

# INFORME FINAL DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

**NanoBiofertilizantes: Uso de arcillas en la preparación de  
Emulsiones de Pickering para formulados agrícolas a partir  
de biomasa microalgal de Arthrospira máxima**

## Documento 1

Escuela de Biología

Investigador coordinador:

Dr. Fabián Gilberto Villalta Romero

Investigadores colaboradores

Ing. Francinie Murillo Vega

M.Sc. Mauricio Chicas Romero

Lic. Alejandro Medaglia Mata

## 1 Tabla de contenido

1	Tabla de contenido .....	2
2	Tabla de Figuras .....	5
3	Código y Título del proyecto .....	7
4	Autores y direcciones .....	7
5	Resumen .....	8
6	Palabras clave .....	8
7	Introducción .....	9
8	Marco Teórico .....	10
9	Metodología .....	14
9.1	Establecer un prototipo de sistema para el cultivo microalgal de <i>Arthrospira maxima</i> en biorreactores de capa fina.....	14
9.1.1	Diseñar un sistema integrado de cultivo de <i>Arthrospira máxima</i> usando un sistema de capa fina. ....	14
9.1.2	Realizar cultivos microalgales empleando aguas residuales de sistemas agropecuarios y agroalimentarios .....	14
9.1.3	Realizar procesos de secado y molienda de las microalgas.....	14
9.1.4	Rotura celular por método de ultrasonicación, homogenización e hidrólisis enzimática. ....	14
9.2	Establecer un protocolo de formulación de Nanobiofertilizantes a base de microalgas por medio de emulsiones Pickering estabilizadas con arcillas.....	15
9.2.1	Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y caracterización fisicoquímica. ....	15
9.2.2	Caracterizar la biomasa microalga y el nanobiofertilizante por resonancia magnética, espectroscópica, microscópica y reológica .....	16
9.2.3	Caracterizar el fluido de la de la biomasa microalga y el nanobiofertilizante con ruptura, tales como: la viscosidad, estabilidad, tipo de fluido y tamaño de gota ...	16
9.3	Determinar el efecto de las formulaciones de nanobiofertilizantes en el rendimiento agronómico (cultivo de piña) y en las comunidades microbianas del suelo asociadas al cultivo.	

9.3.1	Realizar las aplicaciones de los nanobiofertilizantes a cultivos de piña y evaluar su efecto en desarrollo de la planta. ....	17
9.3.2	Analizar y comparar la composición de las comunidades microbianas del suelo cuando se aplica en nanobiofertilizante a base de microalgas.....	19
10	Resultados .....	21
10.1	Establecer un prototipo de sistema para el cultivo microalgal de <i>Arthrospira maxima</i> en biorreactores de capa fina.....	21
10.1.1	Diseñar un sistema integrado de cultivo de <i>Arthrospira máxima</i> usando un sistema de capa fina.....	21
10.1.2	Realizar cultivos microalgales empleando aguas residuales de sistemas agropecuarios y agroalimentarios .....	21
10.1.3	Realizar procesos de secado y molienda de las microalgas.....	22
10.1.4	Rotura celular por método de ultrasonicación, homogenización e hidrólisis enzimática.....	24
10.2	Establecer un protocolo de formulación de Nanobiofertilizantes a base de microalgas por medio de emulsiones Pickering estabilizadas con arcillas.....	26
10.2.1	Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y caracterización fisicoquímica .....	26
10.2.2	Caracterizar la biomasa microalga y el nanobiofertilizante por resonancia magnética, espectroscópica, microscópica y reológica .....	27
10.2.3	Caracterizar el fluido de la de la biomasa microalga y el nanobiofertilizante con ruptura, tales como: la viscosidad, estabilidad, tipo de fluido y tamaño de gota ...	32
10.3	Determinar el efecto de las formulaciones de nanobiofertilizantes en el rendimiento agronómico (cultivo de piña) y en las comunidades microbianas del suelo asociadas al cultivo.	
	34	
10.3.1	Realizar las aplicaciones de los nanobiofertilizantes a cultivos de piña y evaluar su efecto en desarrollo de la planta. ....	34
10.3.2	Analizar y comparar la composición de las comunidades microbianas del suelo cuando se aplica en nanobiofertilizante a base de microalgas.....	36
11	Discusión.....	41

12	Conclusiones y recomendaciones.....	43
13	Referencias .....	44
14	Anexos.....	46

## 2 Tabla de Figuras

Figura 1 Raceway capa fina para el cultivo de <i>A. máxima</i> : A) Cultivo de 10 mil litros y B) cultivo de 100 L.....	21
Figura 2 Curva de crecimiento de <i>A. maxima</i> en vacaza.....	22
Figura 3 Curva de crecimiento de <i>A. maxima</i> en el estanque con medio industrial.....	22
Figura 4 Curva de secado de las Biomasa de <i>A. maxima</i> a diferentes temperaturas .....	23
Figura 5 Evaluación del contenido de ácidos nucleicos en el sobrenadante de muestras sonicadas a diferentes tiempos .....	24
Figura 6Evaluación del contenido de proteína en el sobrenadante de muestras sonicadas a diferentes tiempo .....	24
Figura 7 Liberación de ácido nucleico a biomasas tratadas con TCH: <i>Trichoderma Hazcianum</i> , BAS: <i>Bascillus subtilis</i> y ENZ: coctel enzimático.....	24
Figura 8 Liberación de proteínas de biomasas tratadas con TCH: <i>Trichoderma Hazcianum</i> , BAS: <i>Bascillus subtilis</i> y ENZ: coctel enzimático.....	25
Figura 4 Imagen de microscopia electrónica TEM A) <i>Arthrospira máxima</i> hidrolizada, magnificación 1,0K B) <i>Arthrospira máxima</i> , magnificación x 800.....	26
Figura 10 Espectro de aminoácidos identificados mediante espectrometría de masas para el hidrolizado de microalgas: A) Alanina, B) arginina, C) Ácido aspártico, D) glutamina, E) ácido glutámico, F) leucina/isoleucina, G) lisina, H) prolina, I) serina, J) treonina, K) triptofano, L) tirosina, M) valina, N)asparagina, y Ñ) fenilalanina.....	28
Figura 11 Espectros infrarrojos de las arcillas bentonita y caolin que se usarán para la formulación de los nanobiofertilizantes .....	29
Figura 12 Espectro de difracción de rayos X de las arcillas que se utilizarán para formular los biofertilizantes.....	30
Figura 13 Imagen de microscopía electrónica de arcillas .....	31
<i>Figura 14 Reducción del tamaño de partículas de las arcillas bentonita y caolin .....</i>	<i>32</i>
Figura 15 Barrido de formulación acorde a la salinidad empleando proporciones 50:50 aceite:agua, 0,5% arcilla. A los 8 días 1. Control 2. Adición NaCl 3. Adición NaCl y ajuste de pH 4. Adición KNO <sub>3</sub> 5. Adición KNO <sub>3</sub> y ajuste de pH. A) Barrido de formulación con bentonita B) Barrido de formulación con caolin. C) Muestra 4B D) Muestra 5B. ....	33

Figura 16 Barrido de formulación acorde a porcentaje arcilla empleando proporciones 50:50 aceite:agua, y KNO <sub>3</sub> . A los 8 días <b>1.</b> 0,5% bentonita <b>2.</b> 0,75% bentonita. <b>3.</b> 1,0% bentonita. A) Barrido de formulación B) Muestra 2B. C) Muestra 3B. D) Muestra 3B .....	33
Figura 17 Barrido de formulación a porcentaje arcilla empleando proporciones 50:50 aceite:agua. <b>1.</b> 0,5% caolin <b>2.</b> 1.0% caolin. <b>3.</b> 1,5% caolin <b>4.</b> 2,0% caolin <b>5.</b> 2,5% caolin A) Barrido de formulación B) Muestra 3C. Magnificación 10X C) Muestra 4C. D) Muestra 5C.	33
Figura 18 Campo de cultivo para la evaluación de las formulaciones de microalgas .....	34
Figura 19 Evaluación del efecto de diferentes formulaciones de microalgas y dosis en el peso seco promedio de la hoja D de piña .....	34
Figura 20 Evaluación del efecto de diferentes formulaciones de microalgas y dosis en el peso seco promedio de la planta de piña .....	35
Figura 21 Evaluación del efecto de diferentes formulaciones de microalgas y dosis en el peso fresco promedio de los frutos de piña .....	35
Figura 22 Evaluación del efecto de diferentes formulaciones de microalgas y dosis en los grados Brix promedio de los frutos de piña.....	36
Figura 23 Análisis de ordenamiento de Coordenada Principales (PCoA) visualizado por inicio (abril) y final del experimento (octubre) de la comunidad de bacterias obtenida por secuenciación de amplicones de la región 16S rRNA.....	36
Figura 24 Análisis de ordenamiento de Coordenada Principales (PCoA) visualizado por tratamiento (formulado) y concentración del formulado, de la comunidad de bacterias al final del experimento .....	37
Figura 25 Análisis de ordenamiento de Coordenada Principales (PCoA) visualizado por tratamiento (formulado) y concentración del formulado de la comunidad de bacterias obtenida por secuenciación de amplicones de la región 16S rRNA. ....	37
Figura 26 Diversidad alfa expresada con el índice de Shannon de las comunidades bacterianas para 4 tratamientos de microalgas.....	38
Figura 27 Abundancia relativa de la comunidad de bacterias al nivel al inicio (abril) y al final (octubre) de experimento. ....	39
Figura 28 Análisis de prevalencia (LEFse) de los géneros con mayor presencia en cada uno de los tratamientos al final del experimento. Los colores rojo y naranja significan prevalencia alta	

y media-alta, respectivamente. Los colores celeste y azul son de prevalencia baja-media y baja, respectivamente. .... 40

Figura 29 Análisis de abundancia relativa a nivel de filo en cada uno de los tratamientos y concentraciones del experimento. .... 40

### 3 Código y Título del proyecto

Código: 1510131

Título: NanoBiofertilizantes: Uso de arcillas en la preparación de Emulsiones de Pickering para formulados agrícolas a partir de biomasa microalgal de *Arthrospira máxima*

### 4 Autores y direcciones

Indicar nombre completo de los y las participantes del proyecto, incluyendo el grado académico. Debe especificarse la coordinación.

