



Nombre del Proyecto: Biorrefinería de microalgas: Desarrollo de un proceso integral sostenible para la producción de compuestos bioactivos a base de microalgas para la agricultura, ganadería y acuicultura

Código del proyecto Promotora: FI-053B-19

Investigador Principal: Ph.D. Fabián Villalta Romero

Unidad de Investigación: Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, ITCR

Período que cubre el presente informe: 1/01/2020 hasta el 31/12/2023

Fecha: 15/3/2023

Observaciones: El énfasis de este informe debe ser en el cumplimiento de objetivos y obtención de resultados.

1. Avance de las actividades.

- ✓ Complete el cuadro 1. Liste todas las actividades que, según el plan de trabajo, esperaba desarrollar.

➤ Indicador: % de avance de actividades

Cuadro 1. Porcentaje de avance en objetivos y actividades

Respecto a los objetivos		Respecto a las actividades				
Objetivo Específico	% Avance	Actividades asociadas al objetivo	% de avance/informe			
			1 (0%)	2 (33%)	3 (66%)	4 (100%)
1° Objetivo. Establecer un protocolo de pasteurización para el tratamiento del agua proveniente de la digestión de los residuos agroindustriales	100	Caracterización de las aguas residuales.				X
		Análisis de la composición química y microbiológica del efluente del biodigestor				X



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

		Formulación de medios de cultivo				X
		Combustión del biogás				X
2° Objetivo. Establecer el cultivo de un consorcio de microalgas en aguas residuales	100%	Establecimiento de cultivos de las microalgas				X
		Monitoreo de cultivos				X
3 ° Objetivo. Establecer un organigrama con las operaciones unitarias necesarias para la obtención de productos con valor comercial.	100%	Separación de la biomasa de microalgas.				X
		Separación de proteínas y clorofila de la biomasa de microalgas				X
		Caracterización de las fracciones por espectrometría de masas				X
4° Objetivo. Analizar el mercado de los productos generados a partir de las biomasa de microalgas cultivadas con medios agroindustriales.	100%	Analizar el mercado de los productos generados a partir de las biomasa de microalgas cultivadas con medios agroindustriales.				X

- ✓ Realice una valoración con respecto al logro de todos los objetivos planteados,

Por medio de la ejecución de este proyecto se logró determinar la importancia de la robustez del consorcio con el que se trabajó para alcanzar el desarrollo de un producto con aplicación en la ganadería como estimulante de crecimiento del pasto y maíz.

2. Avance financiero.

- ✓ Porcentaje de ejecución de gastos

% de ejecución presupuestaria = $46,351,932.00 / 46,635,856.00 = 99\%$

TOTAL INGRESOS ₡46,635,856.00

TOTAL EGRESOS ₡46,351,932.00

SUPERAVIT / DEFICIT AL 31 DE DICIEMBRE DEL 2023 ₡283,924.00



- ✓ Presentar los comprobantes de pago o facturas correspondientes.

3. Productos, efectos e impactos

- ✓ Liste lo siguiente:

- Productos: Resultados inmediatos del proyecto. Se logró generar un sistema cultivo eficiente para obtener biomasa para formular bioestimulantes de uso agrícola o materia primas para la formulación de piensos y derivados de clorofila
- Efectos: Cambios a corto y mediano plazo. Implementación de un nuevo proceso productivo para la producción de microalgas para la generación de productos agropecuarios.
- Impactos: Cambios a mediano y largo plazo producto del desarrollo del proyecto. Generar opciones productivas donde se aprovechan residuos de sistemas productivos como la ganadería para tener nuevos productos de alto valor
 - ✓ Debe adjuntar la documentación (manuales, procedimientos, políticas, análisis) que considere pertinente para demostrar que la actividad se ejecutó y se alcanzó el entregable esperado

4. Conclusiones

- Se ha logrado implementar un sistema de producción que permite aprovechar materias primas de agroindustrias y el dióxido de carbono generado para el cultivo de microalgas y la generación de bioinsumos para uso agrícola
- Se han identificado consorcios de microalgas muy productivos los cuales aprovechan la interacción microalgas y bacterias para generar nutrientes que se requieren para el crecimiento de las microalgas.



5. Nivel de madurez de la tecnología desarrollada

Ubique el nivel de desarrollo en que se encuentra la tecnología desarrollada:

TRL	Nivel de desarrollo	Descripción	Marque con X
1	<i>Investigación básica:</i> Principios básicos reportados de la nueva tecnología propuesta.	Revisión y publicación de artículos científicos, el desarrollo y uso básico del conocimiento para iniciar una tecnología, sin un propósito definido de aplicación. Se desarrolla en entorno de laboratorio	
2	<i>Investigación aplicada:</i> Formulación del concepto o aplicación de la propuesta tecnológica.	Se desarrolló un prototipo con componentes básicos para ser probado en ambiente simulado. Entorno de laboratorio	
3	Investigación aplicada: Desarrollo experimental o prueba del concepto tecnológico (Prueba de concepto)	Explora aplicaciones prácticas de la propuesta tecnológica, siendo las posibles aplicaciones aún especulativas. Se sustentan en el análisis del estado del arte acotado al concepto de aplicación tecnológica. Se desarrolla en entorno de laboratorio.	
4	<i>Investigación aplicada:</i> Validación tecnológica en entorno de laboratorio. Pruebas de baja fidelidad.	Desarrollo de un prototipo tecnológico con componentes básicos integrados para ser probados en un ambiente simulado, con resultados donde se ponen a prueba sus principales características. Se desarrollo en un entorno de laboratorio.	
5	<i>Desarrollo tecnológico:</i> Validación tecnológica en entorno de laboratorio. Pruebas de alta fidelidad.	Desarrollo de tecnología con los componentes integrados para ser validados. Considera prototipos a escala en un entorno simulado cercano al real con pruebas de características completas. En este nivel el paquete tecnológico adquiere importancia y continúa adelante.	
6	<i>Desarrollo tecnológico:</i> Demostración de funcionamiento del	Se caracteriza por encontrarse en el estado de validación del sistema o prototipo desarrollado en un ambiente simulado de	X



Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

	prototipo en un entorno cercano al real	alta fidelidad o un entorno operacional controlado o una planta piloto.	
7	<i>Desarrollo tecnológico:</i> Demostración de funcionamiento del prototipo en un entorno operacional real.	Se caracteriza por encontrarse en el estado de validación del sistema o prototipo desarrollado en un entorno real (operacional). El prototipo/sistema/producto mínimo viable ya es considerado una innovación aquí en adelante. Incluye una demostración técnica y cualitativa. Se desarrolla en un entorno real.	
8	<i>Innovación:</i> Tecnología finalizada validada y certificada	Se caracteriza por tener una tecnología validada o certificada luego de pruebas en un entorno real y cumplimiento de normativas nacionales. La tecnología ha logrado convertirse en un producto/servicio comercializable, su riesgo es bajo y puede ser transferido de forma completa. Se desarrolla en entorno real.	
9	<i>Innovación:</i> Tecnología finalizada en proceso de implementación o comercialización (emprendimiento)	Se caracteriza por encontrarse en el proceso de implementación o comercialización del producto/servicio para satisfacer necesidades del mercado. La nueva tecnología se encuentra totalmente disponible y se puede utilizar en cualquier entorno real. Se desarrollo en entorno real.	

6. Propiedad Intelectual

¿Ha considerado el tema de propiedad intelectual relacionada con el proyecto y sus resultados?

El modelo propuesto para el cultivo de microalgas tiene mucho potencial para patentarse o generar un modelo de utilidad.

¿Se ha acercado a alguna instancia de apoyo (Oficina de Transferencia de Tecnología, Incubadora) para asesorarse respecto de la ruta a seguir?



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Si, se ha conversado con el personal de la oficina de Vinculación para poder iniciar el proceso de escritura de patente o modelo de utilidad que se desarrolló.

7. ¿Qué sigue?

¿Cuál es el principal reto que se genera con los resultados alcanzados?

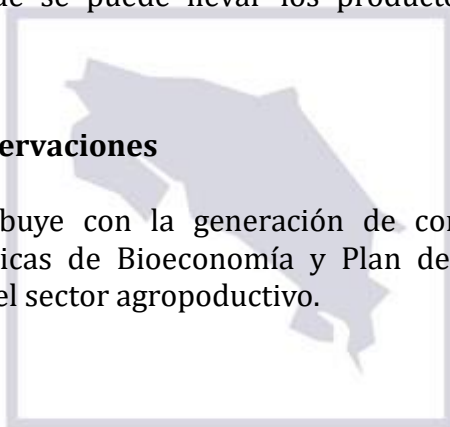
Los resultados alcanzados muestran que es posible cultivar microalgas por medio del aprovechamiento de residuos agroindustriales mediante el consorcio con microorganismos que le permite suplir algunos nutrientes como el nitrógeno y fuente de carbono.

¿Qué requiere para que se supere ese reto?

Se requiere conseguir recursos para seguir esta línea de investigación en el ITCR o fuera de la institución para que se puede llevar los productos desarrollados al sector agropecuario.

8. Sugerencias y observaciones

Esta investigación contribuye con la generación de conocimiento que se puede implementar en las políticas de Bioeconomía y Plan de Desarrollo Nacional para contribuir en desarrollo del sector agroproduktivo.



Firma del investigador principal o del responsable



Anexos

Resultados

1. Establecer un protocolo de pasteurización para el tratamiento del agua proveniente de la gestión de los residuos agroindustriales

Se realizó la evaluación de los parámetros químicos medios de cultivo provenientes del sector agroindustrial, se analizó vacaza proveniente de la en la finca Agroganadera Montero, ubicada en San Rafael de Irazú, Alvarado de Cartago. La cerdaza se recolectó de la Finca XXX ubicada en Pacayas, Cartago. Finalmente se evaluó suero de leche de la Empresa Sigma Alimentos ubicada en Cot de Cartago.

Cuadro 1: Parámetros químicos de las aguas residuales al inicio del ensayo

Análisis de nutrientes						
	Muestra	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	PO ₄ ⁻³	NH ₄ ⁺	pH
		mg/ml				
Vacaza	Vacaza 1	>500	31	>80	91	7,08
	Vacaza 2	>500	12	>80	48	6,95
	Vacaza 3	>500	17	>80	66	6,76
Cerdaza	Cerdaza 1	<10	<0,5	>80	>350	—
	Cerdaza 2	<10	<0,5	>80	>350	—
	Cerdaza 3	<10	<0,5	>80	>350	—
Suero	Suero 1	41	2,3	9	50	2,54
	Suero 2	49	2,5	>80	45	3,39
	Suero 3	49	3,4	>80	63	3,41

Además se realizaron análisis microbiológicos de la muestras en donde se evaluó el contenido de E. Coli y salmonella en muestras autoclavadas y sin autoclavar.

Resultados del ensayo Para la ejecución de los ensayos de coliformes se utiliza el procedimiento Determinación de Coliformes Totales, Coliformes fecales y Escherichia coli en abonos orgánicos metodología desarrollada de acuerdo con el Standard Methods for the examination of water and wastewater. 23ª Edición, 2017 y Test Methods for the Examination of Composting and Compost, 2002.

Cuadro 2 Conteo microbiológico de E. coli y Salmonella en los medios utilizados

Muestra	<i>Escherichia coli</i> NMP/ml	<i>Salmonella</i>
Suero	>1100	Negativa
Suero Autoclavado	Negativa	Negativa
Vacaza	Negativa	Negativa
Vacaza Autoclavado	Negativa	Negativa



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Cuadro 3: Parámetros químicos de las aguas residuales 10 días después de iniciado el ensayo.

Análisis de nutrientes						
	Muestra	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	PO ₄ ⁻³	NH ₄ ⁺	pH
Vacaza	Vacaza 1	29	3,9	8	63	5,54
	Vacaza 2	113	2,8	70	67	5,45
	Vacaza 3	46	1,9	5	55	5,64
Cerdaza	Cerdaza 1	109	5,6	14	90	3,69
	Cerdaza 2	110	9,9	15	86	3,61
	Cerdaza 3	37	2,1	<3	209	5,08
Suero	Suero 1	68	2,8	>80	59	3,45
	Suero 2	36	3,6	49	63	3,35
	Suero 3	49	3,4	>80	63	3,41

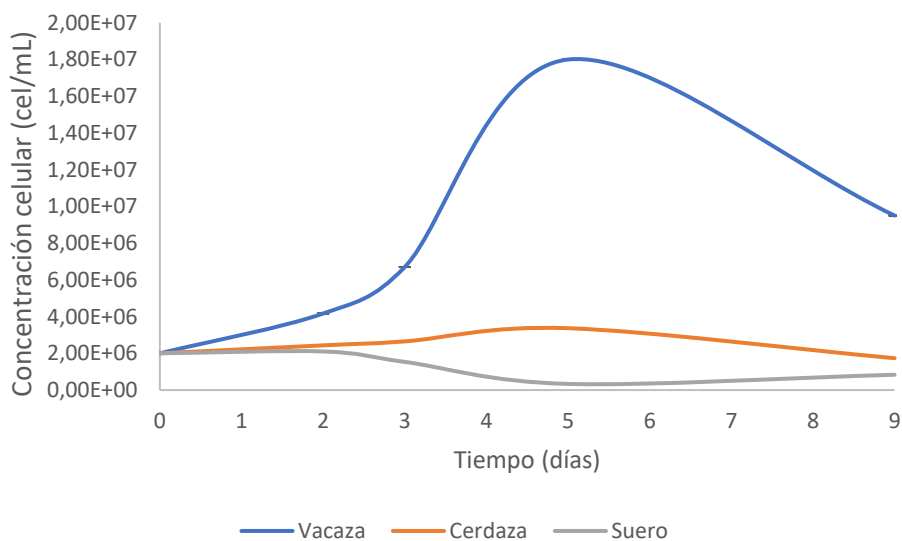


Figura 1 Curva de crecimiento del consorcio de microalgas con diferentes medios orgánicos.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Cuadro 4 Cantidad de biomasa colectada en bidones cultivado con medio de vacaza

Medio	Biomasa Húmeda	Porcentaje de Humedad
Vacaza	37,0787	70,435
Vacaza	26,8049	87,413
Vacaza	44,1394	90,036



Figura 2: Cultivo del consorcio de microalgas con medio de vacaza y alimentado con el dióxido de carbono generado de la fermentación.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3



Figura 3 Diseño de reactor de capa fina para el cultivo de las microalgas

Para optimizar el cultivo de las microalgas se realizó un diseño experimental en donde se evaluaron los efectos de diferentes parámetros como el medio orgánico, el consorcio de bacterias, el uso de una fuente adicional de carbono, efecto de la luz y la oscuridad. En el Cuadro 4 se muestran los parámetros analizados para diferentes tratamientos.

Cuadro 5: Condiciones de cultivo y parámetros de crecimiento del consorcio de microalgas

Bidón	Fecha	Tipo de medio	Bicarbonato	Condición de luz	Bacterias	Conteo celular	pH	nitratos	nitritos
1	1	qm	con	oscuro	no	30.5	6.93	500	80
2	1	org	con	oscuro	no	75.75	5.32	500	80
3	1	qm	sin	oscuro	no	33.7	7.30	500	80
4	1	org	sin	oscuro	no	36.25	4.99	500	80
5	1	qm	con	luz	no	28	6.90	500	80
6	1	org	con	luz	no	45	7.22	500	80
7	1	qm	sin	luz	no	45.45	7.58	500	80
8	1	org	sin	luz	no	102	5.29	500	80
9	1	qm	con	oscuro	si	68.5	7.03	500	80
10	1	org	con	oscuro	si	79.75	6.51	500	80
11	1	qm	sin	oscuro	si	88.5	7.18	500	67
12	1	org	sin	oscuro	si	57	6.64	500	80
13	1	qm	con	luz	si	42.75	7.62	500	38
14	1	org	con	luz	si	48.7	5.70	500	80
15	1	qm	sin	luz	si	117	6.62	500	80
16	1	org	sin	luz	si	36.5	5.58	500	72
17	1	qm	con	oscuro	no	39.75	7.01	500	80
18	1	org	con	oscuro	no	11.25	5.31	500	80



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

19	1	qm	sin	oscuro	no	98.75	7.20	500	73
20	1	org	sin	oscuro	no	75.25	5.95	500	72
21	1	qm	con	luz	no	47.25	7.41	500	71
22	1	org	con	luz	no	63.75	5.36	500	72
23	1	qm	sin	luz	no	35.5	7.83	500	80
24	1	org	sin	luz	no	42.25	5.44	500	80
25	1	qm	con	oscuro	si	33.75	7.03	500	72
26	1	org	con	oscuro	si	87	6.13	500	80
27	1	qm	sin	oscuro	si	72.25	7.11	500	80
28	1	org	sin	oscuro	si	42	5.57	500	80
29	1	qm	con	luz	si	53.5	7.40	500	80
30	1	org	con	luz	si	102.5	6.35	500	80
31	1	qm	sin	luz	si	45	7.57	500	80
32	1	org	sin	luz	si	44	5.78	492	32
1	2	qm	con	oscuro	no	51.75	7.82	500	80
2	2	org	con	oscuro	no	50	8.48	23	2.4
3	2	qm	sin	oscuro	no	55	7.20	500	67
4	2	org	sin	oscuro	no	28	7.29	10	1.3
5	2	qm	con	luz	no	36.5	9.37	500	59
6	2	org	con	luz	no	NA	8.23	61	5
7	2	qm	sin	luz	no	82.25	8.43	498	46
8	2	org	sin	luz	no	NA	7.29	25	3
9	2	qm	con	oscuro	si	56.75	8.09	500	80
10	2	org	con	oscuro	si	57.5	8.16	54	5.3
11	2	qm	sin	oscuro	si	72	7.38	500	65
12	2	org	sin	oscuro	si	28.75	7.40	10	1.8
13	2	qm	con	luz	si	71.5	9.38	500	64
14	2	org	con	luz	si	21.25	8.07	42	4.2
15	2	qm	sin	luz	si	97.25	8.59	500	57
16	2	org	sin	luz	si	35.5	7.24	14	2.6
17	2	qm	con	oscuro	no	38.5	7.60	97	6.6
18	2	org	con	oscuro	no	26.25	8.17	500	80
19	2	qm	sin	oscuro	no	34.5	7.54	10	1.5
20	2	org	sin	oscuro	no	26	7.55	183	18
21	2	qm	con	luz	no	64.25	9.17	500	50
22	2	org	con	luz	no	33.75	8.24	95	6.1
23	2	qm	sin	luz	no	34	8.48	500	80
24	2	org	sin	luz	no	NA	7.53	38	3,5



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

25	2	qm	con	oscuro	si	31.75	7.61	463	47
26	2	org	con	oscuro	si	31.25	8.16	48	6
27	2	qm	sin	oscuro	si	28.5	7.81	500	80
28	2	org	sin	oscuro	si	26.5	7.28	200	32
29	2	qm	con	luz	si	12	9.14	500	75
30	2	org	con	luz	si	24	8.28	42	3.5
31	2	qm	sin	luz	si	18	7.28	500	71
32	2	org	sin	luz	si	41.25	7.37	28	3.8
1	3	qm	con	oscuro	no	48.75	8.85	500	80
2	3	org	con	oscuro	no	78.5	8.49	40	3.6
3	3	qm	sin	oscuro	no	69.25	7.20	500	80
4	3	org	sin	oscuro	no	77.5	7.07	103	5.6
5	3	qm	con	luz	no	33.25	9.52	500	80
6	3	org	con	luz	no	NA	8.68	19	2.9
7	3	qm	sin	luz	no	159	8.83	500	66
8	3	org	sin	luz	no	NA	7.68	55	4.6
9	3	qm	con	oscuro	si	45.25	8.76	500	80
10	3	org	con	oscuro	si	43.5	8.41	88	6.8
11	3	qm	sin	oscuro	si	3.75	7.15	500	80
12	3	org	sin	oscuro	si	30.75	7.45	128	27
13	3	qm	con	luz	si	300	9.58	500	80
14	3	org	con	luz	si	338	10.02	49	3.6
15	3	qm	sin	luz	si	203.75	8.69	500	56
16	3	org	sin	luz	si	25	7.67	50	4.3
17	3	qm	con	oscuro	no	54.5	8.87	500	80
18	3	org	con	oscuro	no	71.5	8.60	40	4.7
19	3	qm	sin	oscuro	no	33.25	7.75	500	80
20	3	org	sin	oscuro	no	16.5	7.92	93	8.9
21	3	qm	con	luz	no	67.75	9.43	500	80
22	3	org	con	luz	no	49.25	8.71	172	8.6
23	3	qm	sin	luz	no	78	8.55	500	49
24	3	org	sin	luz	no	NA	7.77	315	5.2
25	3	qm	con	oscuro	si	39.25	8.66	500	80
26	3	org	con	oscuro	si	NA	8.37	8.8	6.8
27	3	qm	sin	oscuro	si	6.75	7.26	500	78
28	3	org	sin	oscuro	si	52.75	9.38	132	6
29	3	qm	con	luz	si	NA	7.46	10	0.7



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

30	3	org	con	luz	si	624	9.57	45	4
31	3	qm	sin	luz	si	99.25	8.82	299	27
32	3	org	sin	luz	si	147.25	7.72	23	3.6
1	4	qm	con	oscuro	no	80.25			
2	4	org	con	oscuro	no	67.25			
3	4	qm	sin	oscuro	no	35			
4	4	org	sin	oscuro	no	51.75			
5	4	qm	con	luz	no	42.5			
6	4	org	con	luz	no	227			
7	4	qm	sin	luz	no	185.25			
8	4	org	sin	luz	no	85.25			
9	4	qm	con	oscuro	si	47.75			
10	4	org	con	oscuro	si	81.5			
11	4	qm	sin	oscuro	si	6.75			
12	4	org	sin	oscuro	si	33.5			
13	4	qm	con	luz	si	17.25			
14	4	org	con	luz	si	271.5			
15	4	qm	sin	luz	si	355			
16	4	org	sin	luz	si	346.75			
17	4	qm	con	oscuro	no	56.5			
18	4	org	con	oscuro	no	28.25			
19	4	qm	sin	oscuro	no	21			
20	4	org	sin	oscuro	no	10.75			
21	4	qm	con	luz	no	13			
22	4	org	con	luz	no	125.25			
23	4	qm	sin	luz	no	163.75			
24	4	org	sin	luz	no	238.25			
25	4	qm	con	oscuro	si	34.25			
26	4	org	con	oscuro	si	58.5			
27	4	qm	sin	oscuro	si	60.25			
28	4	org	sin	oscuro	si	44.25			
29	4	qm	con	luz	si	34.75			
30	4	org	con	luz	si	90.5			
31	4	qm	sin	luz	si	114			
32	4	org	sin	luz	si	585.75			



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

1	5	qm	con	oscuro	no	75.25	9.17		
2	5	org	con	oscuro	no	52.75	7.67		
3	5	qm	sin	oscuro	no	21	7.28		
4	5	org	sin	oscuro	no	49.2	7.82		
5	5	qm	con	luz	no	39.5	10.00		
6	5	org	con	luz	no	150.5	9.57		
7	5	qm	sin	luz	no	279.5	8.33		
8	5	org	sin	luz	no	128.75	8.46		
9	5	qm	con	oscuro	si	86	9.14		
10	5	org	con	oscuro	si	61.5	8.54		
11	5	qm	sin	oscuro	si	2	7.45		
12	5	org	sin	oscuro	si	71	7.65		
13	5	qm	con	luz	si	23	9.43		
14	5	org	con	luz	si	232	9.84		
15	5	qm	sin	luz	si	88.5	8.48		
16	5	org	sin	luz	si	594	9.70		
17	5	qm	con	oscuro	no	17.25	8.85		
18	5	org	con	oscuro	no	24.5	8.74		
19	5	qm	sin	oscuro	no	13.75	7.75		
20	5	org	sin	oscuro	no	9.5	7.31		
21	5	qm	con	luz	no	65.5	9.40		
22	5	org	con	luz	no	55.75	9.75		
23	5	qm	sin	luz	no	217.75	8.52		
24	5	org	sin	luz	no	386	9.18		
25	5	qm	con	oscuro	si	12.25	8.78		
26	5	org	con	oscuro	si	47.25	8.68		
27	5	qm	sin	oscuro	si	22.75	7.05		
28	5	org	sin	oscuro	si	40.5	7.46		
29	5	qm	con	luz	si	78	9.30		
30	5	org	con	luz	si	118	10.09		
31	5	qm	sin	luz	si	66.25	8.75		
32	5	org	sin	luz	si	198	9.25		

En la gráfica 1 se puede observar que la condición que presentó el mayor conteo celular fue el cultivo de microalga en medio orgánico con adición de bacterias y bicarbonato en condición de luz.

