuente de carbono orgánica, una inorgánica

y luz (Manzoni, Montenegro, Martínez, 2021).

Entre los géneros de microalgas más estudiados, *Chlorella* es uno que encierra un conjunto de alrededor de 30 especies de algas verdes con una alta tasa de crecimiento y cuyo rendimiento en componentes específicos puede ser modificado mediante la naturaleza del medio suministrado. Además, posee una elevada resistencia contra condiciones adversas de cultivo como limitación de nitrógeno y fósforo, alta concentración de CO₂, exposición excesiva a la luz, exceso de hierro en el medio, aumento de temperatura e invasores; lo que la hace ideal para la producción a gran escala (Safi et al., 2014). Adicionalmente, según la FDA (Food and Drug Administration), la biomasa de este género se clasifica como “otro suplemento dietético” dentro de la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe) (García et al., 2017) permitiendo su uso en productos destinados para el consumo humano.

En la actualidad se producen cerca de 10.000 TON/año de *Chlorella* a nivel mundial (García et al., 2018) y a partir de estos procesos se ha estimado que el valor asociado a la preparación de los medios representa entre un 30 - 40% de los costos totales de operación (Jad-Allah, 2012). Dichos costos derivados de la formulación y estandarización de los medios de cultivo, sumados a la alta demanda de reactivos químicos, sales, vitaminas y demás nutrientes, son uno de los factores que hacen que en Colombia la producción comercial de biomasa y el desarrollo de escalamientos de estos procesos se dé en menor medida que en el resto del mundo; por lo que resulta de gran importancia la búsqueda de fuentes de nutrientes alternativas como posible estrategia para minimizar el gasto.

Algunos insumos agrícolas tales como fertilizantes, abonos inorgánicos o minerales contienen incorporados en su

preparación macro y micronutrientes que pueden suplir las necesidades nutricionales de las microalgas durante su crecimiento (Richmond, 1999). Son compuestos de fácil acceso para la comunidad y presentan precios menores comparados a los reactivos químicos convencionales de grado analítico usados en estos procesos productivos, todo lo anterior los convierte en una alternativa interesante a la hora disminuir los costos asociados a la formulación de los medios de cultivo.

Estos insumos, al ser mezclas multicomponentes, disminuyen significativamente el tiempo de preparación de los medios, lo que hace que no solo reduzcan el costo del medio sino también el de la mano de obra (Silva, 2016). Adicionalmente, estos compuestos pueden ser utilizados en procesos destinados a la obtención de suplementos alimenticios o piensos para animales.

Por todo lo anterior, el presente trabajo propone realizar un análisis sistemático de literatura que permita identificar el panorama, los retos de escalado relacionados al medio de cultivo, y los factores nutricionales más influyentes en la producción de biomasa de *Chlorella sp.* a escalas piloto e industrial. Así mismo, presentar los insumos agrícolas como una alternativa nutricional para la suplementación de los medios de cultivo en la producción de biomasa de *Chlorella sp.*

2. Metodología

Durante la investigación se establecieron 2 momentos principales, cada uno de ellos con una metodología de recopilación y análisis de información diferentes. El primero de ellos se denominó panorama general y tuvo como objetivo proporcionar información sobre el proceso investigativo del cultivo de microalgas tanto en Colombia como en el mundo, y de esta forma lograr

visualizar el estado real de la ciencia, así como el volumen, evolución y distribución geográfica de la investigación sobre el cultivo de microalgas. El segundo momento fue la búsqueda y análisis de la información sobre las estrategias y tipos de cultivo usados en la actualidad, los requerimientos nutricionales de *Chlorella* y la caracterización y disponibilidad de los insumos agrícolas; esto con el objetivo de presentar un análisis sobre los retos y oportunidades que presenta este campo para Colombia.

2.1 Panorama general: producción científica sobre el cultivo de microalgas.

Se recopiló información de las bases de datos internacionales “Scopus” y “Web of Science” buscando obtener un punto de referencia acerca de la literatura disponible sobre los medios de cultivo para la producción de *Chlorella*. Por ello, se construyó la ecuación de búsqueda o Query con los términos: «culture AND media AND *Chlorella* AND biomass» presentes en títulos, resúmenes, y palabras claves, específicamente. Los resultados arrojados en la búsqueda fueron filtrados desde el 2013 al 2021, ya que ambas bases coinciden con un aumento significativo en la producción de literatura científica en ese año. Por un lado, “Web of Science” pasa de 29 artículos en 2012 a 57 en 2013, manteniendo un crecimiento exponencial, donde a medio año ya lleva 70 artículos publicados. Por otro lado, “Scopus” muestra el aumento en la producción desde 2011 pasando de 19 artículos en 2010 a 39 en el siguiente año. Pero dado que en la otra base

no era tan significativo para hacer una comparación equitativa se tomó desde el 2013 también con 69 documentos, y la producción de documentos se mantuvo fluctuante, pero aumentó. En conjunto, siendo información actualizada sobre el trabajo y avances en el área.

Una vez depurada la búsqueda se descargó la información para su posterior análisis en el software R-studio. Este es un lenguaje de programación y entorno computacional dedicado a la estadística, el cual mediante cálculos de patrones permite desglosar de forma detallada una serie de variables como: volumen de producción y distribución espacial de la materia analizada [R Development Core Team, 2006]. En este sentido, R a través de su interfaz llamada Biblioshiny, permitió analizar dos indicadores bibliométricos cuantitativos de la actividad científica, el primero de ellos fue cantidad de publicaciones por año y el segundo los países que más publican sobre el tema. Los tipos de artículos y las bases de datos de donde se extrajo la información se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación de los artículos analizados en el panorama general.

	Scopus	Web of Science
Sources (Journals, Books, etc)	268	237
Documents	718	667
Article	667	637
Conference paper	34	0
Review	12	29
Book chapter	3	0
Conference review	1	0
Data paper	1	1

Fuente: realización propia con los datos obtenidos de R.

Adicionalmente, este software permitió obtener nubes de palabras con los títulos y resúmenes de los artículos analizados, dichas nubes sirvieron para determinar algunas de las palabras claves usadas en la

posterior etapa de búsqueda de información sobre los tipos de cultivo y los requerimientos nutricionales específicos de *Chlorella*.

2.2. Retos y oportunidades: Búsqueda y análisis de la información.

En esta búsqueda se usaron numerosas bases de datos para recopilar la información, algunas de las cuales fueron: “ScienceDirect”, “Scopus”, “Pubmed”, “SpringerLink”, “Scielo”, “Web of Science” y “Google Scholar”. También se determinaron distintas ecuaciones de búsqueda pues no se encontró una sola que

englobara toda la información necesaria. En dichos Query se tuvieron en cuenta palabras clave como “*Chlorella*”, “biomass”, “microalgae”, “productivity”, “production”, “culture”, “medium”, “growth”, “cultivation”; presentes en las nubes de palabras obtenidas con R anteriormente y las cuales se muestran en la gráfica 1. También se incluyeron abreviaciones comúnmente empleadas como “C: N”, “sp.” y “algae”, para reducir la pérdida de información valiosa y tener un mayor alcance.

Gráfica 1: Nubes de palabras claves.



a) Nube de palabras Scopus.

b) Nube de palabras Web of Science.

Fuente: realización propia mediante R.

Posteriormente se realizó la depuración de los documentos en dos etapas, en la primera de ellas solo se tuvo como criterio de selección el año de publicación del documento de 2011 hasta la actualidad. Buscando tener información actualizada y evaluar los avances y cambios dentro de la última década. En la segunda etapa se procedió con la lectura de los títulos, Abstract y palabras claves, aplicando los criterios de selección presentados en la tabla 2.

Tabla 2: Criterios de selección etapa 2.

Variable	Criterio
Microorganismo	Microalgas del género <i>Chlorella</i> .
Tipo de sistema empleado	fotobiorreactores (abiertos o cerrados) escala piloto o industrial
Produccion de biomasa	Incluye la concentración de biomasa que se genera
Formulación del medio de cultivo	Se establecen las concentraciones y nutrientes empleados así como las condiciones y tipo de cultivo.

Fuente: realización propia

Estos criterios se implementan con el objetivo de extraer solo la información

relevante para el estudio. Es así como resulta de vital importancia que los artículos analizados usaran microalgas del género *Chlorella*, fotobiorreactores abiertos o cerrados y que estuvieran en escala piloto o industrial, que incluyeran la cantidad de biomasa producida y la descripción detallada del medio empleado con concentraciones y condiciones de cultivo. De aquí, tras la depuración mencionada, obtuvimos 236 artículos.