Nombre	Escuela	Correo Electrónico
Dr. Fabián Villalta Romero	Biología	fvillalta@itcr.ac.cr
Ing. Francinie Murillo Vega	Biología	frmurillo@itcr.ac.cr
Lic. Alejandro Medaglia Mata	Biología	amedaglia@itcr.ac.cr
Dra. Karla Meneses Montero	Biología	kmeneses@itcr.ac.cr
Dr. Luis Alvarado Marchena	Biología	lavarado@itcr.ac.cr
M.Sc. Mauricio Chicas Romero	Biología	mchicas@itcr.ac.cr
M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes	Biología (Jubilada)	mguerrero@itcr.ac.cr

## 5 Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo principal evaluar el uso de arcillas para la formulación de Nanobiofertilizantes a base de microalgas por medio de emulsiones Pickering y su efecto en las comunidades microbianas de suelo en cultivos de piña. Como alcance de la investigación se logró generar resultados y experiencia que permitirán solventar la limitada cantidad de investigación en este tema y en el desarrollo de formulaciones de emulsiones de biofertilizantes estabilizadas con arcillas, así como el efecto que tendría en el mejoramiento de las condiciones microbianas del suelo. La combinación de biomasa microalgales y arcillas permitió generar prototipos de formulaciones de un insumo agrícola que fue caracterizado con diferentes técnicas y evaluado en parcelas experimentales en Buenos Aires de Puntarenas en la empresa Pindeco; en los ensayos de campo no se observó un efecto en el peso de la planta ni en la “hoja D” de la planta de piña en algunas dosis y tratamientos. Además, se logró analizar el efecto en las comunidades microbiológicas mostrando cambios en la abundancia y diversidad de los microorganismos presentes. Se concluye que el uso de arcillas permitió estabilizar la biomasa de *A. máxima* para la formulación de insumos agrícolas. Fue posible generar diferentes formulaciones, y se procedió a someter a Secreto la que presentó mejor estabilidad. Al evaluar las formulaciones en cultivo de piña se observó un pequeño incremento en el contenido de grado Brix de los frutos, y un cambio en la abundancia y diversidad de los microorganismos presentes en el suelo.

## 6 Palabras clave

Microalgas, Bioestimulantes, emulsiones.

## 7 Introducción

El problema investigado permitió generar experiencia en la construcción de emulsiones Pickering (arcillas como surfactante) donde se trabajó con la biomasa microalgal de *Arthrospira maxima* para la elaboración de un bioinsumo agrícola. Para ello se implementaron técnicas de caracterización tanto de las arcillas empleadas que fueron caolín y bentonita como de la microalga la cual se sometió a procesos de hidrólisis. Una vez caracterizadas las arcillas y la microalga se procedieron a generar un barrido para generar una formulación estable.

Diferentes formulaciones fueron evaluadas en el cultivo de piña donde se determinó el efecto sobre el rendimiento, para lo cual se midió el peso seco de las plantas tratadas, así como de la hoja D. También se evaluó el rendimiento en la cantidad de frutos, peso de los frutos y su calidad. Paralelamente, se determinó el efecto de las formulaciones en la dinámica de las comunidades microbianas del suelo como parámetro de mejoramiento de la biodiversidad y fertilidad.

Por lo que, esta investigación permitió generar información para el desarrollo de formulaciones de bioinsumos de microalgas que sean eficientes, así mismo, generaron resultados de los efectos que tuvieron en el mejoramiento de las condiciones microbianas del suelo en cultivos de piña.

La combinación de biomasa microalgales y arcillas en la formulación de un insumo agrícola permitió generar un prototipo de producto que además de dar un estímulo a los cultivos por medio del contenido de aminoácidos, fitohormonas, materia orgánica, macro y micronutrientes, permite mejorar la calidad del fruto y la microbiología del suelo.

Además, la evaluación de las comunidades microbianas en el suelo en los cultivos de piña permitió generar resultados importantes que permiten validar la necesidad de generar insumos como los desarrollados. A pesar de que se cuenta en el mercado con diferentes insumos agrícolas con nuevas tecnologías que permiten aumentar los rendimientos de los cultivos, en la actualidad no se dispone de un producto de tecnología nacional a base de microalgas, que además de contribuir con las mejoras en la calidad del fruto de piña y contribuya a restablecer las comunidades microbianas del suelo.

Con esta propuesta se pudo avanzar en el desarrollo de una línea de investigación de impacto científico y tecnológico que beneficia principalmente al sector agrícola, atendiendo de esta forma la demanda de nuevas tecnologías que sean eficientes y amigables con el ambiente.

El objetivo general de la investigación fue “Evaluar el uso de arcillas para la formulación de Nanobiofertilizantes a base de microalgas por medio de emulsiones Pickering y su efecto en las comunidades microbianas de suelo en cultivos de piña”.

## 8 Marco Teórico

Las microalgas son un amplio grupo de organismos procariotas y eucariotas, estos microorganismos se caracterizan por realizar fotosíntesis; en los ecosistemas acuáticos son consideradas como los productores primarios más abundantes. A nivel económica su interés ha venido en aumento pro su capacidad de que su cultivo emplea la energía solar, tienen uno de los mayores rendimientos de producción de biomasa anual, la composición bioquímica puede modificarse fácilmente variando las condiciones ambientales y/o la composición del medio de cultivo. Esto permite que, bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular en altas concentraciones compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros. Además de que existen varios millones de especies de algas y microalgas. (Saifullah et al., 2014; Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Estas características las hacen ser versátiles para diferentes usos, entre ellos tenemos el tratamiento de aguas residuales, pues pueden generar beneficios como reducción de la demanda química o biológica de oxígeno, DQO o DBO, remoción de nitrógeno y fósforo, remoción de metales pesados y remoción de patógenos. También se puede usar para extracción de pigmentos o alimento para humanos o animales, obtención de productos biotecnológicos con uso en medicina, farmacia y/o cosmética. También es posible usar microalgas como biofertilizante a en producción de biocombustibles. (Hernández & Labbé, 2014)

Para el caso de la producción de biocombustibles se puede hacer por gasificación o pirolisis, obteniendo carbón vegetal, llamado Biochar o Biocarbón, que posee un alto potencial como fertilizante en la agricultura.

Mientras que el potencial de las microalgas como biofertilizantes radica en que contienen altos niveles de micronutrientes y macronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Así como algunos reguladores de crecimiento, poliaminas, enzimas, hidratos de carbono, proteínas y vitaminas aplicadas para mejorar el crecimiento vegetativo y el rendimiento. Por lo tanto, se mejoran no solo las características del suelo, sino además genera un efecto favorable sobre el estado nutricional de las plantas (García & Martel, 2004).

Varios estudios han establecido una asociación entre una mayor absorción de nutrientes, mayor acumulación de biomasa y mayores rendimientos de los cultivos debido a la incorporación de biofertilizantes a base de microalgas. Un estudio determinó los efectos de los extractos de algas sobre la germinación de semillas, y observó una germinación más rápida y un mayor crecimiento de las semillas de arroz. Otros estudios más recientes obtuvieron resultados similares utilizando extractos de algas marinas en las semillas de tomate y trigo (García-González & Sommerfeld, 2015). Se ha mostrado que el estiércol de vaca y la microalga *Spirulina platensis* tienen un potencial significativo como biofertilizantes para mejorar el crecimiento y el rendimiento de plantas de maíz (Dineshkumar et al 2017).

Es por ello se ha usado como acondicionadoras de suelos por muchos años en la agricultura en países asiáticos como China e India, donde proveen más de 20 kg nitrógeno  $\text{h}^{-1}$  año $^{-1}$ . Algunas cianobacterias fijadoras de nitrógenos como *Anabaena*, *Nostoc*, *Aulosira*, *Tolypothrix* y *Scytonema* han sido utilizadas en los cultivos de arroz. Mientras, el mucílago producido por las especies productoras del género *Chlamydomonas* sp. se han utilizado como acondicionadores del suelo para controlar la erosión de los suelos irrigados mediante pivote en América del Norte. (Naidoo et al., 2013).

Experimentos de campo realizados durante las últimas dos décadas por parte del Instituto Indio de Investigación Agrícola (IARI), Nueva Delhi, utilizando microalgas azul verdosas como biofertilizante

rural, han demostrado que se puede proporcionar de 25 a 30 kg de microalgas como fuente de nitrógeno por hectárea por ciclo. Aumento hasta el 30% del rendimiento de los cultivos de arroz. Por otra parte, las microalgas también añaden (1) materia orgánica, (2) sintetizan y liberan aminoácidos, vitaminas y auxinas, (3) reducen el contenido de materia oxidable de la tierra, (4) proporcionan oxígeno a la rizosfera sumergida, (5) mejoran la salinidad y funcionan como tampón para el pH, (6) solubilizan fosfatos, y (7) aumentan la eficiencia del uso de fertilizantes (Uysal et al., 2015).

De igual manera, Tripathi et al. (2008) evaluó el rol de las microalgas azul verdosas como biofertilizante en la mejora de la demanda de nitrógeno y el estrés por cenizas volantes en el crecimiento y rendimiento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L). Se observó una mejora significativa de crecimiento de las plantas que crecen en suelos enmendados con algas en comparación con un suelo de jardín. El estudio sugiere que el uso integrado de microalgas, cenizas volantes mejora el crecimiento, el rendimiento y la composición mineral de las plantas de arroz además de reducir la gran demanda de fertilizantes nitrogenados.

La agricultura tiene una gran importancia en la economía de nuestro país debido a su contribución en la producción interna y en la generación de empleos. Sin embargo, a pesar de que los fertilizantes sintéticos permitieron aumentar la productividad de alimentos, el uso excesivo de los mismos ha ocasionado grandes daños ambientales. En Costa Rica, se reportan valores de consumo de fertilizantes de hasta 980 kg/ha productiva, cifra que supera a los datos reportados para el resto de países latinoamericanos y europeos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2018).

Costa Rica por el alto uso de fertilizantes es responsable del 40% de las emisiones de los Gases de Efecto Invernadero (GEI, volatilización y denitrificación de  $\text{NH}_3$  y  $\text{NO}_2$ ), además de la contaminación de nitratos en aguas destinadas para el consumo humano y la pérdida de la diversidad microbiológica del suelo, agua y demás ecosistemas asociados al recurso acuático (Bhardwaj 2014). Las actividades agrícolas y ganaderas contribuyen directamente a la emisión de gases con efecto invernadero, bajando a su vez los rendimientos en la agricultura a mediano plazo (Vindas-Segura, 2009).

Ante este panorama, el sector agrario requiere de tecnologías innovadoras que le permitan mitigar los efectos al ambiente y al cambio climático, generando a su vez un incremento en la productividad agrícola, donde hoy día es altamente demandante. Adicionalmente, el mercado es cada vez es más exigente, principalmente en Europa, donde se exportan diversos productos agrícolas y por tanto, Costa Rica se ve obligado a realizar cambios inmediatos en las prácticas agropecuarias, tales como el uso de fertilizantes amigables con el ambiente, innovadores y eficientes, con menor huella de carbono (Pérez, 2018).