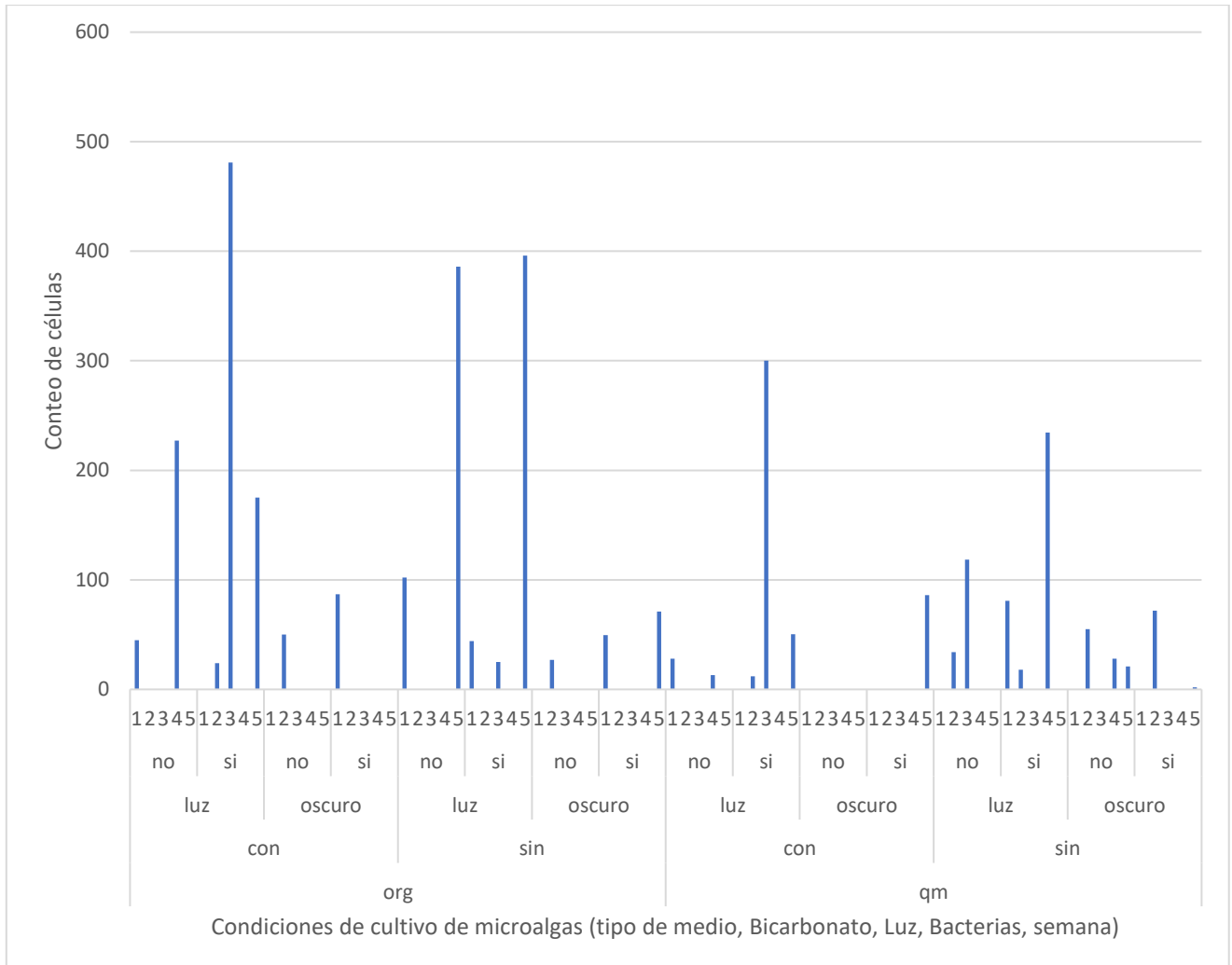


Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3



Gráfica 1 Conteo celular de microalgas en función de las condiciones de cultivo de microalgas (, tipo de medio (orgánico o químico), Adición o ausencia de Bicarbonato, con luz o sin luz; adición de un consorcio de Bacterias o sin adición del consorcio de Bacterias y semana después de inoculado)



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Se validó el potencial de la biomasa producida se realizó un ensayo en pasturas. Se realizó un ensayo en donde se evaluó la biomasa de microalgas formulada y aplicada a diferentes dosis tal y como se muestra a continuación.

Tratamiento 1, dosis baja: 2.5 ml de biofertilizante por 1 l de agua

Tratamiento 2, dosis media: 5 ml de biofertilizante por 1 l de agua

Tratamiento 3, dosis alta: 10 ml de biofertilizante por 1 l de agua

Tratamiento 4, testigo: sin biofertilizante

El ensayo fue realizado en en el cantón de Alvarado, distrito de Pacayas (9° 56' 42.9" N 83° 48' 58.2" O). La Finca Agroganadera Montero S.A. Dentro de la finca se delimitaron 20 cuadrantes de 4 m² cada uno, dejando un espacio de la cerca de 3 m, para disminuir la incidencia de error por efecto borde. Se utilizaron postes de plásticos identificados de distintos colores según el tratamiento y cuerda delgada para diferenciar cada cuadrante, además, se dejó un espacio entre cada cuadrante de 0.8 m. Las cinco réplicas de cada uno de los tratamientos se realizó por medio de una distribución por bloques al azar.

De cada tratamiento y réplica se tomaron de forma aleatoria 50 plántulas de pasto y se realizó el conteo de hojas a los días 33, 38 y 45 después de haber sido sometida a pastoreo. La aplicación de las microalgas se realizó 2 días después de haberse realizado el pastoreo.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

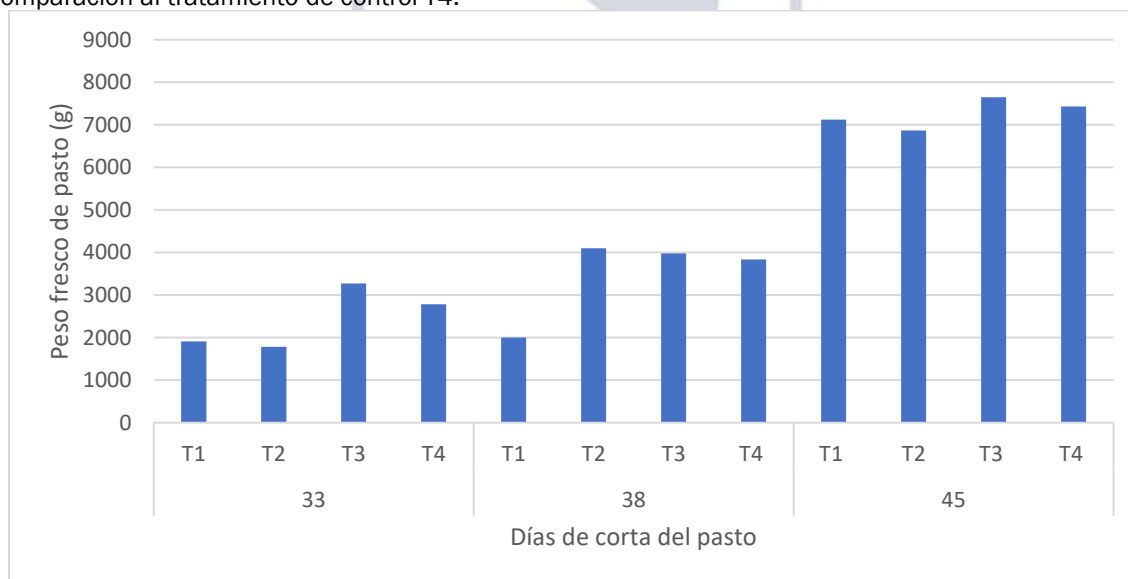
Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Cuadro 6 Promedio de hojas en el pasto Kikuyo para cada tratamiento

Días de corte después de aplicar el Bioestimulante	Número de Hojas promedio_T1	Número de Hojas promedio_T2	Número de Hojas promedio_T3	Número de Hojas promedio_T4
33	6,26	6,18	5,84	5,78
38	6,92	6,68	6,76	6,60
45	7,06	7,12	7,18	7,06
Total general	6,75	6,66	6,59	6,48

A cada tratamiento se le realizó la técnica de Botanal para tomar muestras de pasto y enviarlas a realizar análisis NIR para estimar la calidad bromatológica. Se pesó la biomasa fresca recolectada por la técnica de Botanal. Se puede observar que el tratamiento T3 presenta un ligero incremento de la biomasa en comparación al tratamiento de control T4.



Gráfica 2 Peso de la biomasa fresca de pasto recolectada al realizar la técnica de Botanal en cada tratamiento a diferentes días de corta.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Adicionalmente, se han desarrollado protocolos para todo el proceso de cultivo de las microalgas como se muestra a continuación que se han optimizado a lo largo del proyecto, estos son insumos muy valiosos para el cultivo de las microalgas y deben ser mantenidos en confidencialidad.

	INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)- Laboratorio de Microalgas.	Código: P-CC-001
		Páginas: 9
		Versión No. 01
		Actualizar: Semestre
		Frecuencia: Diaria
Elaborado por: Jeffry Garro Méndez Fecha: 09/06/2022	Última revisión por: Fabián Villalta Romero Fecha: 09/06/2022	Aprobado por: Maritza Guerrero Barrantes Fecha: 09/06/2022

Protocolo de monitoreo de condiciones de crecimiento y subcultivo.

Conteo celular

- 1) De la muestra tomada de cada repetición de cada tratamiento se separará un mililitro (1 ml) y se pondrá una gota de Lugol. Si no se puede contar el mismo día, se guarda la muestra debidamente rotulada a temperatura ambiente.
- 2) Se toma la cámara y se pone el cubreobjetos de forma que cubra las dos cuadrículas de conteo.
- 3) Se toma una pipeta de 1 a 10 ul y se toma 1 ul, cuidando que se presione hasta el primer tope del émbolo. La punta de la pipeta con la muestra se pone en la orilla del cubreobjetos y se dispensa la muestra presionando hasta el último tope del émbolo. La muestra deberá entrar a la cuadrícula de conteo por capilaridad.
- 4) La cuadrícula de recuento está formada por 9 cuadrados grandes, cada uno de ellos con una superficie de 1 mm².
- 5) El cuadrado grande central (que se puede ver en su totalidad con el objetivo 10X; ver figura), está dividido en 25 cuadrados medianos (con el objetivo 40X se pueden ver los cuadrados medianos completamente; ver figura), cada uno de ellos con 16 cuadrados pequeños en su interior. Los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (no se muestran en la figura), están formados por 16 cuadrados medianos.



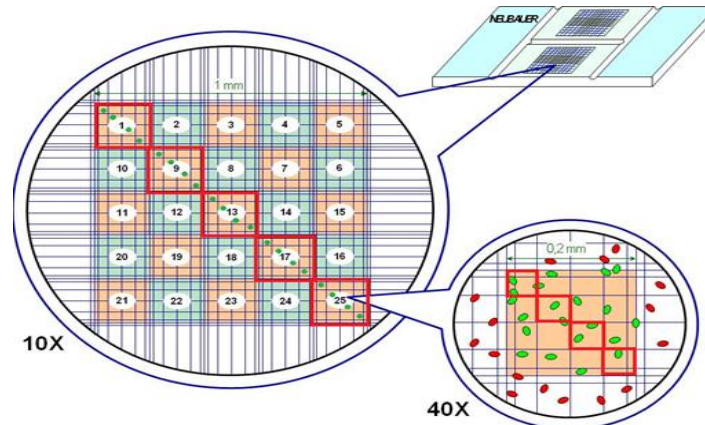
Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

- 6) El recuento se puede realizar tanto en el cuadrado grande central como en los de las esquinas, dependiendo del tamaño de las células en estudio. En este ejemplo realizaremos el recuento en el cuadrado central.



- 7) Cuando colocamos la muestra bajo el cubreobjetos, la suspensión celular alcanza una altura de 0,1 mm. Teniendo estos datos en cuenta, y si consideramos uno de los cuadrados grandes, el volumen contenido en éste será de: $1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$
- 8) El conteo lo hacemos en el cuadro del centro que contiene 25 cuadros medianos, cada uno de ellos subdividido en 16 cuadritos. De este cuadro central seleccionamos la línea diagonal que contiene 5 cuadros (vista 10 X). Ahora contamos en cada cuadro mediano las células ubicadas en la línea diagonal de 4 cuadros (vista 40 X).
- 9) Al final sumamos el total de toda la matriz. Así con cada una de las repeticiones. Calculamos el promedio. Para saber las cel/ml aplicamos la fórmula: $\text{Prom} \times 20 \times 10\,000$.
- 10) Si para hacer el recuento hemos tenido que concentrar o diluir la muestra inicial, hemos de tener en cuenta este factor de concentración-dilución (f): $\text{Prom} \times 20 \times 10\,000 \times f$.

Análisis de pH

● Método 1: pHmetro

- 1) Recoja una muestra de 50 ml del cultivo a medir.
- 2) Retire la tapa protectora.
- 3) Sitúe el electrodo en el líquido a medir y mueva un poco el medidor.
- 4) Pasados unos segundos presione el botón ON/OFF.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

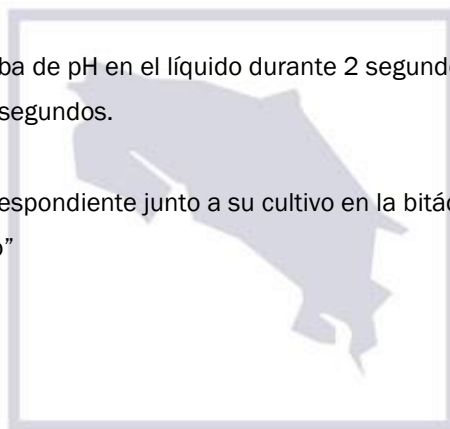
Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

- 5) Tome nota del valor que aparece en la pantalla.
- 6) Presione el botón ON/OFF para desconectar la unidad.
- 7) Reporte la medida correspondiente junto a su cultivo en la bitácora “Monitoreo de condiciones de crecimiento y cultivo”



- Método 2: Kit tiras pH
- 1) Sumerja la tira de prueba de pH en el líquido durante 2 segundos.
 - 2) Luego espere unos 10 segundos.
 - 3) Compare.
 - 4) Reporte la medida correspondiente junto a su cultivo en la bitácora “Monitoreo de condiciones de crecimiento y cultivo”



Análisis de Nutrientes

Potasio

- 1) Coloque el tubo de ensayo en el molde
- 2) Añada 10 gotas de potasio-1 (ácido nítrico al 0,7%)
- 3) Sumerja la tira reactiva en la muestra de pH neutro por 1 segundo.
- 4) Agite un poco para eliminar el exceso del líquido.
- 5) Ponga la tira reactiva dentro del tubo de ensayo lleno y espere 60 segundos.
- 6) Agite un poco para eliminar el exceso de líquido.
- 7) Compare con la escala de colores.

En presencia de iones de potasio, la almohadilla adquiere una coloración amarilla a rojo anaranjado

Fosfato

- 1) Recolectar muestra según “protocolo de toma de muestras”
- 2) Añadir 5 ml de muestra en el vaso aforado.
- 3) Añadir 5 gotas de react 1 ($\text{PO}_4^{3-}\text{-1}$) a la muestra y agitar.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

- 4) Sumergir la tira por 15 segundos, remover el exceso.
- 5) En el tubo de ensayo, añadir 6 gotas de react 2 (PO_4^{3-2})
- 6) Sumergir la tira por 15 segundos en el tubo de ensayo.
- 7) Agitar tira para remover exceso, esperar 60 segundos y medir (comparar).

Amonio

- 1) Recolectar muestra según "protocolo de toma de muestras"
- 2) Enjuague el recipiente de medición con la solución de prueba y llénalo hasta los 5 ml. marca.
- 3) Añadir 10 gotas de NH_4^+-1 (solución de hidróxido de sodio) a la muestra.
- 4) Agitar con cuidado.
- 5) Sumerja la tira reactiva en la solución de prueba durante 5 segundos.
- 6) Sacude el exceso de líquido.
- 7) Compara con la escala de colores.

*Si hay iones de amonio, el campo de prueba se vuelve naranja. *

Calcio

- 1) Recolectar muestra según "protocolo de toma de muestras"
- 2) Añadir 5 ml de muestra
- 3) Sumergir tira por 1 segundo en muestra.
- 4) Dejar reposar la tira
- 5) Añadir 1 cucharada de $\text{Ca}^{2+}-1$ y agitar.
- 6) Añadir 10 gotas de $\text{Ca}^{2+}-2$ y agitar.
- 7) Sumergir tira por 45 segundos en muestra.
- 8) Sacudir y medir (comprar)

Zinc.

- 1) Lave el vaso aforado con la solución problema y llénelo hasta la marca de 5 mL.
- 2) Añada dos gotas de $\text{Zn}^{2+}-1$ (sosa caustica) a la muestra. Si aparecen enturbiamientos o posos de precipitación. Estos deberán filtrarse antes de la realización de la prueba.
- 3) Agite cuidadosamente.
- 4) Sumerja la tira reactiva en la muestra por 1 segundo.
- 5) Agite un poco para eliminar el exceso de líquido.
- 6) Espere 30 segundos.
- 7) Compare con la escala de colores. En presencia de iones de zinc, la almohadilla adquiere una coloración roja.

Nitrato/Nitrito



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

- 1) Sumerja la tira reactiva con ambas almohadillas por 1 s en la muestra (pH 1-9)
- 2) Agite un poco para eliminar el exceso de líquido.
- 3) Espere 60 segundos.
- 4) Compare la almohadilla reactiva en la escala de colores.

*En presencia de iones de nitrato, la almohadilla en la punta de la tira se tornará violeta rojizo. La almohadilla que se encuentra encima muestra la concentración de nitrito.

Dureza de Carbonatos

- 1) Sumerja la tira reactiva por 5 segundos en la muestra.
- 2) Agite un poco para eliminar el exceso de líquido
- 3) Espere 30 segundos.
- 4) Compare con la escala de colores.

Sulfato

- 1) Sumerja la tira reactiva con todas sus almohadillas en la muestra por 1 segundo.
- 2) Agite un poco para eliminar el exceso.
- 3) Espere 120 segundos.
- 4) Compare con la escala de colores.

Cloro Sensitive

- 1) Sumerja la tira reactiva en la solución problema por 15 segundos moviéndola hacia adelante y hacia atrás.
- 2) Agüite un poco para eliminar el exceso de líquido.
- 3) Compare con la escala de colores

El color adquirido por la almohadilla reactiva todavía puede cambiar después de la lectura, por lo tanto, es muy importante no dejar pasar mas tiempo del indicado para leer el resultado si se quieren obtener valores correctos

Hierro total 100

- 1) Sumerja la tira reactiva por 1 segundo en la solución muestra (pH 1-7)
- 2) Agite un poco para eliminar el exceso de líquido.
- 3) Espere 60 segundos.
- 4) Compare la almohadilla con la escala de colores.

*En presencia de iones de hierro la almohadilla adquirirá una coloración azul. *

Análisis de Salinidad-Conductividad

- 1) Recolecte una muestra de 50 ml de el inóculo a analizar según el "Protocolo de toma de muestra".
- 2) Coloque la muestra en el electrodo del conductímetro.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

- 3) Encienda el conductímetro y espere a que se estabilice el valor de salinidad (en mg/L) y la temperatura.
- 4) Registre dicho valor en la bitácora de "Monitoreo de condiciones de crecimiento y cultivo".

NOTA: Reporte la medida correspondiente junto a su cultivo en la bitácora la bitácora correspondiente para cada nutriente.

Peso Seco

Realizar el análisis por duplicado. Manipular la canasta con pinzas

1. Identificar la canasta de aluminio y poner a peso constante por cada muestra que se va a analizar (dejarlo 2 hrs en estufa a 100 °C).
2. Dejar enfriar la canasta en un desecador durante 15 a 20 minutos.
3. Pesar la canasta en la balanza granataria. Apuntar el peso en la bitácora correspondiente.
4. Ponga de 5 – 20 ml de muestra medida con pipeta dentro de la canasta.
5. Colocar la canasta en la estufa a 100 °C hasta peso constante.
6. Transferir la canasta con la muestra seca a un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente (15 minutos).
7. Pesar la canasta con la muestra desecada y apuntar el peso hasta peso constante, regresándolas 10 minutos al horno y enfriando nuevamente.

CÁLCULOS

Este análisis se realiza por duplicado.

$$PS = (P2 - P1) * 100 / V.M$$

En donde: PS = Peso seco en mg

P1 = peso de canasta a peso constante en mg

P2 = peso de la canasta con la muestra desecada en mg

V.M = volumen de la muestra en ml

Hacer la conversión a g/L de cultivo. Si se tiene mg/ml reportar el resultado como g/L usando el mismo valor.

El coeficiente de variación máximo permisible entre dos repeticiones será de 1%, efectuadas con el mismo equipo, la misma metodología y muestra, en caso contrario repetir el análisis hasta obtener dicho coeficiente de variación.

Análisis Cualitativo

Además, se realiza una revisión cualitativa la cual consiste en tomar una muestra y hacer una comparación directa con la siguiente paleta de colores:



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3



→ Alga sana

→ Alga contaminada

→ Alga contaminada





Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

		INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)- Laboratorio de Microalgas.	Código: IT-E-001
			Páginas: 19
			Versión No. 01
			Actualizar: Semestre
			Frecuencia: Diaria
Elaborado por: Jeffry Garro Méndez Fecha: 09/06/2022		Última revisión por: Fabián Villalta Romero Fecha: 09/06/2022	Aprobado por: Maritza Guerrero Barrantes Fecha: 09/06/2022

Instructivo Estándar de Operación del Método: Escalamiento 2

I. Objetivo

Multiplicar de forma exponencial las concentraciones celulares de los inóculos de microalgas.

II. Alcance

Este método es aplicable para cepas MT27, MT02, MT09 y MT04.

III. Normativa y Criterios Aplicables

Normativa

El proceso no depende de alguna normativa.

Criterios:

Para la creación de biofertilizante por parte del laboratorio de microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) se deberá tomar en consideración los siguientes criterios y parámetros de medición en la etapa Escalamiento.

CRITERIO	PARÁMETRO
Cantidad de materia prima disponible	Al menos 14 bidones de microalgas que hayan aprobado el Monitoreo de condiciones de crecimiento y cultivo para el caso de escalamiento de tanquetas. Y al menos 4 tanquetas que hayan aprobado el monitoreo de condiciones de crecimiento y cultivo para el caso de escalamiento de estanques.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Cantidad de mano de obra	Al menos dos estudiantes o profesionales para el proceso de operación.
--------------------------	---

Tabla 1. Criterios para actividades de Escalamiento

IV. Términos y definiciones

Escalamiento: Proceso en el cual se da un incremento celular en una determinada etapa del proceso.

pH: Medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia o una solución.

Concentración celular: Cantidad de células disueltas en un ml.

Salinidad: Cantidad de sales disueltas en agua.

Nutrientes: compuestos químicos que aportan a las células todo lo que necesitan.

Medio Líquido Industrial: se utilizan preferentemente para favorecer el desarrollo bacteriano de células estresadas.

Escalamiento: Proceso en el cual se da un incremento celular en una determinada etapa del proceso.

V. Responsables

Todo Asistente especial de laboratorio o profesional será responsable de cumplir con este procedimiento sin ninguna excepción.

VI. Documentos Asociados

- Protocolo de limpieza de estanques y tanquetas.
- Instructivo de monitoreo de condiciones de crecimiento y cultivo.
- Control de parámetros químicos para el cultivo y frecuencia de muestreo.
- Instrucciones de etapa de escalamiento.

VII. Entradas/Salidas

PROVEEDORES	ENTRADAS	PROCEDIMIENTO	SALIDAS	CLIENTES
Escalamiento medio	Bidones de 15 L	Escalamiento de tanquetas.	Tanquetas con 800 litros de cultivo.	Área de estanques.
Área de estanques	Tanquetas de 800 litros de volumen	Escalamiento de estanques.	Estanque 1 con # litros de cultivo y estanque 2 con # de cultivo.	Laboratorio de formulación



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Laboratorio de Microalgas	Medio Industrial	Alimentación de microalgas en tanquetas y estanques.	N/A	N/A
---------------------------	------------------	--	-----	-----

Tabla 2. SIPOC Escalamiento

VIII. Materiales, Equipos y Sistemas

- Tanquetas de 1000 litros de capacidad.
- Estanque de 30000 y 40000 litros de capacidad.
- Motor de pecera flujo 1000L/hora
- Electrobomba
- Manguera de flujo.
- Corriente eléctrica.
- Medio Industrial.
- Agua potable.
- Microscopio.
- Cámara de Nuebauer.
- Conductímetro.
- pHmetro.
- Quantofix de nutrientes.



IX. Instrucciones

Limpieza de Superficies

- 1) Limpiar tanquetas y estanques según el protocolo “Limpieza de tanquetas y Estanques”

Escalamiento de tanquetas

Recolectar una muestra de cada uno de los bidones siguiendo los pasos del “protocolo de toma de muestra” y posteriormente analizar los parámetros de las muestras de cada uno de los bidones según el Instructivo de Trabajo “Monitoreo de condiciones de crecimiento y cultivo” y verificar que dichos parámetros se encuentren en los siguientes valores:

Tabla 3. Valores de parámetros previos a escalamiento de tanquetas.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Parámetro medido	Valor										
Concentración Celular	_____células/ml										
Grado de acidez o alcalinidad (pH)	<table><tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td></tr></table>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Conductividad	_____mg/L										
Micronutrientes	Potasio _____mg/L Fosfato _____mg/L Amonio _____mg/L Zinc _____mg/L Sulfato _____mg/L Fosfato _____mg/L Calcio _____mg/L Nitrato/Nitrito _____mg/L Dureza de Carbonatos _____mg/L Cloro sesnsitive _____mg/L Hierro total _____mg/L										

Una vez que estos valores estén verificados se procede a seguir con las siguientes instrucciones:

- 1) Verter 4 bidones de 15 litros en una tanqueta con una capacidad de 1000 litros. (Anexo 3)
- 2) Llenar volumen de tanqueta con agua hasta 200 litros (un total de 140 litros de agua).
- 3) Inmediatamente, instalar de 2 a 4 motores de pecera (Anexo 1) para permitir el movimiento y oxigenación necesaria de las microalgas.
- 4) Realizar monitores de condiciones de crecimiento y cultivo cada 2 días.
- 5) Registrar dichos valores en "Registro de Tanquetas"
- 6) Alimentar la tanqueta con medo industrial (MIS) según sea lo requerido después de las revisiones, así como NaCl y H₂O.
- 7) Dejar en estado de crecimiento por ____ días.
- 8) Repetir los pasos 4-6



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3



Figura 1. Tanqueta de 1000 litros de capacidad en etapa inicial de escalamiento.

