

**Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco**

**Instituto de Ingeniería, UNAM**

**Protocolo:**

Valorización de biomasa microalgal para la obtención de biofertilizantes como sustitutos de la fertilización sintética, mejorador de suelos, efecto fungicida, y eliminar la contaminación provocada por el uso intensivo de agroquímicos.

**Tecnologías Innovadoras para el uso sustentable de agua,  
biocombustibles y residuos sólidos**

**2023-12/95-3611**

**Alumna:**

González Avila Karina Estefania

**Asesores:**

Dra. Orta Ledesma María Teresa - Instituto de Ingeniería

Dra. Fuentes Ponce Mariela Hada– UAM Xochimilco

## **1. JUSTIFICACIÓN**

Los agroquímicos presentan consecuencias como lo es la contaminación y destrucción de biotas, sin embargo, los efectos por su utilización son diferentes dependiendo de la cantidad, continuidad y el tiempo, los cuales son efectos a largo y corto plazo.

Los efectos a corto plazo no solo provocan contaminación en el ambiente abiótico; suelos, aguas superficiales y subterráneas, aire, la muerte de diversos organismos benéficos a consecuencia de la eliminación de plagas o enfermedades alterando el equilibrio fisiológico de todos los organismos expuestos a los agroquímicos, este tipo de efectos son provocados por plaguicidas no persistentes y con aplicación no continuas. No obstante, cuando los efectos se vuelven a largo plazo cuando se hacen continuas aplicaciones o se utilizan plaguicidas persistentes o permanentes en el suelo provocando, los daños ya mencionados agravando las consecuencias con aplicaciones continuas, puesto que con cada aplicación se agregan más y más daños y consecuencias al ambiente, pues se requieren años para degradarse y hay constante daño, además del daño inmediato después de la aplicación. A este nivel, es cuando se genera la resistencia de las especies a los agroquímicos y las alteraciones ecológicas, resultando en alteraciones agronómicas las cuales causan cambios en el suelo, resistencias, etcétera (GOB, s.f.).

Por lo que en los últimos años se ha buscado alternativas sustentables, reales y rentables en los sistemas agrícolas, por lo que se explora la utilización de la microalga como fuente de reemplazo ecológica de los agroquímicos, fertilizantes y plaguicidas, proporcionando a su vez una ayuda no solo al cultivo sino al suelo. Por lo que la utilización de la microalga es una alternativa que no solo cumple con los objetivos de los convenios e intereses en nuevas alternativas, buscando que pueda ser competitivo a un agroquímico.

## **2. OBJETIVOS**

Objetivo general:

Valorización de biomasa microalgal para la obtención de biofertilizantes como sustitutos de la fertilización sintética, mejorador de suelos, efecto fungicida, así como para eliminar la contaminación provocada por el uso intensivo de agroquímicos.

Objetivo particular:

- Valorar el potencial de la microalga en las plantas de interés alimenticio bajo un diseño experimental
- Considerar las ventajas y las desventajas del desempeño de la microalga como biofertilizante considerando su efecto fungicida
- Evaluación del biofertilizante a base de microalga como mejorador de suelo
- Evaluación del biofertilizante a base de microalga como sustituto de la fertilización sintética

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. AGROQUÍMICOS**

Hoy en día los problemas de plagas y enfermedades, así como la agricultura convencional depende del uso intensivo de los agroquímicos o fertilizantes sintéticos con el objetivo de alcanzar altos rendimientos en los cultivos; ya sea frutícola, hortícola o incluso en el sector florícola, al ser resueltos con fertilización sintética con el tiempo han costado la salud del suelo, así como su estructura y fertilidad, los mantos acuíferos, la seguridad alimentaria y la salud del planeta. La FAO menciona que en América se consume el 23% de los fertilizantes en el mundo, EU con un 13% y el restante lo consume América Latina, además se menciona que "la producción mundial de fertilizantes mantiene una tendencia creciente", de acuerdo, con un informe de la Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes (FAO, 2009). Las poblaciones humanas pasaron de ser poco numerosas a generar una demanda en los alimentos, tanto los de "canasta básica", provocando que los agricultores buscarán alternativas que los ayudarán a alcanzar la productividad necesaria que cumpla con la demanda, incluso produciendo productos que son fuera de temporada.

En los años 50 y 60 con la Revolución Verde se alcanzaron altos índices de productividad que permitían cubrir la demanda utilizando agroquímicos sintéticos, no obstante, actualmente

han observado las consecuencias de su uso desmedido en el paso del tiempo desde la contaminación ambiental, la pérdida de diversidad y calidad del suelo, a pesar de eso su uso continuo hasta el día de hoy aún cuando existen otros tipos de fertilizaciones.

Estas consecuencias abrieron el panorama para buscar nuevas formas de agricultura y, por ende, otro tipo de fertilización. Actualmente hay muchos tipos de fertilizantes, por lo que se debe tener clara la diferencia en los fertilizantes, dado que existen tres tipos o categorías; fertilizantes químicos, biofertilizantes y abonos verdes, la diferencia recae en sus propios nombres además de las necesidades específicas de los cultivos. El Gobierno de México (2022) menciona que el fertilizante químico tiene la característica de su elaboración puesto que es por obra del ser humano, pueden ser de origen natural, animal, vegetal o sintético en donde los nutrientes principales para el suelo son el Nitrógeno, Fósforo y Potasio (NPK), y se destaca por su alta concentración y su fácil manejo en almacenamiento, distribución y aplicación aumentando así la productividad en el campo (los cultivos). Por otro lado, los abonos verdes o abonos orgánicos se caracterizan por ser compuestos por materia orgánica fresca, su aplicación va directo al suelo y mientras sucede la descomposición los nutrientes pasan al suelo, siendo principalmente fijado el N. Una característica adicional de los abonos verdes es el mejoramiento de la estructura del suelo, reduciendo la erosión, regulador de la temperatura del suelo, además del almacenamiento de humedad. Por último, están los biofertilizantes compuestos por grandes cantidades de microorganismos con varias funciones, entre los cuales están los aportes de N en el suelo y las plantas, además de un incremento en la disponibilidad de otros nutrientes. Por otro lado, está el bajo costo respecto a los fertilizantes químicos y los abonos orgánicos (GOB, 2022).

El N es el nutriente excesivamente aplicado como fertilizante seguido del P y K, en donde las consecuencias de su uso indiscriminado provocan impactos como la eutrofización, acidificación y toxicidad en el suelo además de los daños al ambiente como es la lixiviación de nitratos y la evaporación (NO y N<sub>2</sub>O) causado por el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados (González-Ulibarry, 2019; Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010). Además, están los daños a las interacciones bióticas que a su vez perjudican a los cultivos dado que se estudió que los cultivos con fertilización nitrogenada presentan más presencia de insectos

(artrópodos), además de una mayor resistencia, a pesar del uso, para eliminarlos (Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010).

La roca fosfórica es la materia prima de los fertilizantes fosforados y tienen importantes cantidades de Cadmio dependiendo del tipo de roca, sin embargo, su uso continuo induce a la acumulación de este en el suelo poniendo en riesgo a las plantas y animales por su toxicidad (Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010). Por otro lado, está la contaminación del agua por parte de nitratos y fosfatos, la cual es provocada por un exceso de nutrientes (N y P) en el agua provocando la intoxicación no solo del agua sino de vida animal acuática y vegetal en varios aspectos alterando las cadenas tróficas (US EPA, 2016).