Las microalgas han sido objeto de estudio por parte del sector académico y la industria, tanto a nivel nacional como internacional, con el fin de lograr el desarrollo y la innovación (I+D+i) de nuevos productos que respondan a cambios inmediatos en el sector agrícola, especialmente en el desarrollo de nuevas formulaciones de biofertilizantes (Coppens et al., 2016; Grunert et al., 2016; Zhang et al., 2017). Algunas investigaciones han mostrado que la aplicación de formulaciones de biofertilizantes microalgales en semillas de arroz acelera el proceso de germinación y el crecimiento de las plántulas; así mismo, este efecto se ha reportado en las semillas de tomate y trigo (García-González & Sommerfeld, 2016). Investigaciones recientes muestran, que la aplicación de biofertilizantes microalgales contribuye en el aporte de materia orgánica, reducción del contenido de materia oxidable de la tierra, oxigenación de la rizosfera sumergida, control de la salinidad y del pH, aumentando la eficiencia del uso de fertilizantes (Uysal et al., 2015). Otros autores reportan, que los biofertilizantes mantienen el ambiente del suelo rico en todos tipos de micro y macroelementos a través de la fijación de nitrógeno,

solubilización o mineralización de fosfato y potasio, liberación de sustancias reguladoras del crecimiento, producción de antibióticos y biodegradación de la materia orgánica en el suelo. Cuando los biofertilizantes se aplican como semilla o inoculantes del suelo, se multiplican y participan en el ciclo de nutrientes y productividad de cultivos (Sinha 2011, Singh 2011).

A pesar de los múltiples beneficios del uso de las microalgas como biofertilizantes, es necesaria una adecuada formulación para hacer más eficiente la asimilación de los nutrientes por la planta. En el caso de esta propuesta, se pretende aprovechar el contenido aminoácido, fitohormonas y reguladores de crecimiento entre otros nutrientes, presentes en microalgas costarricenses para evaluar su potencial como biofertilizante alternativo. La formulación del biofertilizante será a través de una emulsión tipo Pickering, donde se usan arcillas como interface o emulsificante para la estabilización de la emulsión, procurando generar una liberación controlada de los nutrientes. Este abordaje permitiría industrializar el fertilizante, a través de un control estricto de su formulación, estabilidad para el almacenaje, reproducibilidad y escalabilidad. Para ello como paso final del proyecto se ensayará en cultivos de ambiente controlado.

El uso de surfactantes como adyuvantes para facilitar la acción de biomoléculas es conocida, la cual permite a por medio de la reducción del tamaño de las gotas, aumentar la adhesión en la planta y la humectabilidad. Los surfactantes también facilitan la movilidad de las moléculas por la cutícula, lo que disminuye la barrera que esta presenta (Fagerström, 2014; Schreiber & Schonherr, 2009). Dentro de los surfactantes se puede hacer uso de sustancias iónicas, no iónicas e incluso arcillas, que son parte de las emulsiones Pickering. Las emulsiones Pickering, son las que usan partículas coloidales para estabilizar ya sea el agua en el aceite (emulsiones W/O) o el aceite en el agua (emulsiones O/W), de tal forma que se encuentran en la interfaz agua-aceite, ocasionando que haya equilibrio mecánico. Para que esto ocurra las partículas deben tener tamaños de nanómetros a micrómetros. Este tipo de emulsión es empleado en los casos donde el uso de los surfactantes causa efectos adversos como lo es irritación, formación de espuma, toxicidad, u otras interacciones no deseadas en la aplicación como fertilizante. Se ha reportado emulsiones Pickering donde hay una reducción en irritación de tejidos, además de presentar versatilidad en cuanto a la viscosidad, pues se puede ajustar con la concentración de partículas sólidas. (Zoppe, Venditti, & Rojas, 2012)(Frelichowska, Bolzinger, & Chevalier, 2010). Algunos de los materiales más estudiados en este tipo de emulsiones están el carbonato de calcio y las arcillas y se han estudiado este tipo de emulsiones en la formulación de productos para el sector agrícola (Auweter, Behrens, & Ngai, 2009).

Las arcillas son de interés en la estabilización de emulsiones pickeing, ya que estas son fáciles de conseguir, bajo costo, amigables con el ambiente, y afines al suelo, pueden ser pre-tratadas con compuestos orgánicos y generar partículas anfífilas que ayudan a la estabilidad de las emulsiones. Además, tienen propiedades interesantes que favorecen su aplicación entre ellas

están: fijar cationes sobre sus superficies o, menudo pueden presentar moléculas orgánicas como especies adsorbidas, de tal forma que puede ser vehículos para el transporte de moléculas. (Touzouirt et al., 2018).

Finalmente, es necesario conocer el efecto de los nanobiofertilizantes en la diversidad microbiana del suelo, donde hasta la fecha se cuenta con muy pocos estudios a pesar de que, en los últimos años, ha crecido la importación de formulaciones de microalgas para uso agrícola.

Este estudio pretende generar un nuevo producto a partir de microalgas y emulsiones Pickering a partir de arcillas comunes que además de dar un aporte nutricional a los cultivos por medio del contenido de aminoácidos, fitohormonas, materia orgánica, macro y micronutrientes, también cuente con los beneficios que aportarían las arcillas, las cuales permitirían estabilizar las emulsiones y actuar como vehículos para la liberación controlada de los nutrientes proporcionando una mayor superficie activa. En paralelo se requiere realizar una completa caracterización, fisicoquímica, espectroscópica y microscópica de las emulsiones y de la composición genética de las comunidades microbianas posterior a las aplicaciones en los cultivos.

## 9 Metodología

### 9.1 Establecer un prototipo de sistema para el cultivo microalgal de *Arthrospira maxima* en biorreactores de capa fina.

#### 9.1.1 Diseñar un sistema integrado de cultivo de *Arthrospira máxima* usando un sistema de capa fina.

La microalga *Arthrospira maxima* proveniente del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, se utilizó durante la ejecución de la propuesta. El alga fue registrada en CONAGEBIO.

Se partió de un inóculo de matraces de 25ml y con volumen de cultivo de 5ml, a 110 rpm a temperatura ambiente de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). La iluminación artificial con lámparas fluorescentes fue de 1200 lux. Estos cultivos se escalaron hasta 10000 litros.

El inóculo inicial en el cultivo de capa fina será de entre  $1,0 \times 10^4$  cel/ml y los muestreos se realizarán cada dos días mediante el método de muestreo sin reemplazo. El incremento de la biomasa microalgal se realizó por medio de conteo celular en una cámara Neubauer, colocando 10  $\mu\text{l}$  de muestra del cultivo en la cámara, se cuenta por duplicado cada muestra, según Moheimani et al. (2013)

Posteriormente de coleccionar las muestras y de contar el número de células por mililitro, se procedió a evaluar el peso seco cada dos días. Se toma papel filtro de nitrocelulosa de 110mm previamente pesado y tarado. Se filtran 20ml de muestra al vacío utilizando un kitasato y un embudo Büchner y se lava el filtro con 10ml de agua destilada para limpiar la biomasa de la presencia de sales y/o residuos. Se determinó el peso seco con la balanza de humedad (Radwag PMR50).

#### 9.1.2 Realizar cultivos microalgales empleando aguas residuales de sistemas agropecuarios y agroalimentarios

El medio de cultivo de las microalgas que se utilizó vacaza (protocolo en Secreto Industrial establecido por el ITCR). Las aguas residuales fueron caracterizadas a nivel químico y físico con el fin de establecer los volúmenes a utilizar en el cultivo masivo. Debido a problemas de contaminación no se obtiene el crecimiento esperado en el cultivo. Se tuvo que realizar el cultivo con medio industrial, y su cultivo en el Raceway. Se este cultivo se cosechaba el 10% y se centrifugó a 5000 rpm (Westfalia, GEA).

#### 9.1.3 Realizar procesos de secado y molienda de las microalgas

La biomasa obtenida se realizó un ensayo de cinética de secado evaluando diferentes temperaturas 50, 60, 70 y 90°C. Se determinó la curva de cinética de secado para cada condición; se tomarán mediciones del peso de las muestras cada 30 minutos hasta alcanzar el peso constante.

La biomasa obtenida en el proceso de secado, a diferentes temperaturas, se sometió a un proceso de molienda, en donde se determinará el tamaño de partícula necesario para poder elaborar una suspensión microalgal, de esta manera determinar por medio de espectrofotometría la velocidad de sedimentación.

#### 9.1.4 Rotura celular por método de ultrasonificación, homogenización e hidrólisis enzimática.

Se realizó la rotura celular como pretratamiento de biomasa microalgal para la liberación de proteínas y preparación de emulsiones mediante el uso de ultrasonido y enzimas.

La biomasa de cada cultivo de microalga se disolverá en agua destilada a una proporción de 10% m/v. Se coloca la disolución en un tubo tipo Falcon de 50 mL y se coloca en una bañera de hielo. Se realiza la ultrasonificación (Ultrasonic Processor UP400S) a 325 y 260 Vatios de potencia y se tomó muestras a los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min, se tomó 1 mL y se colocó en tubos Eppendorf. Se centrifugó (Sorvall,

Legend XIR, Termo Scientific,) cada tubo a 5000 rpm durante 10 minutos. Se toma el sobrenadante después de la centrifugación para realizar una medición de absorbancia. Se mide a 260 y 280 nm para cuantificar la cantidad de proteína y ácidos nucleicos libres.

La hidrólisis enzimática de la biomasa de microalgas se realizó con el objetivo de obtener mayor cantidad de aminoácidos libres. Se tomó la biomasa previamente tratada y se colocará en los reactores de hidrólisis. Se añadió un coctel enzimático a una concentración de 4% v/m respecto a la biomasa seca. Las proteasas se dejarán por 24 h a 37°C.

Se evaluó el efecto del hongo (*Trichoderma harzianum*, HUMITEC BIOTERRA de Agrícola Piscis) . y la bacteria *Bacillus subtilis* (Serenade®, Bayer) en la hidrólisis de proteínas y materia orgánica de las biomazas microalgales previamente tratadas.

Para la determinación de la eficacia de rotura se realizó la cuantificación de proteínas extraídas en el citoplasma utilizando el método de cuantificación de Bradford (Bradford, 1976). Se realizará un análisis histológico de las microalgas donde se evaluará mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) el grado de lisis celular para determinar cuál tratamiento permite de manera más eficiente la liberación extracelular de los compuestos bioactivos.

## **9.2 Establecer un protocolo de formulación de Nanobiofertilizantes a base de microalgas por medio de emulsiones Pickering estabilizadas con arcillas.**

### **9.2.1 Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y caracterización fisicoquímica.**

La biomasa seca *A. maxima* obtenida después de la molienda fue procesadas químicamente para su observación mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Para determinar el grado de partícula o presencia de agregados. Se realizó una fijación inicial durante al menos 24 horas empleando el fijador de Karnovsky (Karnovsky, 1965), el cual consiste en una mezcla de glutaraldehído al 2.5% v/v y paraformaldehído al 2% m/v con el fin de fijar las proteínas y conservar la ultraestructura celular. Posteriormente se realizó una post-fijación de alrededor de 2 horas empleando tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) con el fin de fijar lípidos insaturados presentes en la muestra.

Consecutivamente, se realizó un proceso de deshidratación de las muestras mediante el uso de concentraciones ascendentes de acetona (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) y, posteriormente, se realizaron lavados con acetona:resina (1:1) para promover la transición entre solventes y la infiltración de la resina. Finalmente, se realizó lavados con resina pura y luego, se transferirán las muestras a un molde en el cual se realizó el proceso de curado o de inclusión de la resina a una temperatura de 80°C durante 48 horas.