Posteriormente se procedió con la organización de la información, los artículos seleccionados fueron agrupados por categorías, lo que permitió ver todo el universo de búsqueda clasificado en temáticas, facilitando el análisis de la información en las etapas posteriores, como se listan a continuación:

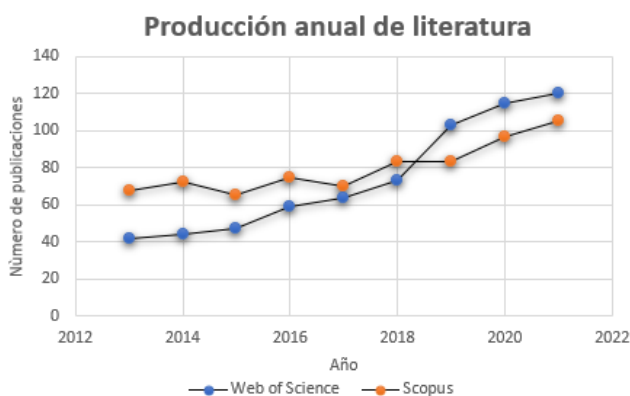
1. Dificultades en el escalamiento relacionadas específicamente al medio de cultivo.
2. Requerimientos nutricionales de *Chlorella sp.*
3. Tipos, estrategias de cultivo y medios usados actualmente.
4. Insumos agrícolas como nutrientes para el crecimiento de biomasa de *Chlorella sp.*

3. Resultados y discusión

3.1 Panorama general: Producción de literatura sobre el cultivo de microalgas.

A continuación, se muestran los resultados del análisis bibliométrico realizado usando la interfaz de R llamada Biblioshiny. En términos generales, en la gráfica 2 se puede observar que las publicaciones científicas sobre el cultivo de microalgas indexadas en las bases de datos internacionales “Scopus” y “Web of Science” presentan una tendencia creciente, alcanzando un máximo de publicaciones en el año 2021 con 105 y 120 publicaciones respectivamente. Esta tendencia puede verse relacionada con la creciente inversión en investigación sobre energías sostenibles y soluciones de base biológica para problemáticas ambientales y sociales. Adicionalmente, la implementación de economías con enfoques circulares en la industria también fomenta el interés científico por microorganismos como las microalgas, pues son particularmente expertos en la remediación de desechos y también son increíblemente versátiles minimizando el desperdicio y optimizando la reutilización de recursos.

Gráfica 2: Número de publicaciones por año en las bases de datos Scopus y Web of Science.

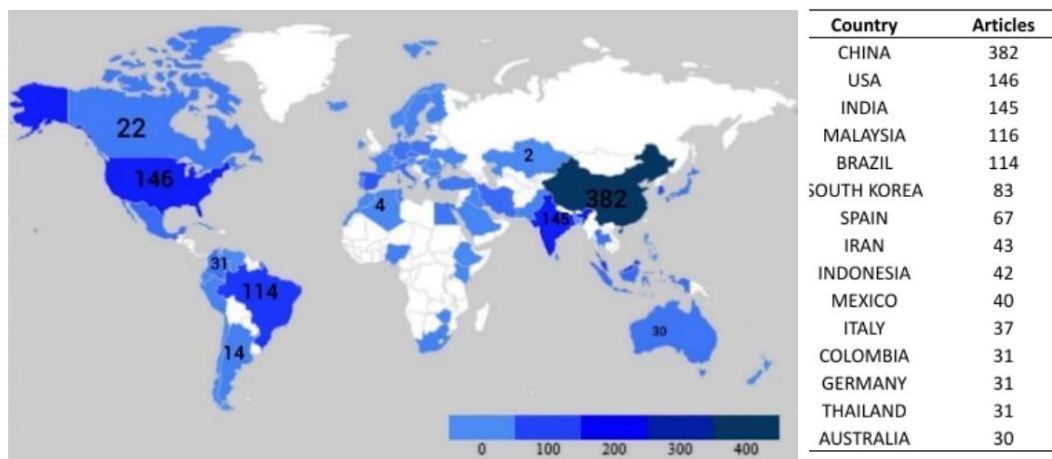


Fuente: realización propia con los datos obtenidos de R.

Por otra parte, existe un interés creciente en los consumidores por los alimentos funcionales y de origen natural lo que ha beneficiado el mercado de productos como suplementos proteicos y ácidos grasos como el omega 3 obtenidos a partir de las microalgas. Aquí destaca el género *Chlorella* pues es de los pocos que posee aprobación por parte de la FDA para el consumo humano, lo que ha hecho de este un mercado en expansión.

Seguido de esto, se analizó cuáles eran los países que más publicaciones habían realizado sobre el cultivo de microalgas en un periodo de tiempo específico de 8 años, con el fin de conocer la distribución geográfica de la investigación y posteriormente comparar estos países con Colombia en términos económicos y de mercado para así determinar cuál es el aporte científico del país y qué factores pueden influir en este comportamiento.

Gráfica 3: *Country scientific production.*



Fuente: *realización propia con los datos obtenidos de R.*

La gráfica 3 permite visualizar los países y el número de artículos publicados por cada uno de ellos, de esta forma se encontró que países como China, Estados Unidos e India, los cuales son potencias mundiales a nivel industrial, presentaron la mayor cantidad de publicaciones en estas dos bases de datos. Es posible relacionar este hecho con lo reportado por The Insight Partners en su informe “APAC Microalgae-Based Products Market.” donde mencionan que China dominó el mercado de microalgas en términos de ingresos valorados en US\$ 123,03 millones en 2020; y que se espera

que India sea el país de más rápido crecimiento para el año 2028 con una CAGR del 9,5%. Por su parte, Estados Unidos lidera el mercado de productos a base de microalgas en América del Norte con una participación de mercado del 79,2 % y se espera que continúe su dominio en 2028.

En América Latina se evidencia una menor cantidad de publicaciones, siendo uno de los factores que más inciden en este comportamiento la poca inversión en investigación y desarrollo en los países de la región, la cual solo llega aproximadamente

a 0.54% del PIB, frente al 2% y casi el 3% de las economías de altos ingresos (Grupo Banco Mundial, 2022). Adicionalmente, en esta región la industria de productos basados en microalgas ha tenido un menor desarrollo, de manera que las investigaciones relacionadas con el cultivo de microalgas han sido lideradas principalmente por instituciones universitarias y centros de investigación. Colombia es el tercer país en Latinoamérica (después de Brasil y México) con más publicaciones sobre el cultivo de microalgas con un total de 31 artículos registrados en las bases de datos “Scopus” y “Web of Science” por encima de países como Alemania y Argentina. Si bien el panorama es prometedor, dichas investigaciones son en su mayoría a escala de laboratorio y evidencian la necesidad de nuevas tecnologías que hagan de este proceso uno económicamente viable a nivel industrial, pues hasta el 2018 en Colombia no había empresas que se dedicaran a la producción y comercialización de biomasa microalgal lo que ha hecho que este mercado sea cubierto únicamente con producto importado.

3.2 Sistemas de cultivo para microalgas.

Dentro de los sistemas de producción mediante los cuales se está realizando actualmente el cultivo comercial de microalgas se encuentran: Entornos naturales (estanques, lagos o lagunas) y fotobiorreactores que pueden ser abiertos o cerrados, la elección de uno u otro dependerá del tipo, características y valor del producto final que se quiera desarrollar y de la disponibilidad de recursos

económicos para el proyecto (Ávila and Flórez, 2021). Los sistemas naturales se caracterizan por ser más económicos y de fácil operación (Hernández-Pérez, 2014). Sin embargo, dentro de sus desventajas se encuentran la baja accesibilidad a luz, la necesidad de grandes extensiones de terreno y la exposición a contaminación por parte de organismos heterótrofos de rápido crecimiento.

En cuanto a los fotobiorreactores abiertos (OPS, Open Pond System) el más utilizado para la producción de microalgas a nivel comercial es el raceway (Kumar et al., 2015). Este tipo de sistemas tienen un alto potencial para la obtención de diversos bioproductos a escala comercial ya que requieren de poca energía y por lo tanto son económicamente viables y fáciles de mantener, sin embargo, al igual que los entornos naturales dependen de la luz natural para la iluminación del cultivo y presentan dificultades para el control de condiciones como pH, temperatura y contaminación. Dentro de las especies más comunes que se cultivan es este tipo de configuraciones se encuentra *Chlorella sp* (Kumar et al., 2015).