Escalamiento de estanques

Recolectar una muestra de cada una de las tanquetas siguiendo los pasos del “protocolo de toma de muestra” y posteriormente analizar los parámetros de las muestras de cada una de las tanquetas según el Instructivo de Trabajo “Monitoreo de condiciones de crecimiento y cultivo” y verificar que dichos parámetros se encuentren en los siguientes valores:



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Tabla 4. Valores de parámetros previos a escalamiento de estanques.

Parámetro medido	Valor										
Concentración Celular	_____ células/ml										
Grado de acidez o alcalinidad (pH)	<table><tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td></tr></table>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Conductividad	777777 mg/L										
Micronutrientes	Potasio _____mg/L										
	Fosfato _____mg/L										
	Amonio _____mg/L										
	Zinc _____mg/L										
	Sulfato _____mg/L										
	Fosfato _____mg/L										
	Calcio _____mg/L										
	Nitrato/Nitrito _____mg/L										
	Dureza de Carbonatos _____mg/L										
	Cloro sesnsitive _____mg/L										
	Hierro total _____mg/L										

Una vez que estos valores estén verificados se procede con las siguientes instrucciones:

- 1) Conectar electrobomba a las tanquetas introduciéndola en su totalidad y la manguera hacia el estanque para permitir el intercambio de líquido de tanqueta a estanque. (Anexo 2)
- 2) Repetir paso 1 en mínimo ____ tanquetas mas según el volumen inicial de estanque deseado.
- 3) Añadir ____ litros de H₂O iniciales para estanque #1 y ____ litros de H₂O para estanque#2.
- 4) Activar sistema de paletas 24/7 a 20 RPM, mientras que para el estanque #2 activar bomba.
- 5) Realizar monitores de condiciones de crecimiento y cultivo establecidos en el apartado “Monitoreo de condiciones de cultivo y crecimiento de estanques y tanquetas” de este documento cada 2 días.
- 6) Registrar dichos valores en “Registro de Estanques”.
- 7) Alimentar la tanqueta con medo industrial (MIS) según sea lo requerido después de las revisiones, así como NaCl y H₂O.

Volumen Estanque #1



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

- Cada centímetro en altura del estanque equivale a 946 litros.
- Las paletas tienen una altura de 12centímetros sobre el nivel del estanque, por lo que ocuparíamos un volumen inicial a una altura de 12cm. 12 centímetros de altura equivalen a 11356litros (volumen final).



Figura 2. Estanque #1

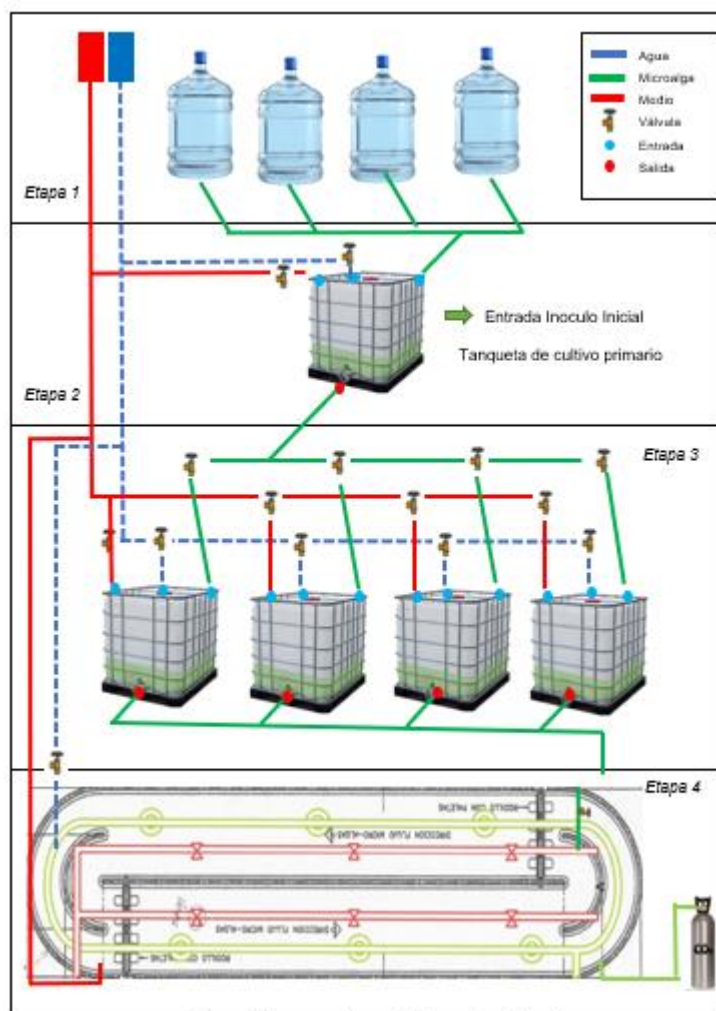


Figura 3. Diagrama de explosión escalamiento 2.

MONITOREO DE CONDICIONES DE CULTIVO Y CRECIMIENTO EN TANQUETAS Y ESTANQUES.

1. Debe realizarse la determinación de los parámetros fisicoquímicos: pH, salinidad, conductividad y sólidos disueltos, cada dos días.
2. Para la evaluación de la productividad y viabilidad del cultivo, llevar a cabo el conteo celular al microscopio en cámara de Neubauer, así como el análisis de nutrientes, pH y salinidad.
3. Determinar la demanda química y biológica de oxígeno del medio de cultivo al inicio y final del proceso.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Medición	Frecuencia	Cantidad de muestra	Método de medición	Valor Ideal										
Grado de acidez o alcalinidad (pH)	Cada 2 días	50 ml	pH metro											
Salinidad	Cada 2 días		Conductímetro	<table border="1"><tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td></tr></table>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2		3	4	5	6	7	8	9	10				
Nutrientes	Cada 2 días	Potasio_____mg/L												
		Fosfato_____mg/L												
		Amonio_____mg/L												
		Zinc_____mg/L												
		Sulfato_____mg/L												
		Fosfato_____mg/L												
		Calcio_____mg/L												
		Nitrato/Nitrito_____mg/L												
		Dureza de Carbonatos _____mg/L												
		Cloro sesnsitive_____mg/L												
Hierro total_____mg/L														
Concentración	Cada 2 días	0,5 ml Lugol + 1,5 ml muestra	Cámara de Neubauer, conteo en microscopio de luz blanca invertido	Células/militro										

Tabla 5. Mecanismo de monitoreo del sistema de producción de microalgas.

- Obtener el volumen de evaporación por día en el estanque, con el fin de reponer diariamente el volumen de agua perdido.

X. Control de Cambios

Fecha:	Modificado por:	Sección en que se realiza el cambio	Descripción del cambio realizado



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Tabla 6. Control de Cambios

XI. Anexos

Anexo 1. Motores de pecera tanquetas



Especificaciones
Flujo: 1000 Litros/hora
Potencia: 10 Watts
Voltaje: 110V



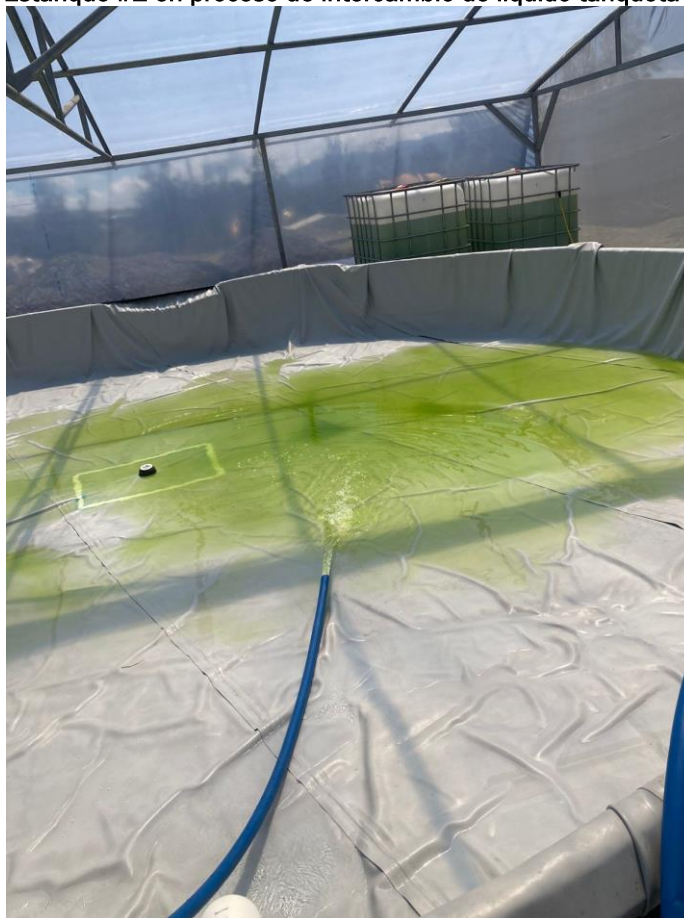
Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Anexo 2: Estanque #2 en proceso de intercambio de líquido tanqueta-estanque.





Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Anexo3. Biorreactores listos para iniciar escalamiento de tanquetas.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Anexo 4. Registro A Tanqueta

[illegible]



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Anexo 5. Registro B Tanqueta

Código de Tanqueta	Cultivos Utilizados						Fecha:	Registro #:			
Bidón #1:	Volumen:	L	Bidón #7:	Volumen:	L	Número Tanqueta:					
Bidón #2:	Volumen:	L	Bidón #8:	Volumen:	L	Capacidad Tanqueta:	L				
Bidón #3:	Volumen:	L	Bidón #9:	Volumen:	L	Volumen Inicial:	L				
Bidón #4:	Volumen:	L	Bidón #10:	Volumen:	L	Volumen Final:	L				
Bidón #5:	Volumen:	L	Bidón #11:	Volumen:	L	Cepa: MT27 MT02 MT09					
Bidón #6:	Volumen:	L	Bidón #12:	Volumen:	L	MT04 Otra:					
Numero Revisión	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Fecha											
Encargado											
Contaminación	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	
Conteo 1											
Conteo 2											
Conteo 3											
Conteo 4											
x prom											
[] cel/ml											
pH	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	
Conductividad											
Peso Seco											
Evaporación											
NH ₄ ⁺											
Ca ²⁺											
Zn ²⁺											
PO ₄ ³⁻											
NO ₂ /NO ₃											
Otro											
Alimentada	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	
Vol. pre alimento											
Vol. alimentado											
Sal											
H ₂ O											
Vol. post alimento											





Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Anexo 6. Registro A Estanque

Código de Estanque: _____		Fecha: _____		☐ Escalada ☐ Contaminada	
Cultivos utilizados (Bidones)				Número Tanqueta: _____	
1) _____	5) _____	Capacidad Tanqueta: _____ litros			
2) _____	6) _____	Volumen inicial: _____ litros			
3) _____	7) _____	Volumen final: _____ litros			
4) _____	8) _____	Cepa: ☐ MT27 ☐ MT02 ☐ MT09 ☐ MT04 ☐ Otra			
Revisión # _____ Fecha: _____ Encargado: _____					
Contaminación: ☐ Bacterias ☐ Hongos ☐ Protozorios				Concentración Celular: ☐ Óptimo ☐ No óptimo	
Fecha detección _____ Observaciones: _____				Conteo 1 _____ Conteo 2 _____ Conteo 3 _____	
_____				Conteo 4 _____ x _____ [] cel/ml _____	
_____				pH [] [] [] [] [] [] [] [] [] [] ☐ Óptimo ☐ Subir ☐ Bajar	
Nutrientes		Cosecha		Alimentación	
NH ₄ ⁺ _____ mg/L		☐ Cosecha		☐ Alimentación	
Ca ²⁺ _____ mg/L		Vol. pre-cosecha _____ L		Vol. pre-alimento _____ L	
Zn ²⁺ _____ mg/L		Vol. cosechado _____ L		Vol. alimentado _____ L	
PO ₄ ³⁻ _____ mg/L		Vol. post-cosecha _____ L		H ₂ O _____ L	
NO ₂ / NO ₃ _____ mg/L		_____		Vol. post-alimento _____ L	
Otros: _____ mg/L		_____		_____	
Observaciones: _____					

Revisión # _____ Fecha: _____ Encargado: _____					
Contaminación: ☐ Bacterias ☐ Hongos ☐ Protozorios				Concentración Celular: ☐ Óptimo ☐ No óptimo	
Fecha detección _____ Observaciones: _____				Conteo 1 _____ Conteo 2 _____ Conteo 3 _____	
_____				Conteo 4 _____ x _____ [] cel/ml _____	
_____				pH [] [] [] [] [] [] [] [] [] [] ☐ Óptimo ☐ Subir ☐ Bajar	
Nutrientes		Cosecha		Alimentación	
NH ₄ ⁺ _____ mg/L		☐ Cosecha		☐ Alimentación	
Ca ²⁺ _____ mg/L		Vol. pre-cosecha _____ L		Vol. pre-alimento _____ L	
Zn ²⁺ _____ mg/L		Vol. cosechado _____ L		Vol. alimentado _____ L	
PO ₄ ³⁻ _____ mg/L		Vol. post-cosecha _____ L		H ₂ O _____ L	
NO ₂ / NO ₃ _____ mg/L		_____		Vol. post-alimento _____ L	
Otros: _____ mg/L		_____		_____	
Observaciones: _____					



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Anexo 7. Registro B Estanque

Código de Estanque	Cultivos Utilizados				Fecha:	Registro #:						
Tanqueta #1:		Volumen: L		Tanqueta #6:		Volumen: L		Información Tanqueta				
Tanqueta #2:		Volumen: L		Tanqueta #7:		Volumen: L		Número Estanque: Capacidad: L				
Tanqueta #3:		Volumen: L		Tanqueta #8:		Volumen: L		Volumen Inicial: L				
Tanqueta #4:		Volumen: L		Tanqueta #9:		Volumen: L		Volumen Final: L				
Tanqueta #5:		Volumen: L		Tanqueta #10:		Volumen: L		Cepa: MT27 MT02 MT09				
								MT04 Otra:				
Numero Revisión	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Fecha	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
Encargado												
Contaminación	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No		
Conteo 1												
Conteo 2												
Conteo 3												
Conteo 4												
x prom												
[] cel/ml												
pH	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo		
Conductividad												
Peso Seco												
Evaporación												
NH ₄ ⁺												
Ca ²⁺												
Zn ²⁺												
PO ₄ ³⁻												
NO ₂ / NO ₃												
Otro												
Cosecha	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No		
Vol. pre cosecha												
Vol. cosechado												
Vol. post Cosecha												
Alimentada	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No	Si No		
Vol. pre alimento												
Vol. alimetado												
Sal												
H ₂ O												
Vol.post alimento												



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

	INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)- Laboratorio de Microalgas.	Código: IT-F-001
		Páginas: 8
		Versión No. 01
		Actualizar: Semestre
		Frecuencia: Diaria
Elaborado por: Jeffry Garro Méndez Fecha: 09/06/2022	Última revisión por: Fabián Villalta Romero Fecha: 09/06/2022	Aprobado por: Maritza Guerrero Barrantes Fecha: 09/06/2022

Instructivo Estándar de Operación del Método: Cosecha, Secado Micoalgal y Formulación

I. Objetivo

Recuperar la biomasa microalgal cultivada en diferentes volúmenes de cultivo para hacer análisis bromatológico completo o parcial.

II. Alcance

Adecuado para muestras del cultivo microalgal.

III. Normativa y Criterios Aplicables

Normativa

El proceso no depende de alguna normativa.

Criterios:

Para la creación de biofertilizante por parte del laboratorio de microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) se deberá tomar en consideración los siguientes criterios y parámetros de medición en la etapa de cosecha:

Tabla 1. Criterios para actividades de Cosecha

CRITERIO	PARÁMETRO
Cantidad de materia prima disponible	Al menos un estanque con un 70% de capacidad de cultivo microalgal.
Cantidad de pedidos pendientes	Al menos __ pedidos de biofertilizante.
Cantidad de estudiantes asistentes	Al menos un asistente para el proceso de operación.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

IV. Términos y definiciones

Secado:

Centrifugar: método para separar sustancias sólidas de líquidas de distinta densidad en una mezcla, siempre y cuando las primeras sean insolubles, empleando para ello la fuerza giratoria o fuerza centrífuga

Biomasa: fracción biodegradable de los productos, residuos y desechos de origen biológico procedentes de actividades agrarias, incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal, de la silvicultura y de las industrias conexas, incluidas la pesca y la acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos, incluidos los residuos industriales y municipales de origen biológico.

V. Responsables

Todo Asistente especial de laboratorio será responsable de cumplir con este procedimiento

VI. Documentos Asociados

- VINC-PI-F04
- Registro de Cosecha.
- Registro de Formulación

VII. Entradas/Salidas

Tabla 2. SIPOC cosecha

PROVEEDORES	ENTRADAS	PROCEDIMIENTO	SALIDAS	CLIENTES
Escalamiento 2	Microalgas en crecimiento	Centrifugado y secado	Biomasa algal	Laboratorio de Formulación

VIII. Materiales, Equipos y Sistemas

Método por sedimentación

- Manguera interna de aireación (la misma empleada en el biorreactor).
- Pipeteador o jeringa.
- Recipiente vidrio de 1 o 2 litros.
- Refrigerador

Método por centrifuga

- Descremadora CENAPATOP MOTOP
- Placa Petri de plástico pre-pesada.
- Conexión eléctrica 110v
- Desagüe



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

- Refrigerador
- Becker de vidrio o plástico de 1 L.
- Cronometro
- Espátulas de plástico
- Llave de desarmado y armado de partes de la Descremadora

Peso Seco

- Guantes
- Unidad de filtración
- Bomba de vacío
- Canastas de aluminio
- Filtros (e.g. acetato de celulosa (0.2, 0.45, 0.8), Whatman) según cada experimento.
- Horno, 103-105 °C
- Balanza analítica

IX. Instrucciones

Método de sedimentación

1. Detener la agitación del cultivo. Dejar una manguera a una altura de 10 cm de fondo del biorreactor.
2. Almacenar el cultivo a 4 °C por 24 horas.
3. Por gravedad con una manguera, retirar el sobrenadante del cultivo, conectar al final de la manguera un pipeteador de pera o jeringa de 60 ml para succionar el líquido sobrenadante. Tratar de no agitar o mover bruscamente para no re-suspender las algas en el cultivo.
4. Dejar solamente las algas sedimentadas. Re-suspender las algas en el medio y pasar a una botella de vidrio de 1 L limpia, sellar y llevar nuevamente a 4 °C por 4-5 h.
5. Con jeringa retirar el sobrenadante
6. Congelar la suspensión concentrada de microalgas en placa Petri de plástico.

Método de centrifuga

1. Revisar el equipo y asegurarse que se encuentra limpio y libre de residuos de separaciones anteriores.
2. Armado del equipo.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

- a. Colocar los discos de centrifugación en el cabezal, de modo que todos se ajusten hasta el fondo del eje del cabezal y encajen entre sí, sin que quede espacio de más de ~3 mm entre ellos.
 - b. Colocar el cobertor de plástico pvc (color blanco) en la tapa del cabezal de centrifugación de modo que se ajuste la ranura y el tornillo de sujeción.
 - c. Poner la tapa al cabezal de centrifugación y ajustar con el tornillo en la parte superior, socar el tornillo con la llave de desarmado del equipo, de modo que quede bien ajustado, pero sin exceder la fuerza al socar.
 - d. Colocar el cabezal de centrifugación en el rotor de la descremadora
 - e. Colocar el desagüe de separación de líquidos, asegurarse que quede correctamente acoplado.
 - f. Poner sobre el desagüe de separación la pieza de sujeción del recipiente que contendrá la mezcla a separar, en este caso el medio de cultivo.
 - g. Colocar la bolla de control de fluido, luego ajustar el recipiente de contención del líquido a separar, ajustar el pistilo de control de flujo, de modo que quede cerrado.
3. Encender el motor y esperar a que alcance la máxima velocidad (1 min).
 4. Agregar el medio de cultivo hasta 3 L.
 5. Girar suavemente el pistilo para controlar el flujo de paso, ajustar el flujo entre 400 y 500 ml/min, empleando un cronometro y un Becker o recipiente graduado volumetricamente.
 6. Una vez ajustado el flujo continuar con la separación
 7. Una vez concluido el centrifugado, retirar todas las partes, destapar el cabezal de centrifugación y con una espátula plástica separar la biomasa de la tapa cuidadosamente, colocar la biomasa en la placa Petri plástica pre pesada.
 8. Desarmar y limpiar todas las partes del equipo empleando jabón de manos y esponja, no emplear esponjas abrasivas para no rayar las partes. Dejar escurrir.
 9. Congelar la biomasa.

Secado

Secado por liofilización

1. Pasar a placa de Petri de plástico la pasta de microalgas y llevar al congelador
2. Liofilizar la biomasa a -52 °C por 8 h. Guardar en desecador hasta guardar en un recipiente de vidrio tapado.

Secado en estufa

1. Pasar la biomasa a una placa Petri de vidrio pre-pesada y llevar a la estufa a 40 °C. Monitorear cada hora el secado. No dejar más de 8 horas continuas la biomasa en el horno sin vigilancia. Si



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

se requiere detener el secado antes de terminar, retirar la biomasa de la estufa y congelar nuevamente.

2. Colocar nuevamente la biomasa a 40°C hasta observar que la pasta se ha secado, pesar cada hora la biomasa hasta observar peso constante.
3. Almacenar la biomasa en un recipiente de vidrio tapado.

Análisis de Humedad- Peso seco peso seco en microalgas

1. Póngase los guantes.

- La grasa de las manos se puede transferir a los contenedores de muestras y los filtros con mucha facilidad, y éstas afectarán a la precisión de sus mediciones.

Para filtros Sartorius

1. Preparación del filtro: utilizando pinzas, transfíralo a la canasta de aluminio rotulada. Deje secar hasta peso constante en el horno 103-105°C (~ 1 hora). Enfriar los filtros en el desecador hasta temperatura ambiente y secar. Almacene los filtros en el desecador hasta que se los necesite. Pesar inmediatamente en una balanza analítica antes de usar.
2. Determinación del peso seco: montar la unidad de filtración, colocar el filtro previamente pesado en el asiento y comenzar la succión. Filtrar 10 mL de la suspensión microalgal bien mezclada. Retire con cuidado el filtro de la unidad de filtración y transfíralo a la canasta de aluminio. Séquelo en el horno al menos 1 hora a 103-105°C, enfríe en el desecador hasta temperatura ambiente y pesar. Repetir la medición hasta obtener un peso constante.

Para filtros Whatman

1. Preparación del filtro: utilizando pinzas, coloque el filtro adecuadamente en la unidad de filtración. Aplique vacío y lávelo tres veces sucesivas con 20 mL de agua destilada. Continuar con la succión para eliminar todo rastro de agua. Quite el filtro y transfíralo a la canasta de aluminio rotulada. Deje secar hasta peso constante en el horno 103-105°C (~ 1 hora). Enfriar los filtros en el desecador hasta temperatura ambiente y secar. Almacene los filtros en el desecador hasta que se los necesite. Pesar inmediatamente antes de usar.
2. Determinación del peso seco: montar la unidad de filtración, colocar el filtro previamente pesado en el asiento y comenzar la succión. Filtrar 10 mL de la suspensión microalgal bien mezclada. Retire con cuidado el filtro de la unidad de filtración y transfíralo a la canasta de aluminio. Séquelo en el horno al menos 1 hora a 103-105°C, enfríe en el desecador hasta temperatura ambiente y pesar. Repetir la medición hasta obtener un peso constante.

Cálculo:



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

$$\text{Peso seco } \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de la muestra, mL}}$$

Donde: A = peso del filtro + muestra, mg

B = peso del filtro, mg

Formulación de Biofertilizante

- El instructivo estándar de Formulación de Biofertilizante es un secreto industrial en el documento "VINC-PI-F04 ". A este documento solo tiene accesos la dirección general.

X. Control de Cambios

Tabla 3. Control de Cambios

Fecha:	Modificado por:	Sección en que se realiza el cambio	Descripción del cambio realizado

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE MICROALGAS FIJADORAS DE NITRÓGENO COMO SUPLEMENTO DE FERTILIZANTE PARA EL CULTIVO DE ZEA MAYS HR-245

La investigación se realizó en el Invernadero de Investigación de la Escuela de Ingeniería Agrícola ubicado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Central Cartago.