Una vez terminada la inclusión, las muestras fue cortadas empleando un ultramicrotomo (Leica, EM UC7) con el fin de obtener segmentos de aproximadamente 80 nm de grosor. Dichos cortes fueron colocados en rejillas de cobre de 200 mesh (TedPella Inc.) y analizaron utilizando un Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM-2100), a diversas magnificaciones y a un voltaje de aceleración de 100.00 kV para la determinación de la morfología y diámetro aparente de las partículas. Este análisis se realizó en el Laboratorio Institucional de Microscopía del ITCR.

En paralelo se determinará la caracterización fisicoquímica de la biomasa, por medio de análisis fisicoquímicos en el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. Para cada lote de biomasa microalgal se analizará lo siguiente:

- Líquido Químico Completo (N, P, Ca, Mg, K, Cu, Fe, Zn, Mn, B, S)

### 9.2.2 Caracterizar la biomasa microalga y el nanobiofertilizante por resonancia magnética, espectroscópica, microscópica y reológica

Para la completa caracterización de las formulaciones se realizarán las mediciones haciendo uso de técnicas como la Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ); espectrometría UV-visible, fluorescencia, espectrometría de masas y determinación del tamaño de partícula por Dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras fueron analizadas en un Equipo de Resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) con 60 MHz de resolución de la Spinsolve del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Las muestras sólidas fueron disueltas en una mezcla de agua deuterada al 10%; en el caso de las formulaciones líquidas se tomó 900  $\mu\text{L}$  y se le agregará 100  $\mu\text{L}$  de agua deuterada. Estas fueron transferidas a los tubos de resonancia magnética nuclear con la ayuda de una pipeta Pasteur o una micropipeta.

A partir de los espectros obtenidos se identificarán las señales obtenidas por medio de su desplazamiento químico, estas fueron tabuladas

Para la caracterización por espectroscopía UV-visible de la biomasa de microalgas, las muestras sólidas fueron disueltas en agua destilada. Se realizó un espectro de absorbancia de las muestras en el rango de los 200-800 nm haciendo uso de cubetas de cuarzo en un Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 del Centro de Investigación de Biotecnología. Se realizó las diluciones correspondientes hasta obtener absorbancias que no saturan las señales, menor a la 1 U.A .

Las biomásas también fueron analizadas en el equipo de Espectrometría de Masas en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. Se generaron espectros de masas de los principales componentes de las biomásas analizadas, la identificación de los compuestos presentes se realizó por medio de la búsqueda en librerías de espectros de masas. Para la preparación de la muestra se pesó 5 mg de biomasa seca. en un falcon de 15 mL. Se agregó 100  $\mu\text{L}$  de disolución oxidante y dejó en la capilla de gases a temperatura ambiente por 1 h. Luego se agregó 10 mg de metabisulfito de sodio (liberación de gases) y se dejó en la capilla de gases hasta que todo el dióxido de azufre escape. Después se agregó 200  $\mu\text{L}$  de HCL concentrado y se calentó a 110  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente se agregó 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 10 M y se ajusta el pH a 3 con 40  $\mu\text{L}$  de Acido Fórmico y 60  $\mu\text{L}$  de Agua grado MS, se centrifugó a 1300 rpm por 10 min. Se tomó 8,5  $\mu\text{L}$  de muestra y se ponen en un eppi de 1,5 mL. Se agregó 15  $\mu\text{L}$  del estándar interno (extracto de microalgas  $^{13}\text{C}$ ). Se agregó 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo grado masas y 100  $\mu\text{L}$  de MeOH donde se observó la formación de un precipitado. Se centrifugó 10 min a 1000 rpm. Se transfirió 200  $\mu\text{L}$  (sin tocar el precipitado) a un vial con inserto. Se inyectan 10  $\mu\text{L}$  de muestra al equipo de masas.

Para la caracterización por determinación del tamaño de partícula (DDL), se realizaron mediciones de Dispersión dinámica de luz (DDL) con el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern) del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Se utilizó una cubetas de poliestireno cuadradas de 12 mm (DTS0012) y Celda capilar plegada desechable (DTS1070). Las muestras fueron diluidas en agua, y se analizaron a un ángulo de observación de  $90^{\circ}$ , utilizando parámetros de índice de refracción de 1.333 y de viscosidad de 0.900 cP. Empleando el mismo equipo, se realizaron los análisis de potencial zeta de cada una de las emulsiones, y sus diluciones en caso de ser necesarias, con el fin de obtener información acerca de la carga superficial de las partículas. A partir de la información obtenida se comparó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de las mezclas haciendo uso de métodos de comparación estadísticos.

La caracterización por medio de Microscopía electrónica de Transmisión (MET) de biomasa de microalgas con ruptura celular, serán analizadas inmediatamente después de su proceso de formulación empleando un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-2100), a diversas magnificaciones y a un voltaje de aceleración de 100.00 kV para la determinación de la morfología y diámetro aparente de las partículas.

### 9.2.3 Caracterizar el fluido de la de la biomasa microalga y el nanobiofertilizante con ruptura, tales como: la viscosidad, estabilidad, tipo de fluido y tamaño de gota

Para determinar la viscosidad y estabilidad de la biomasa microalgal con ruptura celular se realizarán mediante el uso de un reómetro rotatorio, la viscosidad empleando una temperatura de  $25,0 \pm 0,1$  °C. Posteriormente se realizó la determinación de la estabilidad de cada una de las emulsiones con respecto a la temperatura, se midió la viscosidad entre 20-40°C.

Para generar la caracterización del tipo de fluido, se hizo una determinación del barrido oscilatorio de esfuerzo usando un reómetro rotatorio a una frecuencia de 1Hz, mientras que para la determinación del barrido de frecuencia se empleará un esfuerzo 1Pa; estas mediciones se realizaron a  $20,0 \pm 0,1$  °C. Mediante estos barridos se obtendrá el tiempo que requiere para poder fluir y el tipo de fluido que es viscoso o viscoelástico y con ello las propiedades inherentes al fluido formado.

Para determinación cualitativa del tamaño de partícula se observó a través de la difracción de un puntero láser. Las medidas de tamaño y la variación de las partículas con el tiempo son parámetros de estabilidad, importantes y se pueden observar mediante fotografías por microscopios de luz.

#### **2.4 Preparar formulaciones de los nanobiofertilizantes a base de microalgas y emulsiones Pickering, estableciendo su estabilidad ante pH y salinidad, así como sus propiedades reológicas.**

Para la formulación de las emulsiones de Nanobiofertilizantes, el hidrolizado líquido acuoso de las microalgas se integró a una emulsión Pickering, como medio de formulación de un nanobiofertilizante. Se utilizaron las arcillas bentonita o caolinita, como agentes surfactantes. Se realizaron barridos de formulación que cambiando variables tales como: relación agua/medio oleoso (70/30, 50/50, 30/70), concentración y tipo de arcilla (al menos tres concentraciones), y se observará la estabilidad de la emulsión en el tiempo. Se seleccionará la emulsión que cumpla con las condiciones de mayor estabilidad, observando en el microscopio de luz su coalescencia. Se realizaron suspensiones coloidales en agua a través de la sonicación de las arcillas en agua, generando tres concentraciones para cada arcilla. Las emulsiones obtenidas más estables se estudiarán posteriormente su comportamiento reológico y estabilidad ante la temperatura.

### **9.3 Determinar el efecto de las formulaciones de nanobiofertilizantes en el rendimiento agronómico (cultivo de piña) y en las comunidades microbianas del suelo asociadas al cultivo.**

#### **9.3.1 Realizar las aplicaciones de los nanobiofertilizantes a cultivos de piña y evaluar su efecto en desarrollo de la planta.**

Se estudió el efecto de tres preparados de microalgas y un control comercial, para un total de 4 tratamientos. Se estudió 4 dosis de aplicación para cada formulado y un control absoluto sin aplicación. Cada tratamiento se realizó por triplicado, para un total de 48 unidades experimentales para la totalidad del ensayo.

Cada unidad experimental contó con un tamaño de 16 x 16 m, para un área de 264 m<sup>2</sup>, por lo que la parcela experimental para el ensayo fue de 6336 m<sup>2</sup>. Cada unidad experimental contó con 1800 plantas, para un total de 43 200 plantas requeridas para el ensayo. La semilla empleada fue de calidad media baja, con peso de 9 a 12 onzas.

Los biofertilizantes se aplicarán por medio de aspersión con un spray boom experimental, siendo las dosis de cada producto de 0, 1.08, 2.15, 4.30 mL/L de solución. La frecuencia de aplicación será al momento de la siembra, al mes, a los dos meses y cada 15 días después del segundo mes de cultivo hasta el mes 9, para un total de 17 aplicaciones. Las aplicaciones se harán previo a la aplicación de fertilizantes sintéticos o herbicidas. Se realizará muestreos de núcleos de suelo hasta 15 cm de profundidad previo a la siembra, en el mes cero, 2, 5, 7, 9 y 11. Se tomarán 3 núcleos de cada unidad experimental por cada tiempo de muestreo, se realizará un cuarteo para realizar las mediciones. Cada evaluación consiste en

48 mediciones, en cada muestra de suelo una de ellas, se realizará un análisis genético de las comunidades microbianas

*Cuadro 1 Tratamientos, dosis, tamaño de las parcelas y programa de aplicación de microalgas en piña*

Trat (Producto)	Sub · Trat.	Dosis (L/ha)	Dosis (ml/L)	Area (m <sup>2</sup> )	Lt/trat	Sobran te (lt)	Volum en agua total (L)	Volume n producto (lt)/ciclo	Volume n producto (ml)/ciclo	Product o/ Trat 21 ciclos	Lt totales Producto
1	0	0	0	264	49,4	45	94,4	0,000	0,000	0,00	14,92
	1	2,0	1,08	264	49,4	45	94,4	0,102	101,917	2,14	
	3	4,0	2,15	264	49,4	45	94,4	0,203	202,891	4,26	
	6	8,0	4,30	264	49,4	45	94,4	0,406	405,782	8,52	
2	0	0,0	0	264	49,4	45	94,4	0,000	0,000	0,00	14,92
	1	2,0	1,08	264	49,4	45	94,4	0,102	101,917	2,14	
	3	4,0	2,15	264	49,4	45	94,4	0,203	202,891	4,26	
	6	8,0	4,30	264	49,4	45	94,4	0,406	405,782	8,52	
3	0	0,0	0	264	49,4	45	94,4	0,000	0,000	0,00	14,92
	1	2,0	1,08	264	49,4	45	94,4	0,102	101,917	2,14	
	3	4,0	2,15	264	49,4	45	94,4	0,203	202,891	4,26	
	6	8,0	4,30	264	49,4	45	94,4	0,406	405,782	8,52	
4	0	0,0	0	264	49,4	45	94,4	0,000	0,000	0,00	14,92
	1	2,0	1,08	264	49,4	45	94,4	0,102	101,917	2,14	
	3	4,0	2,15	264	49,4	45	94,4	0,203	202,891	4,26	
	6	8,0	4,30	264	49,4	45	94,4	0,406	405,782	8,52	