### 3.2. SITUACIÓN DE LOS AGROQUÍMICOS EN MÉXICO

En México el uso de fertilizantes se inició con la Revolución Verde en la década de los 60, sin embargo, su regulación no fue hasta 1988 con la publicación de la *Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente* (LGEEPA) en donde se establecieron los primeros criterios para evitar la contaminación del agua, del suelo y la obligación de desarrollar NOM en esta materia y el rechazo a la importación de plaguicidas prohibidos en los países de origen (INECC, 2021). Según los resultados dados por el estudio (con 136 sitios de estudio alrededor de la República), se reportó que el uso de agroquímicos varía entre agrícola, florícola, doméstico, veterinario, urbano y otros. Mientras que, en el sector agrícola, se reportó su uso en 37 cultivos (maíz, chile, jitomate, caña de azúcar, sorgo, entre otros), en donde 16 no hay especificación del cultivo (INECC, 2021).

En México entre el 2009 y 2010 se utilizaron alrededor de 455 toneladas (ton) de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) por cada 1000 hectáreas (ha), y en 2013 se utilizaron 37,455 ton de insecticidas, 31,455 ton de insecticidas, 31,195 ton de herbicidas y 42,223 ton de fungicidas según Arrellano-Aguilar y Rendón von Osten para GREENPEACE (GREENPEACE, 2018). Y en México, el mercado de agroquímicos está segmentado por tipos: fertilizantes, plaguicidas, adyuvantes y reguladores del crecimiento y por su aplicación (granos y cereales, legumbres y semillas oleaginosas, frutas y verduras, césped y plantas ornamentales, etc.), por lo que la valoración del mercado es de 1,268.0 MDD únicamente en EU, esperándose un alcance de 1,617.0 MDD para el 2027 (Mordor Intelligence, *s.f.*).

### 3.3. BIOFERTILIZANTES

Armenta-Bojórquez y colaboradores menciona que a pesar de la alta accesibilidad de los agroquímicos y de su alta concentración de nutrientes presentan baja eficiencia (<50) dado que el fertilizante no incorporado por las plantas trae consigo un impacto ambiental adverso por lixiviación a los mantos acuíferos, por liberación al medio ambiental o contaminación al mismo suelo. Por lo que los biofertilizantes buscan sustituir parcial o totalmente a fertilización sintética, además siendo una respuesta a la contaminación que genera (Armenta-Bojórquez *et. al.*, 2010).

Hay grandes ventajas de los biofertilizantes además de ser una alternativa ecológica y de bajo costo a los fertilizantes sintéticos y es que ayuda a la estructura del suelo mejorándolo y ayudando a la captación de nutrientes, producción de fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal. Y así como hay tipos de fertilizantes, agroquímicos o productos sintéticos, existen diferentes tipos de biofertilizantes, de los cuales tenemos los biofertilizantes de acción directa y de acción indirecta. Los biofertilizantes de acción directa son los que sus microorganismos se encuentran en el interior de los tejidos vegetales por lo que su efecto es en las plantas, un ejemplo son las micorrizas. Mientras que los biofertilizantes de acción indirecta son aquellos favorecen la solubilidad de los nutrientes no disponibles en el suelo para las plantas, como lo son algunas especies del género *Bacillus*, por lo que dependiendo de los microorganismos que componen el biofertilizante es su beneficio (Probelte, 2019).

Por otro lado, están los tipos de microorganismos, en los que se catalogan en dos grupos; el primero incluye a los microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promuevan el crecimiento de las plantas fijando N atmosférico, solubilizando Hierro y P inorgánico y mejorando la tolerancia al estrés por sequías, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas por parte de la planta. Mientras que el segundo grupo agrupa los microorganismos que son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos. Y dentro de estos microorganismos también podemos encontrar clasificados los que fijan N atmosférico (FBNA), los cuales intervienen en la fijación biológica por la reducción enzimática de N<sub>2</sub> a amonio (NH<sub>4</sub>). Aquí podemos encontrar a las

bacterias, hongos y algas como parte de los microorganismos que fijan el N en forma no simbiótica o de vida libre (Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010).

No obstante, la biofertilización es vista como un complemento de la fertilización sintética, sin embargo, la biofertilización puede ser utilizada sin necesidad de ser un complemento considerando que se requiere de un tiempo de cambio o el tiempo respuesta del cultivo, lo cual puede ser de 3-5 años. Los biofertilizantes pueden estar acompañados de los abonos verdes, cultivos de cobertura o de rotación entre otros como mejoradores de la fertilidad del suelo, así como la estructura de este (Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010).

### 3.4. MICROALGAS

Las microalgas son multifacéticas en cuanto a su utilización, en el sector agrícola o agrónomo, Tello y colaboradores (2018) mencionan que se puede utilizar como biofertilizantes en arrozales por medio de inoculación con helechos flotantes por fijación simbiótica de N, bioestimulantes obtenidos por extractos líquidos de ellas, estructurador de suelos por su aplicación o por biofertilizantes por inoculación al suelo de cianobacterias fijadoras de N de manera no simbiótica, llegando a la conclusión que "el biofertilizante con base de microalgas se puede considerar una fuente inagotable como insumo en la fertilización de los cultivos siempre y cuando se mantengan las condiciones adecuadas de luminosidad, pH, aireación y nutrición" (Tello *et al.*, 2018).

De forma natural, las algas tienen en sus tejidos siete veces más nitrógeno que fósforo, y en plantas terrestres esta proporción aumenta hasta unas quince veces más. "La mayor parte de suelos y rocas contienen bajas cantidades de fósforo, un elemento que, además, es muy poco soluble en agua. Por ello, las especies de aguas continentales se han adaptado para acumular fósforo y reciclarlo eficientemente" (Yan *et al.*, 2016). Además, las plantas tienen la capacidad de tomar y retener más P a comparación del N, lo cual usan a su favor los ecosistemas oligotróficos.

#### 3.4.1. Estructura y composición de las microalgas

La pared celular es una estructura de polisacáridos reticulados que proporciona resistencia (Harrison, 1991), además del mantenimiento de la forma celular y su protección, la pared

celular estabiliza la presión osmótica dentro de la célula y regula la permeabilidad con respecto a macromoléculas (González-Balderas, 2020).

Sin embargo, para poder utilizar la microalga como un biofertilizante tiene que presentar ciertas características agronómicas, como lo es la temperatura, iluminación, pH y salinidad. En la cuestión de temperatura Tello y colaboradores mencionan que la cepa debe de tener temperaturas de 18°-22° C con el fin de su reproducción, sin embargo, varía la tolerancia de temperaturas según la variedad de microalgas (2018). A su vez, mencionan que la iluminación para el mantenimiento de las cepas es la luz artificial dado que la intensidad luminosa se utiliza para la variación de volumen, concentración celular del cultivo y con la especie, frecuentemente utilizando "cool-white" de 40w, mientras que para el pH se menciona que su nivel ideal es de 9 para que no se inmovilice los minerales y se tenga buena solubilidad del CO<sub>2</sub> recordando que se tiene influencia directa o indirecta en el metabolismo de las microalgas por la distribución relativa de las formas inorgánicas de Carbono (C). Por último, se menciona que para la concentración de sales minerales disueltas en agua dulce o en agua de mar, puede afectar el crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica, sin embargo, también se menciona que la salinidad adquiere influencia cuando se relaciona con otras variables (luz, temperatura, fuente de N y concentración de nutrientes) puesto que el estrés salino en las células de las microalgas equilibran su presión osmótica con el exterior aumentando la síntesis de solutos o su incorporación (Tello *et. al.*, 2018).