Se utilizó el cultivo de *Zea mays* (var. HR-245) adquirido como semilla comercial (maíz blanco híbrido HR-245) para siembra. Las semillas se sembraron en un sustrato inerte formado por una mezcla de 70% de fibra de coco y 30% de granza de arroz, el cilindro de sustrato en las macetas fue de 30 centímetros de diámetro por 50 centímetros de alto. En cada maceta se sembraron 3 semillas y a los 10 días de nacidos los almácigos, se eliminaron 2 plántulas de cada maceta, dejando una planta por maceta para evaluar los tratamientos.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

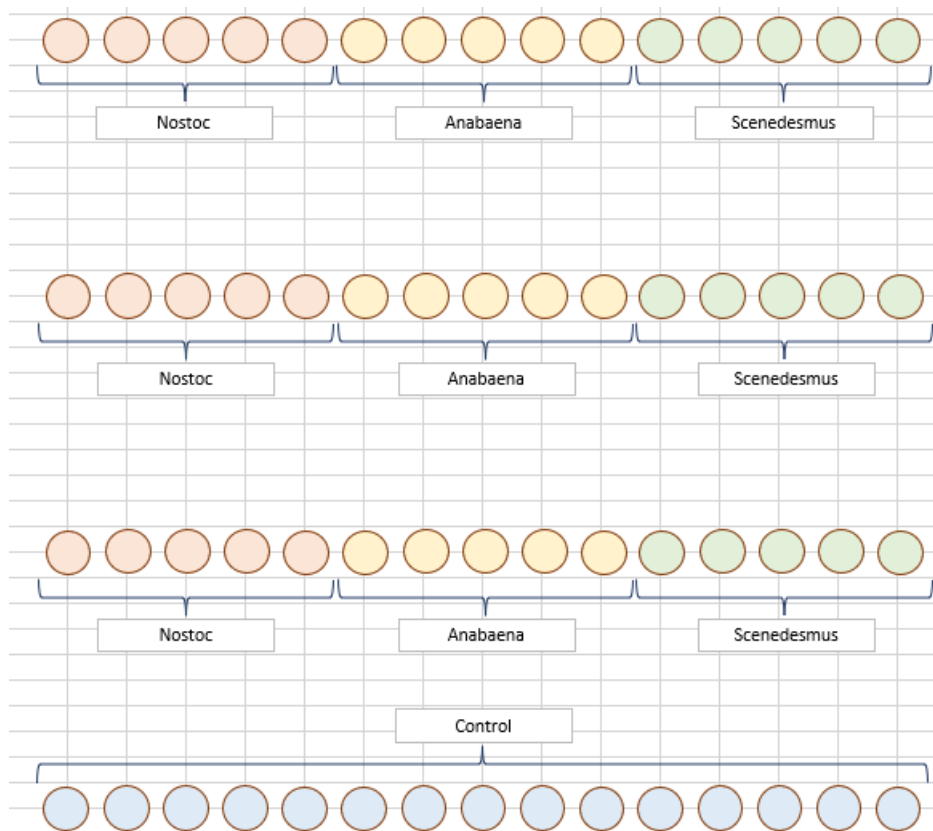


Figura 4. Distribución de las plantas por tratamiento en el invernadero.

El diseño de este cuasi-experimento consistió en cuatro filas, para las 3 especies y el control, siguiendo las 4 líneas de riego en el invernadero. Cada especie contó con tres repeticiones y cada repetición contó con 5 plantas, siendo 15 plantas por especie. Las macetas se distribuyeron en filas quedando las plantas a 50cm una de otra y dejando 1.5m entre filas para facilitar el monitoreo y la fertilización (figura 1).

Cuadro 7. Tratamientos aplicados y cantidad de plantas muestreadas.

Tratamiento	Nitrógeno	MFN	Réplica	Plantas
Sin MFN (control)	100% N (2.4 g)		A	5
			B	5
			C	5
Nostoc sp.	74% N (1.78 g)	20 mL Bio N (5 ml/L) 20 mL Bio N (50 ml/L)	A	5
			B	5
			C	5
Anabaena sp.	74% N (1.78 g)	20 mL Bio A (5 ml/L) 20 mL Bio A (50 ml/L)	A	5
			B	5
			C	5
Scenedesmus sp.	74% N (1.78 g)	20 mL Raceway (5 ml/L)	A	5



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

20 mL Raceway (50 ml/L)	B	5
	C	5

Para determinar las características fenológicas y de biomasa de *Zea mays* para cada MFN, se realizaron 4 tratamientos (cuadro 1): Un tratamiento de control, sin MFN y solamente con el fertilizante agroquímico; Un tratamiento para cada uno de los 3 MFN. Cada tratamiento se aplicó a 15 plantas, siendo un total de 60 plantas (figura 1).

Las microalgas fueron cultivadas en el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR en Cartago. Se utilizaron 3 tipos de microalga para los tratamientos: *Nostoc sp.* (lote Bio N 11-10-22), *Anabaena sp* (lote Bio A 11-10-22). y *Scenedesmus sp* (lote Raceway 11-10-22). La formulación de microalgas es una emulsión de aceite en agua.

Una semana después de la siembra se realizó el primer inóculo con una dilución de 5 mL/L a partir de la formulación preparada por el CIB y se aplicaron 20 mL de tratamiento por maceta. En el día 55 se aplicó un segundo inóculo de 20 mL por planta de una dilución de 50 mL/L de la formulación respectiva.

Los fertilizantes utilizados fueron: Fertilizante de azufre elemental Fertisul MG, producido por Suphur Mills Limited; Fertilizante granulado de nitrógeno Nitrato de Amonio 33.5%, producido por Abonos del Pacífico S.A.; fertilizante foliar de nitrógeno Huma Gro Super Nitro 30-0-0, producido por Bio Huma Netics Inc.; fertilizante de potasio Huma Gro Buffer K, producido por Bio Huma Netics Inc.; fertilizante de fósforo Huma Gro Phosmax, producido por Bio Huma Netics Inc.; y fertilizante de micronutrientes (Quelato de Aminoácido) Metalosate Zinc Plus, producido por Albion Laboratories Inc. Se siguió un plan de fertilización (cuadro 2) determinado a partir de las recomendaciones del MAG para *Zea mays* y del vendedor de las semillas de HR-245.

Cuadro 8. Fechas de fertilización y fertilizantes aplicados por planta.

Día	Tratamientos	Fertilizantes por planta
7	MFN y Control	2.3 mL de Super Nitro (0.7 g de Nitrógeno)
		2.2 mL de Phosmax (1.7 g de Fósforo)
		0.75 mL de Buffer K. (0.27 g de Potasio)
	MFN	20 mL de MFN en dilución 5 mL/L
20	MFN y Control	1.91 g de Nitrato de Amonio 33.5% (0.64 g de Nitrógeno)
		0.7 g de Fertisul. (0.64 g de Azufre)
30	MFN y Control	0.71 mL de Phosmax (0.54 g de Fósforo)
		2.86 mL de Buffer K (1.04 g de Potasio)
		0.048 mL de Zinc Plus (1.34 mg de Zinc)
	Control	1.37 g de Nitrato de Amonio 33.5% (0.46 g de Nitrógeno)
40	MFN y Control	0.19 mL de Super Nitro (0.06 g de Nitrógeno)
		0.095 mL de Phosmax (72 mg de Fósforo)
		0.095 mL de Buffer K (34 mg de Potasio)
		0.048 mL de Zinc Plus (1.34 mg de Zinc)
		38 mg de Fertisul. (35 mg de Azufre)
55	MFN	20 mL de MFN en dilución 50 mL/L
65	MFN y Control	0.19 mL de Super Nitro (0.06 g de Nitrógeno)
		0.048 mL de Zinc Plus (1.34 mg de Zinc)
		48 mg de Fertisul (44 mg de Azufre)
	MFN	1 g de Nitrato de Amonio 33.5% (0.335 g de Nitrógeno)
	Control	1.5 g de Nitrato de Amonio (0.5g de Nitrógeno)

Con respecto al nitrógeno por tratamiento, a todas las plantas se les aplicó 2.68 mL de Super Nitro (0.8g de Nitrógeno) y 2.91 g de Nitrato de Amonio (0.97 g de Nitrógeno) para un total de 1.78 g de Nitrógeno.

Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

A las plantas de control se les aplicaron otros 1.87 g de Nitrato de Amonio (0.62 g de Nitrógeno). Esto corresponde a un 26% menos nitrógeno en las plantas de tratamiento con MFN con respecto al control.

Para la irrigación de las plantas se utilizaron goteros regulados de 1 L/hora alimentados con bombas programables. A la siembra se activó la bomba de agua 20 minutos los lunes, miércoles y viernes 330 mL. A partir del día 20 se activó la bomba todos los días.

1 Muestreo de características fenológicas

Para determinar las características fenológicas en el ciclo de vida de *Zea mays* (var. HR-245) para cada tratamiento aplicado, se realizaron muestreos no destructivos de fenología cada 10 días a partir del día 20 y hasta el día 100. Las propiedades medidas para cada planta fueron: La altura del tallo, el número de hojas y el área de 6 hojas. Y para determinar el área de cada hoja se midió el largo y el ancho máximo de la hoja y se calculó el área aproximando la forma de una de maíz, modelando la hoja como una semielipse desde la base hasta la mitad de la hoja y como un triángulo isósceles desde ese punto medio hasta la punta.

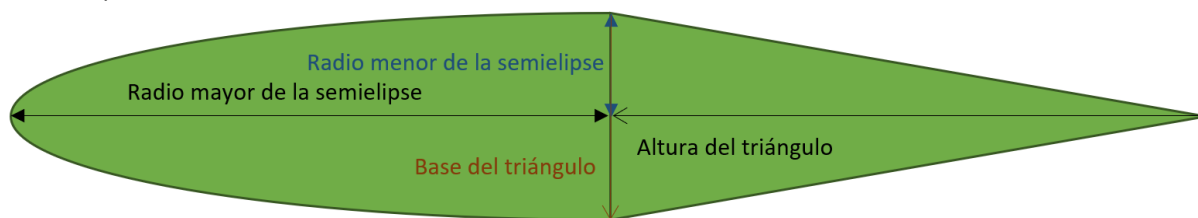


Figura 5. Modelo para aproximar el área de cada hoja a partir del largo y el ancho.

Para la semielipse, el radio menor corresponde a la mitad del ancho de la hoja y el radio mayor a la mitad del largo de la hoja, por lo que el área se calculó como:

i. $\text{Mitad del ancho de la hoja} \times \text{mitad del largo de la hoja} \times \pi \div 2$

Para el triángulo, la base fue el ancho de la hoja y la altura fue la mitad del largo de la hoja, por lo que el área se calculó como:

ii. $\text{Ancho de la hoja} \times \text{mitad del largo de la hoja} \div 2$.

Para determinar la biomasa de *Zea mays* (var. HR-245) por cada tratamiento a aplicar, en el día 100 se cosecharon las mazorcas y se midió el peso de las mazorcas y la cantidad de granos crecidos en cada mazorca. También recolectaron las plantas y se deshidrataron para medir el peso seco del tallo y las hojas. El análisis estadístico de las muestras se realizó con el lenguaje de programación R versión 3.6.3. Las diferencias en la longitud del tallo se evaluaron con una librería con pruebas para modelos de efectos mixtos lineales (lmer), evaluando la longitud de cada tratamiento y la longitud por día. Las diferencias en el área foliar también se evaluaron con modelos de efectos mixtos lineales, pero evaluando el área por tratamiento, el área por día y el área de cada tratamiento por día. Para las mediciones en la cosecha, las diferencias en la biomasa aérea y el peso de mazorca se evaluaron con modelos de efectos mixtos lineales y las diferencias en el número de hojas y el número de granos llenos se evaluaron con una librería librería de ajuste a modelos mixtos lineales generalizados con penalización por quasi-similitud (gnmmPQL).



Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

2 RESULTADOS

Este estudio reveló que, al analizar la longitud del tallo y el número de hojas, las características fenológicas no fueron diferentes entre los tratamientos con MFN y el control, por lo que las plantas crecieron similar al control. Por otro lado, este estudio demostró que el control presentó mayor área foliar que los tratamientos.

Los resultados del análisis estadístico por modelos de efectos mixtos lineales (cuadro 3) demostró que no hubo diferencias significativas en cuanto a la longitud del tallo entre los tratamientos con MFN contra el control. Solamente se encontró diferencia por día ($p < 0.05$), lo cual refleja el crecimiento de las plantas (figura 3).

Cuadro 9. Análisis de modelos de efectos mixtos lineales para la longitud del tallo contra el control, para los tratamientos con *Anabaena sp*; *Nostoc sp*; *Scenedesmus sp.* y el día de muestreo.

	Estimate	Std. Error	df	t value	Pr(> t)
Control	9.4213	7.5895	2.233	1.241	0.328977
<i>Anabaena</i>	-4.8667	8.5856	2.057	-0.567	0.626562
<i>Nostoc</i>	-4.5407	8.5856	2.057	-0.529	0.648429
<i>Scenedesmus</i>	-0.5111	8.5856	2.057	-0.06	0.957809
día 30	9.3833	2.636	526	3.56	0.000405 ***
día 40	22.525	2.636	526	8.545	< 2e-16 ***
día 50	40.525	2.636	526	15.374	< 2e-16 ***
día 60	67.2917	2.636	526	25.528	< 2e-16 ***
día 70	104.175	2.636	526	39.52	< 2e-16 ***
día 80	168.2417	2.636	526	63.825	< 2e-16 ***
día 90	173.7417	2.636	526	65.911	< 2e-16 ***
día 100	168.025	2.636	526	63.742	< 2e-16 ***

Símbolo de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
modelo: lmer(alttallo~trat+fdia+(1|ffila),data=h)

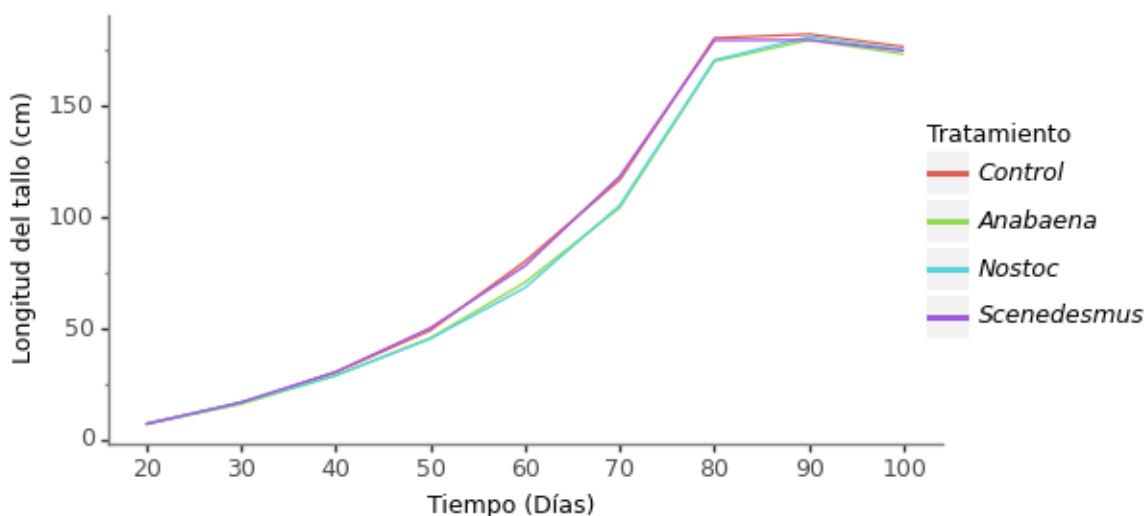


Figura 6. Tendencia de crecimiento por el promedio de la longitud del tallo para cada tratamiento. Se acelera con el inicio de la floración, entre los días 60 y 70.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Los resultados estadísticos de modelos mixtos lineares generalizados para el número de las hojas determinaron que no hubo diferencia significativa de los tratamientos contra el control (cuadro 4). Solamente hubo diferencia significativa por día, es decir en el crecimiento de las plantas (figura 4).

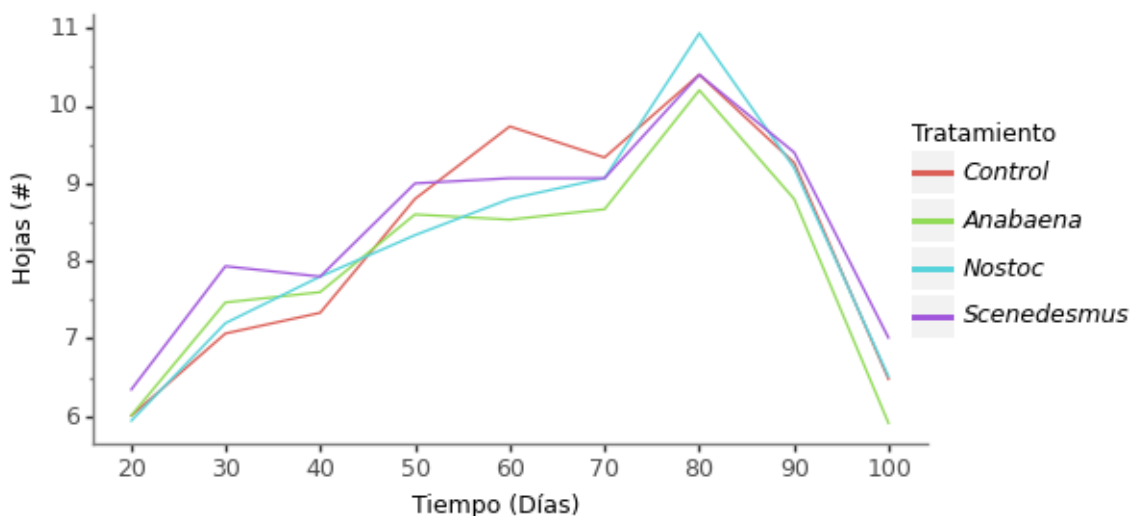


Figura 7. Tendencia en el crecimiento para el número de hojas para cada tratamiento por día a partir de la siembra. A partir del día 80 la hojas inferiores comienzan a secarse.

Cuadro 10. Análisis de modelos mixtos lineares generalizados para el número de hojas contra el control, para los tratamientos con *Anabaena* sp; *Nostoc* sp; *Scenedesmus* sp. y el día de muestreo.

	Value	Std. Error	Df	t-value	p-value
Control	1.808425	0.056831	525	31.82128	0
Anabaena	-0.03777	0.062933	525	-0.60009	0.5487
Nostoc	-0.01028	0.062908	525	-0.1634	0.8703
Scenedesmus	0.019548	0.062881	525	0.31087	0.756
día 30	0.20092	0.02514	525	7.99222	0
día 40	0.229715	0.024978	525	9.19653	0
día 50	0.358596	0.024301	525	14.75674	0
día 60	0.398112	0.024106	525	16.51499	0
día 70	0.398112	0.024106	525	16.51499	0
día 80	0.546977	0.023427	525	23.34842	0
día 90	0.412764	0.024036	525	17.17307	0
día 100	0.063852	0.025957	525	2.45989	0.0142

Modelo: glmmPQL(numhj~trat+fdia,family=poisson,random=~1|ffila,data=h)

Los resultados del modelo de efectos mixtos lineales para el área de hojas y por día reveló que cada tratamiento es significativamente menor que el control ($estimate < 0$ con $p < 0.05$) para cada uno los 3



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

tratamientos con MFN contra el control (cuadro 5), donde a partir del día 60 ya el control muestra un área foliar marcadamente mayor que los tratamientos con MFN (figura 5).





Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Cuadro 11. Análisis de modelos de efectos mixtos lineales para el área de hojas contra el control, para los tratamientos con *Anabaena* sp; *Nostoc* sp; *Scenedesmus* sp. y por el día de muestreo.

	Estimate	Std. Error	df	t value	Pr(> t)
Control	23.97678	22.50018	3.12779	1.066	0.36185
Anabaena	4.36449	27.45004	3.89729	0.159	0.88157
Nostoc	1.54638	27.42526	3.88325	0.056	0.95782
Scenedesmus	1.65313	27.35447	3.84332	0.06	0.95482
día 30	38.34089	14.95467	3188	2.564	0.01040 *
día 40	141.6412	14.95467	3188	9.471	< 2e-16 ***
día 50	253.025	14.95467	3188	16.919	< 2e-16 ***
día 60	412.8586	14.95467	3188	27.607	< 2e-16 ***
día 70	490.4526	14.95467	3188	32.796	< 2e-16 ***
día 80	506.7042	14.95467	3188	33.883	< 2e-16 ***
día 90	473.0983	14.95467	3188	31.635	< 2e-16 ***
día 100	426.0749	14.95467	3188	28.491	< 2e-16 ***
Anabaena en día 30	6.1927	21.24146	3188.002	0.292	0.77066
Anabaena en día 40	5.72451	21.21244	3188.003	0.27	0.78728
Anabaena en día 50	6.95729	21.21244	3188.003	0.328	0.74295
Anabaena en día 60	-47.9344	21.21244	3188.003	-2.26	0.02391 *
Anabaena en día 70	-97.3662	21.21244	3188.003	-4.59	4.60e-06 ***
Anabaena en día 80	-112.7	21.21244	3188.003	-5.313	1.15e-07 ***
Anabaena en día 90	-142.786	21.21244	3188.003	-6.731	1.99e-11 ***
Anabaena en día 100	-148.105	21.21244	3188.003	-6.982	3.53e-12 ***
Nostoc en día 30	4.54162	21.18036	3188	0.214	0.83023
Nostoc en día 40	-0.56249	21.18036	3188	-0.027	0.97881
Nostoc en día 50	7.8554	21.18036	3188	0.371	0.71075
Nostoc en día 60	-57.9816	21.18036	3188	-2.738	0.00622 **
Nostoc en día 70	-104.478	21.18036	3188	-4.933	8.52e-07 ***
Nostoc en día 80	-115.638	21.18036	3188	-5.46	5.14e-08 ***
Nostoc en día 90	-134.524	21.18036	3188	-6.351	2.44e-10 ***
Nostoc en día 100	-117.985	21.18036	3188	-5.57	2.75e-08 ***
Scenedesmus en día 30	2.45676	21.08862	3188	0.116	0.90727
Scenedesmus en día 40	-0.02213	21.08862	3188	-0.001	0.99916
Scenedesmus en día 50	-0.05091	21.08862	3188	-0.002	0.99807
Scenedesmus en día 60	-42.8814	21.08862	3188	-2.033	0.04210 *
Scenedesmus en día 70	-89.45	21.08862	3188	-4.242	2.28e-05 ***
Scenedesmus en día 80	-99.0502	21.08862	3188	-4.697	2.75e-06 ***
Scenedesmus en día 90	-101.842	21.08862	3188	-4.829	1.43e-06 ***
Scenedesmus en día 100	-83.7284	21.08862	3188	-3.97	7.34e-05 ***



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Símbolo de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Modelo: lmer(areahj~trat*fdia+(1|ffila),data=k)

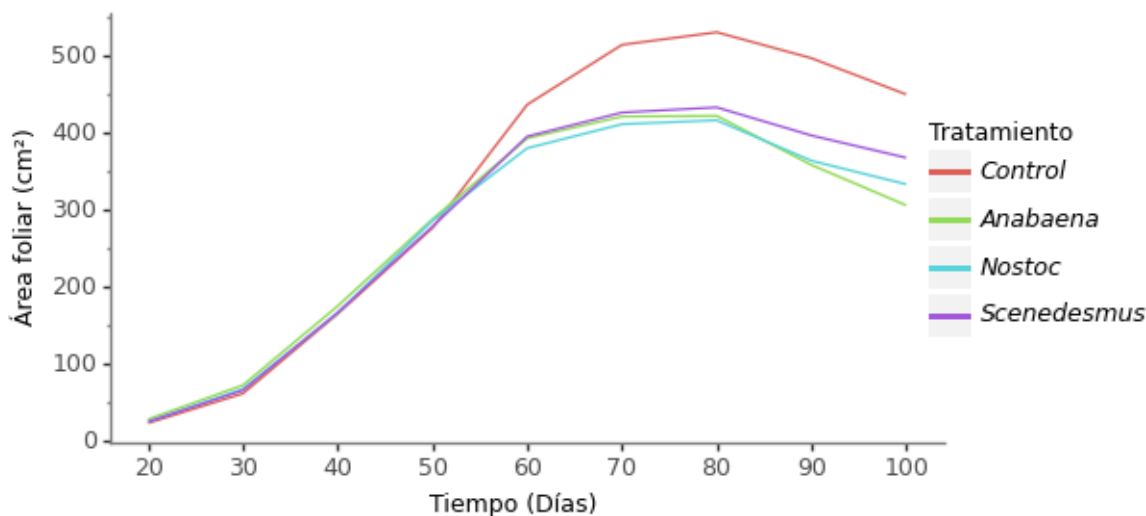


Figura 8. Tendencia en el crecimiento del área fotosintética para cada tratamiento.

El control tiene hojas marcadamente más grandes a partir de la floración en el día 60.

Los análisis de modelos de efectos mixtos lineales para la biomasa del tallo y hojas (cuadro 6) demostraron que los tratamientos con MFN fueron estadísticamente equivalentes con el control ($p > 0.5$). Solamente el tratamiento con *Anabaena* sp estuvo cerca de ser considerado menor que control ($p = 0.069$), lo que se refleja en que el diagrama de cajas muestra el menor promedio para el tratamiento con *Anabaena* sp, pero las distribuciones no se muestran separadas (figura 6).

Cuadro 12. Análisis de modelos de efectos mixtos lineales de la biomasa aérea para los tratamientos con *Anabaena* sp; *Nostoc* sp; *Scenedesmus* sp. contra el control.

	Estimate	Std. Error	df	t value	Pr(> t)
Control	335.58	27.093	2	12.386	0.00646 **
Anabaena	-98.313	33.902	2.755	-2.9	0.06927 .
Nostoc	-76.5	33.902	2.755	-2.256	0.11713
Scenedesmus	-61.573	33.902	2.755	-1.816	0.17506

Símbolo de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Modelo: lmer(biompl~trat+(1|ffila),data=m)



Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

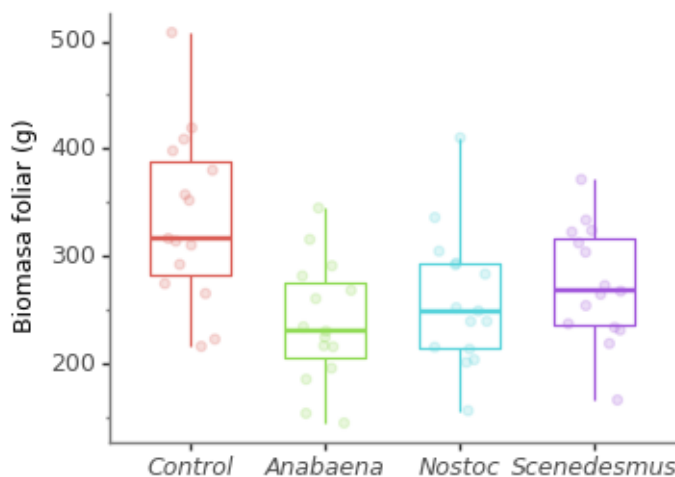


Figura 9. Diferencias en la biomasa aérea de la planta deshidratada luego de la cosecha.