Por último, los fotobiorreactores cerrados (CPBR, Closed Photobioreactors) surgen con el objetivo de corregir las dificultades que se presentan en los reactores anteriores, permitiendo así el control de parámetros importantes como temperatura e intensidad lumínica, disminuyendo sustancialmente los problemas presentes en los sistemas abiertos y aumentando la productividad volumétrica de biomasa, siendo *Chlorella* uno de los géneros que se han cultivado de esta forma para obtener inóculos de alta

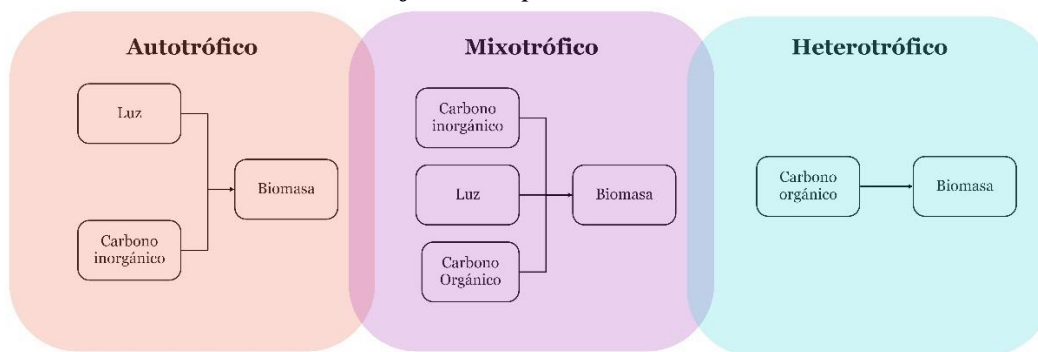
densidad. (Enzing et al., 2014). Dentro de las desventajas que limitan su uso a escala comercial son los altos costos de operación y el requerimiento de intercambio de gases, pues la acumulación de oxígeno producido por las microalgas durante la fotosíntesis puede tener un efecto negativo en el rendimiento del sistema y por esto es importante irlo eliminando durante el proceso.

3.3 Estrategias de cultivo.

Uno de los factores más importantes para lograr que la producción de microalgas a escala comercial sea económica y ambientalmente factible es el desarrollo de sistemas de cultivos sostenibles y rentables (Richmond, 2004), lo que se puede lograr a partir de parámetros como el pH, la

temperatura, la intensidad de la luz y la concentración de nutrientes (Moreno-Galván et al., 2012) de esta forma resulta necesario considerar la estrategia o tipo de cultivo adecuado según el objetivo productivo del proceso. Existen diferentes estrategias de cultivo y estas varían según la(s) fuentes de carbono y energía suministradas, como se puede observar en la gráfica 4 entre las principales se encuentran: el cultivo autótrofo, que contiene una fuente de carbono inorgánica y luz como fuente de energía; el cultivo heterótrofo, el cual implementa al carbono orgánico como fuente de carbono y energía; y el cultivo mixotrófico que cuenta con una fuente de carbono orgánica, una inorgánica y luz como fuente de energía (Manzoni, Montenegro, et al., 2021).

Gráfica 4: Tipos de cultivo.



Adaptado de: Microalgae and cyanobacteria modeling in water resource recovery facilities: A critical review, by Shoener; Schramm, et al... 2019.

En el cultivo mixotrófico las microalgas, incluido el género *Chlorella*, son capaces de combinar los tipos de nutrición descritos anteriormente, consumen CO₂ atmosférico (en presencia de luz a través de la fotosíntesis), así como moléculas orgánicas y micronutrientes del entorno de crecimiento (Pérez-García et al., 2011).

Estos cultivos suelen presentar tasas de crecimiento más altas que los cultivos autótrofos debido a la presencia de compuestos orgánicos en el medio que hacen que el crecimiento celular no dependa únicamente de la fotosíntesis, y que los heterótrofos al implementar las ventajas de ambos tipos de nutrición a la vez (Wang et

al., 2014). Por parte de los cultivos autótrofos estos se ven limitados en último lugar por la asimilación de nutrientes inorgánicos (C, N, P), por la luz o ambos; donde su suplementación con una fuente de carbono orgánica deja a disposición una fuente adicional de carbono reducido y energía que combate las pérdidas en la producción de biomasa asociadas a la respiración y estimula su producción (Park et al., 2012).

Se encuentran reportes donde (Cheirsilp et al., 2016), para *Chlorella sp. marina* usando 0,2% w/v de glucosa, la concentración de biomasa bajo cultivo mixotrófico fue la mayor, 1,41 g/L, seguido del heterotrófico con 0,50 g/L, y siendo tres veces superior a la obtenida en el fotoautotrófico de 0,39 g/L. Donde el mejor crecimiento se puede deber al efecto positivo de la glucosa en el metabolismo fotoautotrófico y/o al efecto de la luz en la asimilación de glucosa, ya que esta debe ser moderada, siendo parte de los parámetros que influyen en el tipo de cultivo. Un estudio diferente, sobre el efecto de la mixotrofia en el crecimiento de microalgas, encontró que las productividades de biomasa para *C. sorokiniana* mixotróficamente con glucosa eran 4,2 veces las halladas fotoautotróficamente (Wan et al., 2011).

Actualmente, el cultivo fotoautótrofo es el más común empleado en la producción de biomasa microalgal, producida a nivel mundial (Chen; 2011). Es el más común al ser la forma primitiva de cultivar microalgas y gozar de una forma de operación simple. Se puede cultivar en sistemas abiertos como aguas naturales (lagos, lagunas y estanques), consiguiendo bajos costos; así como la fuente de carbono generalmente es

CO₂ que se puede suplementar con el aire corriente o aireadores sumergidos (Zhan et al., 2017). Sin embargo, este tipo de cultivo posee varias desventajas como una baja tasa de crecimiento y producción de biomasa, así como largos periodos de cultivo ya que la luz se vuelve un factor limitante en sistemas con altas densidades celulares. Puesto que la penetración de esta es inversamente proporcional a la turbidez del medio de cultivo limitando el alcance de la fotosíntesis a las microalgas que están en el fondo de los fotobiorreactores necesitando mayor relación superficie/volumen (Richmond, 2004). Ahora bien, el cultivo heterotrófico presenta ventajas como una mayor tasa de crecimiento, mayor biomasa y acumulación de lípidos, así como menor costo de cosecha por la alta densidad celular, pero representa un mayor costo debido al valor de las fuentes de carbono orgánicas, siendo su principal fuente la glucosa; así como la necesidad de medios estériles y fáciles de contaminar, la producción de CO₂ y sus condiciones de oscuridad disminuyen la generación de pigmentos y fitoquímicos (Zhan et al., 2017).

En este sentido, el uso e implementación de medios de cultivo mixotróficos en Colombia resulta prometedor pues aprovecha el hecho de que posee una alta riqueza lumínica, con fotoperiodos de 12 horas diarias favoreciendo la fotosíntesis en el día y al mismo tiempo reduce la fotolimitación usando fuentes orgánicas de carbono. Como la microalga asimilaría sustratos orgánicos el crecimiento celular no dependería estrictamente de la fotosíntesis, consiguiendo una segunda fuente de energía que haría que se redujera la luz a

intensidades bajas y moderadas, siendo no limitante para el crecimiento, y dando un factor estimulante para la formación de biomasa (Dragone, 2022).

3.4 Requerimientos nutricionales para generación de biomasa de *Chlorella*.

La biomasa microalgal posee un bajo contenido de celulosa a diferencia de los cultivos terrestres como las plantas, en cambio, maneja una cantidad de nutrientes tres veces superior (Markou et al., 2014), dando una mayor demanda de estos. Aunque la absorción de nutrientes se puede ver afectada por los factores ambientales, como pH, temperatura, intensidad de luz, turbidez, entre otros (Molinuevo-Salces et al., 2019). Además, dependiendo de las condiciones de cultivo, la composición de nutrientes de las microalgas o *Chlorella* puede variar significativamente (Bazarnova et al., 2022). Así pues, generalmente la biomasa de *Chlorella* contiene cantidades de proteína superiores al 60%, peso seco, polisacáridos entre 10-15%, lípidos entre 12-15%, ácidos grasos insaturados, carotenoides, como también, algunos inmunoestimulantes, vitaminas y minerales, en menor proporción (Masojídek & Torzillo, 2008).

En los requerimientos nutricionales para la formación de biomasa de *Chlorella sp.* hay una relación principal de los tres componentes mayoritarios de la microalga, Carbono, Nitrógeno y Fósforo. Sin embargo, la información de los demás elementos que la componen es limitada y muy general para todas las microalgas.

3.4.1 Carbono, Nitrógeno y Fósforo.

La relación base para el crecimiento óptimo de las microalgas de C:N:P es de rango aproximado 50:8:1 (Woertz et al., 2009). Esta relación entre C:N:P afecta la morfología de *Chlorella sp.* (Rendón-Castrillón et al., 2020), ya que cambia la incorporación de los nutrientes según la suplementación de los elementos. Además, bajo la estrategia de cultivo mixotrófico, la iluminación, las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo tienen una alta influencia en la biosíntesis de microalgas y lípidos; sobre todo los tipos y concentraciones de fuentes de carbono, ya que deben optimizarse para lograr mejores productividades (Liu et al., 2021).

El carbono es el principal elemento de las microalgas, puesto que está presente en todos los compuestos orgánicos, y representa aproximadamente entre el 17,5 al 65% del peso seco de la biomasa, según la especie y las condiciones de cultivo (Markou et al., 2014).