#### 3.4.2. Importancia de la microalga

Las microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles es prometedor gracias a los componentes de la biomasa (subproducto utilizado como materia prima) como lo son los lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos y fósforo, entre otros, además de su viabilidad económica en procesos es alta y considerable (González-Balderas, 2020). Sin embargo, esta alternativa es aún lejana, no obstante, poco se habla de la alternativa de usar la microalga con fines en la agricultura, como podría ser su utilización como biofertilizante.

Como ya se mencionó un biofertilizante es una alternativa a lo sintético que ayudaría y sería respuesta a la contaminación por su utilización desmedida de manera que un biofertilizante ayuda a la adquisición de los nutrientes del suelo a la planta, funge como mejorador de suelos, es rentable por su bajo costo y puede ser utilizado en conjugación a otros tipos de manejos

agrícolas, o como único. Por lo que un biofertilizante con base microalgal ayudaría a la aportación de nutrientes como lo es el P, N, así como en la aportación de proteínas y carbohidratos. Dado que el objetivo de las proteínas en la biomasa microalgal en ambos géneros es darle un valor adicional a la biomasa a partir de su fracción proteica, debido a que los biocomponentes que son comúnmente aplicados a la producción de biocombustibles, los lípidos y los carbohidratos (González-Balderas, 2020). Mientras que para el fósforo es un elemento esencial en el ADN, lípidos de ARn, proteínas, enzimas y ATP portador de energía, es responsable de la alimentación y rendimiento agrícola pues es un macronutriente importante en los fertilizantes pues forma parte del NPK (Nitrógeno, Fósforo y Potasio).

#### 3.4.3. Importancia de los lípidos, proteínas y carbohidratos

Dado que estos ayudan al cultivo en varios aspectos; los lípidos proporcionan energía metabólica (ATP) de 9.5 Kcal/g siendo el nutriente que más energía aporta, mientras que las proteínas aportan 5.6Kcal/g y los carbohidratos 4.1Kcal/g (FAO, 1989), ayudando a que el producto de interés tenga la suficiente energía para poder desarrollarse (Missaoui, *et. al.*, 2021). Por otro lado, las proteínas intervienen en aspectos de crecimiento y desarrollo de la planta dado que estimulan la formación de clorofila, ácidos nucleicos, fosfolípidos, almidones, azúcares y las vitaminas que proporciona el plan/producto de interés, por otro lado, también aporta micronutrientes y activa y promueve procesos enzimáticos, todo esto en conjunto determinará que la planta tenga un crecimiento y desarrollo correcto y correspondiente al ciclo agrícola del cultivo/planta (Plant & Soil Sciencies, 2023). Mientras que los carbohidratos Martínez-Trinidad y colaboradores (2013) menciona que las plantas utilizan los carbohidratos junto el CO<sub>2</sub> para generar energía para toda la planta, es decir, la fotosíntesis, además los carbohidratos forman la estructura de la planta y almacena la energía (Martínez-Trinidad, *et. al.*, 2013).

#### 3.4.4. Proceso de obtención de la microalga

La microalga es obtenida como subproducto del tratamiento de aguas residuales en donde la planta piloto llamada "Atzintli" busca la limpieza y recuperación de aguas residuales por medio de la microalga. No obstante, se observó que el subproducto, la microalga, puede aprovecharse en biocombustible, bioplásticos y en este caso, observar la posibilidad de utilizarse como un biofertilizante pasando a cultivar la microalga siendo cultivada en

raceways o reactor de 300L con agua residual y es cultivada en el que se cultiva por 15 días, para posteriormente pasar al sedimentador en el que se dejan seis días más, cumpliendo 21 días de cultivo y obteniendo 150 ml/L de microalga.

En el cultivo de microalga se observan dos tipos de géneros de microalgas; *Desmodesmus* sp. y *Scenedesmus obliquus*, y su separación no es posible, sin embargo, se diferencian sí el cultivo de microalga tiene predominancia del género *Desmodesmus* es identificado como el **consorcio D**, mientras que sí la predominancia es del género *Scenedesmus* es llamado **consorcio S**.

### 3.5. CULTIVO DEL FRIJOL

Es una planta herbácea perteneciente a la familia *fabaceae*, la cual posee tallos delgados y débiles los cuales pueden llegar hasta 3 metros cuando se van enrollando durante el ciclo, no obstante, su altura promedio es de 50 a 70, además cuenta con una raíz tetraarca, pivotante principal y con ramificaciones por lo cual su profundidad ideal de siembra es de 3-5cm, mientras que la vaina puede llegar a medir 10 a 12 cm, normalmente es de color negro, verde o morada, dependiendo de la variedad y su forma es oval o redondas, con presencia de inflorescencias y hojas, en donde las primeras tres son estípulas (SAGARPA, 2017).

A su vez la planta requiere una humedad uniforme y constante, temperaturas de 10°-27°C dado que la planta es susceptible en condiciones extremas, mientras que para el pH se maneja de 6.5-7.5 para una disponibilidad óptima de macro y micronutrientes. Por lo mismo es importante que sea un suelo ligero y bien drenado, por lo que podemos determinar que para el cultivo el suelo franco arcilloso es el ideal puesto que posee partículas de minerales inorgánicos de diferentes tamaños (arcilla, limo y arena), obteniendo características ya mencionadas antes, además de una capacidad de campo (CC) de 25-30% (SAGARPA, 2017; INIFAP, 2021; SIAP; 2019).

A pesar de sus múltiples nombres tanto en diferentes idiomas el "frijol negro" es un cultivo nativo de los trópicos de América y sin importar la ubicación en la que es cultivada, la forma es la misma. En México podemos encontrarla cultivada en Chiapas, Colima, Durango, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, SLP, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (INIFAP, 2021). Por lo que el cultivo es clave tanto en la dieta mexicana como en el PIB agrícola nacional, siendo responsable de

1.93% además de cubrir los requerimientos de consumo nacional además de ser exportador a EU (84.07%), Canadá (13.47%), y China (2.05%), y a nivel nacional, gracias a formar parte de la canasta básica, es responsable del consumo anual de 9.9 kg. Y en lo que respecta a la región que forma parte la CDMX, la región 17, es considerada como una zona con "potencial" por ser responsable de 2,771,818 ha y una participación nacional del 6.58% y un rendimiento promedio de 0.82ton/ha (SAGARPA, 2017).

### 3.5.1. Taxonomía y ciclo del frijol

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Phaseolus* L.

Especie: *vulgaris* L.

(CONABIO, 2009)

El ciclo del frijol es anual por lo que lo podemos encontrar durante todo el año y es una de las razones por las cuales es un alimento que se encuentra en la canasta básica, sin embargo, es importante recalcar que hay variedades del frijol que no presentan esta característica, siendo posible que sean perennes. Además, los cultivos presentan diferentes características durante sus etapas fenológicas por lo que es importante definir las etapas fenológicas de *P. vulgaris*.