El control generó mayor biomasa que los tratamientos con menos fertilizante de nitrógeno.

Los análisis estadísticos de la masa de mazorca (cuadro 7) revelaron que los tratamientos con MFN tuvieron mazorcas equivalentes al control ($p > 0.05$). El tratamiento con *Anabaena* sp fue el único que se aproximó a ser considerado diferente ($p = 0.069$), pero visualmente no se aprecia que el diagrama de cajas señale una diferencia entre los tratamientos (figura 7).

Cuadro 13. Análisis de modelos de efectos mixtos lineales del peso de mazorca para los tratamientos con *Anabaena* sp; *Nostoc* sp; *Scenedesmus* sp. contra el control.

	Estimate	Std. Error	df	t value	Pr(> t)
Control	136.68	13.221	2	10.338	0.00923 **
Anabaena	-45.693	17.449	3.401	-2.619	0.06948 .
Nostoc	-36.933	17.449	3.401	-2.117	0.11385
Scenedesmus	-26.62	17.449	3.401	-1.526	0.21395

Símbolo de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Modelo: lmer(biom_mazo~trat+(1|ffila),data=m)



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

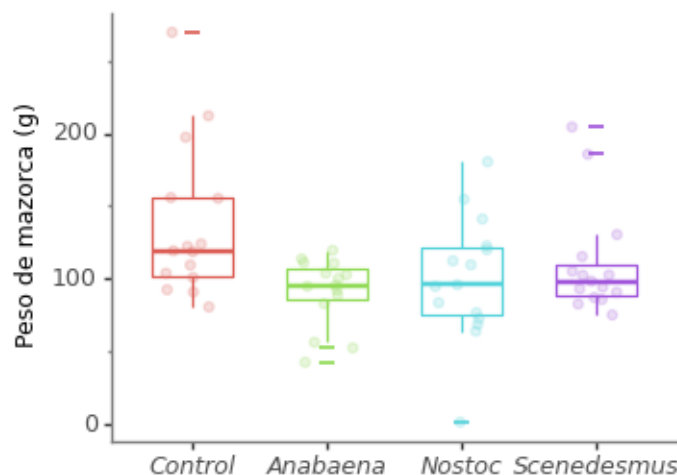


Figura 10. Diferencias en la biomasa de mazorca luego de la cosecha.

El promedio del peso de mazorca en los 3 tratamientos es similar entre ellos y menores que el control.

Los resultados de los análisis determinaron que por los modelos mixtos lineales generalizados para la cantidad de granos llenos se observa que el número de granos producidos en las mazorcas es igual entre los tratamientos versus el control (cuadro 8). Visualmente se confirma en el diagrama de cajas que las distribuciones para los tratamientos y el control no están separadas (figura 8).

Cuadro 14. Análisis de modelos mixtos lineales generalizados del número de granos cuajados en la mazorca para los tratamientos con *Anabaena* sp; *Nostoc* sp; *Scenedesmus* sp. contra el control.

	Value	Std. Error	df	t-value	p-value
Control	5.802521	0.110589	53	52.46914	0
Anabaena	-0.1826	0.164043	53	-1.11314	0.2707
Nostoc	-0.19476	0.164589	53	-1.18331	0.242
Scenedesmus	-0.05738	0.158689	53	-0.36161	0.7191

Modelo: glmmPQL(numgran~trat,family=poisson,random=~1|ffila,data=l)



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

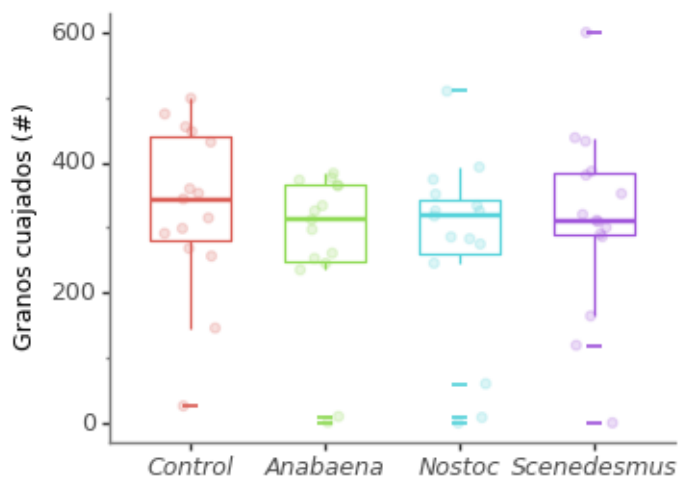


Figura 11. Diferencias en el número de granos cuajados en la mazorca al tiempo de la cosecha.

En varias mazorcas no se dio llenado de granos.





Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Anexo:

Artículo sometido

Type of the Paper (Review)

Advances in the development of biofertilizers and biostimulants from microalgae

Alejandra M. Miranda ¹, Fabian Hernandez-Tenorio ², Fabian Villalta ³, Gabriel J. Vargas ⁴, Alex A. Sáez ^{1*}



Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date





Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Copyright: © 2024 by the authors.
Submitted for possible open access
publication under the terms and
conditions of the Creative Commons
Attribution (CC BY) license
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Biological Sciences and Bioprocesses Group (CIBIOP), Environmental and Biotechnological processes Group (GIPAB); School of Applied Sciences and Engineering, Universidad de EAFIT, Medellín 050022, Colombia; ammirandap@eafit.edu.co
- ² Environmental Processes Research Group (GIPAB), School of Applied Sciences and Engineering, Universidad EAFIT, Medellín 050022, Colombia.; fehernandt@eafit.edu.co
- ³ Centro de Investigación de Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 159-7050, Costa Rica; fvillalta@itcr.ac.cr
- ⁴ I&D Cementos Argos S.A, Centro de Argos para la Innovación, Medellín 050022, Colombia; gvargasva@argos.com.co
- * Correspondence: asaez@eafit.edu.co

Abstract: Microalgae have commercial potential in different sectors of the industry. Specifically in modern agriculture, its can be used because have the ability to supply nutrients in the soil, produce plant growth hormones, polysaccharides, antimicrobial compounds and other metabolites that improve agricultural productivity. Therefore, products formulated from microalgae as biofertilizers and biostimulants turn out to be beneficial for agriculture and are positioned as a novel and environmentally friendly strategy. However, these bioproducts present challenges in preparation that affect shelf life due to the rapid degradation of bioformulated products. Therefore, this work aimed to provide a comprehensive review of biofertilizers and biostimulants from microalgae, for which a bibliometric analysis was carried out to establish trends using scientometric indicators, technological advances were identified in terms of formulation methods. and the global market for these bioproducts was analyzed.

Keywords: Biofertilizers, Biostimulants, Bibliometric analysis, Microalgae, Agriculture.

1. Introduction

Global food security is one of the greatest challenges that society faces [1]. It is estimated that by 2050 humanity will reach 9.5 billion inhabitants [2] and that by 2030 people affected by hunger will exceed 840 million (equivalent to 10% of the world's population), so Mass production of food is required, without the use of large areas of land. For this reason, an exponential increase in the use of fertilizers in agricultural crops is projected. Synthetic fertilizers are made up of amounts of Nitrogen (N), Phosphorus (P) and Potassium (K) [3], and are applied in excess to crops to provide the nutrients necessary to increase agricultural productivity. However, plants absorb only a limited amount of these nutrients (30-40%) [2] and the rest is lost in the soil, which worsens environmental pollution due to eutrophication processes in water bodies. deterioration and gradual loss of soil



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

fertility, destruction of the stability of microorganisms, accumulation of heavy metals in plant tissue and inorganic contaminants in the soil [4]. Furthermore, chemically manufactured fertilizers present a serious threat to their production due to the scarcity of phosphate rocks (source of P) and the growing uncertainty in the supply of natural gas (essential for the synthesis of ammonia) due to of geopolitical conflicts in producing regions [5], [6]. Consequently, pollution problems and product shortages lead to dangers for public health and the development of sustainable and ecological technologies [7]. Therefore, it is necessary to create new agricultural technologies capable of optimizing food production.

On the other hand, the use of biofertilizers and biostimulants in agriculture has become an innovative, environmentally friendly technology since these allow improving soil fertility and productivity in plants growth [8]. Biofertilizers are products containing living microorganisms or natural substances that are able to improve chemical and biological soil properties, stimulating plant growth, and restoring soil fertility [9]. In turn, biostimulants are products derived from organic material that, applied in small quantities, are able to stimulate the growth and development of several crops under both optimal and stressful conditions [10], [11]. These products can be used as a complement to fertilizers because they strengthen the immune system and improve the plant's tolerance to abiotic challenges [12]. It is worth noting that, although biostimulants are not biofertilizers, both products are beneficial for plants, because they are currently considered complements or substitutes for chemical fertilizers [13]. As for the market, it is estimated that the demand for these products will increase in the coming years. For example, the biofertilizers market registered a value of 1,106 million dollars in 2016 and is projected to grow at a rate of 14.2%, reaching values of 3,124 million by the end of 2024 [14]. The biostimulants market is expected to reach 4.47 million dollars by 2025 [15].

The correct formulation of biofertilizers and biostimulants is of great importance because this directly affects their effectiveness and usefulness in agriculture [16]. Although biofertilizers and biostimulants constitute an alternative to chemical fertilizers, there are still challenges in the formulations, since the conditions during storage and transportation of the bioformulated products can affect the useful life of the product, which can generate negative effects for human health and the environment [17,18]. This work focused on showing a comprehensive review of the various technological developments for the formulation of biofertilizers and biostimulants based on microalgae. Likewise, the current state of the market and companies that market these bioproducts were presented. In addition, this review provides a bibliometric analysis of biofertilizers and biostimulants,



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

which highlights current trends on strains used, scientific production, and metabolites of interest, among others.

2. Bibliometric analysis of microalgae-based biofertilizers and biostimulants

Microalgae biofertilizers and biostimulants are currently proposed as a sustainable strategy for modern agriculture, which seeks to increase the productivity of crops and reduce the environmental impact, due to the excess of nutrients in the soil due to indiscriminate application of synthetic fertilizers [19]. The development of these bioproducts enables the effective and innovative use of biological resources from a circular economy approach, therefore allowing us to address the growing crisis regarding energy, water, and food consumption [20]. Consequently, it was pertinent to analyze the technological trends related to the development of biofertilizers and biostimulants from microalgae. For this reason, a systematic search was carried out in the Scopus database under the search criteria established by the equation TITLE-ABS-KEY ("biofertilizer" OR "biostimulant" AND "micro-algae") AND (LIMIT -TO (DOCTYPE, "ar") OR LIMIT -TO (DOCTYPE, "re")). It should be noted that articles published up to 2023 were considered. The information collected was purified to avoid the repetition of terms with abbreviations and hyphens. The VOSviewer version 1.6 software types were used. 16 and CorTextManager to develop the co-occurrence network, Sankey diagram, and historical map.

The co-occurrence map allowed us to determine the keywords most frequently cited in scientific publications on biofertilizers and biostimulants based on microalgae (Figure 1). The microalgae strains *Chlamydomonas*, *Chlorella vulgaris*, and *Spirulina* (red, blue, and purple nodes) were identified as the most used according to co-occurrence in biofertilizer and biostimulant formulation studies. Similarly, the keyword *Anabaena cylindrica* (purple node) was found, which corresponds to a species of the genus of cyanobacteria *Anabaena* that has presented an emerging potential in recent years for the development of economical and environmentally friendly biofertilizers. [21]. The map also showed terms related to bioactive compounds that are of interest to promote agricultural productivity such as phytohormones, protein hydrolysates, and phycocyanin (yellow, blue, and orange nodes). Likewise, keywords linked to the circular economy were identified such as biorefinery, sustainability, resource recovery, life cycle analysis, and nutrient recovery (yellow and green nodes). The terms abiotic stress, plant growth, nitrogen, humic substances, nutrients, and *Solanum lycopersicum* were related to agricultural crops (red, blue, and light blue nodes).



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

combinations “biodiesel & nutrients removal”, “CO₂ capture & biofuels production” and “bioproducts & agricultural development”, that currently microalgae are not only investigated for applications in the energy sector, but they have gained strength in the agricultural sector due to the benefits they have for crops.

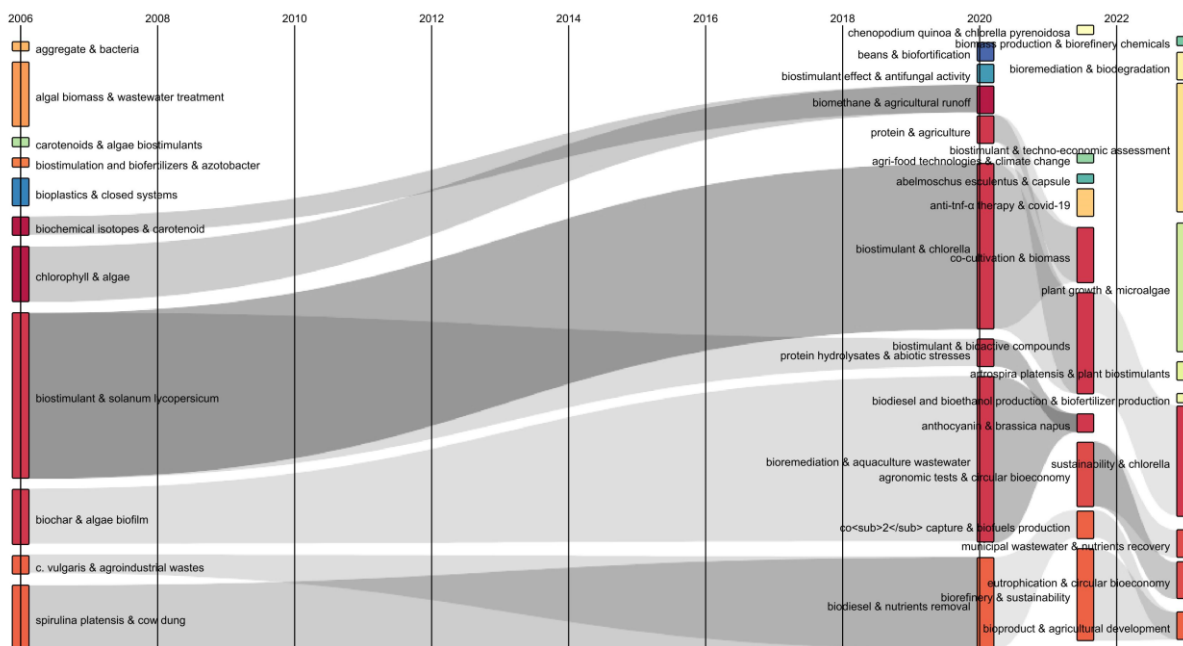


Figure 2. Sankey diagram of author keywords in publications on biofertilizers and biostimulants from microalgae.

Additionally, the historical map was developed in the period 2020-2023 and showed the relationships between the most important keywords, according to the co-occurrence measures of scientific publications on biofertilizers and biostimulants based on microalgae (Figure 3). This analysis reaffirmed the trends observed in the co-occurrence map and the Sankey diagram, for example, for the year 2021, keywords such as sustainable agriculture, biofertilizer, cyanobacteria, and circular economy, among others, were identified. While for the years 2022 and 2023, the keywords found were algae biostimulants, sustainability, *Spirulina*, *Chlorella*, biorefinery, wastewater, and microalgae biomass, among others. Also, it was possible to identify from the trends shown by the keywords, that in the context of the circular economy, the production of microalgae can contribute on different fronts, including its use as a biofertilizer or biostimulant, as well as the recovery of nutrients through the use of alternative and cheaper means such as wastewater or chemical fertilizers. Therefore, the use of sustainable sources of nutrients in



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

agriculture, such as microalgae biomass, improves sustainability and promotes the circular economy. [19,24,25].

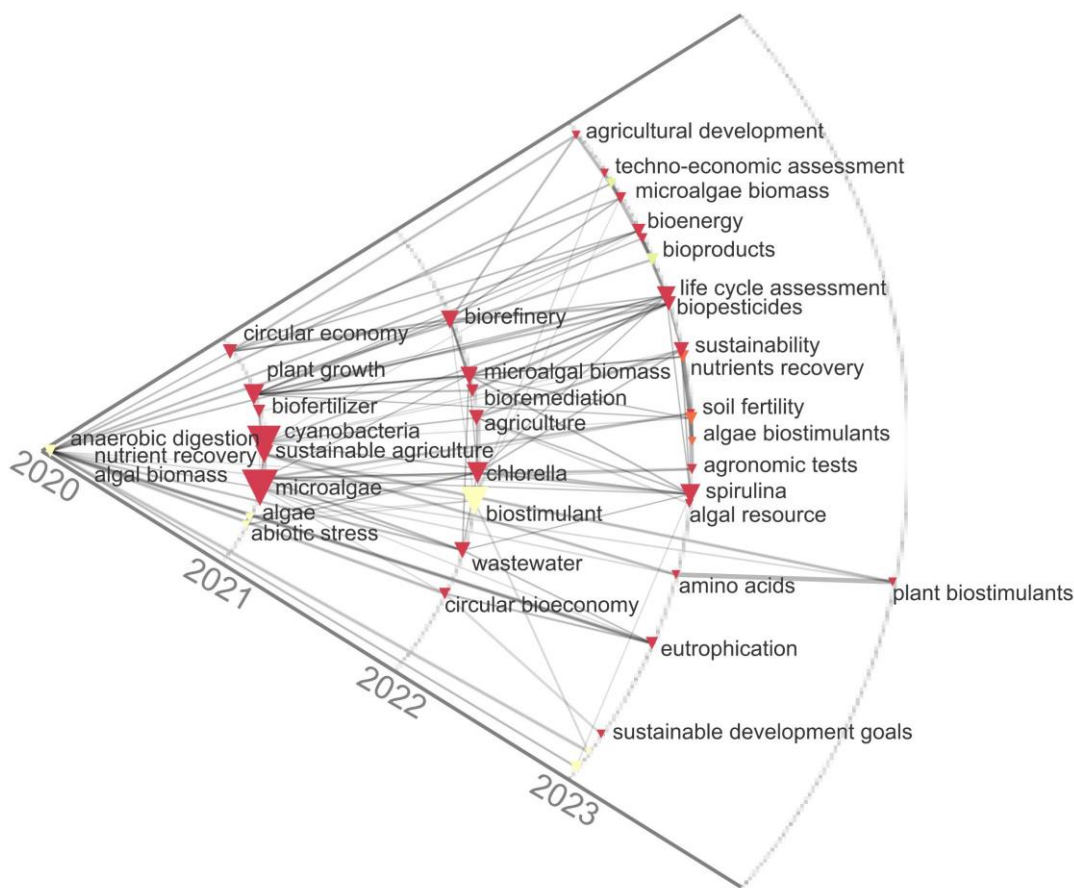


Figure 3. Historical map of keywords in publications on biofertilizers and biostimulants from microalgae.

3. Potential strategies for the formulation of biofertilizers and biostimulants

The terms biostimulants and biofertilizers are often misused. Biofertilizers can be interpreted in different ways. A biofertilizer is a bacterial, algal, or fungal inoculant applied to plants with the aim of increasing the availability of nutrients and their utilization by plants, regardless of the nutrient content of the inoculant itself. Biofertilizer is a product biodegradable and can be used as a fertilizer containing live phosphate solubilizing and nitrogen fixing microorganisms PGPR. Biofertilizers add nutrients through natural nitrogen fixation processes, solubilizing phosphorus, and stimulating plant growth through the synthesis of growth-promoting substances. These are not considered fertilizers, as such, because they do not provide a sufficient amount of

Unidad de Gestión de Programas**Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos**

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

nutrients. Biostimulants are substances, other than fertilizers, that promote plant growth when applied in small quantities. However, they are classified as a fertilizer from a regulatory point of view for marketing [26]. Their physiological effects depend on their composition as they contain various organic and mineral compounds which plants can use as metabolites, growth regulators, and nutrients; however, biostimulants cannot be considered biofertilizers [27].

The formulation of biostimulants and biofertilizers is important because in appropriate doses these products usually give rapid responses to physiological growth (good formation of leaves, roots and reproductive structures) and crop yield [28]. The formulation is defined as a process in which the selected biomass is linked to carrier [29], which contains ingredients responsible for the stabilization and preservation of the biomass during the transport and storage of the bioproduct [30]. The right formulation should allow easy handling and application of the product, good profitability, stability of physicochemical properties, good physiological state for as long as possible and compliance with the regulations established by environmental authorities that govern this type of products [31]. Biofertilizers and biostimulants could be formulated in liquid or solid presentations through the implementation of techniques such as encapsulation, spray drying, fluidized bed, among others (Figure 4).

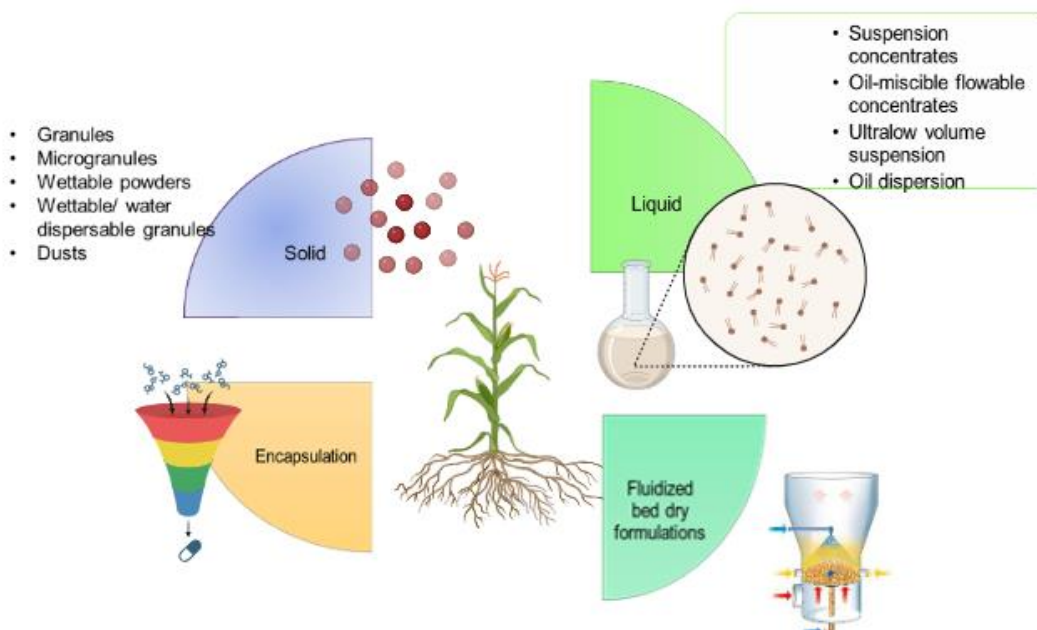


Figure 4. Types of formulations for biofertilizers and biostimulants development.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Solid formulations include granules, microgranules, powders, wettable powders, wettable, and water-dispersible granules. These formulations are characterized by being economical, easy to produce, and have various advantages such as high disintegration capacity (allowing greater availability of the active ingredient in less time), ease of storage and application, greater chemical stability, among others. On the other hand, liquid formulations of biofertilizers or biostimulants are also known as suspensions of microorganisms in liquids. These are attractive for modern agriculture because the useful life is longer (1-2 years), they are easy to handle, apply and allow a higher density of microorganisms in lower doses of inoculants with the same effects as solid formulations [31], [32]. Liquid formulations are composed of approximately 10 to 40% microorganisms, 1-3% suspending ingredient, 1-5% dispersant, 3-8% surfactant, and 35-65% carrier liquid (oil or water) [31]. These liquid products are of interest not only for their long useful life, ability to withstand high temperatures (up to 45 °C), ease of storage, application in both seeds and soils, but also for the ability to reduce the use of chemical fertilizers from 15 to 40% [31], [33]. However, it is important to highlight that, although these products can be stored for a long time, microorganisms can face stress due to nutrient limitation or hypoxia, which would cause the population in the formulation to drastically decrease, so the authors such as Lee [34], suggest that the product should be used in the shortest possible time and stored at cool temperatures (8-15 °C). Liquid formulations can be classified into suspension concentrates, ultra-low volume suspensions, oil-miscible concentrated fluids and oil dispersion. (Table 1) [35].

Table 1. Formulations for biofertilizers and biostimulants.