En primer lugar, la suplementación de carbono inorgánico para microalgas se da principalmente en forma de CO₂, ya que al ser organismos fotosintéticos lo asimilan de forma natural, pero se puede asimilar de carbonatos solubles como Na₂CO₃ o el NaHCO₃ (Céspedes, 2019). Sin embargo, la suplementación de CO₂ se debe procurar realizar en bajos porcentajes; por ejemplo, para *C. pyrenoidosa* la mayor tasa de biofijación y concentración de biomasa se obtuvo al 10% v/v de CO₂, de 0,260g/Ldía y 1,55g/L, respectivamente, y disminuye a 0,054g/Ldía y 0,69g/L a concentraciones de 50% v/v CO₂ (Tang et al., 2011). También, en un estudio de crecimiento autótrofo de *C. vulgaris* se encontró que la alta

concentración de DIC⁴ favorece significativamente la tasa de crecimiento, y que se puede emplear NaHCO₃ como tampón alternativo al CO₂, aproximadamente 2,8g/L dan 400mg/L de DIC (comparables a una concentración máxima lograda con CO₂ puro) a 1 atm; este se usa como ion (HCO₃)⁻, pero la alta concentración de iones sodio puede inhibir su crecimiento, sugiriendo no pasar de 60mM Na, o 5000mg NaHCO₃ (Kim et al., 2014). Cabe resaltar que se está estudiando la relación entre la optimización de la intensidad de la luz para promover la asimilación de la fuente de carbono orgánico, facilitando la producción de biomasa (Gao et al., 2022).

En segundo lugar, el carbono orgánico se puede suplementar a las especies de *Chlorella* en sustratos como: glucosa, acetato de sodio (Josephine et al., 2015), glicerol crudo (Chakravarty & Mallick, 2022), sucrosa (Wang et al., 2018), etc. Estos presentan distintas asimilaciones según la especie, por ejemplo, para el caso de *C. pyrenoidosa* los monosacáridos (glucosa, galactosa, fructosa) son fuentes de carbono estimulantes para su crecimiento, en comparación con los disacáridos (sacarosa, maltosa, lactosa) y el almidón (Zhang et al., 2014). Así, muchos compuestos orgánicos se han evaluado para la producción de biomasa microalgal, como los que se encuentran en la tabla 3:

Tabla 3: Contenido de biomasa, productividad de biomasa, compuestos orgánicos usados bajo crecimiento mixotrófico^a en especies seleccionadas de *Chlorella*.

Cepa de <i>Chlorella</i>	Fuente de carbono orgánico	Cantidad	Biomasa [g/L]	Tasa de biomasa [g/L día]	Tasa de crecimiento específico [día ⁻¹]	Ref.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa	10g/L	2,11± 0,07	0,35 ± 0,01	1,09 ± 0,06	(Kong et al., 2013)
		20g/L	2,24 ± 0,06	0,37 ± 0,04	1,12 ± 0,17	(Kong et al., 2013)
	Melaza de azúcar	10g/L	0,756	- ^b	-	(Rajivgandhi et al., 2022)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glicerol	1% w/v	2,67 ± 0,3	-	0,91 ± 0,1	(Sforza et al., 2012)
	Acetato	-	3,29	-	1,45	(Sforza et al., 2012)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucosa	10 g/L	5,08	-	3,29	(Li et al., 2014)
		20 g/L	4,91	-	3,25	(Li et al., 2014)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Acetato	10 g/L	0,87	0,121	-	(Rai et al., 2013)
	Glicerol	0,5% v/v	0,42	-	-	(Rai et al., 2013)

^a La fuente de carbono inorgánica para todos fue CO₂

^b No se detectó o mencionó

⁴ Carbono Inorgánico Disuelto

Como se puede observar en la tabla 3, la concentración óptima del sustrato orgánico depende de la cepa de *Chlorella* a emplear, ya que no presentan la misma asimilación. Lo encontrado para *Chlorella sorokiniana* con la fuente de carbono de glucosa denota que trabaja mejor a concentraciones alrededor de 10g/L, y se puede dar una posible inhibición por sustrato a mayores cantidades. Por otro lado, según el estudio de la melaza sobre *C. vulgaris*, esta ayudó a incrementar el contenido de lípidos a un 77% (Rajivgandhi et al., 2022). Si bien es un resultado favorable, muestra que algunas fuentes pueden incentivar la producción de metabolitos, teniendo que considerarse cuando el enfoque es producir biomasa.

El nitrógeno es el segundo elemento más abundante en la biomasa microalgal, con rangos entre 1% al 14%, de peso seco (Markou et al., 2014). Las microalgas lo asimilan mayoritariamente en amonio (NH₄⁺), nitrato (NO₃⁻) y urea, así como extracto de levadura, peptonas, aminoácidos y purinas (Perez-Garcia et al., 2011). Su suministro es necesario para el crecimiento de las células de microalgas, sin este, después de un crecimiento celular avanzado, el consumo del carbono pasa a formación de lípidos en vez de proteínas (Moreno-Garcia et al., 2017). Este posee una estrecha relación con el P, se refleja, por ejemplo, en un estudio mixotrófico para *C. vulgaris*, donde se halló que se requieren niveles controlados de N-P para poder simular mejor las características del entorno híbrido real de las microalgas; así como se

obtuvo que la mayor conversión de N y P fue en los niveles más bajos de 1-2mg N/L y 0,1-0,4mg P/L, indicando que es suficiente para la absorción efectiva de nutrientes (Huang et al., 2021).

Por último, el fósforo es el tercer componente mayoritario de la biomasa microalgal, y se presenta en desde 0,05% a valores arriba de 3,3% (Markou et al., 2014). En la formación de la biomasa juega un papel decisivo, pues pertenece a los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, así como hace parte de los metabolismos de la célula o sus procesos bioquímicos (Bougaran et al., 2010). Para *Chlorella pyrenoidosa* el consumo de cinco formas de fósforo (Pi, STPP, G-6P, β-glicerol-P y ATP)⁵ le era adecuado para crecer mixotróficamente, se asimilaban bien; presentaba preferencia por Pi, pues lo absorbe directamente, en cambio los monofosfatos (G-6P y β-glicerol-P) promovían la acumulación de carbohidratos, proteínas y clorofila-a (Miao et al., 2022). Si bien no es representativo de toda la especie, sienta bases para la evaluación de distintas posibles formas asimilables de fósforo.

3.4.2 Elementos traza.

El resto de los micronutrientes que requieren las cepas de *Chlorella* para la formación de biomasa varían dependiendo de las mismas. Para el 2010 los miembros del género *Chlorella* pertenecían a las *Chlorellaceae*, pero se dividió en dos clados distintos, el clado *Parachlorella* y el clado *Chlorella*, que ayudó a identificar una alta diversidad filogenética y morfológica

⁵ K₂HPO₄, tripolifosfato de sodio, glucosa-6-fosfato, glicerosfosfato de β-sodio, trifosfato de adenosina

combinada (Bock et al., 2011). Mostrándose así una polifilia que caracteriza a las cepas del género, y que requiere mayor investigación. Con esto, se pretende recalcar que la información sobre la composición

específica de los macronutrientes y micronutrientes de estas se encuentra muy limitada, siendo mayoritariamente encontrada para *C. vulgaris* como se ve en la tabla 4:

Tabla 4: Contenido de la biomasa de cepas seleccionadas del género *Chlorella*.

Cepa de <i>Chlorella</i>	Contenido de la biomasa	Cantidades	Ref.	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Proteínas	45,23 mg/50g	(Alagawany et al., 2021)	
	Lípidos totales	18,12 mg/50g		
	Carbohidratos	23,43 mg/50g		
	Calcio (Ca)	16,52 mg/50g		
	Zinc (Zn)	2,72 mg/50g		
	Magnesio (Mg)	18,65 mg/50g		
	Manganeso (Mn)	5,66 mg/50g		
	Cobre (Cu)	0,93 mg/50g		
	Hierro (Fe)	15,94 mg/50g		
	Na	1,35 g/100g		
	K	0,05 – 2,15 g/100g		
	Ca	0,59 – 0,27 g/100g		
	Mg	0,34 – 0,44 g/100g		
	P	1,76 – 0,96 g/100g		
	Cr	trf g/100g		(Safi et al., 2014)
	Cu	tr – 0,19 g/100g		
	Zn	tr – 0,55 g/100g		
	Mn	tr – 0,40 g/100g		
	Se	tr g/100g		
I	0,13 g/100g			
Fe	0,26 – 0,68 g/100g			
<i>Chlorella protothecoides</i>	Proteína cruda	51,20%	(Peng et al., 2000)	
	Lípidos	14,30%		
	Carbohidratos	10,30%		
	Cenizas	7,47%		
	Humedad	10,90%		
	Otros	5,74%		
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Proteína	47,8 ± 2 % (w/w)	(Kumar et al., 2014)	
	Fibra	0,35 ± 0,04 % (w/w)		
	Lípidos	19,93 ± 1 % (w/w)		
	Minerales/Cenizas	7,3 ± 0,2 % (w/w)		
	Humedad	6,54 ± 0,4 % (w/w)		
	Carbohidratos	18,08 ± 3,64 % (w/w)		

Como se visualiza en la Tabla 4, se seleccionaron 3 especies como base comparativa de la composición química y mineral de la biomasa en el género. En la búsqueda se identificó mayor detalle sobre el contenido de *C. vulgaris*.