**Tabla 1. Etapas fenológicas del frijol negro**

<b>Etapas fenológicas</b>	<b>Descripción</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Imagen</b>
---------------------------	--------------------	---------------	---------------

<p>V0 germinación</p>	<p>Parte inicial de la etapa contando desde el día en que la semilla tiene humedad suficiente, es decir, el primer día de riego/lluvia.</p>	<p>12-15D de siembra a germinación</p>	
<p>V1 emergencia</p>	<p>Se toma desde la presencia de los cotiledones (epigeos) de la planta aparecen a nivel del suelo.</p>	<p>15-42D</p>	
<p>V2 hojas primarias</p>	<p>Comienza cuando las hojas primarias (unifoliadas y compuestas) se despliegan.</p>	<p>15-27D</p>	
<p>V3 primeras hojas trifoliadas</p>	<p>Da comienzo cuando la planta presenta la primera hoja trifoliada completamente abierta y las láminas de los folíolos se ubican en un plano.</p>	<p>15-27D</p>	

<p>V4 tercera hoja trifoliada</p>	<p>Da comienzo cuando la tercera hoja trifoliada está desplegada.</p>	<p>15-27D</p>	
<p>R5 prefloración</p>	<p>Da comienzo cuando aparece el primer botón o racimo.</p>	<p>27-42D</p>	
<p>R6 floración</p>	<p>Da comienzo cuando la primera flor esté abierta.</p>	<p>42-60D</p>	

<p>R7 formación de las vainas</p>	<p>Da comienzo cuando se presenta la primera vaina con corola de la flor colgada o desprendida.</p>	<p>60-75D</p>	
<p>R8 llenado de la vaina</p>	<p>Da comienzo cuando la primera vaina comienza a llenarse. Aquí también es el inicio del crecimiento activo de la semilla y las vainas presentan abultados correspondientes a las semillas en crecimiento.</p>	<p>75-113D</p>	

R9 maduración fisiológica	En esta última etapa se reconoce por la coloración y secado de las primeras vainas, continúa el amarillamiento, la caída de hojas y todas las partes de la planta se secan para dar paso a la pérdida de pigmentación de la vaina. Baja el nivel de agua hasta un 15%, y así se obtiene el color típico de la semilla (frijol).	75-113D	
---------------------------------	---	---------	---

*Datos recopilados de SIAP, 2019*

Según los datos recopilados de INIFAP, el periodo de siembra a germinación dura de 12-15 días (D), el periodo de germinación a floración es de 15/27-45D, de la floración a la aparición de la vaina verde 7-15D y de la floración a la cosecha de la semilla 38-38D. Por lo que podemos decir que el tiempo del cultivo es de 3-4 meses o 113D aproximadamente (2021).

A su vez, se reporta que el requerimiento de agua durante el ciclo va es determinante a las necesidades que requiere cada fase fenológica del cultivo y siempre constante en el cultivo. En las primeras fases (V0- R6) el requerimiento es menor puesto que el área foliar es menor, sin embargo, en el último tercio del cultivo (R7-R9) los requerimientos de agua aumentan por la presencia del fruto y su formación y maduración (Párraga *et al.*, 2020).

### 3.5.2. Siembra

La siembra es directa en campo normalmente es de un espacio entre planta de 6cm y 70cm de espacio entre hileras, mientras que para la profundidad de siembra es de 2-4cm (SIAP, 2019).

Sin embargo, para evitar la contaminación entre tratamientos por lo menos se debe de tener una distancia entre plantas de 15 a 25 centímetros.

### 3.5.3. Nutrición

El cultivo de frijol se nutre de diferentes nutrientes, principalmente y en mayor cantidad de N, K, Ca y en menor cantidad de S, Mg y P, sin embargo, requiere de más minerales.

La FAO menciona que los requerimientos de la planta difieren en variedad y en tamaño de la planta, pero en promedio presenta la siguiente tabla:

**Tabla 2. Exigencias nutrimentales del frijol**

Componentes de la cosecha	Kg/ha					
	N	P	K	Ca	Mg	S
Vainas	32	4	22	4	4	10
Tallos	65	5	71	50	14	15
Total	94	9	93	54	18	25

*Datos proporcionados por FAO, s.f.*

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder evaluar la microalga y su eficiencia, se desarrollará el experimento en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC) con el fin de igualar las condiciones reales en campo y así obtener datos más certeros y reales que en condiciones controlables como lo es en un laboratorio.

### Ilustración 1. Vista aérea del campo experimental

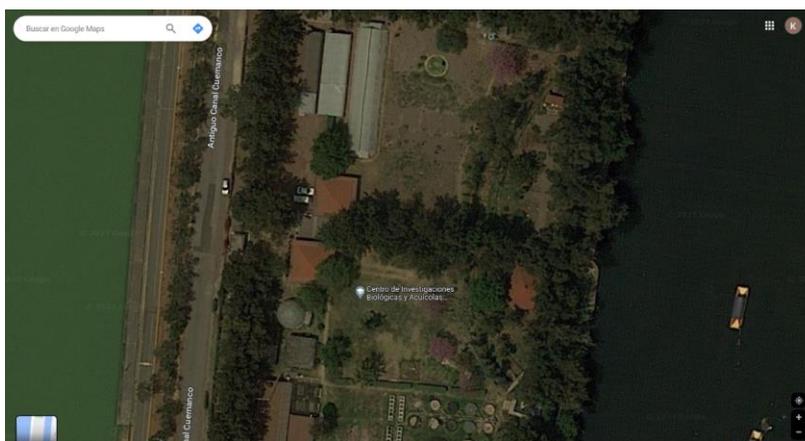


Ilustración 1. Vista aérea del campo experimental ubicado en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC). Recuperada de Google Earth, 2023.

En donde el diseño experimental será en bloques completos al azar, con cuatro tratamientos; Testigo (TAG), fertilización normal por medio de un agroquímico (TAGR), microalga seca (MS) y concentrado microalgal (CM), los cuales serán en bloques al azar.

**Tabla 3. Diseño experimental con bloques al azar**

Bloque 1			
T4	T2	T3	T1
T1	T4	T2	T3
T2	T3	T1	T4
T3	T1	T4	T2
T4	T2	T1	T3
Bloque 2			
T1	T2	T3	T4
T3	T4	T1	T2
T2	T1	T4	T3
T4	T3	T2	T1
T1	T4	T3	T2
Bloque 3			
T3	T1	T4	T2
T1	T3	T2	T4
T4	T2	T3	T1
T2	T4	T1	T3
T3	T1	T4	T2

Tabla 3. El diseño experimental de bloques completos al azar con 4 tratamientos, los tratamientos son los siguientes: el T1 es Testigo (TAG), T2 es fertilizante químico (TAGR), T3 es Microalgal Seca (MS), T4 MS + Concentrado de Microalga (CM) al 100%.

#### 4.1. ANÁLISIS

Con el objetivo de poder evaluar el mayor número de variables que puedan afectar o ayudar al cultivo se harán diversos análisis en suelo, agua y la microalga.

En el caso del suelo se evaluará el pH y su estructura con el fin de poder evaluar su mejoramiento con la microalga, y únicamente se realizará un segundo análisis en el suelo, puesto que se busca que con el biofertilizante a base de microalga se mejore su estado.

En el caso de la microalga, los análisis serán realizados en el rendimiento que presente la planta, sin embargo, se analizará en la microalga macro y micronutrientes, especial CHON y P.

#### 4.2. ANÁLISIS DE LA PLANTA

Con el fin de poder medir la efectividad del biofertilizante a base de microalga en la planta se evaluarán varios aspectos de la planta.

Se aterrizará la metodología de Tello Hidalgo (2018) con relación a los propios objetivos de este experimento, en el cual monitorea los aspectos importantes de la planta con el propósito de ver el rendimiento del biofertilizante en la planta. En este experimento, el principal aspecto a evaluar será el número de vainas que se tengan por planta además del número de semillas que se obtengan puesto que es producto de interés. Por otro lado, se evaluarán el número de hojas después de las hojas trifoliadas y las inflorescencias, una vez más, por planta, así como la altura de la planta.

La toma de datos se llevará a cabo después de la fase V4 o después de la aparición de la tercera hoja trifoliada, y será dos veces a la semana durante todo el cultivo (tres meses). En el caso de las inflorescencias, vainas y semillas, su conteo será realizado desde su aparición hasta el fin del ciclo agrícola.