*Cuadro 2 Código de las parcelas del ensayo de aplicación de microalgas en piña*

Formulación	Dosis (mL/L)	Réplica	Código	Formulación	Dosis (mL/L)	Réplica	Código
1	0	1	1.1.0	3	0	1	3.1.0
1	1.08	1	1.1.1	3	1.08	1	3.1.1
1	2.15	1	1.1.2	3	2.15	1	3.1.2
1	4.30	1	1.1.3	3	4.30	1	3.1.3
1	0	2	1.2.0	3	0	2	3.2.0
1	1.08	2	1.2.1	3	1.08	2	3.2.1
1	2.15	2	1.2.2	3	2.15	2	3.2.2
1	4.30	2	1.2.3	3	4.30	2	3.2.3
1	0	3	1.3.0	3	0	3	3.3.0

1	1.08	3	1.3.1	3	1.08	3	3.3.1
1	2.15	3	1.3.2	3	2.15	3	3.3.2
1	4.30	3	1.3.3	3	4.30	3	3.3.3
2	0	1	2.1.0	4	0	1	4.1.0
2	1.08	1	2.1.1	4	1.08	1	4.1.1
2	2.15	1	2.1.2	4	2.15	1	4.1.2
2	4.30	1	2.1.3	4	4.30	1	4.1.3
2	0	2	2.2.0	4	0	2	4.2.0
2	1.08	2	2.2.1	4	1.08	2	4.2.1
2	2.15	2	2.2.2	4	2.15	2	4.2.2
2	4.30	2	2.2.3	4	4.30	2	4.2.3
2	0	3	2.3.0	4	0	3	4.3.0
2	1.08	3	2.3.1	4	1.08	3	4.3.1
2	2.15	3	2.3.2	4	2.15	3	4.3.2
2	4.30	3	2.3.3	4	4.30	3	4.3.3

Se seleccionarán 10 plantas por tratamiento, eliminando las plantas que puedan ser influenciadas por el efecto de borde. Se tomarán datos peso de la planta, peso de la hoja D, peso del fruto, calidad del fruto. Para determinar el cambio de la comunidad microbiana con la aplicación de los nanobiofertilizantes, se realizarán análisis de suelo al inicio y al final del ensayo en cada uno de los diferentes tratamientos de los dos bloques establecidos. Se tomarán 10 muestras en diferentes puntos de cada bloque, eliminando la cobertura vegetal y rastrojo; para la toma de las muestras se utilizará un barreno tomando los primeros 10 cm de cada punto de muestreo. En cada bloque de tratamiento se juntarán las muestras recolectadas y se disgregarán los terrones hasta obtener tamaños de partículas menores a 1 cm. Se realizará la técnica del cuarteo en cada tratamiento hasta obtener un tamaño de muestra de 500g, para los análisis de suelo.

Se realizarán análisis de físico-químico para la determinación de, Ca, Mg, K, P, Cu, Fe, Zn, Mn, contenido de materia orgánica, pH, conductividad eléctrica, metales pesados (Cd, Cr, Co, Pb, Ni), retención de fósforo, retención de agua, densidad de partículas entre otros. Estos análisis se realizarán en el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica mediante la contratación de servicios.

### 9.3.2 Analizar y comparar la composición de las comunidades microbianas del suelo cuando se aplica en nanobiofertilizante a base de microalgas

Para el análisis de poblaciones microbianas del suelo se tomarán 2 muestras de aproximadamente 10 g de suelo para cada tratamiento al inicio, a los 6 meses y los 12 meses de aplicación del nanobiofertilizante y se transportan al laboratorio. Se hace una muestra compuesta de cada tratamiento, se mezclan vigorosamente y se divide en 4 proporciones iguales. De una de las proporciones se hace la extracción de ADN por duplicado. Para esto se utilizará el kit FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, USA). Inicialmente se hace la lisis de 500 mg de suelo mediante el uso de la matriz de lisis E (MP Biomedical, USA) la cual contiene esferas de cerámica, de sílica y de vidrio. Esto se hará con el equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA) a una velocidad de 5.5 m/s durante 30 s. Posteriormente se sigue el protocolo recomendado por el fabricante para el FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, USA).

El análisis de las comunidades microbianas se realizará mediante la construcción de bibliotecas de amplicones para la detección de la región hipervariable V3-V4 del 16S rRNA, con los imprimadores Bakt\_341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) y Bakt\_805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC). Posteriormente se realizará la secuenciación “pair-end” en un equipo Illumina MiSeq (Illumina, USA). Este procedimiento se realizará al ADN aislado previamente, el cual será enviado a las facilidades de

Macrogen (Macrogen, Corea del Sur) para la aplicación del protocolo para el análisis de las comunidades microbianas.

Los datos crudos generados por la secuenciación en el MiSeq (Illumina, USA) se analizarán siguiendo un protocolo similar al descrito por Arce-Rodriguez et al. (2016). Resumidamente, se usará el paquete bioinformático Mothur (Schloss et al. 2009), para alinear las secuencias limpias con bases de datos como Silva bacteria (Quast et al. 2013). El análisis de los taxones más abundantes (OTUs con abundancia relativa mayor a 0.05%) se usarán para la posterior clasificación con la base de datos RDP (Ribosomal Database Project). El análisis filogenético se realizará tomando como referencia las secuencias de bases de datos curadas del NCBI. El programa MEGA6 (Tamura et al. 2016) se usará en la construcción de árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud con remuestreo (bootstrap). Los recursos computacionales para el análisis bioinformático serán provistos por el Colaboratorio Nacional de Computación Avanzada (CNCA) en el Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT-CONARE).

### **3.3 Analizar el efecto de los tratamientos de nanofertilizantes respecto a las características vegetativas y reproductivas, así como la calidad del fruto de la piña.**

Las variables biométricas de la planta a medir en las plantas de piña peso de la planta y peso de la hoja D . Los frutos serán evaluados respecto al Peso y calidad,. Al jugo de la piña se le realizará determinación de grados brix (°Bx) y análisis químico. Se evaluaron 10 frutos por unidad experimental para un total de 240 frutos a analizar. Estas mediciones serán realizadas por la empresa PINDECO. Se analizarán 10 plantas por parcela

## 10 Resultados

### 10.1 Establecer un prototipo de sistema para el cultivo microalgal de *Arthrospira maxima* en biorreactores de capa fina.

#### 10.1.1 Diseñar un sistema integrado de cultivo de *Arthrospira máxima* usando un sistema de capa fina.

Se realizó el cultivo de *A máxima* en sistema raceway adaptando la altura del cultivo a 10 cm en el estanque tipo Raceway del ITCR, Figura 1 (A). Además, se diseñó el sistema prototipo con capacidad de 100 L de cultivo de microalgas. Figura 1(B).



(A)



(B)

Figura 1 Raceway capa fina para el cultivo de *A. máxima*: A) Cultivo de 10 mil litros y B) cultivo de 100 L

#### 10.1.2 Realizar cultivos microalgales empleando aguas residuales de sistemas agropecuarios y agroalimentarios

Se realizó el cultivo de microalgas en diferentes proporciones de vacaza (Figura 2), sin embargo, se observa que no se obtuvo un crecimiento favorable de la microalga con el medio empleado. Cabe señalar, que durante la ejecución de la investigación se presentó problemas de contaminación de los cultivos microalgales desde la etapa del cepario. Para ello se emplearon protocolos de limpieza con antibióticos los cuales repercutieron en la robustez de la cepa a los pedios orgánicos como la vacaza. Al observarse un crecimiento favorable en medio industrial se seleccionó este medio para cultivo a mayor volumen, (Figura 3)

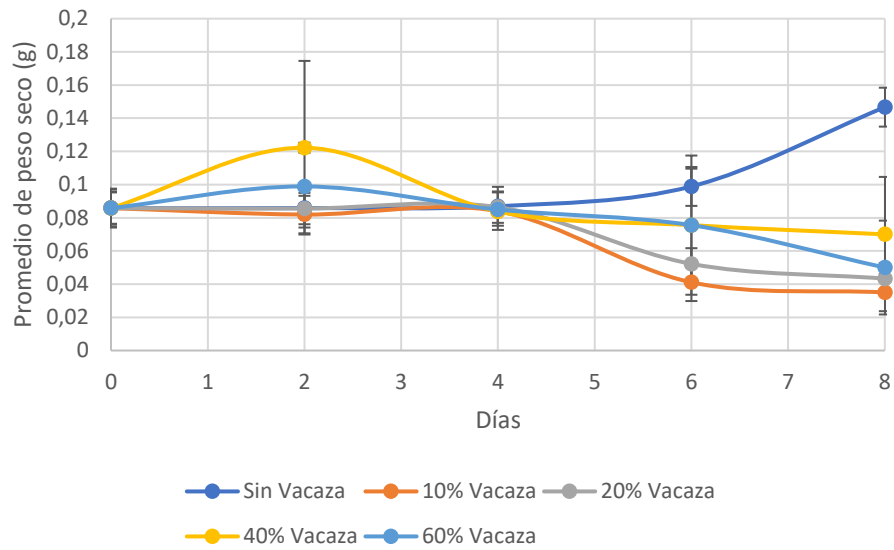


Figura 2 Curva de crecimiento de *A. maxima* en vacaza

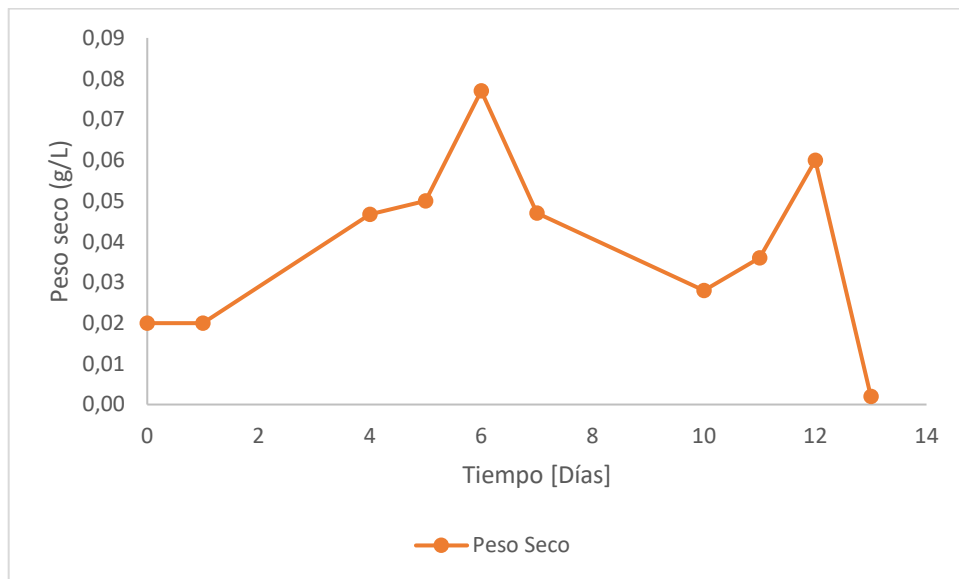


Figura 3 Curva de crecimiento de *A. maxima* en el estanque con medio industrial

### 10.1.3 Realizar procesos de secado y molienda de las microalgas

De la biomasa cosechada se procedió a realizar el proceso de secado a diferentes temperaturas, realizando curvas de secado a 50,60, 70 y 90°C, Figura 4 y Cuadro 3.