Contrariamente, las proporciones de otras especies no se encuentran especificadas con regularidad. Siendo así un campo que necesita más investigación y que puede proporcionar información clave a la hora de producir biomasa de estas cepas, ya que son elementos vitales para su crecimiento (Moronta et al., 2006). De cualquier forma, no es común que se dé un enfoque a su requerimiento, más allá de lo que pueden componer de los carbohidratos, lípidos, proteínas o fibra de la microalga. Tomando como base lo encontrado en la tabla 4, se puede sugerir que los elementos traza más comúnmente requeridos son Na, K, Ca, Mg, Mn, Cr, Cu, Zn, I, Fe.

Para el trabajo con una u otra especie se podría sugerir hacer un análisis más detallado y práctico de los componentes mediante mediciones sobre la composición química y mineral de la biomasa, cuando se busca producir biomasa. Se considera es información que puede ayudar a entender los requerimientos nutricionales del género, entendiendo que no es tan factible de realizar siempre caracterizaciones de los elementos o componentes de la biomasa específicos, y que no es un obstáculo para producir su biomasa. Así, la alternativa sería relacionar, como se viene realizando a lo largo del documento, los elementos de los que se tiene la información, junto a las necesidades metabólicas conocidas de cada cepa. Pues estas muestran qué minerales o elementos se emplean en los procesos base

del microorganismo, generación de proteínas, construcción de la pared celular, transporte de elementos, entre otros.

3.5 Retos de escalado

El escalamiento a volúmenes mayores de los procesos de producción de biomasa microalgal implican una alta demanda de reactivos de óptimo grado analítico y un consumo considerable de hombre-tiempo para la preparación de los medios nutritivos, los cuales son costosos si se tienen que adquirir en grandes cantidades, lo que eleva los costos de producción de los cultivos de las microalgas (Molina et al., 2003; Simental y Sánchez, 2003; Borowizka, 2013). Si bien el cultivo mixotrófico ofrece varios beneficios sobre los cultivos convencionales autótrofos y heterótrofos, aún se deben superar algunos desafíos como la disponibilidad de fuentes de carbono económicas y sostenibles, y el control de la contaminación.

La utilización de carbono orgánico en el medio, a pesar de ser una manera eficaz de aumentar el crecimiento de microalgas, puede aumentar significativamente el costo de cultivo, y es la razón por la cual este tipo de cultivo puede ser fácilmente contaminado por otros microorganismos como bacterias que se alimentan de fuentes orgánicas (Chojnacka y Noworyta, 2004; Mitra et al., 2012). Se estima que el costo de esta fuente de carbono es aproximadamente el 80% del costo total del medio de cultivo (Abreu et al., 2012), requiriendo el estudio e implementación de opciones más económicas. Algunas de las alternativas para reducir el costo del sustrato orgánico que se han planteado incluyen combinar el tratamiento de aguas residuales con el cultivo de microalgas (Ogbonna,

Moheimani, 2015). Sin embargo, una de las principales limitaciones que expone es que reduce el rango de aplicaciones de la biomasa generada, pues esta podría estar contaminada por los compuestos presentes en las aguas residuales y solo podría usarse para la producción de biocombustibles en lugar de aplicaciones para alimentos o piensos o fármacos.

Como alternativa a lo anterior se ha planteado el uso de fuentes como el glicerol, acetato e hidrolizados lignocelulósicos desintoxicados (Miazek, Remacle, et al., 2014). Estos últimos deben explorarse más a fondo pues solo algunas cepas de *Chlorella* han sido reportadas como capaces de metabolizar eficientemente la xilosa (Miazek, Remacle, et al, 2014). Además, se ha reportado que la suplementación continua de acetato en pequeñas cantidades puede reducir la posibilidad de contaminación en cultivos de *Chlorella* (Liu, Chen, et al.. 2014).

En cuanto a los demás componentes de los medios se ha encontrado que agregar un exceso de metales traza y aniones puede provocar la precipitación de algunos componentes y que se produzcan pérdidas significativas de constituyentes minerales cuando se utilizan compuestos químicamente puros (Sullivan, Dean, et al., 2017). Por esta razón se recomienda optimizar el medio para suprimir la precipitación eliminando el exceso de iones divalentes como Ca^{2+} , SO_4^{2-} y PO_4^{2-} de esta forma se reducen las pérdidas de componentes críticos por precipitación, incluidos K, Mg, Mn, Fe y Co (Sullivan, Dean, et al., 2017) y por ende se reducen los costos asociados a la suplementación de estos.

Continuando con los costos asociados a los medios de cultivo, se encontró que muchas de las alternativas existentes para la reducción de estos se enfocan principalmente en el aporte de carbono y nitrógeno (Ogbonna, Moheimani, 2015). Sin embargo, poco se habla de componentes como el fósforo, potasio, cobre, azufre, hierro y zinc, los cuales también representan gastos que pueden disminuirse mediante el uso de fuentes de nutrientes no convencionales, económicas y de fácil acceso.

3.6 Insumos agrícolas.

Los insumos agrícolas tales como fertilizantes, abonos inorgánicos o bioestimulantes contienen incorporados en su preparación macro y micronutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, cobre, azufre, hierro y zinc; esto sumado a factores como su bajo precio y fácil acceso, los convierte en una alternativa interesante a la hora de formular medios de cultivo de menor costo que no pongan en riesgo ni la productividad ni la concentración de los componentes bioquímicos de la biomasa microalgal.

Estos insumos pueden presentarse en forma líquida como soluciones concentradas o en forma granulada (Bilski, 2020), y en ambas presentaciones disminuyen el tiempo de preparación de los medios, pues al ser mezclas multicomponentes todos los reactivos, o la mayoría de estos, están incorporados en su fórmula química, lo que hace que no solo reduzcan el costo de los reactivos sino también el de la mano de obra (Silva, 2016). Adicionalmente, dichos compuestos no reducen el rango de las aplicaciones de la biomasa producida, por lo

cual pueden ser utilizados en procesos destinados a la obtención de suplementos alimenticios o piensos, fármacos, o productos de consumo humano o animal.

Si bien los insumos agrícolas abarcan semillas, vacunas, herramientas de manejo del cultivo, pesticidas, bioestimulantes o fertilizantes, es este último, por sus distintas composiciones con disposición de nutrientes, los que se reportan como fuentes alternativas para suplementar la producción de microalgas. Estos compuestos pueden ser de origen orgánico, obtenidos a partir de residuos animales y vegetales; o sintéticos, provenientes principalmente de la industria minera y petroquímica (Rodrigues, Ozorio et al., 2015). Además, los sintéticos poseen en su composición química nitrógeno total (N), óxido de fósforo (P_2O_5), y óxido de potasio (K_2O_7) principalmente, entre otros elementos.

Diversos estudios han demostrado la eficiencia de los fertilizantes como medios nutritivos en cultivos microalgales cuyos

resultados, en términos de productividad de la biomasa, son mayores o equivalentes con respecto a los medios nutritivos preparados a partir de reactivos químicos convencionales como el BG11 y F/2 (Ortiz et al., 2011; Jad-Allah, 2012). Sin embargo, en la contabilidad total, se debe cuantificar no solamente el costo de los reactivos, sino también la productividad de la biomasa y concentraciones de fitoquímicos como clorofila, proteínas y carbohidratos según sea el objetivo productivo del proceso (Silva, 2016). Por lo tanto, se debe asegurar que el fertilizante usado contenga la combinación adecuada de compuestos según las necesidades específicas del proceso y de la especie de *Chlorella* involucrada. En la tabla 6 se listan algunos medios de cultivo, tanto convencionales como con fertilizantes, se describe su composición y los rendimientos de biomasa obtenidos.

Tabla 6: Rendimientos de biomasa reportados en medios convencionales y medios con fertilizantes.