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Antes de determinar los resultados obtenidos en el cultivo se valorizo los nutrientes de la microalga, por lo que se midieron lípidos, proteínas y carbohidratos que posee la microalga. Para obtener toda la biomasa requerida para los 4 tratamientos (TAG, TAGR, CM y MS) se requirieron 3 lotes de biomasa con un aporte de total de 36.5268 mg/L de lípidos, 0.01937 mg/L de proteínas y 152.7789 mg/L de carbohidratos (Tabla 4), este aporte fue en dosis a nivel suelo para que la planta tuviera la disponibilidad. Es importante destacar la importancia

de estos tres macronutrientes puesto que ayudan a varios aspectos de la planta y en el producto de interés del cultivo.

**Tabla 4. Aportación de biomasa microalga de macronutrientes**

	Lípidos (mg/L)	Proteínas (mg/L)	Carbohidratos (mg/L)
Aportación por dosis	18.2634078	0.09686618	76.3894737
Aportación total	36.5268156	0.19373236	152.778947

Tabla 4. Aportación de la biomasa microalgal de lípidos, proteínas y carbohidratos con SST de 8.977. Determinaciones propias, 2023.

Conforme a la literatura y lo observado en las plantas con tratamiento de biomasa microalgal (MS y CM), las plantas presentaron un mejor desarrollo y crecimiento adecuado y acelerado en algunas etapas fenológicas, además de tener estructuras fuertes, esto puede ser acreditable a las dosis aplicables dado a los macronutrientes que proporciona la biomasa.

A su vez, se evaluó la estructura del suelo; el estado inicial de suelo agrícola se encontraba en condiciones pobres visualmente, es decir, seco, bloques grandes y densos de suelo/terrones y con pocos agregados finos o "tierrita fina" con respecto a la FAO (2009), mientras que al final del experimento se dejó descansar el suelo por un mes, posterior a este tiempo, el suelo se observó en condición buena a moderada, puesto que se observaba más agregados finos, terrones de suelo casi nulos además de que presentaban la característica que al presionarlos se deshacían (FAO, 2009; Benites Jump, 2016). A su vez, el color del suelo cambió de un marrón claro a un color fuerte, es decir, paso de tener una condición pobre visualmente

(Ilustración 3, A) a una buena condición visual (Ilustración 3, B), la cual además de determina que hay materia orgánica en el suelo que proveen nutrientes al suelo.

Por otro lado, en nivel de retención de agua cambio, es decir, la capacidad de absorción del suelo mejoro disminuyendo el encharcamiento de agua, obteniendo un porcentaje de humedad de 18.096% mejorando la retención del agua en el suelo 1.43% en solo un ciclo agrícola. Sin embargo, el pH del suelo que fue utilizado por el experimento aumento 0.05%



Ilustración 2. Condición del suelo. A) Condición visual del suelo antes del experimento. B) Condición visual del suelo después del experimento. Autoría propia, 2023.

a comparación del pH del suelo de la zona; es importante aclarar que el suelo agrícola de la zona es alcalino por la zona, no obstante, es algo que se debe de considerar en futuras repeticiones.

Durante la experimentación se observaron varios puntos importantes en el cultivo, por lo que es necesario evaluar los resultados por partes. La primera parte evaluada es la germinación del cultivo, destacando el porcentaje de germinación de la semilla. Con fines de control de este experimento se puso a germinar en charola de 200 cavidades, las cuales fueron monitoreadas las cuales terminaron de germinar en 14 días. Con un porcentaje de germinación (PG) del 92.5%, el cual fue sacado con la metodología de Ruíz Sánchez y colaboradores (2018).

$$PG = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas sembradas}} * 100 =$$

$$PG = \frac{185}{200} * 100 = 92.5\%$$

Obteniendo mejor porcentaje de germinación que lo que se reporta en (IICA *et. al.*, 2009), el cual es de 80%, superando por 12.5%. es posible que esto se deba a que durante la germinación de las semillas fueron regadas con agua residual de la planta experimental

Atzintli, puesto que el agua poseía 2.32 mg/L de SST en 20 litros que fueron utilizados, además 12.35 mg/L de nitratos y 2.13 mg/L de nitritos, se puede concluir que ayudaron a que la plata presentará más resistencia a los fríos y ayudara a la formación de aminoácidos.

A su vez también de evaluó el número de hojas en cada planta y la altura de ellas. En donde las plántulas poseían sus primeras hojas trifoliadas, mientras que para que la altura las plántulas superaban los tres centímetros, mientras que otra superaba los cinco centímetros. Por lo que las plántulas superaron las primeras etapas fenológicas en las primera tres semanas del ciclo agrícola o los primeros 14 días, reduciendo el tiempo de estas etapas (V1, V2 y V) las cuales son de 15 a 27 DDS (días después de siembra). Y una vez más se presume que el crecimiento acelerado es gracias al agua residual proporcionada por la planta Atzintli.



Ilustración 3. Vista aérea de la charola de germinación (200 cavidades). Autoría propia, 2023.



Ilustración 4. Plántulas de frijol en charola de 200 cavidades con una cinta métrica para ver la altura de las plántulas. Autoría propia, 2023.

La siguiente fase del cultivo es el reproductivo de la planta las cuales constan de R5, R6, R7, R8, y R9, y para poder evaluar esta etapa del ciclo agrícola y sobre todo la eficiencia de la biomasa microalgal como biofertilizante se monitoreo y midió el número de hojas por planta, altura de la planta, número de inflorescencias, vainas y su longitud, y semillas por planta.

Para determinar el desarrollo de cada planta por tratamientos en número de hojas por planta, vainas cosechadas por planta, desarrollo de vainas por planta y número de flores por planta, se corrieron los datos recopilados en el programa JMP para realizar un análisis de varianza, es decir, un ANOVA simple (0.05 de error) y pruebas Tukey para la comparación de medias.

### 5.1. Número de hojas

El análisis de varianza para el número de hojas por planta no es representativo estadísticamente por el número de repeticiones por tratamiento, sin embargo, la prueba Tukey corrida para el análisis determina que en cuestión de número de hojas todas las plantas tuvieron un número de hojas similares entre los cuatro tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con mayor número de hojas en el tratamiento con agroquímico (TAGR).

#### Ilustración 5. Análisis de varianza de hojas por tratamiento

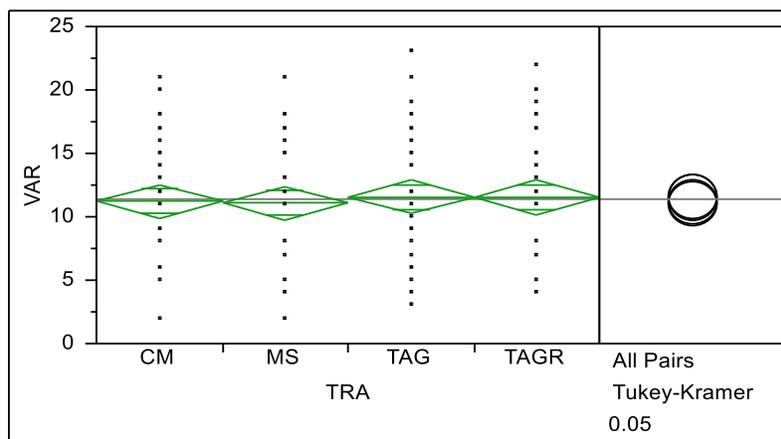


Ilustración 5. CM= Concentrado microalgal, MS= Microalga seca, TAG= tratamiento con agua, TAGR= tratamiento con agroquímico. Elaboración propia con el programa JMP, 2023.