Type of formulation	Description	Advantages	Ref.
Granules- Microgranules	Dry particles composed of biomass (active ingredient with 5-20%), binder and carrier	Non-dusty, non-caking, high disintegration capacity, easy to store and apply, non-inhalable and used for soil treatments	[35],[31]



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Wettable Powders	Composed of 50-80 technical powder, 15-45% filler, 1-10% dispersant and 3-5% surfactant	These powders are easily miscible with water and can be suspended in a liquid carrier, their shelf life can exceed 18 months..	[35],[31], [36]
Water-wettable/dispersible granules	Non-dusty solid formulation, with wetting and dispersing agents, but in higher concentrations than wettable powders	Non-dusty solid formulation and disperses quickly in water	[14]
Powders	Contain a very finely ground mixture of the active ingredient (usually 10%). They are used with adhesives and desiccants.	Ease of storage, greater ease of transportation and greater chemical stability	[35],[31], [36]
Suspension concentrates	Made by combining solid active ingredients with low water solubility and acceptable hydrolysis.	Its do not generate dust, are easy to measure and can be poured into spray tanks.	[33]
Ultra-low volume suspensions	Solid particles dispersed in a liquid in small quantities. It can be dispersed by ultra-low volume aerial or ground spray machinery into a very fine spray	Can be dispersed using aerial or ground spray machinery The spray is very fine	[33], [31]
Oil-miscible concentrated fluids	It is a suspension containing active ingredient(s) dispersed in an organic fluid	Extremely fine spray	[31]
Oil dispersion	Contains active ingredients in oil or in a water-immiscible solvent	Due to the oil, the active ingredient remains in contact with the plants for a longer time	[33], [31]

Emulsions are another type of formulations that consist of colloidal dispersions, characterized by the mixture of two immiscible liquids, where one liquid is in the form of drops dispersed in another



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

liquid and stabilized by a surfactant [37]. This type of mixtures has low viscosity, optical transparency, and thermodynamic stability conditions with droplet sizes of 0.1 to 10 μm [38]. Emulsions can be classified as water droplets dispersed in oil (W/O) or oil droplets in water (O/W). W/O are of interest because the oil traps water, which delays evaporation, and the contact time of the active ingredient increases [39]. In the case of O/W, they are a type of emulsion that prevents the degradation of molecules without affecting biological activity, this is because it allows combining the protection provided by the hydrophobic environments created within the droplets with the greatest dispersion. of metabolites in an aqueous medium, [38,40]. Furthermore, these emulsions are environmentally friendly, less toxic to plants, and scalable in industrial processes [41]. In general, emulsions are considered as controlled releasers of active ingredients, which is why they are widely used in the agricultural, pharmaceutical, cosmetic, and food industries, among others [42], [43]. It is important to highlight that the thermodynamic stability of emulsions is a critical factor in the development of this type of formulations. Therefore, the use of homogenizers, pipe flow systems, or rotor-stator systems that supply energy to achieve thermodynamically stable conditions and avoid flotation, sedimentation, coalescence, or flocculation is required [44].

On the other hand, encapsulation can be defined as the process in which a substance (active agent and core) is trapped, totally or partially covered by a carrier material (encapsulating agent), called wall material, capsule, membrane, shell, matrix, or external phase, to form a system of particles [38,45]. This technique is used to encapsulate solid, liquid, or gaseous compounds in small particle sizes that can range between 1-100 nm (nanoparticles) and between 100 nm and 1000 μm (microparticles) [46], [47], [48]. The active substance can be from bacteria, fungal cells, hyphal segments, to biopesticides, phosphorus-solubilizing biofertilizers, mycorrhizal fungi or rhizobia, among others [31], [49]. The cells can be alive, such as the special case of polymer entrapment which consists of the mixture of a polymer with living cells (which can be microalgae), for subsequent chemical solidification [50]. Generally, the shape of the beads is uniform, and after application, they are degraded by soil microorganisms, which releases trapped cells [51]. Among the advantages of this type of formulation are ease of production and handling, non-toxic nature, ease of storage at room temperature for prolonged periods, temporary protection of the encapsulated microorganisms with respect to the environment, elimination of the undesirable effects of light, gradual release of trapped cells, among others [48],[50], [52]. However, this type of formulations also represents major disadvantages such as the high cost of polymers and low oxygen transfer, which limits cell survival [48], [50], [53] In encapsulation, the carrier material or wall serves as



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

protection against different environmental conditions, such as humidity, high temperatures, helps to mask unpleasant odors and improves bioavailability, which contributes to increasing stability and therefore prolonging life. usefulness of the product [52], [54]. Among encapsulation materials, a wide variety of natural and synthetic polymers, biologically based substances, and copolymers can be found [48], [55], [56]. This choice depends on the active agent, required needs, and type of application.

Another formulation that allows the quality and useful life of biofertilizers and biostimulants to be substantially maintained is the formulation from fluidized bed drying [31], [57]. This type of formulation involves suspending solid particles or granules against gravity in a stream of warm or hot air flowing upward, creating a fluidized condition. Once drying is completed, the humidity of the bioinoculant is reduced, preventing contaminants from growing and contaminating the target cells [31], [48], [57]. The fluidized bed drying formulation presents advantages such as a decrease in the number of cells of microorganisms other than those of interest, the possibility of modifying temperatures as needed, makes it possible to work with consortia of microorganisms beneficial to agriculture, less contamination, and a good plants response [31], [57], [58].

Biofertilizers can also be formulated through the use of nanotechnology, resulting in the development of so-called nanobiofertilizers which are defined as the integration of nanoparticles and biofertilizers. This technological advance represents a novel and modern approach that transforms conventional agricultural strategies into precision agriculture[59]. Nanobiofertilizers are developed from the encapsulation of biofertilizers at nanometer sizes (1-100 nm) by using suitable wall materials such as polymers, biopolymers, or inorganic compounds. The reduction in particle size due to nanoscale facilitates nutrient uptake in plants, therefore nutrient losses and toxicity are reduced. Furthermore, these nanoproducts enable the release of nutrients according to the plant's requirements and have a significant effect as resistance-inducing agents against pathogenic pests and diseases [60,61]. Likewise, it has been reported that nanobiofertilizers developed from microalgae can be used as nanobiosensors, because they are sensitive to environmental fluctuations and have the ability to interact differentially with certain toxic agents such as heavy metals and pesticides, among others [62].

4. Study cases in the application of biofertilizers and biostimulants based on microalgae

Biofertilizers and biostimulants obtained from microalgae are products considered to have high beneficial potential in modern agriculture since they allow improvement in the absorption of nutrients, increase the efficiency of crops, and improve the



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

physiological state of plants[63], [64], [65], [66–68]. Authors such as Mousa [33] report that currently in countries such as Jordan, India, and the United States, there are companies that produce and market liquid biofertilizers based on algae, reporting successful cases for fruit and vegetable crops, as well as field crops. For the case of India, it should be noted Biotechnology Department of Govt. of India has introduced four major centers in the growing areas of paddy fields of the country to accelerate and extension of work in the field of algal bio fertilizer in 1990. The programme was launched in Lukhnow (UP), Calcutta (West Bengal), Madurai (Tamil Nadu), and New Delhi under technology development and presentation programmes on Cyanobacterial biofertilizer with the objective of a) to provide low cost locally used technology for large production of BGA, b) to isolate better and fast growing N₂- fixing strains, c) to demonstrate the farmers in the field, d) to develop starter inoculums and e) to study both ecology and economy benefits [69]. On the other hand, Dineshkumar et al. [70], state that the strains *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* have positive effects on the growth parameters of mung beans, achieving an increase between values of 60.7-95% of the fresh weight with respect to the control and an increase in the weight of the spikes and grains by 22 and 90%, with reference to the control, respectively. Furthermore, they affirm that the application and proper use of biofertilizers from microalgae will not only have an impact on the economic development of sustainable agriculture but will also guarantee a reduction in the level of pollution, which is why interest in using them is growing. to microalgae as an active ingredient in biofertilizers and biostimulants.

Microalgae extracts under different cultivation conditions have the ability to sustain agricultural productivity and minimize environmental degradation [71]. There are different studies in which it is shown that the application of microalgae as a biofertilizer or biostimulant can improve morphological and molecular responses in high-value products for the family basket and enhance germination, the development of seedlings, sprouts, root systems in vegetables and cereals, etc. [72], [73], [74]. For example, Faheed [75] reports that the granular formulation used dried microalgae (treatments with 2.3 g of dry microalgae per kg-1 of soil) as soil additives improve plant nutrients, presenting fresh and dry weights (g/plant).) up to 10 times more than those found with the control, because the microalgae extracts favor physiological reactions that lead to good growth and improved soil fertility.

Garcia & González, [72] affirm that the foliar application of aqueous extracts of *A. dimorphus* generates a positive effect as the concentrations of the extracts increase, increasing the germination speed of tomato seeds between 40 - 63% compared to the control, this is possibly because foliar applications provide faster utilization of nutrients. Foliar applications provide faster utilization of nutrients and



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

allow for faster correction of nutrient deficiencies compared to soil applications of fertilizers. Also, Bello et al. [71] confirm that microalgae extracts have the ability to promote growth in plant species such as tomato (*Solanum lycopersicum*), cucumber (*Cucumis sativus*), and pumpkin (*Cucurbita maxima*) and are appropriate candidates for the formulation of a biofertilizer. Likewise, Mutale-joan et al. [76] and are appropriate candidates for the formulation of a biofertilizer. Likewise, Mutale-joan et al. [76] studied the effect of biostimulants of 18 bioextracts obtained from microalgae and cyanobacteria on the growth of tomato plants. The authors reported significant results in the length of roots and shoots (112.65 and 53.70%, respectively), increases in the dry weight of roots and shoots between 34.81 and 58.69%. Regarding the absorption of nitrogen, phosphorus, and potassium, the values increased by 185.17%, 119.36%, and 78.04%, respectively. On the other hand, Wuang et al. [77] report that the formulation of *S. platensis* in liquid form in concentrations of 2 – 10 g/L, present higher yields than those obtained with chemical fertilizers, for plant species such as arugula, with an increase in plant height, chlorophyll, and dry weight by 55.3, 30.2 and 18.7%, respectively, compared to plants grown with Triple Pro 15-15-15. Similarly, Godlewska et al. [78] reported a type of formulation in the form of a suspension of *S. platensis* in a 1:10 ratio, mixed with a homogenizer for 40 min, 500 rpm, 37 °C. This increased the length of the radish plants (range of 71 – 129% longer compared to the control) as the concentration of the preparation increased. Possibly this increase in plant productivity and seed quality is due to the increase in the absorption of nutrients and growth regulators by the seeds. Dmytryk et al. [79] reported that in treatment of wheat seeds with formulations of *Spirulina* sp. type liquid emulsions (10% *Spirulina* sp extract, 2.5% ionic emulsifier, non-ionic emulsifier – 3%, Atlox 4913, 1%, Mannitol, and 0.1% L-ascorbic acid) the increase in plant mass and height of sprouts by more than 16 and 11%, respectively, compared to control samples. Likewise, Michalak et al. [80] reported that, by applying *S. platensis* extracts to wheat crops, in a 1.5 L/ha formulation, it is possible to obtain an average number of grains on the cob that is 6% higher compared to the control group. Additionally, biomass yield is increased (approx. 13%), stem length, and the amount of grains per ear. The authors suggested that formulations that have microalgae extracts present biostimulant properties similar to products available on the market, with the great advantage that these are not produced by chemical synthesis, therefore, they are more respectful of the environment.

On the other hand, in the case of corn, authors such as Al-saman [81], stated that dosing up to 3.0 g of powdered algae biomass per kilogram of soil, it is possible to improve the nitrogen content (between 81.53 - 129.2%), sugar content (up to 31.42%), total plant length (Max 46.3%), dry weight (Max 96.5%) and phenol content (up to 315%) of the



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

entire corn plant. Navarro-López et al. [82] reported the biostimulant potential of *Scenedesmus obliquus* cultured in brewery wastewater at different concentrations. For example, with 0.1 g/L without any other treatment, the germination rate increased up to 40%, the au-xin-like activity, with 0.5 g/L of extract after a combination of cell disruption, enzymatic hydrolysis and centrifugation, It increased up to 60% for the control and, for cytokine-like activity with 2 g/L extracts without pretreatments, values of up to 187.5% were achieved to the control. This evidence suggests that the biomass obtained is useful as a biostimulant for watercress, mung bean, and cucumber seeds, which are agricultural models. In a similar study, Barone et al [83], applied extracts of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* to sugar beet (*Betavulgaris* L. sp. *vulgaris*) to investigate their morphological and molecular responses to different treatments, obtaining positive results with primary and secondary metabolism, the regulation of genes related to biological pathways and activities. In general, it is possible to affirm that the use of microalgae extracts as biofertilizers or biostimulants, regardless of their mode of application (hydroponic, post-harvest, and foliar application), provides improvement in growth, nutritional balance, improves the development of roots and shoots, allows an increase in antioxidant properties, improves the absorption rate, increases physiological and bioactive compounds, chlorophyll a, b and micronutrients such as Fe, Zn, Cu among others. At soil level, it increases fertility, improves root modulation, increases root size, and the activity of rhizobacteria. [71]. On the other hand, Zhang. C et al [84] reported the great potential of autochthonous microalgae from China in improving saline soils, especially in lowering pH and improving enzyme activity. The authors suggested that algalization is an environmentally friendly and effective approach to lower pH and increase organic matter and enzyme activity of saline soils. The viability of *Chlorella minutissima* as a potential biofertilizer has also been investigated. After 25 days of culture, the dry weight in *C. minutissima* was 0.44 kg. Moreover, from this dry weight, 5.87% N, 1.15% P, and 0.28% K were obtained. Therefore, let's assume the experiment would be performed for one year and completion of every cycle of *C. minutissima* growth takes one month. Accordingly, the feasibility integration of biomass from *C. minutissima* would be conducted in a pond having an area of 1 ha (10000 m²), the total dry biomass obtained from *C. minutissima* would be 391111 kg ha⁻¹ y⁻¹. Accordingly, from this dry weight, one could obtain N, P, and K 22958, 4498, and 1095 kg ha⁻¹ y⁻¹ respectively. So, using this biomass in agriculture as biofertilizers, one can save the chemical fertilizers of about USD 55840 ha⁻¹ y⁻¹ [85].

Additionally, Emmar et al [86] reported that biofertilizers developed from *Nostoc entophyllum* and *Oscillatoria augustissima* can increase the nutritive value of pea seedlings and reduce the use of chemical fertilizers by 50%. The use of cyanobacterial biofertilizers not



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

only reduced the use of chemical fertilizers, but also increased the yield of rice and other crops. Wang et al [87] cultivated *Spirulina filamentosa* and used the biomass as biofertilizer for leafy vegetables Red Bayam (*Amaranthus gangeticus*), Rocket (*Erucasativa*), and Pak Choy (*Brassica rapa ssp. chinensis*). Compared to the chemical fertilizer (Triple-Pro 15-15-15), the iron (Fe), magnesium (Mg), calcium (Ca) and zinc (Zn) content of the algal biomass was higher. These trace elements play an important physiological role in plant growth.

5. Microalgae in the biofertilizer and biostimulant market

Currently, it is possible to affirm that the global biofertilizer market has experienced significant growth in recent years, due to the need for more sustainable and environmentally friendly agricultural practices. Additionally, the increase in demand for organic foods and interest in sustainable agriculture contribute to the growth of the biofertilizer market globally. Consequently, consumers are seeking agricultural products free of chemical residues and are willing to pay more for sustainably grown food. Table 2 presents the global market size for the biofertilizer industry. It can be seen that the forecast for the year 2029 is 5,377.8 million dollars and a CAGR rate from 2024 to 2029 of 15.2%, due to because in 2018 the market size reached 1,482.1 million dollars, while the forecast for the year 2023 is 2,667.3 million dollars and a growth difference from 2023 to 2024 of 13.2%.

Table 2. Global market size of biofertilizer industry (Taken from [88]).

Year – to -Year Change		Market sales (USD 000s)
2018-2019	10.8 %	1,642,575.9
2019-2020	4.7 %	1,719,272.4
2020-2021	14.6 %	1,979,141.3
2021-2022	19.6 %	2,355,452.5
2022-2023	13.2 %	2,667,293.4
2023-2024	13.2 %	3,019,002.8
CAGR 2024-2029	15.6 %	5,377,764.9

Figure 5 presents the world market for biofertilizer industries by region, where the projections for 2024 and 2029 are reported. It is observed that the largest participation for the year 2024 is held by the Asia-Pacific region (\$1,323.8 million). of USD – 56.1% share), possibly because this region is one of the main producers of organic crops, such as cane, vegetables, and rice. Additionally, countries like China and India are emerging leaders in this industry. For example, biostimulants in the Indian scenario had a worth of 71.23 million USD in 2017 and is expected to witness a CAGR of 16.49% in the forecast period up to the



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

year 2024, reaching a total value of 180.95 million USD. Algae based biostimulant companies in India are extremely limited, with most industries utilizing seaweed biomass as biofertilizer. In recent years few companies, like Soley Biotech, Hindustan Bioenergy Limited have started exploring microalgal strains from *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., and *Nannochloropsis* sp., as the source of bioactive metabolites for biostimulant application [24]. In second place is North America with a share of 23.0% (USD 542.7 million) and in third place is the European continent with \$418.2 million USD (17.7% share). It is noteworthy that Europe has the largest area of organic farming in the world (6.5 million hectares in 2021) and is committed to increasing this extension of organic farming in the member countries until it occupies 25% of the agricultural area of the region by 2030, so products such as biofertilizers and biostimulants are beginning to be attractive for these countries. As for Latin America, its participation was low compared to the previous ones, reaching 34 million dollars (2.6% participation). In relation to the projections for the year 2029, the first place would continue to be led by the Asia-Pacific region with \$2,775.7 million dollars (60.4% participation), the second place will be for North America with \$1,049.8 million dollars (22.8%) and the Europe third place with \$701.2 million dollars (15.3%). It is important to highlight that the increase in the spread of organic crops and the demand for organic raw materials around the world, especially in regions such as Europe and North America, will drive the demand for biofertilizers in the coming years. [89].

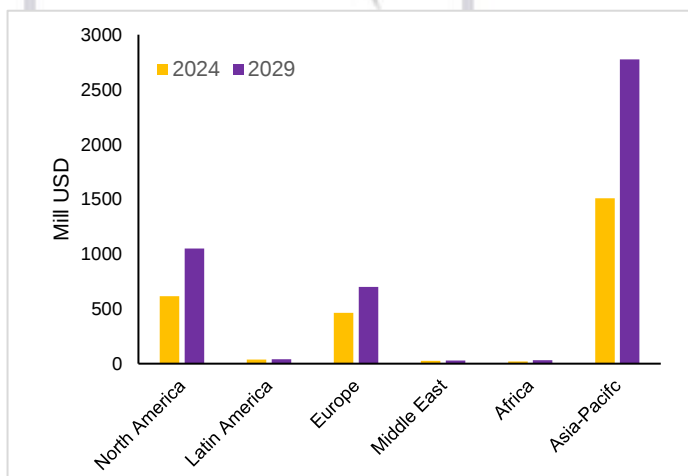


Figure 5. Global biofertilizer industry market by regions

In the types of raw material for the formulation of biofertilizers, blue-green algae (also known as cyanobacteria) stand out, characterized by being photosynthetic organisms, with the ability to fix nitrogen, easily adapting to different types of soil. and have the



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

presence of photosynthetic pigments such as chlorophyll a, phycocyanin among others. Cyanobacteria are emerging microorganisms for sustainable agricultural production, known to control nitrogen deficiency in plants, provide phosphorus to the soil through the mobilization of insoluble phosphate, using phosphatase enzymes, improving soil aeration and the capacity of water retention[90,91]. Biofertilizers based on cyanobacteria are used in various crops such as rice, corn, barley, tomato, chili, radish, cotton, and lettuce among others [71,92], Biofertilizers based on cyanobacteria are used in various crops such as rice, corn, barley, tomato, chili, radish, cotton, lettuce among others [67], [83], and are generally used in countries such as the United States, the Philippines, Egypt, India, and China [81]. The cyanobacteria species most used for the production of biofertilizers are *Anabaena variabilis*, *Nostoc linkia*, *Tolypothrix sp*, *Aulosira fertilissima*, *Calothrix sp*, and *Scytonema sp* [71].

On the other hand, the revenue generated by the global microalgae-based biofertilizers market in 2021 exceeded USD 11.33 million and is expected to generate revenue worth USD 22.28 million in 2028, with a CAGR rate of 9.75% between the year 2022 and 2028, due to the global trend in the world market focused on sustainable and environmentally friendly agriculture, as it offers an alternative to the problems of synthetic fertilizers [93]. Additionally, similar market estimates have been reported for microalgae fertilizers, indicating a 2023 value of \$28.7 million and a 2033 forecast of \$28.7 million, achieving a projected CAGR from 2023 to 2033. from 10 % [94].



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

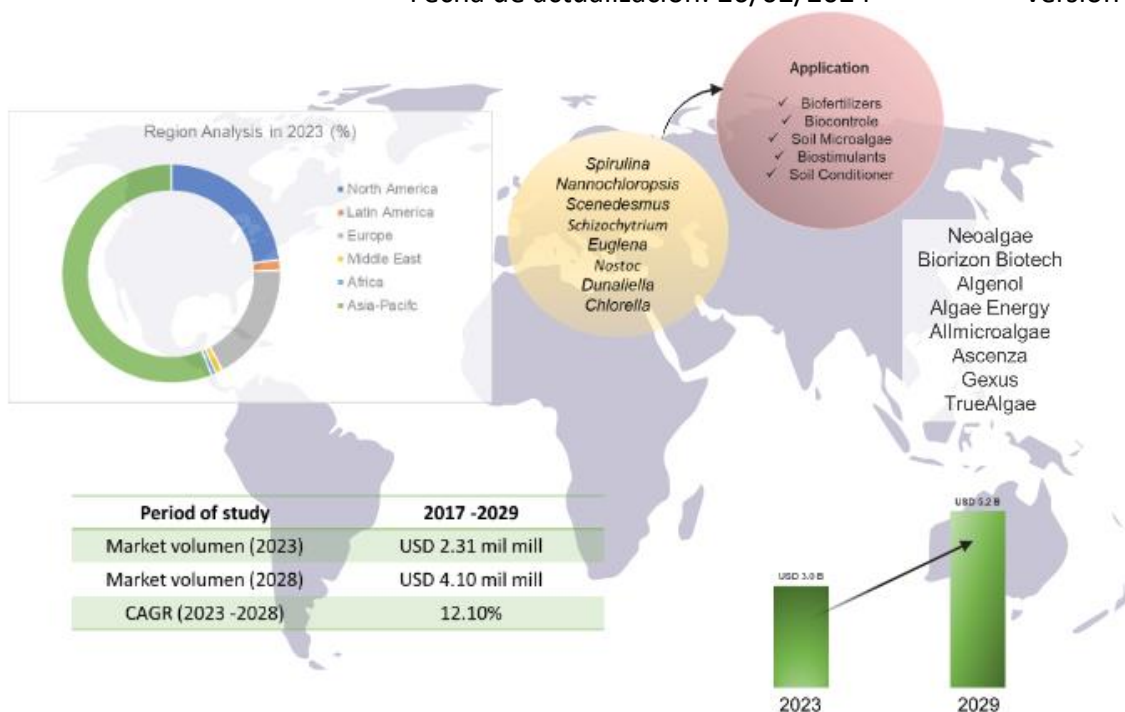


Figure 6. Global market of microalgae of fertilizers.

Some of the major players operating in the global microalgae fertilizers market are mentioned below: Algaenergy, Algatec, Algatechnologies Ltd., Algenol, Algix, Allmicroalgae, Cellana LLC, Cyanotech Corporation, Inner Mon-golia Rejuve Biotech Co. Ltd., Roquette Frères, Biotechnology, Fenchem Biotek, AstaReal, TAAU Australia, Allma (Allmicroalgae), Global EcoPower (Cyane) and Archimede Ri-cerche. These companies drive the global market and encourage, through their research, the development of new strategies for the consolidation of microalgae as raw material for biofertilizers [93,94].

Additionally, it is important to highlight that the role of governments around the world in promoting the development of biofertilizers and biostimulants has been relevant to the growing advancement of this type of products. The United States Department of Agriculture (USDA) reports that demand for organic products increased 50% during the pandemic. For their part, countries such as Australia, Argentina, and Spain have dedicated between 2.4 and 3.4 million hectares of their territory of arable land to organic agriculture, and the European Commission has increased restrictions on the use of synthetic fertilizers, which must be accompanied with biological and organic fertilizers [77]. However, despite government initiatives to produce bioproducts and the benefits of microalgae, large-scale commercial production of biofertilizers based on microalgae continues



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

to present challenges, given that this technology is still in an incipient phase. with marketing limitations due to the short shelf life of bioformulated products, lack of customer knowledge, adequate storage, and poor consumer awareness, among others.

6. Overall discussion and perspectives

The correct formulation of biostimulants and biofertilizers ensures the development of bioproducts with potential for use in the field and commercialization. These bioproducts are of great importance because they allow the productivity of crops and soil to be improved, which leads to sustainable agriculture through the maximum use of natural resources. In addition, dependence on synthetic chemicals is reduced, agricultural production is increased, and environmental impact is minimized. Currently, the development of companies marketing biostimulants and biofertilizers based on algae and microalgae not only generates environmental and agricultural benefits but also economic benefits, contributing to the development of companies and job creation. An example is the Austrian technology company Neoalgae, located in Gijón - Spain, with approximately 50 employees, which has a complete range of products called "Spiragro", suitable for being incorporated into any crop, whether organic or conventional. This biofertilizer is a liquid fertilizer with UNE 142500 certification, which is classified as algae concentrate, growth function, fattening, flowering, algae mix, premium, universal and its price can reach up to 54.95 Euros/5 liters [95]. Another company that uses microalgae as raw materials is Biorizon Biotech, located in Almería - Spain, with 10 employees and presents a line of bioenhancers such as Algafert and Algafert eco, which are based on Spirulina. Biorizon Biotech also produces Biobalance, a new generation biostimulant, designed to optimize the absorption of macro and micronutrients by crops, allowing optimization of the contribution of inputs within a strategy to improve the sustainability of agricultural production. The microalgae hydrolysates present in Biobalance have been chosen for their notorious prebiotic effect due to their demonstrated ability to activate the growth of beneficial fungi and plant growth-promoting bacteria [96]. On the other hand, Algenol is a global biotechnology company that develops all-natural products, as well as personalized biological solutions, to meet various needs. It is located in Florida, United States and has approximately 100 employees and produces sustainable alternatives to chemical fertilizers. [97].