Medio	Composición	Biomasa	Referencia
NPK 20-20-20 Fertilizante	Nitrógeno total: 20% (6% nítrico, 8,8% urea, 5,2% amonio) MgSO ₄ 7H ₂ O = 0,27 g/L P ₂ O ₅ = 200 g/L MgO = 1 g/L K ₂ O = 200 g/L B = 0,5 g/L Cu = 0,10g/L Fe = 2 g/L Mn = 1 g/L Zn = 0,10 g/L	1,63 X10 ⁶ Cells/mL	(Silva, 2016)
	Nitrógeno total: 22% (8,4% nítrico, 3,6% urea, 10% amonio) P ₂ O ₅ = 100 g/L MgO = 20 g/L K ₂ O = 70 g/L B = 0,1 g/L Cu = 0,10g/L Fe = 1,6 g/L Mn = 0,6 g/L Zn = 0,10 g/L	1,12 X10 ⁶ Cells/mL	(Silva, 2016)
Kolwitz (K3) Convencional	Nitrógeno total: 9% MgSO ₄ 7H ₂ O = 0,27 g/L K ₂ HPO ₄ = 0,42 g/L KNO ₃ = 1,71 g/L H ₃ BO ₃ = 2,86 g/L CuSO ₄ 5H ₂ O = 0,08 g/L FeSO ₄ 7H ₂ O = 24,9 g/L MnSO ₄ 4H ₂ O = 1,81 g/L ZnSO ₄ 7H ₂ O = 0,22 g/L Na EDTA = 29,75 g/L	1,83 X10 ⁶ Cells/mL	(Silva, 2016)
Guillard's F/2 Convencional	N (as NaNO ₃) = 12.353 mg/L P (as NaH ₂ P ₄ .H ₂ O) = 1.125 mg/L Fe = 0.6538 mg/L Zn = 0.004481 mg/L Mn = 0.04940 mg/L Mn = 0.002485 mg/L Co = 0.002972 mg/L Cu = 0.002547 mg/L Thiamine = 0.1000 mg/L HCL = 0.0005 mg/L Biotin = 0.0005 mg/L	25 ± 2.6 X10 ⁶ Cells/mL	(Jad-Allah, K. 2012)
A Fertilizante	(NH ₄) ₂ SO ₄ = 150 mg/L Urea = 7,5 mg/L Calcium Superphosphate = 25 mg/L Iron = 1.1% Manganese = 1.5% Copper = 0.5% Molybdenum = 0.01% Boron = 0.3% Cobalt = 0.17% Zinc = 1.1 % Sulfur = 5.3 %	69 ± 8.6 X10 ⁶ Cells/mL	(Jad-Allah, K. 2012)

B Fertilizante	(NH ₄) ₂ SO ₄ = 100 mg/L Urea = 5 mg/L Calcium Superphosphate = 15 mg/L Iron = 1.1% Manganese = 1.5% Copper = 0.5% Molybdenum = 0.01% Boron = 0.3% Cobalt = 0.17% Zinc = 1.1 % Sulfur = 5.3 %	46 ± 1.4 X10 ⁶ Cells/mL	(Jad-Allah, K. 2012)
	C Fertilizante	(NH ₄) ₂ SO ₄ = 300 mg/L Calcium Superphosphate = 50 mg/L Iron = 1.1% Manganese = 1.5% Copper = 0.5% Molybdenum = 0.01% Boron = 0.3% Cobalt = 0.17% Zinc = 1.1 % Sulfur = 5.3 % N:P:K 16:20:20 = 13 mg/L Iron = 1.1% Manganese = 1.5% Copper = 0.5% Molybdenum = 0.01% Boron = 0.3% Cobalt = 0.17% Zinc = 1.1 % Sulfur = 5.3 %	36 ± 7.7 X10 ⁶ Cells/mL
D Fertilizante	Urea = 13 mg/L N:P:K 14:14:14 = 30 mg/L Iron = 1.1% Manganese = 1.5% Copper = 0.5% Molybdenum = 0.01% Boron = 0.3% Cobalt = 0.17% Zinc = 1.1 % Sulfur = 5.3 %	4 ± 1.9 X10 ⁶ Cells/mL	(Jad-Allah, K. 2012)
E Fertilizante	Urea = 13 mg/L N:P:K 14:14:14 = 30 mg/L Iron = 1.1% Manganese = 1.5% Copper = 0.5% Molybdenum = 0.01% Boron = 0.3% Cobalt = 0.17% Zinc = 1.1 % Sulfur = 5.3 %	10 ± 3.0 X10 ⁶ Cells/mL	(Jad-Allah, K. 2012)
Medio Remital Fertilizante	Nitrógeno total = 17% Fósforo asimilable = 6% Potasio soluble en agua = 18% Magnesio = 2% Azufre total = 1,6% Boro = 0,2% Zinc = 0,1%	86,5 X 10 ⁷ Cells/mL	(Ortiz, et al., 2011)
Suoeka Convencional	Para 500 mL: H ₃ BO ₃ = 2,28g ZnSO ₄ .7H ₂ O = 4,40g MnCl ₂ .4H ₂ O = 1,02g FeSO ₄ .7H ₂ O = 1g CoCl ₂ .6H ₂ O = 0,32g CuSO ₄ .5H ₂ O; = 0,32g (NH ₄)MoO ₂ 4.4H ₂ O = 0,22g	39 X 10 ⁷ Cells/mL	(Ortiz, et al., 2011)

Fuente: Elaboración propia.

Lo anterior permite afirmar que el uso de medios nutritivos basados en fertilizantes agrícolas no presenta un detrimento en la productividad de la biomasa microalgal; por el contrario, múltiples investigaciones reportan una producción de biomasa superior o comparable con la obtenida en medios convencionales. Tal es el caso de lo reportado por Silva 2016, donde el crecimiento en medios suplementados con fertilizantes fue comparable con los medios convencionales y adicionalmente la concentración de clorofila en el cultivo con

la combinación del fertilizante NPK 20-20-20 y sulfato de magnesio, resultó ser el tratamiento con la mayor concentración de clorofila total (mg/l).

Como se ha mencionado anteriormente, una consideración determinante para evaluar el desempeño de un medio nutritivo con fuentes diferentes a las convencionales es asegurar la posibilidad de obtener crecimiento y productividad celular alta de manera más económica. Estos aspectos fueron evaluados por Silva 2016 y se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Relación, producción y costos de procesos con medio convencional y fertilizantes.

Medio	Relación [%]	Producción [kg/día]	Costo para producir 1kg de biomasa [\$]
Kolwitz (K3) Convencional	100	60000	7,28
NPK 20-20-20 Fertilizante	90	54000	4,01
NPK 22-10-7 Fertilizante	67	40000	1,16

Tomado de: Silva-Benavides, A. M. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*.

Lo anterior evidencia que es posible obtener un ahorro de hasta un 84% con el fertilizante NPK 22:10:7 y de hasta un 45% con el fertilizante NPK 20-20-20 si se compara con el precio del medio convencional K3. Por otra parte, la productividad reportada para el medio convencional es la más alta; sin embargo, no se encuentra muy lejos de la alcanzada por el medio con fertilizante NPK 20:20:20 el cual representó un 90%.

Como se ha mencionado, el escalado a nivel comercial o industrial de la producción de microalgas se ve obstaculizado por

diferentes parámetros como las condiciones de cultivo, pH, iluminación, posibilidad de contaminaciones, costos, volúmenes, etc. En el estudio de (Lam & Lee, 2012) se evalúan estos factores usando el fertilizante orgánico o compost Baja Serbajadi Humus 27 con *Chlorella vulgaris*. Llegando a concluir que para un buen crecimiento se requiere suficiente suplemento de nutrientes (80ml y 100ml dando biomasa de 0,29g/L a 0,31g/L) y que es factible el uso del fertilizante orgánico para ello. Además, el implemento de un pH entre 7-8, con mayor tasa de crecimiento específico a 8 (0,263

días⁻¹), teniendo cuidado con la concentración de CO₂ en el medio, pues puede aumentar el pH y tener efectos adversos en el crecimiento. Crecimiento por 12 días, y favorabilidad de fotoperiodos de 12h sobre los de 3h, 6h y 9h, dando casi el doble de biomasa alcanzada, con mejor absorción de nutrientes a través de la fotosíntesis. Y, por último, que se ve favorecido el crecimiento bajo fuente de fertilizante inorgánica y cultivo controlado en condiciones interiores. Sin embargo, se debe considerar que las condiciones controladas en general favorecen el crecimiento, y que la variación de un ambiente abierto explican la disminución del crecimiento, puesto que la microalga requeriría un periodo de adaptación. Pero que se encontró que el crecimiento con fertilizantes orgánicos e inorgánicos en un ambiente abierto puede llegar a igualarse. Por último, el costo total de los nutrientes para producir 1 kg de biomasa fue de 2,5-3 USD y de 60-85 USD⁶ para los fertilizantes orgánicos e inorgánicos, respectivamente.