### 5.2. Altura de la planta

La prueba Tukey determino que estadística los tratamientos no son estadísticamente representativos, sin embargo, se determina que los tratamientos MS y TAGR son similares (Ilustración 6, A), no obstante, el tratamiento con microalga seca (MS) competitivo al TARG, con una diferencia de 0.09% estadísticamente (Ilustración 6, B).

Dado que la altura superior del tratamiento MS fueron 145 cm en promedio, mientras que el tratamiento TAGR alcanzo en promedio alturas de 160 cm y en algunas plantas de ambos tratamientos la altura superior fue de 200 cm.

### Ilustración 6. Análisis Tukey de altura

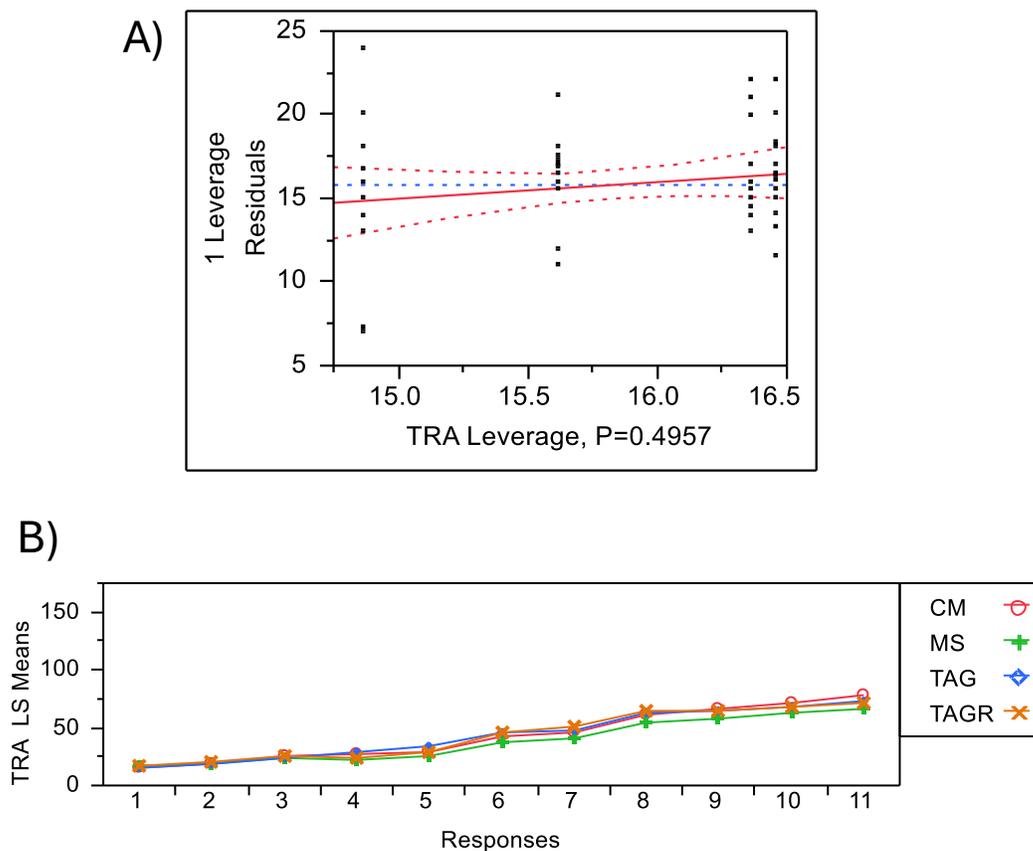


Ilustración 6. CM= Concentrado microalgal, MS= Microalga seca, TAG= tratamiento con agua, TAGR= tratamiento con agroquímico. Elaboración propia con el programa JMP, 2023.

### 5.3. Número de flores

Al igual que en el análisis de varianza, ningún tratamiento es estadísticamente representativo, mientras que con la prueba Tukey los dos tratamientos con mejor desempeño son el Concentrado microalga (CM) y el tratamiento con agua (TAG). Por lo que se puede presumir que el tratamiento MS le proporciona nutrientes conforme la planta lo requiera puesto que se administró las dosis a nivel suelo. Además, se tiene que considerar que tanto el agua residual como la microalga seca proporcionan a la planta nutrientes en diferentes tiempos, puesto que

el agua residual es directo puesto su forma líquida ayuda a la absorción de la planta más rápido, mientras que la microalga seca va descomponiéndose en el suelo, y poco a poco liberando los nutrientes a la planta, eso como consecuencia ayuda al amarre del fruto, puesto que entre más flor más posibilidades hay de que se obtenga un fruto, en este caso la vaina de donde se obtiene el producto de interés.

### Ilustración 7. Análisis de varianza de flores por tratamiento

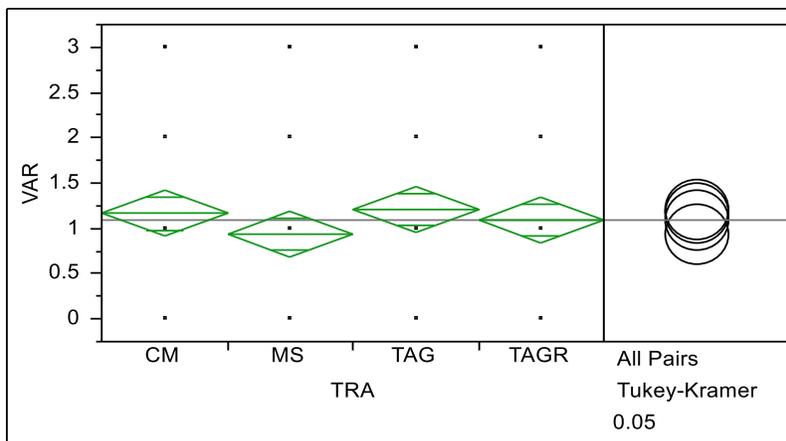


Ilustración 7. CM= Concentrado microalgal, MS= Microalga seca, TAG= Tratamiento con agua, TAGR= Tratamiento con agroquímico. Elaboración propia con el programa JMP, 2023.

#### 5.4. Numero de vainas

El punto clave del experimento fue evaluar el cultivo con la microalga como biofertilizante, por lo que la vaina es el punto principal de la investigación dado que es el producto de interés, por lo que se observó la aparición de las vainas por plantas, el número de vainas y al final las vainas cosechadas por tratamientos.

El tratamiento que funciono mejor para obtener más vainas (producto de interés) es el tratamiento CM, además del TAGR. Ambos son similares en sus resultados, por lo que

podemos destacar que el biofertilizante al igual que el agroquímico, cumplen la función para de amarrar los frutos y obtener más vainas por planta.

### Ilustración 8. Análisis de varianza de vainas por tratamiento

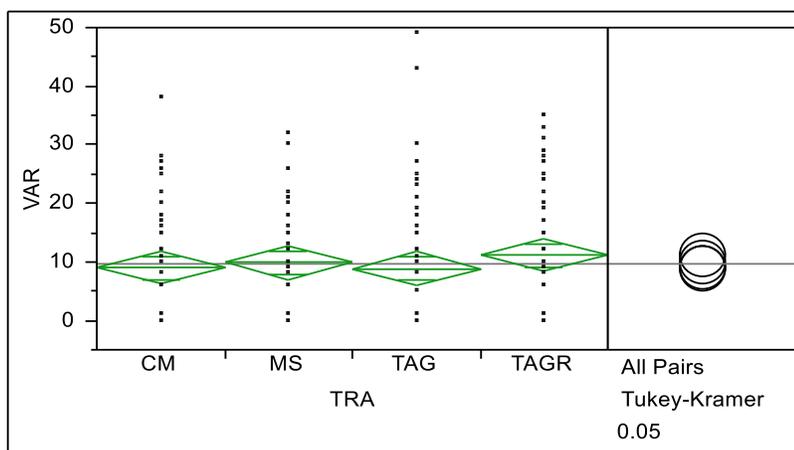


Ilustración 8. CM= Concentrado microalgal, MS= Microalga seca, TAG= Tratamiento con agua, TAGR= Tratamiento con agroquímico. Elaboración propia con el programa JMP, 2023.