On the other hand, Algae Energy biostimulants is a company located in Alco-bendas, Madrid-Spain, which has approximately 100 employees and has a UPT® Production Center, exclusively dedicated to the extraction of bioactive compounds and production of the range of agricultural biostimulants from the culture of microalgae called AgriAlgae® [98] Likewise, Allmicroalgae-Natural Products S.A. is a



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

leading Portuguese company in premium quality microalgae biomass, food safety and innovation. It has approximately 30 employees and is located in Leiria, Portugal, from where it supplies microalgae solutions for food, beverage, nutraceutical, feed, and agricultural applications worldwide. Its organic biostimulant product is called Terralgae (presentation of fine soluble powder), which is a mixture of algae and microalgae such as *Chlorella vulgaris*, which contain in its composition high levels of minerals, phytohormones, vitamins, fatty acids, and high levels of free L-aminoacids among others [99]. Ascenza is also a Portuguese company, located in Lisbon, dedicated to the production of protective fertilizers and biofertilizers, it has approximately 628 employees and a wide range of products consisting of Algaegreen 500, Algaegreen Ca-Force, Algaegreen Fruit Plus, Algaegreen Maxx, Algaegreen Olivo Plus and Algaegreen Viña Plus obtained from the extract of *Ascophyllum nodosum* [100].

Among these companies are also Gexus, a Mexican company located in Nuevo León-Mexico, considered a leader in microalgae biotechnology, with the development of innovative and sustainable technologies that seek to improve efficiency and sustainability in agriculture. Among the biostimulation products are Fitomaxi Radix (based on microalgae), Fitomaxi Crecentus (based on microalgae enriched with Potassium), Fitomaxi Fructus (based on microalgae enriched with Calcium-Boron-Silicon), Fitomaxi Florus (based on microalgae balanced with Boro-Molybdenum-Silicon) [101] TrueAlgae is a biotechnology company from Virginia - United States with global reach, which markets products based on macroalgae for agriculture. It has 15 employees, and its star product is "TrueSolum®, which is an organic product rich in metabolites that is produced from the cultivation of microalgae, specifically *Chlorella* [102].

Although some microalgae-based products for agriculture are currently commercialized. These have limitations related to production costs, as in general microalgae production can be a very expensive process, with relatively low biomass productivity. Although cultivation is widely recognized as the main factor contributing to the cost of algae-based products, harvesting, and dewatering of microalgae biomass are equally important factors affecting total costs [103]. Harvesting costs are reported to account for approximately 20-30% of total production costs. Another reason is that the application of microalgae extracts requires the extraction of bioactive metabolites, and most of the methodologies used are expensive and require large amounts of organic solvents. One alternative to reduce production costs is the use of wastewater as a source of nutrients, however, microalgae have the ability to accumulate heavy metals and other pollutants present in wastewater. Therefore, the use of microalgae biofertilizers derived from wastewater treatment can potentially introduce these contaminants into agricultural soil, posing risks to crop



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

growth and human health. Another significant limitation that prevents the widespread use of microalgae in agriculture is the insufficient understanding of the interactions between microalgae, plants, and the environment. Since the great diversity of photosynthetic organisms, together with the high number of metabolites that can be extracted, represent a major challenge for a thorough understanding of the effects and mechanisms of microalgae on soil and plants, it is important to understand how microalgae interact with plants [104]. It is also necessary to strengthen standards and laws that regulate microalgae biofertilizers and biostimulants to promote the consolidation of microalgae in agriculture [86].

7. Conclusions

Research on biofertilizers and biostimulants is a constantly growing field, which is currently positioned as a novel alternative that can address dependence on chemical fertilizers. Scientometrics showed through bibliometric analysis that these bioproducts formulated from micro-algae can be implemented from the circular economy and biorefinery approaches.

On the other hand, the market analysis showed that there is a tendency to increase the consumption of biofertilizers and biostimulants, due to the decrease in ancestral practices and low technical knowledge of clients and the initiative of governments to promote research and use of these bioproducts. However, although future consumption demands are projected, certain limitations related to the formulation still need to be overcome, which enables large-scale production and conservation of useful life, which will guarantee improvements in nutrient assimilation and product quality product.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.M., F.H-T., G.J.V., F.V and A.A.S.; software, F.H-T.; Formal analysis, A.M.M. and F.H-T.; writing—original draft preparation A.M.M. and F.H-T.; writing—review and editing, A.M.M. and F.H-T.; supervision, F.V., G.J.V., and A.A.S.; project administration, G.J.V., and A.A.S.; funding acquisition, G.J.V. and A.A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors wish to thank Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación – Minciencias (Colombia) for the financing of the program “Precommercial Biofactory for obtaining Microalgae Bioproducts from the Valorization of CO₂ from Industrial Sources BIOFACO2”, contract No. 80740-440-2021 and project code 86018.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Acknowledgments: The authors would like to thank the Ministry of Science, Colombia, Cementos Argos, Universidad EAFIT, and Universidad de Antioquia.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ghorai, P.; Ghosh, D. Ameliorating the Performance of NPK Biofertilizers to Attain Sustainable Agriculture with Special Emphasis on Bioengineering. *Bioresour Technol Rep* **2022**, *19*, 101117, doi:10.1016/j.biteb.2022.101117.
2. Kumar, S.; Diksha; Sindhu, S.S.; Kumar, R. Biofertilizers: An Ecofriendly Technology for Nutrient Recycling and Environmental Sustainability. *Curr Res Microb Sci* **2022**, *3*, 100094, doi:10.1016/j.crmicr.2021.100094.
3. Sharma, G.K.; Khan, S.A.; Shrivastava, M.; Bhattacharyya, R.; Sharma, A.; Gupta, D.K.; Kishore, P.; Gupta, N. Circular Economy Fertilization: Phycoremediated Algal Biomass as Biofertilizers for Sustainable Crop Production. *J Environ Manage* **2021**, *287*, 112295, doi:10.1016/j.jenvman.2021.112295.
4. Yang, L.Y.; Zhou, S.Y.D.; Lin, C.S.; Huang, X.R.; Neilson, R.; Yang, X.R. Effects of Biofertilizer on Soil Microbial Diversity and Antibiotic Resistance Genes. *Science of the Total Environment* **2022**, *820*, 153170, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153170.
5. Acién Fernández, F.G.; Gómez-Serrano, C.; Fernández-Sevilla, J.M. Recovery of Nutrients From Wastewaters Using Microalgae. *Front Sustain Food Syst* **2018**, *2*, 1–13, doi:10.3389/fsufs.2018.00059.
6. Sniatala, B.; Kurniawan, T.A.; Sobotka, D.; Makinia, J.; Othman, M.H.D. Macro-Nutrients Recovery from Liquid Waste as a Sustainable Resource for Production of Recovered Mineral Fertilizer: Uncovering Alternative Options to Sustain Global Food Security Cost-Effectively. *Science of the Total Environment* **2023**, *856*, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.159283.
7. Pereira, A.S.A. de P.; Castro, J. de S.; Ribeiro, V.J.; Calijuri, M.L. Organomineral Fertilizers Pastilles from Microalgae Grown in Wastewater: Ammonia Volatilization and Plant Growth. *Science of the Total Environment* **2021**, *779*, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146205.
8. Ammar, E.E.; Aioub, A.A.A.; Elesawy, A.E.; Karkour, A.M.; Mouhamed, M.S.; Amer, A.A.; EL-Shershaby, N.A. Algae as Bio-Fertilizers: Between Current Situation and Future Prospective: The Role of Algae as a Bio-Fertilizer in Serving of Ecosystem. *Saudi J Biol Sci* **2022**, *29*, 3083–3096, doi:10.1016/j.sjbs.2022.03.020.
9. Ronga, D.; Biazzi, E.; Parati, K.; Carminati, D.; Carminati, E.; Tava, A. Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy* **2019**, *9*.
10. Del Buono, D. Can Biostimulants Be Used to Mitigate the Effect of Anthropogenic Climate Change on Agriculture? It Is Time to Respond. *Science of the Total Environment* **2021**, *751*, 141763, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141763.
11. Tolisano, C.; Del Buono, D. Biobased: Biostimulants and Biogenic Nanoparticles Enter the Scene. *Science of the Total Environment* **2023**, *885*, 163912, doi:10.1016/j.scitotenv.2023.163912.
12. Del Buono, D.; Regni, L.; Proietti, P. Abiotic Stresses, Biostimulants and Plant Activity. *Agriculture (Switzerland)* **2023**, *13*, 4–8, doi:10.3390/agriculture13010191.
13. Drobek, M.; Frac, M.; Cybulska, J. Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress—a Review. *Agronomy* **2019**, *9*, doi:10.3390/agronomy9060335.
14. Trends-of-Applied-Microbiology-for-Sustainable-Economy.
15. Behera, B.; Venkata Supraja, K.; Paramasivan, B. Integrated Microalgal Biorefinery for the Production and Application of Biostimulants in Circular Bioeconomy. *Bioresour Technol* **2021**, *339*, 125588, doi:10.1016/j.biortech.2021.125588.
16. Naik, K.; Mishra, S.; Srichandan, H.; Singh, P.K.; Sarangi, P.K. Plant Growth Promoting Microbes: Potential Link to Sustainable Agriculture and Environment. *Biocatal Agric Biotechnol* **2019**, *21*, 101326, doi:10.1016/j.bcab.2019.101326.
17. Barros-Rodríguez, A.; Rangseekaew, P.; Lasudee, K.; Pathom-aree, W.; Manzanera, M. Regulatory Risks Associated with Bacteria as Biostimulants and Biofertilizers in the Frame of the European Regulation (EU) 2019/1009. *Science of the Total Environment* **2020**, *740*, 140239, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140239.
18. Stirk, W.A.; Bálint, P.; Vambe, M.M.; Kulkarni, M.G.; van Staden, J.; Ördög, V. Effect of Storage on Plant Biostimulant and Bioactive Properties of Freeze-Dried Chlorella Vulgaris Biomass. *J Appl Phycol* **2021**, *33*, 3797–3806, doi:10.1007/s10811-021-02596-9.
19. Braun, J.C.A.; Colla, L.M. Use of Microalgae for the Development of Biofertilizers and Biostimulants. *Bioenergy Res* **2023**, *16*, 289–310.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

20. Cao, T.N.D.; Mukhtar, H.; Le, L.T.; Tran, D.P.H.; Ngo, M.T.T.; Pham, M.D.T.; Nguyen, T.B.; Vo, T.K.Q.; Bui, X.T. Roles of Microalgae-Based Biofertilizer in Sustainability of Green Agriculture and Food-Water-Energy Security Nexus. *Science of the Total Environment* **2023**, *870*.
21. Chittora, D.; Meena, M.; Barupal, T.; Swapnil, P. Cyanobacteria as a Source of Biofertilizers for Sustainable Agriculture. *Biochem Biophys Rep* **2020**, *22*.
22. Sierra-López, L.D.; Hernandez-Tenorio, F.; Marín-Palacio, L.D.; Giraldo-Estrada, C. Coffee Mucilage Clarification: A Promising Raw Material for the Food Industry. *Food and Humanity* **2023**, *1*, 689–695, doi:10.1016/j.foohum.2023.07.019.
23. Morillas-España, A.; Ruiz-Nieto, Á.; Lafarga, T.; Acién, G.; Arbib, Z.; González-López, C. V. Biostimulant Capacity of Chlorella and Chlamydomonium Species Produced Using Wastewater and Centrate. *Biology (Basel)* **2022**, *11*, doi:10.3390/biology11071086.
24. Behera, B.; Venkata Supraja, K.; Paramasivan, B. Integrated Microalgal Biorefinery for the Production and Application of Biostimulants in Circular Bioeconomy. *Bioresour Technol* **2021**, *339*, 125588, doi:10.1016/j.biortech.2021.125588.
25. Kapoore, R.V.; Wood, E.E.; Llewellyn, C.A. Algae Biostimulants: A Critical Look at Microalgal Biostimulants for Sustainable Agricultural Practices. *Biotechnol Adv* **2021**, *49*.
26. Marcel, Y.A.; Nadège, A.A.; Agossou, P.N.; Olaréwadjou, A.; Adolphe, A.; Lamine, B.-M. Bioformulations Based on Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agriculture: Biofertilizer or Biostimulant? *Afr J Agric Res* **2021**, *17*, 1256–1260, doi:10.5897/ajar2021.15756.
27. Paradiković, N.; Teklić, T.; Zeljković, S.; Lisjak, M.; Špoljarević, M. Biostimulants Research in Some Horticultural Plant Species—A Review. *Food Energy Secur* **2019**, *8*.
28. Mahmud, M.S.; Chong, K.P. Formulation of Biofertilizers from Oil Palm Empty Fruit Bunches and Plant Growth-Promoting Microbes: A Comprehensive and Novel Approach towards Plant Health. *J King Saud Univ Sci* **2021**, *33*, 101647, doi:10.1016/j.jksus.2021.101647.
29. Bargaz, A.; Lyamlouli, K.; Chtouki, M.; Zeroual, Y.; Dhiba, D. Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System. *Front Microbiol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.01606.
30. Namasivayam, S.K.R.; Saikia, S.L.; Bharani, R.S.A. Evaluation of Persistence and Plant Growth Promoting Effect of Bioencapsulated Formulation of Suitable Bacterial Biofertilizers. *Biosci Biotechnol Res Asia* **2014**, *11*, 407–415, doi:10.13005/bbra/1289.
31. Mącik, M.; Gryta, A.; Frąc, M. Biofertilizers in Agriculture: An Overview on Concepts, Strategies and Effects on Soil Microorganisms. *Advances in Agronomy* **2020**, *162*, 31–87, doi:10.1016/bs.agron.2020.02.001.
32. Gopal, S.; Baby, A. Enhanced Shelf-Life of Azospirillum and Psb Through. *International Journal of Science, Environment ISSN 2278-3687 (O) and Technology* **2016**, *5*, 2023–2029.
33. Mousa, M.; Allouzi, A.; Mousa, S.; Allouzi, A.; Xiang, Z.; Vimala, C.; Singh, A.; Chong, S. Heliyon Liquid Biofertilizers as a Sustainable Solution for Agriculture. *Heliyon* **2023**, *8*, e12609, doi:10.1016/j.heliyon.2022.e12609.
34. Lee, S.; Lur, H.; Lo, K.; Cheng, K. Evaluation of the Effects of Different Liquid Inoculant Formulations on the Survival and Plant-Growth-Promoting Efficiency of Rhodospseudomonas Palustris Strain PS3. *Appl Microbiol Biotechnol* **2016**, doi:10.1007/s00253-016-7582-9.
35. Arora, N.K.; Mehnaz, S.; Balestrini, R. *Preface*; 2016; ISBN 9788132227793.
36. Brar, S.K.; Verma, M.; Tyagi, R.D.; Valéro, J.R. Recent Advances in Downstream Processing and Formulations of Bacillus Thuringiensis Based Biopesticides. *Process Biochemistry* **2006**, *41*, 323–342, doi:10.1016/j.procbio.2005.07.015.
37. Muñoz, J.; Alfaro, C. Avances En La Formulación de Emulsiones. **2007**, *3495*, 64–73.
38. Hernandez-Tenorio, F.; Miranda, A.M.; Rodríguez, C.A.; Giraldo-Estrada, C.; Sáez, A.A. Potential Strategies in the Biopesticide Formulations: A Bibliometric Analysis. *Agronomy* **2022**, *12*, 2665, doi:10.3390/agronomy12112665.
39. Vandergheynst, J.; Scher, H.; Guo, H. Water-in-Oil Emulsions That Improve the Storage and Delivery of the Biolavicide Lagenidium Giganteum. **2007**, *207–229*, doi:10.1007/s10526-006-9021-9.
40. Pavela, R.; Benelli, G.; Pavoni, L.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Cianfagione, K.; Bajalan, I.; Reza, M.; Lupidi, G.; Romano, D.; et al. Industrial Crops & Products Microemulsions for Delivery of Apiaceae Essential Oils — Towards Highly Effective and Eco-Friendly Mosquito Larvicides ? *Ind Crops Prod* **2019**, *129*, 631–640, doi:10.1016/j.indcrop.2018.11.073.
41. Lucia, A.; Guzmán, E. Jo Ur Na I P Re. *Adv Colloid Interface Sci* **2020**, *102330*, doi:10.1016/j.cis.2020.102330.
42. Vandergheynst, J.; Dooley, T.; Guo, H.; Scher, H.; Cheng, Y. Storage and Release of Solutes and Microalgae from Water-in-Oil Emulsions Stabilized by Silica Nanoparticles. **2010**, *45*, 1–6, doi:10.1016/j.procbio.2009.07.021.
43. Tadros, T.F. Emulsion Formation , Stability , and Rheology. **2013**.
44. Kumar, A.; Raman, Y.; Venkataramani, D.; Bhagwat, S.; Martin, T.; Clark, P.E.; Aichele, C.P. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Emulsion Stability of Surfactant and Solid Stabilized Water-in-Oil Emulsions



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

after Hydrate Formation and Dissociation. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2016**, 506, 607–621, doi:10.1016/j.colsurfa.2016.06.042.

45. Rezaul, M.; Shishir, I.; Xie, L.; Sun, C.; Zheng, X. Food Technology and Equipment , Key Laboratory for Agro-Products Postharvest Handling. *Trends Food Sci Technol* **2018**, doi:10.1016/j.tifs.2018.05.018.
46. Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S. Procedia Food Science An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications. **2011**, 00, doi:10.1016/j.profoo.2011.09.266.
47. Mcclements, D.J. Delivery by Design (DbD): A Standardized Approach to the Development of Efficacious Nanoparticle- and Microparticle-Based Delivery Systems. **2017**, 00, 1–20, doi:10.1111/1541-4337.12313.
48. Vieira, M. V; Pastrana, L.M.; Fuciños, P. Microalgae Encapsulation Systems for Food , Pharmaceutical and Cosmetics Applications. **2020**.
49. John, R.P.; Tyagi, R.D.; Brar, S.K.; Surampalli, R.Y.; Prévost, D. Bio-Encapsulation of Microbial Cells for Targeted Agricultural Delivery. *Crit Rev Biotechnol* **2011**, 31, 211–226, doi:10.3109/07388551.2010.513327.
50. Tong, C.Y.; Derek, C.J.C. Science of the Total Environment Bio-Coatings as Immobilized Microalgae Cultivation Enhancement : A Review. *Science of the Total Environment* **2023**, 887, 163857, doi:10.1016/j.scitotenv.2023.163857.
51. Sahu, P.K.; Brahmaprakash, G.P. Formulations of Biofertilizers –. **2016**, 179–198, doi:10.1007/978-81-322-2644-4.
52. Fang, Z. Encapsulation of Polyphenols e a Review. *Trends Food Sci Technol* **2010**, 21, 510–523, doi:10.1016/j.tifs.2010.08.003.
53. Vasilieva, S.; Shibzukhova, K.; Morozov, A.; Solovchenko, A.; Bessonov, I.; Kopitsyna, M.; Lukyanov, A.; Chekanov, K.; Lobakova, E. Immobilization of Microalgae on the Surface of New Cross-Linked Polyethylenimine-Based Sorbents. *J Biotechnol* **2018**, 281, 31–38, doi:10.1016/j.jbiotec.2018.03.011.
54. Bakry, A.M.; Abbas, S.; Ali, B.; Majeed, H.; Abouelwafa, M.Y.; Mousa, A.; Liang, L. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2016**, 15, 143–182, doi:10.1111/1541-4337.12179.
55. Martínez Rivas, C.J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q.A.; Galindo Rodríguez, S.A.; Román, R.Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery. *Int J Pharm* **2017**, 532, 66–81, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.08.064.
56. Mansour, H.M.; Sohn, M.J.; Al-Ghananeem, A.; DeLuca, P.P. Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects. *Int J Mol Sci* **2010**, 11, 3298–3322, doi:10.3390/ijms11093298.
57. Sengar, R.S.; Singh, A. Bioformulation and Fluid Bed Drying: A New Approach Towards an Improved Biofertilizer Formulation. *Eco-friendly Agro-biological Techniques for Enhancing Crop Productivity* **2018**, 1–282, doi:10.1007/978-981-10-6934-5.
58. Berninger, T.; González López, Ó.; Bejarano, A.; Preininger, C.; Sessitsch, A. Maintenance and Assessment of Cell Viability in Formulation of Non-Sporulating Bacterial Inoculants. *Microb Biotechnol* **2018**, 11, 277–301, doi:10.1111/1751-7915.12880.
59. Rai, P.K.; Rai, A.; Sharma, N.K.; Singh, T.; Kumar, Y. Limitations of Biofertilizers and Their Revitalization through Nanotechnology. *J Clean Prod* **2023**, 418.
60. Kumari, R.; Singh, D.P. Nano-Biofertilizer: An Emerging Eco-Friendly Approach for Sustainable Agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences* **2020**, 90, 733–741.
61. Thirugnanasambandan, T. *Advances and Trends in Nano-Biofertilizers*;
62. Sharma, B.; Tiwari, S.; Kumawat, K.C.; Cardinale, M. Nano-Biofertilizers as Bio-Emerging Strategies for Sustainable Agriculture Development: Potentiality and Their Limitations. *Science of the Total Environment* **2023**, 860, 160476, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.160476.
63. Coppens, J.; Grunert, O.; Van Den Hende, S.; Vanhoutte, I.; Boon, N.; Haesaert, G.; De Gelder, L. The Use of Microalgae as a High-Value Organic Slow-Release Fertilizer Results in Tomatoes with Increased Carotenoid and Sugar Levels. *J Appl Phycol* **2016**, 28, 2367–2377, doi:10.1007/s10811-015-0775-2.
64. Renuka, N.; Guldhe, A.; Prasanna, R.; Singh, P.; Bux, F. Microalgae as Multi-Functional Options in Modern Agriculture: Current Trends, Prospects and Challenges. *Biotechnol Adv* **2018**, 36, 1255–1273, doi:10.1016/j.biotechadv.2018.04.004.
65. Paudel, Y.; Pradhan, S. Role of Blue Green Algae in Rice Productivity. *Agriculture and Biology Journal of North America* **2012**, 3, 332–335, doi:10.5251/abjna.2012.3.8.332.335.
66. Shalaby, T.A.; El-Ramady, H. Effect of Foliar Application of Bio-Stimulants on Growth, Yield, Components, and Storability of Garlic (*Allium Sativum* L.). *Aust J Crop Sci* **2014**, 8, 271–275.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

67. Zhang, Z.; Xu, M.; Fan, Y.; Zhang, L.; Wang, H. Using Microalgae to Reduce the Use of Conventional Fertilizers in Hydroponics and Soil-Based Cultivation. *Science of the Total Environment* **2024**, *912*, doi:10.1016/j.scitotenv.2023.169424.
68. Zhou, L.; Liu, W.; Duan, H.; Dong, H.; Li, J.; Zhang, S.; Zhang, J.; Ding, S.; Xu, T.; Guo, B. Improved Effects of Combined Application of Nitrogen-Fixing Bacteria *Azotobacter Beijerinckii* and Microalgae *Chlorella Pyrenoidosa* on Wheat Growth and Saline-Alkali Soil Quality. *Chemosphere* **2023**, *313*, doi:10.1016/j.chemosphere.2022.137409.
69. Singh, A.K.; Singh, A.P.; Gaurav, N.; Srivastava, A.; Kumar, A. *A Review on Blue Green Algae as Biofertilizer (Site Characteristics, Location and Boundaries of Vindhya Basin, Geology of Rewa, Physiography, Climatology)*; 2016; Vol. 1;.
70. Dineshkumar, R.; Duraimurugan, M.; Sharmiladevi, N.; Lakshmi, L.P. Microalgal Liquid Biofertilizer and Biostimulant Effect on Green Gram (*Vigna Radiata* L) an Experimental Cultivation. **2020**.
71. Bello, A.S.; Saadaoui, I.; Ben-Hamadou, R. "Beyond the Source of Bioenergy": Microalgae in Modern Agriculture as a Biostimulant, Biofertilizer, and Anti-Abiotic Stress. *Agronomy* **2021**, *11*, doi:10.3390/agronomy11081610.
72. Garcia-Gonzalez, J.; Sommerfeld, M. Biofertilizer and Biostimulant Properties of the Microalga *Acutodesmus Dimorphus*. *J Appl Phycol* **2016**, *28*, 1051–1061, doi:10.1007/s10811-015-0625-2.
73. Zhang, J.; Wang, X.; Zhou, Q. Co-Cultivation of *Chlorella* Spp and Tomato in a Hydroponic System. *Biomass Bioenergy* **2017**, *97*, 132–138, doi:10.1016/j.biombioe.2016.12.024.
74. El Arroussi, H.; Benhima, & R.; Elbaouchi, A.; Sijilmassi, & B.; El Mernissi, & N.; Aafsar, & A.; Meftah-Kadmiri, I.; Bendaou, & N.; Smouni, & A. 6TH CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR APPLIED PHYCOLOGY *Dunaliella Salina* Exopolysaccharides: A Promising Biostimulant for Salt Stress Tolerance in Tomato (*Solanum Lycopersicum*). *J Appl Phycol* **2018**.
75. Faheed, F.A. Effect of *Chlorella Vulgaris* as Bio-Fertilizer on Growth Parameters and Metabolic Aspects of Lettuce Plant. *ISSN OnlineAWB J. Agri. Soc. Sci* **2008**, *4*, 1813–2235.
76. Mutale-joan, C.; Redouane, B.; Najib, E.; Yassine, K.; Lyamlouli, K.; Laila, S.; Zeroual, Y.; Hicham, E.A. Screening of Microalgae Liquid Extracts for Their Bio Stimulant Properties on Plant Growth, Nutrient Uptake and Metabolite Profile of *Solanum Lycopersicum* L. *Sci Rep* **2020**, *10*, 1–12, doi:10.1038/s41598-020-59840-4.
77. Wuang, S.C.; Khin, M.C.; Chua, P.Q.D.; Luo, Y.D. Use of *Spirulina* Biomass Produced from Treatment of Aquaculture Wastewater as Agricultural Fertilizers. *Algal Res* **2016**, *15*, 59–64, doi:10.1016/j.algal.2016.02.009.
78. Godlewska, K.; Michalak, I.; Pacyga, P.; Baśladyńska, S.; Chojnacka, K. Potential Applications of Cyanobacteria: *Spirulina Platensis* Filtrates and Homogenates in Agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* **2019**, *35*, 1–18, doi:10.1007/s11274-019-2653-6.
79. Dmytryk, A.; Rój, E.; Wilk, R.; Chojnacka, K. Innowacyjne Biopreparaty Do Zaprawiania Nasion : Wstępna Ocena Właściwości Użytkowych w Początkowej Fazie Wzrostu Roślin. *Przemysł Chemiczny* **2014**, 959–963.
80. Michalak, I.; Chojnacka, K.; Dmytryk, A.; Wilk, R.; Gramza, M.; Rój, E. Evaluation of Supercritical Extracts of Algae as Biostimulants of Plant Growth in Field Trials. *Front Plant Sci* **2016**, *7*, 1–11, doi:10.3389/fpls.2016.01591.
81. Al-saman, M.A.; Farfour, S.A.; Hamouda, R.A. Effects of Some Red Algae on Antioxidant and Phytochemical Contents of Maize (*Zea Mays* L.) Plants. *International Journal of Agricultural Sciences ISSN* **2015**, *5*, 393–398.
82. Navarro-López, E.; Ruíz-Nieto, A.; Ferreira, A.; Gabriel Acien, F.; Gouveia, L. Biostimulant Potential of *Scenedesmus Obliquus* Grown in Brewery Wastewater. *Molecules* **2020**, *25*, 1–16, doi:10.3390/molecules25030664.
83. Barone, V.; Baglieri, A.; Stevanato, P.; Broccanello, C.; Bertoldo, G.; Bertaggia, M.; Cagnin, M.; Pizzeghello, D.; Moliterni, V.M.C.; Mandolino, G.; et al. Root Morphological and Molecular Responses Induced by Microalgae Extracts in Sugar Beet (*Beta Vulgaris* L.). *J Appl Phycol* **2018**, *30*, 1061–1071, doi:10.1007/s10811-017-1283-3.
84. Zhang, C.; Yu, X.; Laipan, M.; Wei, T.; Guo, J. Soil Health Improvement by Inoculation of Indigenous Microalgae in Saline Soil. *Environ Geochem Health* **2024**, *46*, doi:10.1007/s10653-023-01790-7.
85. Khan, S.A.; Sharma, G.K.; Malla, F.A.; Kumar, A.; Rashmi; Gupta, N. Microalgae Based Biofertilizers: A Biorefinery Approach to Phycoremediate Wastewater and Harvest Biodiesel and Manure. *J Clean Prod* **2019**, *211*, 1412–1419, doi:10.1016/j.jclepro.2018.11.281.
86. Ammar, E.E.; Aioub, A.A.A.; Elesawy, A.E.; Karkour, A.M.; Mouhamed, M.S.; Amer, A.A.; EL-Shershaby, N.A. Algae as Bio-Fertilizers: Between Current Situation and Future Prospective. *Saudi J Biol Sci* **2022**, *29*, 3083–3096, doi:10.1016/j.sjbs.2022.03.020.
87. Wuang, S.C.; Khin, M.C.; Chua, P.Q.D.; Luo, Y.D. Use of *Spirulina* Biomass Produced from Treatment of Aquaculture Wastewater as Agricultural Fertilizers. *Algal Res* **2016**, *15*, 59–64, doi:10.1016/j.algal.2016.02.009.
88. Perry/Hope Partners 2023 Global: Biofertilizers Market - Innovative Markets Forecast (2029) Report Available online: <https://www.marketresearch.com/PerryHope-Partners-v4032/Global-Biofertilizers-Innovative-Forecast-33730701/> (accessed on 28 October 2023).