Ahora bien, en Colombia se cuenta con 2311 empresas registradas ante el ICA⁷ productoras de fertilizantes (ICA, 2022b). Los cuales se clasifican en simples, que contengan un macronutriente principal, siendo nitrogenados, fosfatados o potásicos; y compuestos, aquellos que presentan al menos dos macronutrientes básicos, más un elemento adicional o micronutrientes (Rodríguez et al., 2018). De los cuales la totalidad de los fertilizantes simples son importados, y se realiza en planta la fabricación de fertilizantes compuestos, ya

sea por reacción química o mezclado mecánico. De aquí que no se recomiende el uso de fertilizantes simples, ya que sería un proceso similar a lo que ya se realiza en la preparación de soluciones stock, sin enfrentar los retos que dificultan el escalado. Por otra parte, los fertilizantes compuestos reportados ante el ICA en Colombia son aproximadamente 1784, entre composiciones orgánicas e inorgánicas (ICA, 2022a). Por otro lado, hacia las últimas décadas se ha visto un aumento en el interés del mercado de productos agrícolas ecológicos, ya que esta busca el emplear sistemas de producción que utilicen insumos naturales, fertilizantes orgánicos y nada de productos sintéticos o modificados. La cual puede ser un área interesante por evaluar, pues falta mayor conocimiento, inversión y estudio, aunque Colombia tiene características que la pueden favorecer (Sánchez Castañeda, 2017).

Consecuentemente, de la información proporcionada un posible modo de cultivo mixotrófico en Colombia, implementando de base *Chlorella vulgaris*, podría ser implementar glucosa en cantidad aproximada de 10g/L, probar el fertilizante Cerostress que tiene una composición similar a los elementos mencionados que requiere *C. vulgaris*, N, P, K, Mg, S, B, Zn, y aminoácidos libres (Microfertisa, 2008). Este ya que es un concentrado soluble tomar 10g en 600ml para un volumen de 5L en un fotobiorreactor. Considerando las condiciones favorables de los fotoperiodos de 12h en Colombia se podría buscar implementar un sistema de crecimiento

⁶ Dólar estadounidense

⁷ Instituto Colombiano Agropecuario

abierto y compararlo con un sistema cerrado, con un objetivo productivo de 0,33g/L.

4. Conclusiones.

Se evidenció que el interés científico sobre las microalgas está en aumento, debido principalmente a la creciente demanda de energías limpias en el afán por alcanzar el objetivo de desarrollo sostenible número 7 (Garantizar el acceso a una energía asequible, segura, sostenible y moderna). Así mismo, la búsqueda de soluciones de base biológica para problemáticas ambientales y sociales y la implementación de economías con enfoques circulares en la industria han potenciado el interés científico de estos microorganismos.

Se encontró que múltiples investigaciones concuerdan con el hecho de que el cultivo de especies de *Chlorella* en condiciones mixotróficas ofrece la posibilidad de aumentar hasta 4,2 veces las tasas de producción de biomasa comparadas con las obtenidas en cultivos fotoautótrofos; sin embargo, son pocos los reportes del uso de este tipo de cultivo en escalas piloto e industrial. Aun así, los fertilizantes orgánicos e inorgánicos representan un costo menor, que las fuentes de suplementación convencionales.

Se determinó que los insumos agrícolas sí representan una alternativa llamativa ante los retos de escalado relacionados a los requerimientos nutricionales de los medios de cultivo, dada su composición diversa y el ahorro de costos en hasta un 45%. El uso de

fertilizantes N: P: K no presenta una disminución en la productividad de la biomasa microalgal reportando valores de hasta el 90%; sin embargo, se recomienda continuar la investigación llevando a cabo la evaluación experimental de los insumos enfocados a las necesidades específicas de cada especie, así como del objetivo productivo del proceso.

5. Referencias.

- Abalde Alonso, J. E., Cid Blanco, A., Fidalgo Paredes, J. P., Torres Vaamonde, J. E., & Herrero López, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. Universidad da Coruña. Servizo de Publicacións. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Alagawany, M., Taha, A. E., Noreldin, A., El-Tarabily, K. A., & Abd El-Hack, M. E. (2021). Nutritional applications of species of *Spirulina* and *Chlorella* in farmed fish: A review. *Aquaculture*, 542, 736841. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTUR.E.2021.736841>
- Ávila, Isabella; Flórez, Dayana. (2021). Producción de biomasa microalgal enriquecida con selenio ligado orgánicamente a proteínas. Revisión. Department of Biochemical Engineering, Universidad Icesi, Cali, Colombia.
- Bazarnova, J., Smyatskaya, Y., Shlykova, A., Balabaev, A., & Đurović, S. (2022). Obtaining Fat-Soluble Pigments—Carotenoids from the Biomass of *Chlorella* Microalgae. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 3246, 12(7), 3246. <https://doi.org/10.3390/APP12073246>

- Bilski E. (2020). Características de los Fertilizantes. Disponible en: <https://www.caracteristicass.de/fertilizantes/>
- Bock, C., Krienitz, L., & Pröschold, T. (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Http://Fottea.Czechphycology.Cz/Doi/10.5507/Fot.2011.028.Html*, 11(2), 293–312. <https://doi.org/10.5507/FOT.2011.028>
- Borowitzka, M. 2013. High-value products from microalgae- their development and commercialization. *J. Appl.Phycol.* 25:743-756.
- Bougaran, G., Bernard, O., & Sciandra, A. (2010). Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of Theoretical Biology*, 265(3), 443–454. <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2010.04.018>
- Céspedes, D. (2019). *Tratamiento terciario de aguas residuales no domésticas empleando a Chlorella sp. y conversión de la biomasa microbiana por pirólisis lenta* (Vol. 148) [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/43200>
- Chakravarty, S., & Mallick, N. (2022). Carbon dioxide mitigation and biodiesel production by a marine microalga under mixotrophic mode by using transesterification by-product crude glycerol: A synergy of biofuels and waste valorization. *Environmental Technology & Innovation*, 27, 102441. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2022.102441>
- C, Chen; K, Yeh; R. Aisyah; D, Lee; J, Chang. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresour Technol*, 102 pp. 71-81,
- Chojnacka, K. & Noworyta, M. (2004). Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. *Biotechnology(Faisalabad)*, 3(1), 21–34. <https://doi.org/10.3923/biotech.2004.21.34>
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., & Sijtsma, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *Institute for Prospective Technological Studies fashion nutraceuticals»; en Microbial Biotechnology* (10); pp. 1017-1024.
- Florez, J. S. R. (2013). Revisión sistemática de literatura. Caso de estudio: Modelamiento de un par deslizante con fines de predecir desgaste. *Prospectiva*, 11(1), 50. <https://doi.org/10.15665/rp.v11i1.27>
- Gao, P., Guo, L., Gao, M., Zhao, Y., Jin, C., & She, Z. (2022). Regulation of carbon source metabolism in mixotrophic microalgae cultivation in response to light intensity variation. *Journal of Environmental Management*, 302, 114095. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.114095>
- García, J., de Vicente, M., & Galán, B. (2018). Presente y futuro del cultivo de las microalgas para su uso como

- superalimentos. *Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC e b Instituto de Biología Integrativa de Sistemas-CSIC*, 333–350.
- García, J. L., de Vicente, M., & Galán, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*, *10*(5), 1017–1024. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12800>
- Grobbelaar, J. U. (2013). Inorganic Algal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 123–133). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch8>
- Grupo Banco Mundial. (2022). Gasto en investigación y desarrollo (% del PIB) - Latin America & Caribbean.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Microalgae, culture and benefits*, *49*, 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Huang, Y., Lou, C., Luo, L., & Wang, X. C. (2021). Insight into nitrogen and phosphorus coupling effects on mixotrophic *Chlorella vulgaris* growth under stably controlled nutrient conditions. *Science of The Total Environment*, *752*, 141747. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141747>
- Jad-Allah, K. 2012. Development of cheap and simple culture medium for the microalgae *Nannochloropsis* sp. based on agricultural grade fertilizers available in the local market of Gaza Strip (Palestine). *J. Al Azhar University Gaza (Natural Sci.)* *14*:61-76
- Josephine, A., Niveditha, C., Radhika, A., Shali, A. B., Kumar, T. S., Dharani, G., & Kirubakaran, R. (2015). Analytical evaluation of different carbon sources and growth stimulators on the biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* – Implications for biofuels. *Biomass and Bioenergy*, *75*, 170–179. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2015.02.016>
- Kumar, K.; Mishra, S. K.; Shrivastav, A.; Park, M. S. y Yang, J. W. (2015): «Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds»; en *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (51); pp. 875-885.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, *66*, 204–213. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2014.04.010>
- Lin, T. S., & Wu, J. Y. (2015). Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresour Technol*, *184*, 100–107. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.11.005>
- Liu J, Chen F. En: Posten C, Feng Chen S. (2014). *Biología e industria Chlorella applications: advances and prospects*. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 1–35.
- Liu, N., Guo, B., Cao, Y., Wang, H., Yang, S., Huo, H., Kong, W., Zhang, A., & Niu, S. (2021). Effects of organic carbon sources on the biomass and lipid production by the novel microalga *Micractinium reisseri* FM1 under batch and fed-batch cultivation. *South African Journal of Botany*, *139*, 329–337. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.02.028>