Mientras que, el análisis de varianza para el número de vainas cosechadas por tratamiento, determino que no es estadísticamente representativo, sin embargo, con la prueba Tukey se determina que el tratamiento que más destaco fue el CM junto con el tratamiento TAGR.

### Ilustración 9. Análisis de varianza de vainas cosechadas por tratamientos

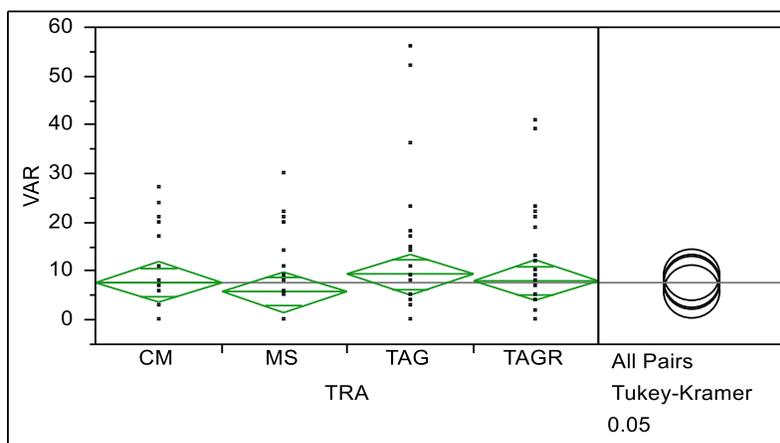
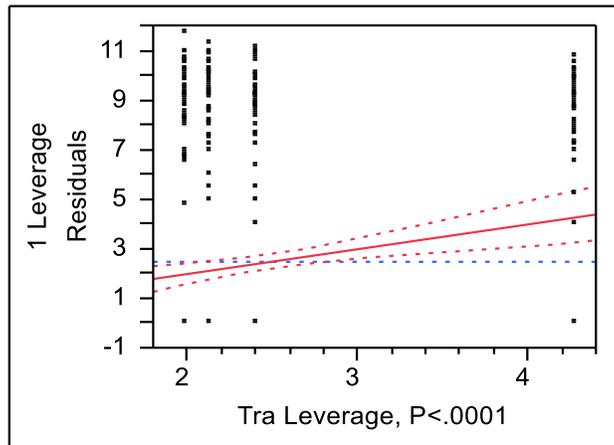


Ilustración 9. CM= Concentrado microalgal, MS= Microalga seca, TAG= Tratamiento con agua, TAGR= Tratamiento con agroquímico. Elaboración propia con el programa JMP, 2023.

No obstante, en la longitud de la vaina se determina por medio de la prueba Tukey que el tratamiento que mejores resultados obtuvo es el tratamiento MS superando al TAGR y que al final de cuentas cuenta con más espacio para que la planta desarrolle otra semilla, beneficiando directamente a la obtención de tener más granos y por ende mayor cantidad del producto de interés; el frijol.

**Ilustración 10. Análisis Tukey longitud de vainas**



Level		Least Sq Mean
MS	A	4.2657143
TAGR	B	2.3970270
CM	B	2.1208556
TAG	B	1.9796791

Levels not connected by same letter are significantly different.

Ilustración 10. Ilustración 9. CM= Concentrado microalgal, MS= Microalga seca, TAG= Tratamiento con agua, TAGR= Tratamiento con agroquímico. Elaboración propia con el programa JMP, 2023.

### 1.1. Número de semillas

Por último, se evaluó el producto de interés, se contabilizaron las semillas obtenidas de cada planta y se juntaron con todo el tratamiento. La prueba Tukey menciona que estadísticamente no es representativa la variación, sin embargo, la diferencia es de 1.41. Es decir, el tratamiento con MS es competitivo con el sintético, seguido del tratamiento CM por 2.64.

#### **Ilustración 11. Análisis Tukey semillas**

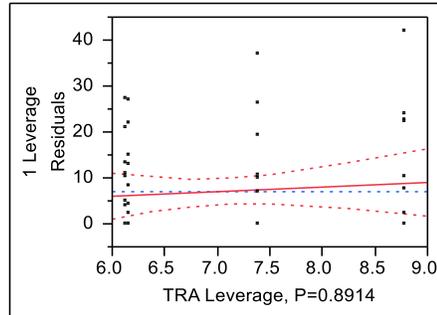


Ilustración 11. Ilustración 10. Ilustración 9. CM= Concentrado microalgal, MS= Microalga seca, TAG= Tratamiento con agua, TAGR= Tratamiento con agroquímico. Elaboración propia con el programa JMP, 2023.

Podemos concluir a su vez, que visualmente el frijol se ve más grande de los tratamientos MS y CM a comparación del tratamiento TAG, como podemos ver en la ilustración 12.

#### **Ilustración 12. Frijoles cosechados**



Ilustración 12. Frijoles cosechados, los del lado izquierdo son del tratamiento TAG y los del lado derecho son del tratamiento CM. Autoría propia, 2023.

## 6. CONCLUSIONES

Por medio de esta investigación experimental se logró valorar el potencial de la microalga como fertilizante con el fin de aumentar la producción del producto de interés: el frijol, por lo que se puede decir que el tratamiento que mejor funcionó fue el tratamiento del Concentrado Microalgal, considerando todos los aspectos evaluados por tratamientos; número de hojas, altura de la planta, número de flores, número de vainas, número de vainas cosechas, longitud de vaina y número de semillas. Esto se debe a la caracterización del agua residual más los nutrientes que posee la microalga seca, es decir, con el agua residual se le proporciona a la planta nutrientes disponibles en ese momento no obstante la planta seguirá teniendo nutrientes disponibles proporcionados por la microalga seca que al descomponerse poco a poco en el suelo va proveyendo a la planta de estos nutrientes.

Sin embargo, otro aspecto que se debe destacar con base a los resultados obtenidos es la aptitud de la microalga como un bioestimulante, los cuales son sustancias o macroorganismos que mejoran la salud y el crecimiento de los cultivos ayudando su vez, a la resistencia de estrés abiótico y bióticos de origen biológico o químico (Yara España, 2023), puesto que se observaron estos efectos durante las diferentes etapas fenológicas del cultivo.

Mientras que su función como fungicida y mejorar de suelo es escasa pero positiva la información que se recopiló en este experimento, dicho de otra forma, no se observó la presencia de alguna plaga o enfermedad en el cultivo durante todo el ciclo agrícola, aunque sí una mejoría en la estructura del suelo después de la aplicación de la microalga (su capacidad de retención, color y gránulos de suelo).

Por todo esto se orienta a seguir la investigación en mayor escala y en diferentes zonas para determinar su eficacia, además de ser necesario recalcar que de ser repetido el experimento se consideren las condiciones en las que fue montado el experimento y abordar o descartar las consideraciones necesarias para su implementación, las dosificaciones de los tratamientos, así como los aspectos edafoclimáticos de la zona en la que se planeó desarrollar puesto que puede ser una ventaja o desventaja en el desarrollo del experimento.