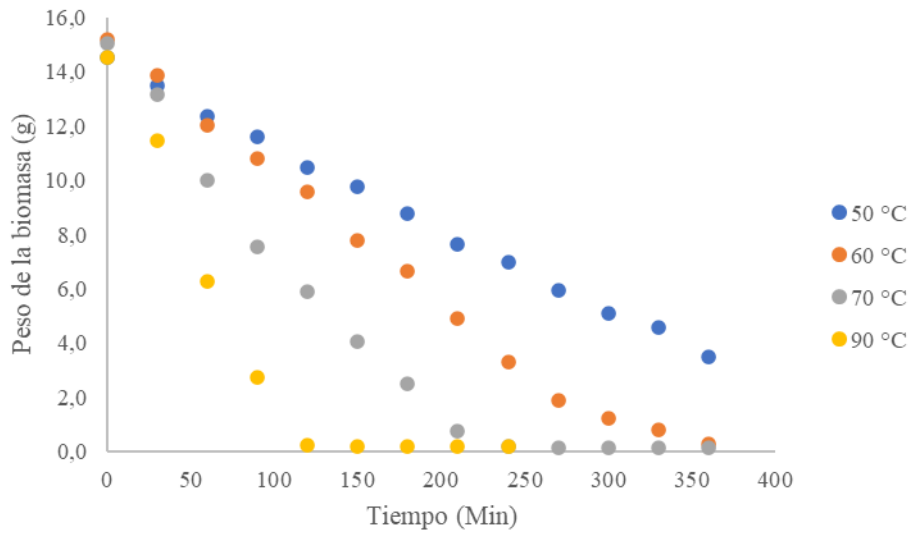


Figura 4 Curva de secado de las Biomasa de *A. maxima* a diferentes temperaturas

Cuadro 3 Secado de biomasa de *A maxima* a diferentes temperaturas

Tiempo (min)	Peso (g)			
	50 °C	60 °C	70° C	90 °C
0	14,5	15,2	15,1	14,5
30	13,5	13,9	13,1	11,5
60	12,4	12,0	10,0	6,3
90	11,6	10,8	7,6	2,7
120	10,5	9,6	5,9	0,2
150	9,8	7,8	4,1	0,2
180	8,8	6,7	2,5	0,2
210	7,7	4,9	0,7	0,2
240	7,0	3,3	0,2	0,2
270	5,9	1,9	0,1	
300	5,1	1,2	0,1	
330	4,6	0,8	0,1	
360	3,5	0,3	0,1	

#### 10.1.4 Rotura celular por método de ultrasonificación, homogenización e hidrólisis enzimática.

Se cuantificó la absorbancia a 260 nm y a 280 nm para determinar la liberación de ácidos nucleicos y proteínas respectivamente con lo métodos de rotura e hidrólisis de la biomasa de *A. maxima*.

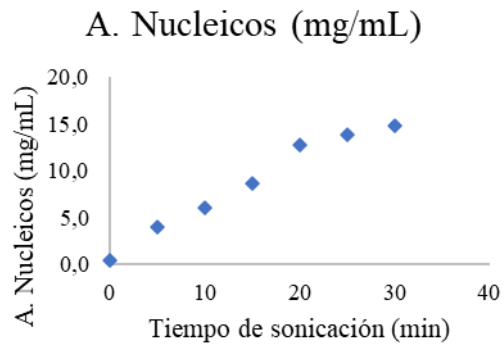


Figura 5 Evaluación del contenido de ácidos nucleicos en el sobrenadante de muestras sonicadas a diferentes tiempos

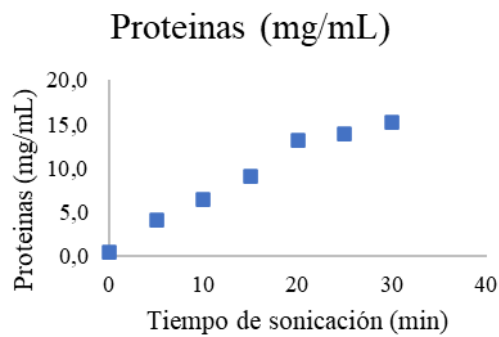


Figura 6 Evaluación del contenido de proteína en el sobrenadante de muestras sonicadas a diferentes tiempo

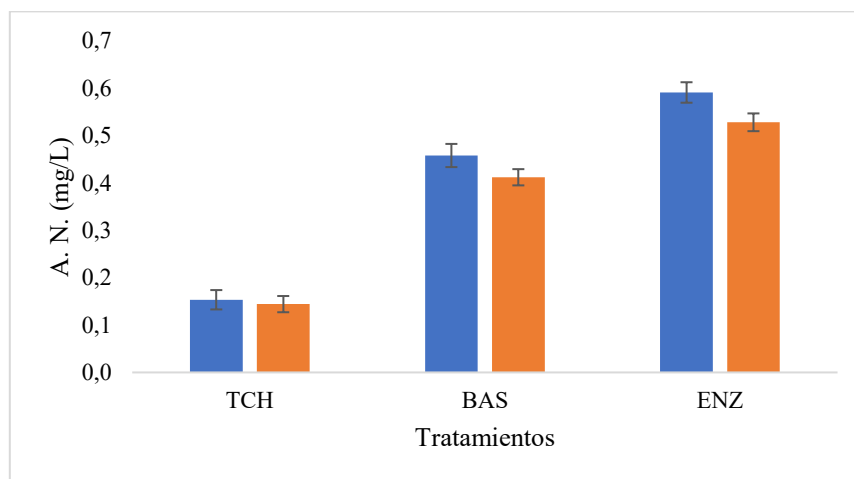


Figura 7 Liberación de ácido nucleico a biomosas tratadas con TCH: *Trichoderma Hazcianum*, BAS: *Bascillus subtilis* y ENZ: coctel enzimático.

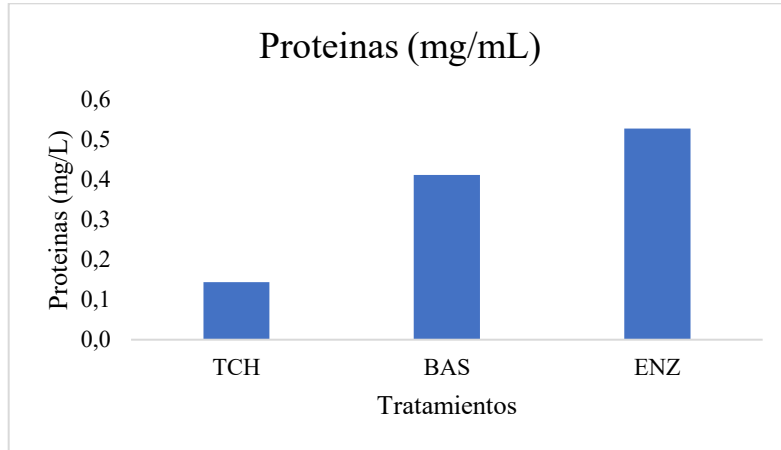


Figura 8 Liberación de proteínas de biomasas tratadas con TCH: *Trichoderma Hazcianum*, BAS: *Bascillus subtilis* y ENZ: coctel enzimático.

## 10.2 Establecer un protocolo de formulación de Nanobiofertilizantes a base de microalgas por medio de emulsiones Pickering estabilizadas con arcillas.