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

89. Mordor Intelligence Biofertilizer Market Size & Share Analysis-Growth Trends & Forecasts up to 2029 Available online: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biofertilizers-market-industry> (accessed on 28 October 2023).
90. Sharma, N.K.; Tiwari, S.P.; Tripathi, K.; Rai, A.K. Sustainability and Cyanobacteria (Blue-Green Algae): Facts and Challenges. *J Appl Phycol* 2011, 23, 1059–1081.
91. Jose, S.; Renuka, N.; Ratha, S.K.; Kumari, S.; Bux, F. Microalgal Bioinoculants for Sustainable Agriculture and Their Interaction with Biotic and Abiotic Components of the Soil. *Pedosphere* 2023, doi:10.1016/j.pedsph.2023.12.002.
92. Gonçalves, A.L. The Use of Microalgae and Cyanobacteria in the Improvement of Agricultural Practices: A Review on Their Biofertilising, Biostimulating and Biopesticide Roles. *Applied Sciences (Switzerland)* 2021, 11, 1–21.
93. Credence Research Microalgae Fertilizers Market Available online: <https://www.credenceresearch.com/report/microalgae-fertilizers-market#summary> (accessed on 28 October 2023).
94. Future Market Insights Demand for Microalgae in Fertilizers Sector Outlook (2023 to 2033) Available online: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/microalgae-fertilizers-sector> (accessed on 28 October 2023).
95. Neoalgae Spiragro: El Fertilizante ECO Natural a Base de Spirulina Available online: <https://neoalgae.es/spiragro/> (accessed on 25 October 2023).
96. Biorizon Biobalance Available online: https://www.biorizon.es/productos_biorizon/biobalance/ (accessed on 25 October 2023).
97. Algenol Algae Product Development and Manufacturing Available online: <https://www.algenol.com/> (accessed on 25 October 2023).
98. Algaenergy Microalgae a Quality Raw Material With An Immense Potential Of Application Available online: <https://www.algaenergy.com/> (accessed on 25 October 2023).
99. Allmicroalgae Cultivating Sustainable Microalgae Solutions Available online: <https://www.allmicroalgae.com/en/> (accessed on 25 October 2023).
100. Ascenza Ascenza Cultivamos El Futuro Available online: <https://ascenza.com/es> (accessed on 25 October 2023).
101. Gexus Biosoluciones Para El Sector Agropecuario Available online: <https://www.gexus.com.mx/> (accessed on 25 October 2023).
102. TrueAlgae Revolutionizing Algae Available online: <https://truealgae.com/> (accessed on 25 October 2023).
103. Dębowski, M.; Zieliński, M.; Kazimierowicz, J.; Kujawska, N.; Talbierz, S. Microalgae Cultivation Technologies as an Opportunity for Bioenergetic System Development—Advantages and Limitations. *Sustainability (Switzerland)* 2020, 12, 1–37.
104. Gonçalves, J.; Freitas, J.; Fernandes, I.; Silva, P. Microalgae as Biofertilizers: A Sustainable Way to Improve Soil Fertility and Plant Growth. *Sustainability (Switzerland)* 2023, 15.

Participación en Eventos

En el presente informe se indican las actividades realizadas en los eventos que se participó en el año 2022

- “Curso de experto en procesos sostenibles basados en microalgas”, a realizarse en Almería, España, del 05 al 09 de setiembre de 2022,
- Pasantía en el Laboratorio del Dr. Francisco Gabriel Acien Fernández, en la Universidad de Almería, España, del 11 al 15 de setiembre de 2022
- Curso “Lisbon Microalgae Biotechnology Advanced Course (LiMBAC 2022)”, a realizarse en Lisboa, Portugal, del 18 al 23 de setiembre de 2022.

Donde se utilizando fondos del proyecto de investigación “Biorrefinería de microalgas: Desarrollo de un proceso integral sostenible para la producción de compuestos bioactivos a base de microalgas para la agricultura, ganadería y acuicultura” para cubrir los viáticos y pagar el costo del Curso de Portugal.

Curso de experto en procesos sostenibles basados en microalgas

El curso consistió en secciones magistrales y prácticas. Se dividió en 5 módulos y se finalizó con un Workshop

MÓDULO 1: Biología y principios básicos de los cultivos de microalgas

- La célula de microalgas
- Fotosíntesis y modelos cinéticos
- Técnicas básicas de cultivo y mantenimiento de microalgas
- Estequiometría y cinética de cultivos de microalgas
- Optimización del cultivo de microalgas en externo

Se realizaron sesiones prácticas de laboratorio sobre medidas de irradiancia lumínica, medidas de extinción de la fluorescencia de clorofila, tasa de fotosíntesis y eficiencia fotosintética.

MÓDULO 2: Fundamentos genéticos de la biotecnología de microalgas

- Plásmidos, promotores, genes *reporter*
- Métodos de transformación genética
- Tecnología CRISPR/Cas en cianobacterias

Las sesiones prácticas consistieron en prácticas sobre detección de plásmidos en cianobacterias, seminario práctico sobre CrispR-Cas y un seminario práctico sobre plásmidos SEVA.



MÓDULO 3: Fundamentos de fotobiorreactores de microalgas

- Fundamentos del diseño de fotobiorreactores
- Fluidodinámica y transferencia de masa en fotobiorreactores
- Transferencia de calor y cantidad de movimiento en fotobiorreactores

En la sesión práctica se realizaron experimentos en fotobiorreactores a escala piloto ubicados en el centro de investigación SABANA en el IFAPA. Se realizaron mediciones de las condiciones de cultivo en reactores de *raceway* y de capa fina cultivados con medios orgánicos y químicos, además, se analizó la variación de las condiciones de cultivo al modificar la transferencia de masa (aire/CO₂) en el reactor.

MÓDULO 4: Cosechado y procesado de biomasa de microalgas

- Cosechado de microalgas
- Disrupción celular
- Recuperación, extracción, aislamiento y purificación de productos de microalgas
- Concepto de biorrefinería de microalgas

En el laboratorio se cosechó biomasa de microalgas mediante centrifugación

MÓDULO 5: Procesos comerciales basados en microalgas

- Análisis técnico-económico de procesos basados en microalgas
- Productos nutraceuticos y de aplicación en salud humana
- Ingredientes alimentarios de microalgas
- Aplicaciones de microalgas en agricultura y alimentación animal, incluyendo acuicultura.
- Tratamiento de aguas residuales con microalgas

El módulo será impartido principalmente por expertos con experiencia industrial con los cuales participó de una mesa redonda para discutir las limitaciones en el desarrollo de procesos basados en microalgas.

El evento finalizó con un Workshop organizado por EMFF-ALGAENAUTS el cual se tituló MICROALGAE FOR BLUE-CIRCULAR ECONOMY PROCESSES

Las ponencias fueron:

- European Algae Biomass Association: Algae for sustainable blue economy (Vitor Verdhello, EABA)
- GreenCoLab: an initiative for the development of blue economy (Luisa Gouveia, GreenCoLab)
- Algae for more sustainable and healthy foods (Claudio Ledda, Livegreen)
- ALGAENAUTS EU PROJECT: Eco-friendly and sustainable new family of biopesticides based on microalgae via circular economy approach (Joaquín Pozo, Biorizon Biotech)
- REALM EU PROJECT: Reusing Effluents from Agriculture to unlock the potential of Microalgae (Joao Navalho, Necton)
- SABANA EU PROJECT: Successful case in Blue Growth Economy (Cintia Gómez, UAL)



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Cuadro 15 Resumen de actividades realizadas en el Curso de Experto en Procesos Sostenibles basados en Microalgas de la Universidad de Almería (España)

Fecha	Horario	Actividad
05/09/22	9:00-14:00	MÓDULO 1: Biología y principios básicos de los cultivos de microalgas
05/09/22	16:00-18:00	Visita a la Universidad de Almería
06/09/22	9:00-14:00	MÓDULO 2: Fundamentos genéticos de la biotecnología de microalgas
06/09/22	16:00-18:00	Reunión RENUWAL/Reunión RITAL
07/09/22	9:00-14:00	MÓDULO 3: Fundamentos de fotobiorreactores de microalgas
07/09/22	16:00-18:00	Visita a Biorizon Biotech SL y planta depuradora de aguas residuales de El Toyo
08/09/22	9:00-14:00	MÓDULO 4: Cosechado y procesado de biomasa de microalgas
08/09/22	16:00-19:00	MÓDULO 5: Procesos comerciales basados en microalgas
09/09/22	9:00-14:00	EMFF-ALGAENAUTS Workshop: MICROALGAE FOR BLUE-CIRCULAR ECONOMY



Figura 12 Certificado de Asistencia ya Aprovechamiento del Curso de Experto en Procesos Sostenibles basados en Microalgas de la Universidad de Almería (España)



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3



Pasantía de Investigación en la Universidad de Almería

La pasantía de investigación se realizó en la Universidad de Almería bajo la supervisión del Dr. Gabriel Acien. Este se realizó del 12 al 16 de setiembre del 2022. Durante esta pasantía de Investigación se pudo profundizar en el uso de sensores para el monitoreo de parámetros de cultivo como pH, Nivel el líquido, O₂ disuelto y Temperatura.

Se utilizó la tarjeta LabJack V12 como sistema de para incorporar sistemas de control y medición de parámetros.

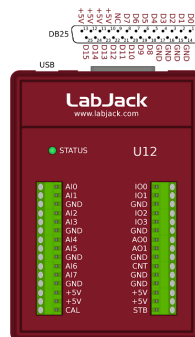


Figura 13 Tarjeta LabJack V12



Unidad de Gestión de Programas

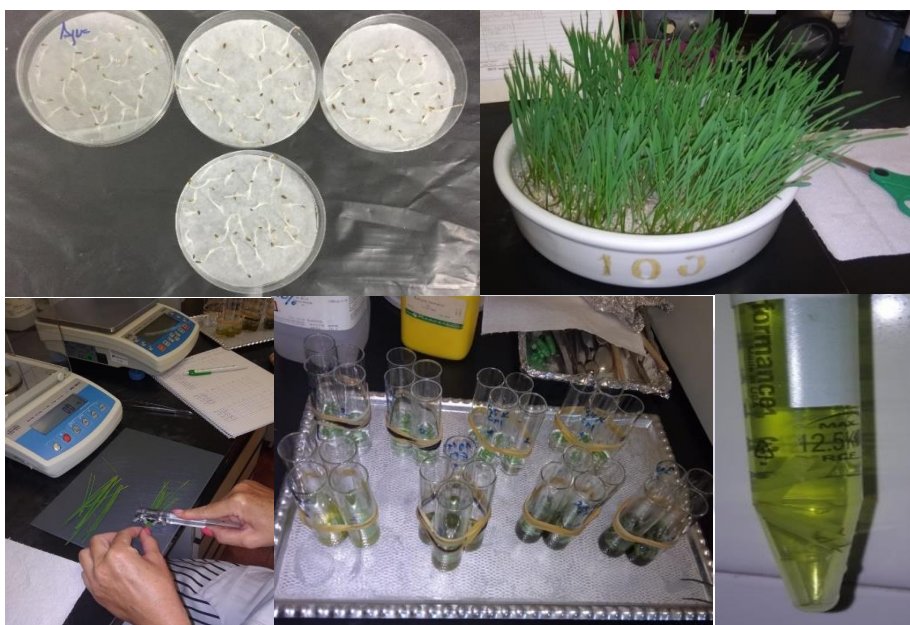
Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Además, se realizaron evaluaciones del potencial de microalgas como bioestimulante, para ello se realizaron los siguientes ensayos.

- Índice de germinación de berro (efecto giberelinas).
- Efecto de auxinas en crecimiento de raíces de soja.
- Efecto de citoquininas en el engrosamiento de cotiledones de pepino.
- Efecto de las citoquininas en el contenido de clorofilas en las hojas de trigo.





Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3

Curso Avanzado de Biotecnología de Microalgas de Lisboa (LIMBAC)

Se asistió al curso Avanzado de Biotecnología Microalgal organizado por A4f en Portugal, en el que se desarrollaron los temas de procesos industriales de Microalgas. Se contó con sesiones de laboratorio donde se analizaron colecciones de microalgas y técnicas de aislamiento de microalgas, y cultivos microalgales. También se tuvieron sesiones en la planta piloto de A4f donde se realizaron procesos de cosecha de microalgas y secado de Biomasa de Microalgas.

Se visitó las instalaciones de la empresa ALGATEC la cuenta con 14 hectáreas para el cultivo de microalgas.

El cronograma del curso fue el siguiente:

DEPARTURE HOTEL	DEPARTURE HOTEL	DEPARTURE HOTEL	DEPARTURE HOTEL	DEPARTURE HOTEL
ARRIVAL TO CAMPUS	ARRIVAL TO CAMPUS	ARRIVAL TO CAMPUS	ARRIVAL TO CAMPUS	ARRIVAL TO CAMPUS
REGISTRATION				
COURSE INTRODUCTION & PEOPLE PRESENTATION	LAB I - Environmental Microalgae Collection and Isolation Team ALPHA	PILOT PLANT I - Visit to Pilot plant and Harvesting of PBR Team OMEGA	ALGATEC'S SITE VISIT	LAB I - Environmental Microalgae Collection and Isolation Team OMEGA
COFFEE BREAK	COFFEE BREAK	COFFEE BREAK	COFFEE BREAK	COFFEE BREAK
I - MICROALGAE INDUSTRIALIZATION - Microalgae Biotechnology Industrial Archaeology to Commercial Production Vitor Vendelino, A4f - From Cell to Tons Luis Costa, A4f - Design of Microalgae Units & Light Impact Edgar Santos, A4f	LAB II - Tools for Contaminant Detection and Identification LAB III - Heterotrophic Growth Team ALPHA	PILOT PLANT II - Processing Culture Team OMEGA	IV - CIRCULAR ECONOMY - Algae Production as a CCU / CCS Mechanism Anaísa Pinto, A4f - SABANA Project: Demonstrating the Application of Microalgae in Agriculture and Aquaculture Gabriel Acián, University of Almería - Integrating Microalgae Production with Industrial Outputs Sara Bolanos, A4f	LAB II - Tools for Contaminant Detection and Identification LAB III - Heterotrophic Growth Team OMEGA
LUNCH	LUNCH	LUNCH	LUNCH	ALGAE LUNCH
II - MICROALGAE DSP - Harvesting Techniques Luis Costa, A4f - Biorefinery & Extraction Elson Gomes, Co-Lab BIOREF - Standardization and Analytical Methodologies Silvio Mangini, Archemade Recherche	LAB IV - Analysis of Cultures Team ALPHA	PILOT PLANT III - Drying of biomass Team OMEGA	V - MULTISTRAM WORKSHOP - Multi-stram biorefinery: what are the challenges Cristina Matos, A4f - Alternative process solutions Alberto Ruiz, IMEC - Membranes technology Jodie Crespo, IBET - Regulatory landscape Teresa Crespo, IBET	LAB II - Tools for Contaminant Detection and Identification LAB III - Heterotrophic Growth Team OMEGA
COFFEE BREAK	COFFEE BREAK	COFFEE BREAK	COFFEE BREAK	COFFEE BREAK
III - MICROALGAE GROWTH TOOLS - Growth tools: Productivity Assessment Liliana Rodóh, UNIF - Small Plants, Big Ideas: Delivering the Promise of Chlorella as a Mainstream Ingredient Andrew Spicer, Algenuity - Contaminants and Crop Protection Cafina Pereira, A4f - Algaepreneur - Tomar Natural - Spirulina Farm Ana Pereira, Tomar Natural	LAB V - Characterization of Biomass - Pigments Team ALPHA	PILOT PLANT IV - Preparation of PBR and inoculation Team OMEGA	V - MULTISTRAM WORKSHOP Case studies Group Activities	LAB IV - Analysis of Cultures Team OMEGA
				DEPARTURE FROM CAMPUS



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3



Figura 14 Certificado de participación del curso LIMBAC 2022



A4F-Algae for Future

15.542 seguidores

8 meses •

#LIMBAC Day#1 | The 4th edition of LiMBAC (Lisbon Microalgae Biotechnology Advanced Course) started this morning, at A4F in Lisbon, gathering more than 30 participants and 23 renowned guest speakers, coming from 16 countries.

The reputation built and the educational value of this advanced course promoted by A4F, a Portuguese biotechnological company recognized as an international reference in the microalgae sector, are well reflected on the total number of participants. They come from so diversified origins, such as Germany, UK, Sweden, Latvia, Morocco, Egypt, Saudi Arabia, Colombia or Costa Rica, just to mention a few examples.

"This initiative aims at familiarizing participants, working for startups as well as for commonly known companies, with the most advanced concepts of microalgae cultivation, paying special attention to scale-up processes, large scale cultivation and downstream processing", explains **Vitor Verdelho**, co-founder and Board Member of A4F, and Managing Director of EABA, the association that represents the algae sector in Europe.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3



A4F-Algae for Future

15,542 seguidores
8 meses

#LIMBAC, Day 2 | Participants to the Lisbon Microalgae Biotechnology Advanced Course had a second day fully dedicated to hands-on practical sessions, at the A4F's Innovation Lab and Experimental Unit, the right place to learn about microalgae production.

"With the uniquely practical and straightforward approach proposed by the LIMBAC, participants were able to learn in more detail the procedures related to microalgae cultivation", says Sara Badenes, Head of the Innovation Center of A4F.

In fact, participants enjoyed today's experience at Lab. Eliana Gasparotto (Italy) comments: "I came here to learn as much as possible about the world of microalgae and I am really learning it. This day at the Lab taught me how to use the right equipment and will be very useful to my career".

[Ver traducción](#)

61

2 comentarios • 4 veces compartido



A4F-Algae for Future

15,542 seguidores
8 meses

#LIMBAC - Day 3 | The Lisbon Microalgae Biotechnology Advanced Course has been offering exciting and diversified topics to participants. This morning, the journey started with the exclusive opportunity to visit the ALGATEC Eco Business Park, the largest microalgae production platform in Europe. Lectures on Circular Economy, more concretely on the integration of microalgae production with industrial outputs, took afterwards the agenda.

Afternoon sessions took the format of a workshop dedicated to Multi-Str3am, a project that aims to build a sustainable multi-strain, multi-method, multi-product microalgae biorefinery, integrating industrial side streams, to create high-value products for food, feed and fragrance.

Participants learned useful insights from Cristina Matos (A4F), Alberto Reis (LNEG), Carla Brazinha (IBET) and Teresa Crespo (IBET) on technologies applied to microalgae biorefineries and became aware of the developments performed by A4F and partners.

"This advanced course is well structured and achieved, and group exercises are excellent in facilitating the interaction between participants and trainers", says Alberto Reis, PhD in Biochemical Engineering,



A4F-Algae for Future

15,542 seguidores
8 meses

#LIMBAC - Day 4 | Participants to the fourth edition of the Lisbon Microalgae Biotechnology Advanced Course had a second learning day devoted to hands-on practical sessions, at the A4F's Innovation Lab and Experimental Unit.

Pedro Cardoso, Pilot Unit Manager at A4F, describes the experience offered today to the LIMBAC's attendees:

"We had the opportunity to demonstrate all the critical stages to get to the desired output. We went from the microalgae inoculation in a tubular PBR to the centrifugation processing and final drying, different steps allowing us to move from the laboratory liquid microalgae culture to a powdered final product."

Feeling enriched by this fully immersive course, participants and lecturers were gifted with a very special evening: a guided visit and social dinner at the MAAT - Museum of Art, Architecture and Technology, one of Lisbon's modern icons.



Unidad de Gestión de Programas

Formulario de informe final para beneficiarios de Proyectos del Fondo de Incentivos

Fecha de actualización: 26/02/2024

Versión 3



Fuente: <https://www.linkedin.com/company/algafuel-s-a>





Logros alcanzados

Se logró participar en 3 eventos, dos curso internacionales y una pasantía, optimizando el uso de recursos Institucionales. En los eventos que se participó se tuvo la oportunidad de adquirir conocimientos en el área de la Biotecnología Microalgal los cuales se han implementado en los cultivos de microalgas del ITCR.

Además, se generaron contactos internacionales con los que se ha trabajado en los últimos meses para la búsqueda de fondos, pasantías y proyectos en conjunto.





Difusión

Se ofreció la charla Titulada Biorrefinería de Microalgas, la cual se brindó en distintas plataformas con un alcance de más de 400 visualizaciones

<https://www.youtube.com/watch?v=kh0BqmG08so>

YouTube

Buscar

BIORREFINERÍA DE MICROALGAS

Charla modalidad híbrida

Presentador:
Fabian Villalta Romero

TEC | Tecnológico de Costa Rica

PELTEC

0:02 / 50:40

Contexto

Cambio climático

United Nations

El cambio climático se refiere a los cambios a largo plazo de las temperaturas y los patrones climáticos. Las actividades humanas han sido el principal motor del cambio climático, debido principalmente a la quema de combustibles fósiles como el carbón, el petróleo y el gas.

Biorrefinería de Microalgas

Tecnológico de Costa Rica

9,97 K suscriptores

Suscribirse

23

Compartir

Descargar

Clip

Guardar

425 Visualizaciones Emitido en directo el 15 ago 2023

Los cultivos de microalgas permiten producir biomasa con múltiples aplicaciones, estas pueden ser utilizadas como materia prima para la obtención de compuestos bioactivos o fuente de energía renovable. Para ello se requiere implementar una serie de procesos unitarios para transformar la biomasa en diferentes productos finales tales como biogás, bioetanol, biofertilizantes, suplementos para alimentación animal y pigmentos.

Conozca más de estos procesos en esta charla, con el PhD. Fabian Villalta Romero.

Esta actividad forma parte del ciclo de charlas del Programa de Energías Limpias del TEC (PELTEC). Conozca más en: <https://www.tec.ac.cr/programa-invest...>

Charlas: Programa de Energías Limpias del TEC

Transcripción

Sigue la transcripción para no perderte nada.

Mostrar transcripción

Tecnológico de Costa Rica

9,97 K suscriptores

Videos

Información

Mostrar menos