## 7. REFERENCIAS

1. Arrellano-Aguilar, O., & Rendón von Osten, J. (2018). La huella de los plaguicidas en México. GREENPEACE. Recuperado 17 de abril de 2023, de [https://www.greenpeace.org/static/planet4-mexico-stateless/2018/11/30b49459-30b49459-plaguicidas\\_en\\_agua\\_ok\\_em.pdf](https://www.greenpeace.org/static/planet4-mexico-stateless/2018/11/30b49459-30b49459-plaguicidas_en_agua_ok_em.pdf)
2. Armenta-Bojórquez, A. D., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., Apodaca-Sánchez, M. A., Gerardo-Montoya, L., & Nava-Pérez, E. (2010). BIOFERTILIZANTES EN EL DESARROLLO AGRÍCOLA DE MÉXICO. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56.
3. CONABIO. (2009). *Phaseolus vulgaris* - ficha informativa. Recuperado 27 de junio de 2023, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm>
4. Contaminación por nutrientes | US EPA. (2016, 16 noviembre). US EPA. Recuperado 10 de abril de 2023, de <https://espanol.epa.gov/espanol/contaminacion-por-nutrientes>
5. De Agricultura Y Desarrollo Rural, S. (2022, 18 noviembre). ¿Conoces las diferencias entre fertilizantes? gob.mx. Recuperado 27 de marzo de 2023, de <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/conoces-las-diferencias-entre-fertilizantes?idiom=es>
6. El Cultivo del Frijol Presente y Futuro para México. ISBN: 978-607-37-1318-4 Primera edición, 2021. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Celaya, Gto., México, agosto de 2021.
7. FAO. (s. f.). Manejo agronómico FRIJOL. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado 27 de junio de 2023, de <https://www.fao.org/3/a1359s/a1359s03.pdf>
8. González Bladeras R. M., Disrupción de microalgas por ultrasonido y ozono para incrementar la recuperación de biocomponentes valorizables, CD de México: UNAM, Ingeniería Ambiental -AGUA. Febrero, 2020.
9. González Ulibarry, P. (2019, marzo). Consecuencias ambientales de la aplicación de fertilizantes. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile/ BCN. Recuperado 31 de marzo de 2023, de

[https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27059/1/Consecuencias ambientales de la aplicacion de fertilizantes.pdf](https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27059/1/Consecuencias_ambientales_de_la_aplicacion_de_fertilizantes.pdf)

10. Harrison, S.T.L., Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery intracellular products, *Biotechnol. Advan.* (1991) 217-240.
11. INECC. (2020, junio). Perspectivas de las importaciones y las exportaciones de plaguicidas en México. INECC. Recuperado 30 de mayo de 2023, de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/559746/PerspectivasImportacionesExportacionesPlaguicidas.pdf>
12. INECC. (2021). Estudios sobre el uso de plaguicidas en México compilación 1980-2018. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728079/141\\_2022\\_Estudios\\_plaguicidas\\_Mexico\\_1980-2018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728079/141_2022_Estudios_plaguicidas_Mexico_1980-2018.pdf)
13. MERCADO DE AGROQUÍMICOS: CRECIMIENTO, TENDENCIAS Y PRONÓSTICOS (2023 - 2028). (s. f.). Mordor intelligent. Recuperado 17 de abril de 2023, de <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/agrochemicals-market>
14. Párraga, J. E. C., Ugando Peñate, M., & Sabando García, A. R. (2020). Necesidades hídricas del frijol caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). calculadas con el coeficiente de cultivo utilizando lisímetro de drenaje. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Recuperado 16 de junio de 2023, de <https://www.redalyc.org/journal/5600/560064435010/html/>
15. Probelte. (2019). ¿Cómo actúan los biofertilizantes en el suelo y los cultivos. Probelte España. <https://probelte.com/es/noticias/como-actuan-los-biofertilizantes-en-el-suelo-y-los-cultivos/>
16. RIESGOS DE LOS PLAGUICIDAS PARA EL AMBIENTE. (s. f.). GOB.MX. Recuperado 26 de junio de 2023, de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/26576/riesgos.pdf>
17. SAGARPA. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2023 FRIJOL MEXICANO.
18. SIAP (2019, marzo). Aptitud agroclimática del frijol en México ciclo agrícola primavera verano. SIAP. Recuperado 13 de mayo de 2023, de

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/448930/Reporte de Aptitud agroclim tica de M xico del frijol PV 2019.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/448930/Reporte_de_Aptitud_agroclim_tica_de_M_xico_del_frijol_PV_2019.pdf)

19. Tello Hidalgo E.G., Valdano Leopoldo T. R., Respuesta agronómica del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) a un biofertilizante con base en microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus*, Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas Carrera de Ingeniería Agronómica. 2018.
20. Yan, Z., Han, W., Peñuelas, J., Sardans, J., Elser, J. J., Du, E., Reich, P. B., & Fang, J. (2016). Phosphorus accumulates faster than nitrogen globally in freshwater ecosystems under anthropogenic impacts. *Ecology Letters*, 19(10), 1237-1246. <https://doi.org/10.1111/ele.12658>
21. Missaoui, K., Gonzalez-Klein, Z., Pazos-Castro, D., Hernandez-Ramirez, G., Garrido-Arandia, M., Brini, F., Diaz-Perales, A., & Tome-Amat, J. (2021). Plant non-specific lipid transfer proteins: An overview. *Centro de Biotecnología y Genética de Plantas - España; Plant Physiology and Biochemistry* 171, 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.026>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942821006409?via%3Dihub>
22. Importancia de las proteínas | Inhibidores de la síntesis de aminoácidos aromáticos - Passel. (s. f.). *Plant & Soil Sciences eLibrary*. [En línea]. Consultado el 11 de diciembre de 2023. Disponible en: <https://passel2.unl.edu/view/lesson/9a49f4ad2e86/2>
23. Martínez-Trinidad, T., Plascencia-Escalante, F. O., & Islas-Rodríguez, L. (2013). RELATIONSHIP BETWEEN CARBOHYDRATES AND VITALITY IN URBAN TREES. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, XIX(3), 459-468. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.03.016>
24. Ruiz-Sánchez M, Muñoz-Hernández Y, Guzmán D, Velázquez-Rodríguez R, Díaz-López GS, Martínez AY, et al. Efecto del calibre semilla (masa) en la germinación del sorgo. *Cultivos Tropicales*. 2018;39(4):51-9.

25. IICA, Red Sicta, & Cooperación Suiza en América Central. (2009, septiembre). Guía técnica para el cultivo de frijol en los municipios de Santa Lucía, Teustepe y San Lorenzo del Departamento de Boaca, Nicaragua. IICA-RED SICTA-COSUDE. [En línea]. Consultado el 9 de noviembre de 2023. Disponible en: <http://repiica.iica.int/DOCS/B2170E/B2170E.PDF>
26. ¿Qué son los bioestimulantes? | Yara España. (2023, 12 abril). Yara España. [En línea]. Consultado el 21 de noviembre de 2023. Disponible en: <https://www.yara.es/noticias-y-eventos/noticias/que-son-los-bioestimulantes/>
27. Benites Jump, J. R. (2018, 20 julio). Guía técnica de campo para la evaluación visual de los suelos. PortalFruticola.com. [En línea]. Consultado el 13 de diciembre de 2023. Disponible en: <https://www.portalfruticola.com/noticias/2016/12/14/guia-tecnica-de-campo-para-la-evaluacion-visual-de-los-suelos/>