### 10.2.1 Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y caracterización fisicoquímica

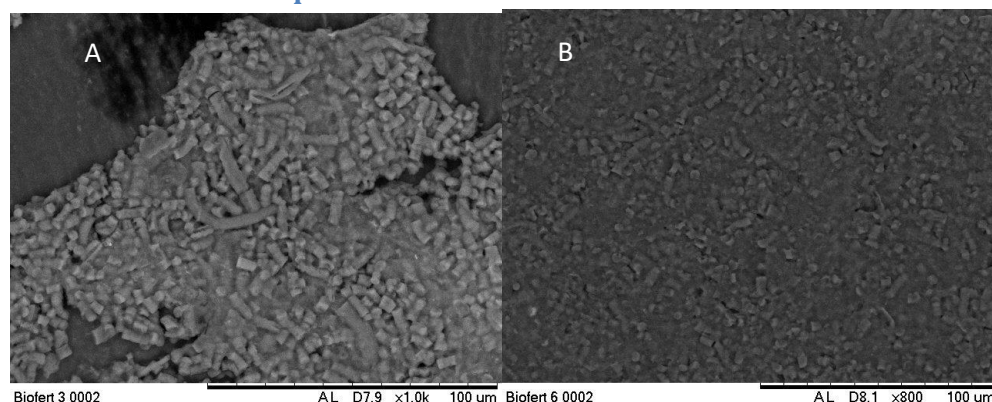


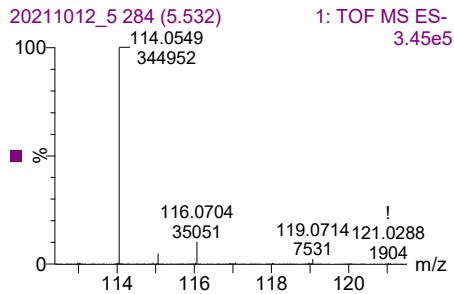
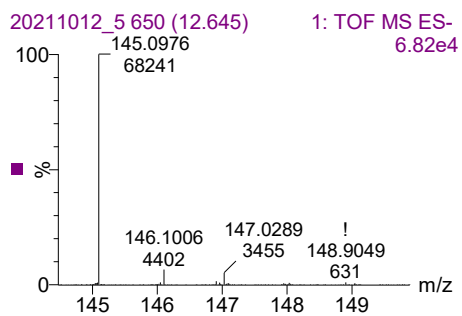
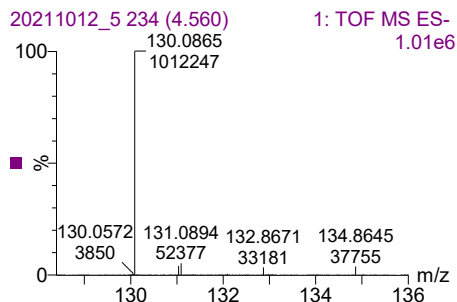
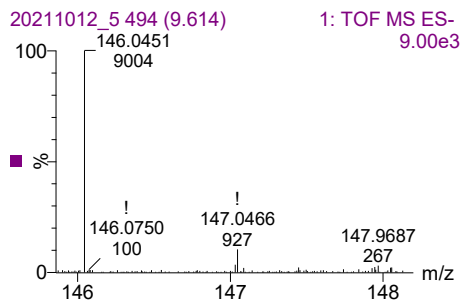
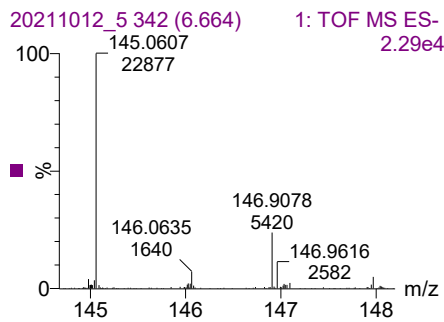
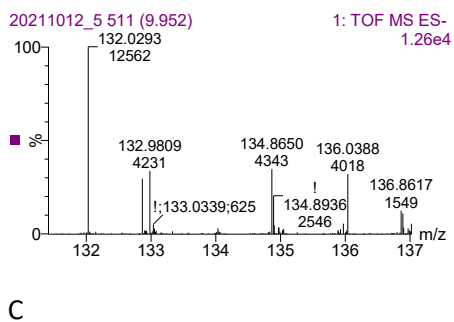
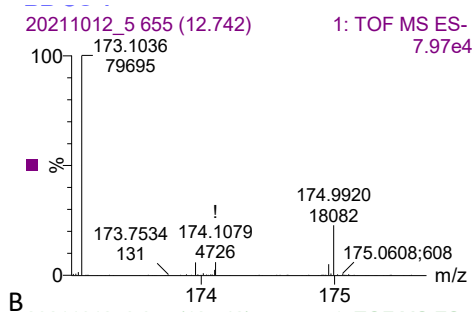
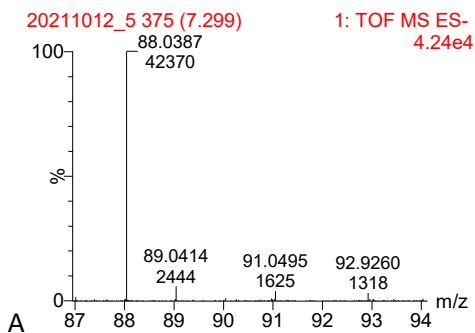
Figura 9 Imagen de microscopía electrónica TEM A) *Arthrospira máxima* hidrolisada, magnificación 1,0K B) *Arthrospira máxima*, magnificación x 800

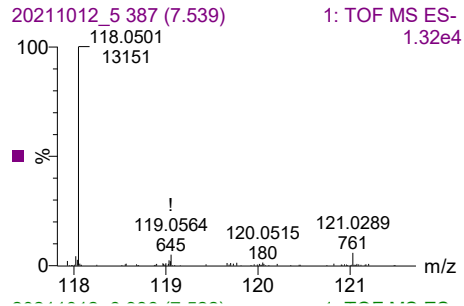
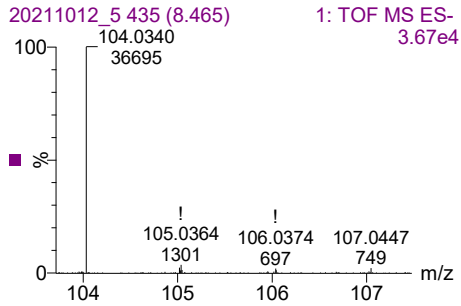
La biomasa se cosecho por medio de centrifugación y se procedió a realizar procesos de hidrólisis, esta se acompañó por medio de microscopía electrónica en donde se observa que la microalga al ser sometida a procesos de hidrólisis presenta un daño en su estructura la que queda fragmentada en unidades menores a las 10  $\mu\text{m}$ , Figura 9.

Cuadro 4 Análisis de elementos de las formulaciones desarrolladas

Identidad	% masa						mg/kg					pH	CE mS/cm	Densidad (g/mL)
	N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B			
Muestra A	ND	0.01 1	0.01 7	0.01 1	0.02 3	0.00 9	14	3	1	<1	3	4.8	0.7	1.00
Muestra B	0.44 5	11.9 1	0.01 3	0.01	0.09	0.04 5	266	<1	15	2	21	1.1	173.3	1.23
Vacaza	0.06	0.06	0.07	0.05	0.26	0.04	268.7	3	11	19	ND	6.8	11.2	1.02

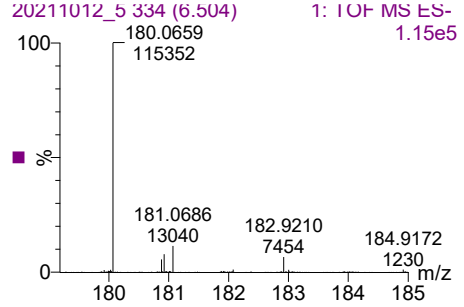
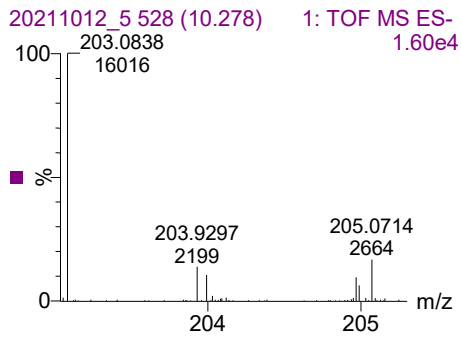
## 10.2.2 Caracterizar la biomasa microalga y el nanobiofertilizante por resonancia magnética, espectroscópica, microscópica y reológica





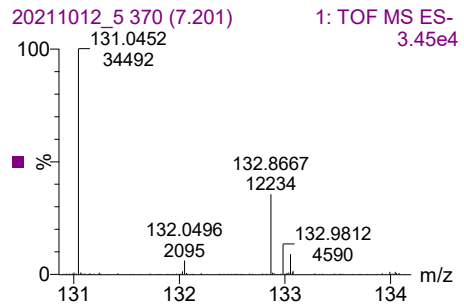
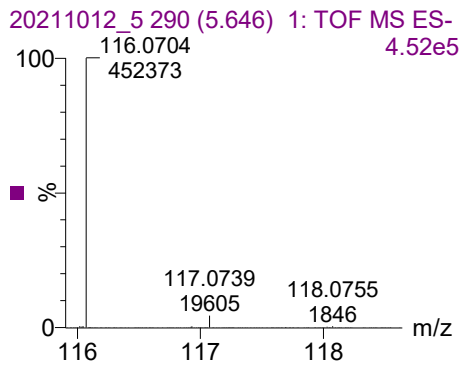
I

J



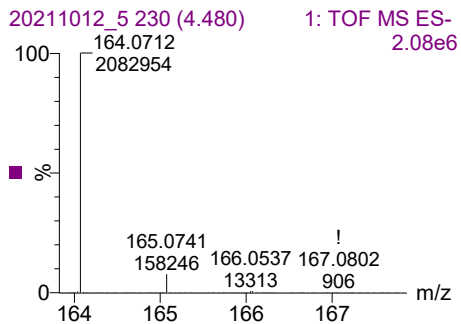
K

L



M

N

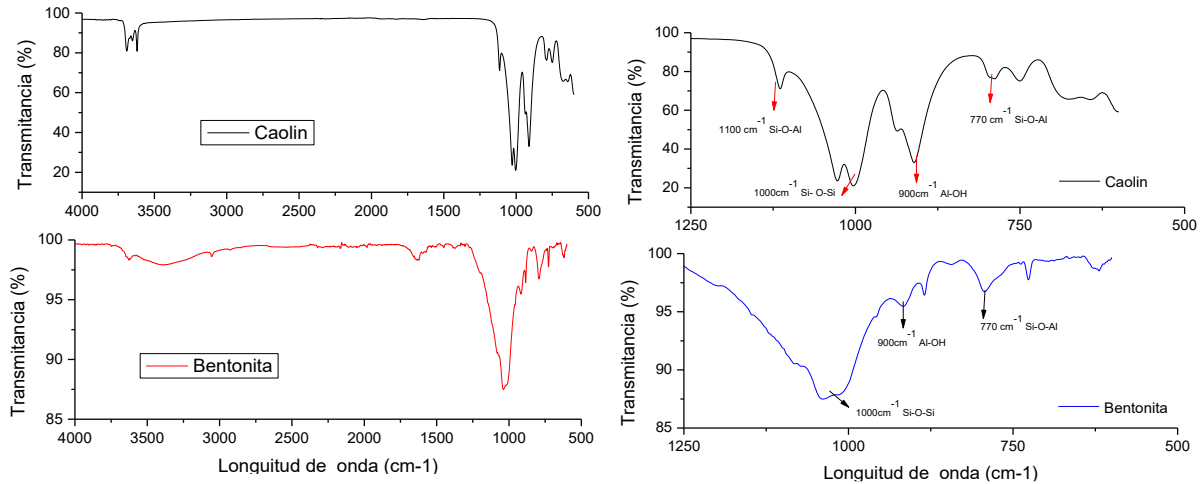


Ñ

Figura 10 Espectro de aminoácidos identificados mediante espectrometría de masas para el hidrolizado de microalgas: A) Alanina, B) arginina, C) Ácido aspártico, D) glutamina, E) ácido glutámico, F) leucina/isoleucina, G) lisina, H) prolina, I) serina, J) treonina, K) triptofano, L) tirosina, M) valina, N) asparagina, y Ñ) fenilalanina

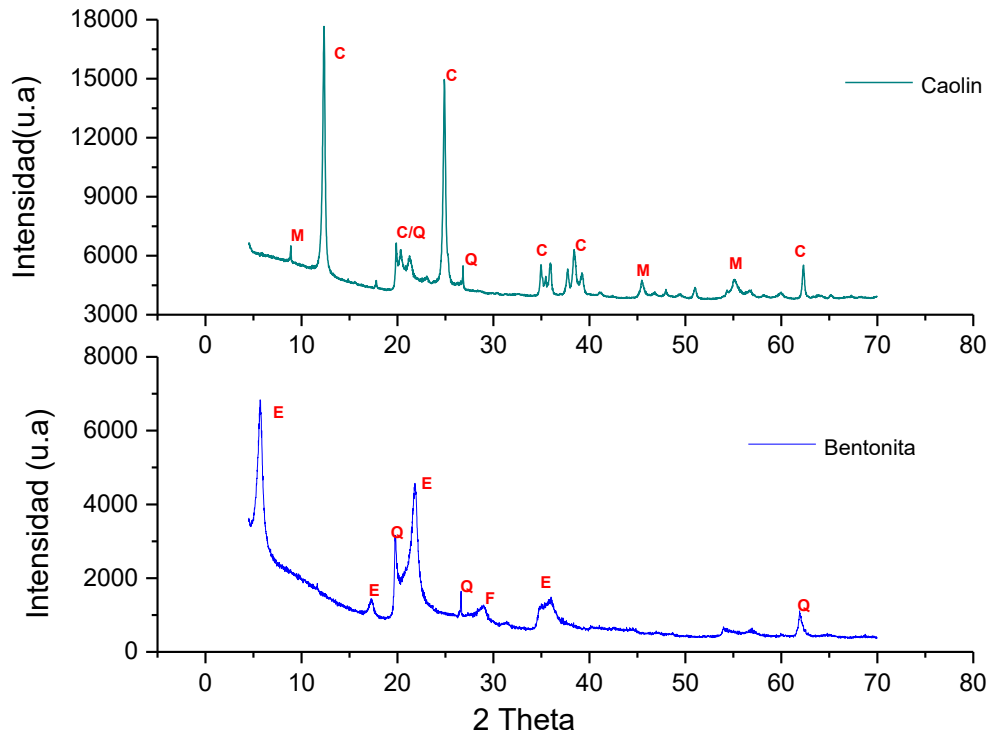
## Caracterización de arcillas

Se realizó la caracterización de las arcillas por técnicas de espectroscopia infrarroja la determinación de grupos funcionales. Con la difracción de rayos X (DRX) se logró determinar las fases cristalinas que componen las arcillas que serán utilizada para los nanobiofertilizantes. La microscopia de barrido permitió determinar la morfología de las mismas, espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDS) para determinar la composición.