- Manzoni, M., Montenegro, C., & Martínez, A. (2021). *Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica*. 25(5).
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186–202. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.07.025>
- Miao, K., Li, X., Guo, L., Gao, M., Zhao, Y., Jin, C., Ji, J., & She, Z. (2022). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with different phosphorus forms under photoautotrophic and mixotrophic modes: Biochemical component synthesis and phosphorus bioavailability appraisal. *Journal of Cleaner Production*, 359, 132058. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.132058>
- Miazek K, Remacle C, Richel A, Goffin D. (2014). Efecto de la lignocelulosa relacionada compuestos sobre el crecimiento de microalgas y la biosíntesis de productos: una revisión. *Energías* 7:4446–81. <https://doi.org/10.3390/en7074446>.
- Mitra D, van Leeuwen J (Hans), Lamsal B. (2012). Cultivo heterotrófico/mixotrófico de *Chlorella vulgaris oleaginosa* en coproductos industriales. *Res. de algas*. 1:40–8. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.002>
- Molina, G.E., H. Belarbi, F.G. Ación, A. Robles, and Y. Chisti. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotech. Adv.* 20:491-515
- Molinuevo-Salces, B., Riaño, B., Hernández, D., & García-González, M. C. (2019). Microalgae and wastewater treatment: Advantages and disadvantages. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, 505–533. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_20/COVER/
- Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S., & Raghavan, G. S. V. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 493–506. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2017.03.024>
- Moronta, R., Mora, R., & Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182006000100003
- Ogbonna JC, Moheimani NR. (2015). Potenciales de la explotación del metabolismo heterótrofo para la producción de aceite de biodiesel por microalgas. En: Moheimani NR, McHenry MP, de Boer K, Bahri PA, editores. *Biocombustibles de biomasa a partir de microalgas. Tecnología de biorrefinería de biocombustibles*. pág. 45–61.
- Ortiz, M., C. Cortés, J. Sánchez, J. Padilla, y A.M. Otero. 2011. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *ORINOQUIA* 16:11-19
- Peng, W., Wu, Q., & Tu, P. (2000). Effects of temperature and holding time on production of renewable fuels from pyrolysis of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Applied Phycology* 2000 12:2, 12(2), 147–152. <https://doi.org/10.1023/A:1008115025002>

- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36.
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.08.037>
- R Development Core Team. (2006). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Disponible en: <http://www.R-project.org>
- Rai, M. P., Nigam, S., & Sharma, R. (2013). Response of growth and fatty acid compositions of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation with acetate and glycerol for bioenergy application. *Biomass and Bioenergy*, 58, 251–257.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2013.08.038>
- Rajivgandhi, G., Ramachandran, G., Chelliah, C. K., Maruthupandy, M., Quero, F., S, V., AL-Mekhlafi, F. A., Wadaan, M. A., Ranjitha, J., & Li, W. J. (2022). Green microalgal strain *Chlorella vulgaris* isolated from industrial wastewater with remediation capacity. *Environmental Technology & Innovation*, 28, 102597.
<https://doi.org/10.1016/J.ETI.2022.102597>
- Rendón-Castrillón, L., Ramírez-Carmona, M., Ocampo-López, C., & Giraldo-Aristizabal, R. (2020). Evaluation of the operational conditions in the production and morphology of *Chlorella* sp. *Brazilian Journal of Biology*, 81(1), 202–209.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.228874>
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia*, 512, pp. 33-37,
- Richmond, A. (1999). Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In: Z. Cohen. Chemicals from microalgae. T.J. International Ltd, Padstow, GRB. p. 353-386.
- Rodrigues, R. B., Ozorio, L. D. M., Bastian Pinto, C. D. L., & Brandão, L. E. T. (2015). Opção de troca de produto na indústria de fertilizantes. *Revista de Administração*, 50(2), 129–140.
<https://doi.org/10.5700/rausp1189>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.
<https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.04.007>
- Sforza, E., Cipriani, R., Morosinotto, T., Bertucco, A., & Giacometti, G. M. (2012). Excess CO₂ supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology*, 104, 523–529.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.10.025>
- Silva-Benavides, A. M. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265.
<https://doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Simental, J., & Sánchez-Saavedra, M. (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering*, 27(4), 265–272.
doi:10.1016/s0144-8609(02)00087
- Sullivan Graham, E. J., Dean, C. A., Yoshida, T. M., Twary, S. N., Teshima, M., Alvarez, M. A., Zidenga, T., Heikoop, J. M., Perkins, G. B., Rahn, T. A., Wagner, G. L., & Laur, P. M. (2017). Oil and gas produced water as a

- growth medium for microalgae cultivation: A review and feasibility analysis. *Algal Research*, 24, 492–504. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.009>
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., & Zhong, J. (2011). CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*, 102(3), 3071–3076. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.10.047>
- The insight partners. (2020a). *Europe Microalgae-Based Products Market Coverage.Forecast to 2028- COVID-19 Impact and Analysis*.
- The insight partners. (2020b). *North America Microalgae-Based Products Market Coverage.Forecast to 2028- COVID-19 Impact and Analysis*.
- Wang J, Yang H, Wang F. (2014). Mixotrophic cultivation of microalgae for the production of biodiesel: status and prospects. *Appl Biochem Biotechnol*; 172:3307–29. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0729-1>
- Wang, S. K., Wang, X., Tao, H. H., Sun, X. S., & Tian, Y. T. (2018). Heterotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with immobilized yeast. *Bioresource Technology*, 249, 425–430. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.10.049>
- Woertz, I., Fulton, L., & Lundquist, T. (2009). *Nutrient Removal & Greenhouse Gas Abatement with CO₂ Supplemented Algal High Rate Ponds*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Nutrient-Removal-%26-Greenhouse-Gas-Abatement-with-CO2-Woertz-Fulton/44c949d66288e9904afb9120f108e3d2acfee195>
- Yeesang, C., & Cheirsilp, B. (2011). Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*, 102(3), 3034–3040. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.10.013>
- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, 118, 61–66. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.05.055>
- Cheirsilp, B., Mandik, Y. I., & Prasertsan, P. (2016). Evaluation of optimal conditions for cultivation of marine *Chlorella* sp. as potential sources of lipids, exopolymeric substances and pigments. *Aquaculture International*, 24(1), 313–326. <https://doi.org/10.1007/S10499-015-9927-2/FIGURES/5>
- Dragone, G. (2022). Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 160, 112284. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2022.112284>
- ICA. (2022a). Productos fertilizantes registrados. *ICA El Campo Es de Todos Minagricultura*, 1–518. <https://www.ica.gov.co/getdoc/a2f80265-2a07-4f5b-964c-f7d39e60e023/productos-registrads-fertilizantes-pag-web-enero-3.aspx>
- ICA. (2022b, May 31). *Empresas*

- registradas fertilizantes*.
https://www.ica.gov.co/getdoc/90935cf8-c4c1-4093-85ad-5ad06fbfda5d/base_de_datos_empresas.aspx
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2012). Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Applied Energy*, *94*, 303–308.
<https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2012.01.075>
- Microfertisa. (2008). *Ficha técnica Cerostress*.
<http://microfertisa.com.co/archivosDescargables/fichasTecnicasProductos/CEROSTRESS.pdf>
- Moronta, R., Mora, R., & Morales, E. (2006). *Respuesta de la microalga Chlorella sorokiniana al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas*.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182006000100003
- Park, K. C., Whitney, C., McNichol, J. C., Dickinson, K. E., MacQuarrie, S., Skrupski, B. P., Zou, J., Wilson, K. E., O’Leary, S. J. B., & McGinn, P. J. (2012). Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: Potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, *24*(3), 339–348.
<https://doi.org/10.1007/S10811-011-9772-2/FIGURES/4>
- Rodríguez, D., Lugo, C., & Bejarano, F. (2018). Estudios Económicos Sectoriales Estudio sobre el mercado de fertilizantes inorgánicos en Colombia. *Superintendencia de Industria y Comercio*, 9–11.
https://www.sic.gov.co/sites/default/files/files/Proteccion_Compentencia/Estudios_Economicos/Mercado_Fertilizantes_Organicos_en_Colombia.pdf
- Sánchez Castañeda, J. (2017). Mercado de productos agrícolas ecológicos en Colombia. *Suma de Negocios*, *8*(18), 156–163.
<https://doi.org/10.1016/J.SUMNEG.2017.10.001>
- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Betenbaugh, M. J., Nie, Z., & Qiu, G. (2011). The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(3), 835–844.
<https://doi.org/10.1007/S00253-011-3399-8/FIGURES/5>
- Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, *42*(12), 8505–8517.
<https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2016.12.021>