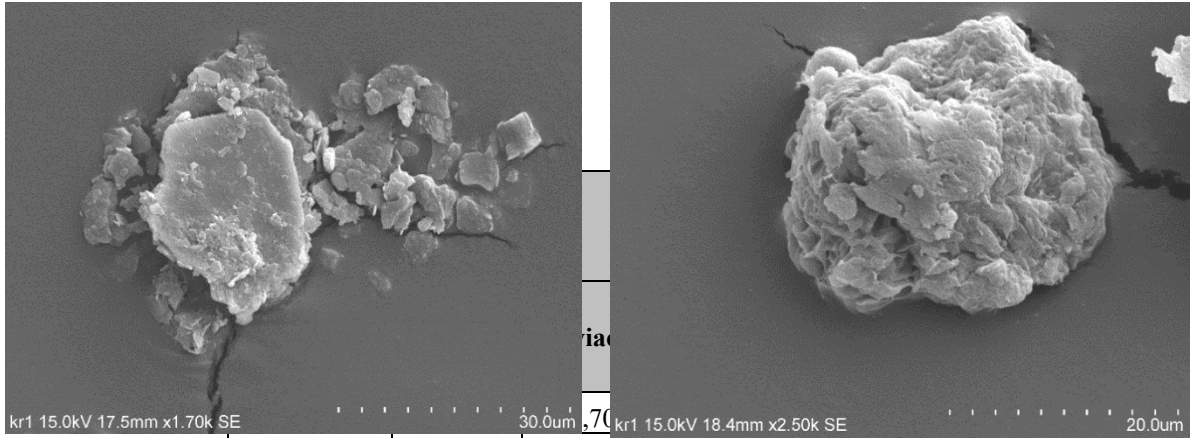
*Figura 11 Espectros infrarrojos de las arcillas bentonita y caolin que se usarán para la formulación de los nanobiofertilizantes*

Por medio de la espectroscopía de infrarrojo se permite detectar los principales grupos funcionales presentes en estos materiales. Las bandas correspondientes a las vibraciones entre  $1120-1045\text{ cm}^{-1}$  se deben al estiramiento asimétrico Si-O-Al y el enlace Si-O-Si. Las bandas ubicadas a  $950-914\text{ cm}^{-1}$  corresponden al enlace Al-OH, las bandas entre  $799-670\text{ cm}^{-1}$  son asignadas al estiramiento simétrico Si-O-Al y por último, las bandas entre  $538-477\text{ cm}^{-1}$  son adjudicadas a enlaces presentes en los tetraedros de silicio. (Landman & Waal, 2003).



*Figura 12 Espectro de difracción de rayos X de las arcillas que se utilizarán para formular los biofertilizantes*

En el caso del caolin se denota que mayoritariamente presenta caolinita, seguido por moscovita, y algunas fracciones pequeñas de cuarzo. Mientras que, en el caso de la bentonita se obtiene principalmente la fase de esmecita, seguido por cuarzo y feldespato.(Rojas-Reyes & Bustamante-Rúa, 2014; Torres et al., 2013)



Cuadro 5 Composición bentonita

	Caolín	Bentonita
Al	20,43	0,27
Si	21,29	0,34
P	1,22	0,01
K	0,265	0,005
Ti	0,707	0,073
Na	-	-
Mg	-	-
Ca	-	-

elemental de caolín y

Figura 13 Imagen de microscopía electronica de arcillas

Al caracterizarla por EDX se denota la composición elemental de las arcillas, siendo en ambas los componentes mayoritarios el O y Si. No obstante, presenta gran diferente en cuenta a la cantidad de aluminio, siendo mucho mayor en el caolín, también se observa que el caolín contiene pequeñas cantidades de titanio, fósforo y potasio, siendo estos últimos de relevancia para empleo agrícola. Mientras, la bentonita posee sodio, magnesio, fósforo y calcio.

Al observarlas al microscopio se denota como la bentonita esta conformada de laminas delgadas, mientras que la caolinita tiene una forma globular. Al determinar la distribución del tamaño se observa la siguiente distribución:

Tamiz	Bentonita			Promedio	Desviación
	1	2	3		
>250µm	0,37%	0,80%	4,49%	1,89%	0,02
250 -125µm	6,80%	9,76%	14,71%	10,42%	0,03
125-63µm	60,81%	72,36%	66,47%	66,55%	0,05
63-45µm	26,09%	15,10%	12,37%	17,86%	0,06
< 45µm	5,92%	1,97%	1,96%	3,29%	0,02

<b>Caolín</b>					
<i>Tamiz</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i>
<b>&gt;250µm</b>	70,22%	71,88%	71,44%	71,18%	0,01
<b>250 -125µm</b>	22,77%	20,30%	24,52%	22,53%	0,02
<b>125-63µm</b>	6,97%	7,76%	4,04%	6,26%	0,02
<b>63-45µm</b>	0,03%	0,05%	0,00%	0,03%	0,0002
<b>&lt; 45µm</b>	0,00%	0,02%	0,00%	0,01%	0,0001

Al realizar el tamizado se observa el caolín presenta valores mayores a los 125µm. Mientras que la bentonita se encuentra en un rango de 250-63 µm, siendo la fracción mayoritaria 125-63µm. Indicando con ello que posee menor tamaño de partícula. No obstante, ambas requieren de un proceso de molienda, por lo que se requiere realizar un diseño factorial en el molino de bolas planetarios, en donde se estudiará el tiempo y la velocidad. Además, se recomienda un proceso de secado para evitar aglomeraciones.

### 10.2.3 Caracterizar el fluido de la de la biomasa microalga y el nanobiofertilizante con ruptura, tales como: la viscosidad, estabilidad, tipo de fluido y tamaño de gota

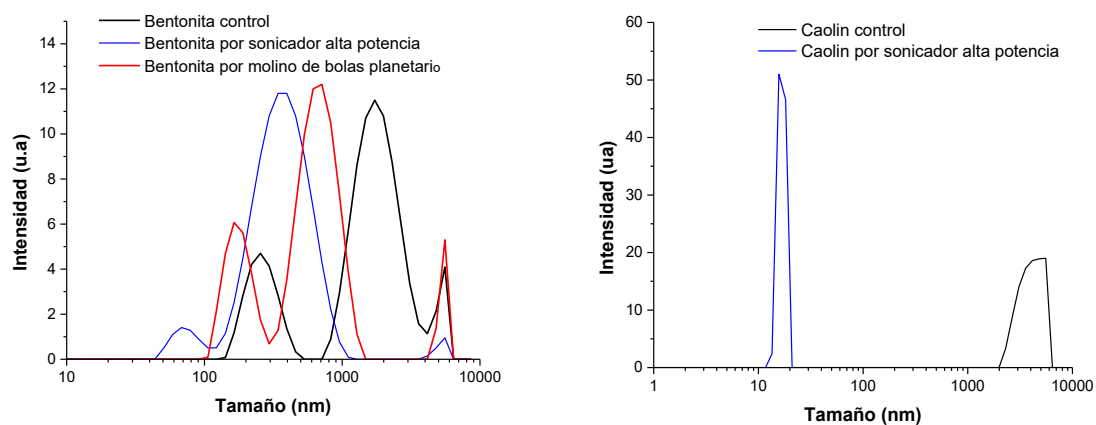


Figura 14 Reducción del tamaño de partículas de las arcillas bentonita y caolín

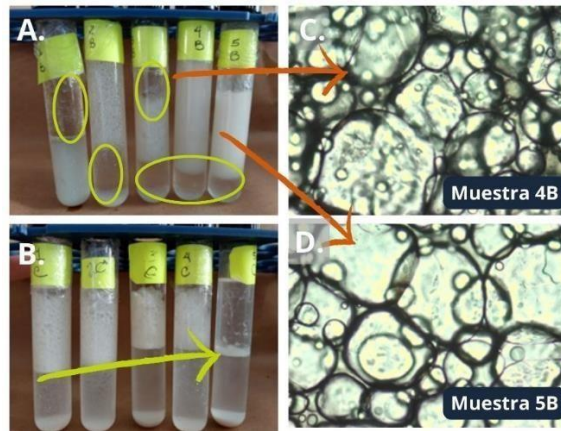


Figura 15 Barrido de formulación acorde a la salinidad empleando proporciones 50:50 aceite:agua, 0,5% arcilla. A los 8 días 1. Control 2. Adición NaCl 3. Adición NaCl y ajuste de pH 4. Adición KNO<sub>3</sub> 5. Adición KNO<sub>3</sub> y ajuste de pH. A) Barrido de formulación con bentonita B) Barrido de formulación con caolin. C) Muestra 4B D) Muestra 5B.

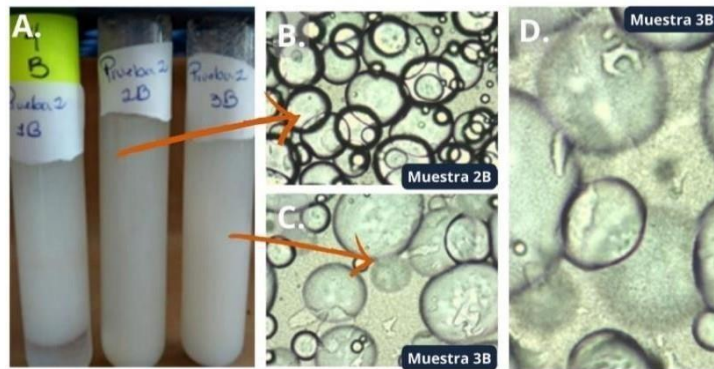


Figura 16 Barrido de formulación acorde a porcentaje arcilla empleando proporciones 50:50 aceite:agua, y KNO<sub>3</sub>. A los 8 días 1. 0,5% bentonita 2. 0,75% bentonita. 3. 1,0% bentonita. A) Barrido de formulación B) Muestra 2B. C) Muestra 3B. D) Muestra 3B

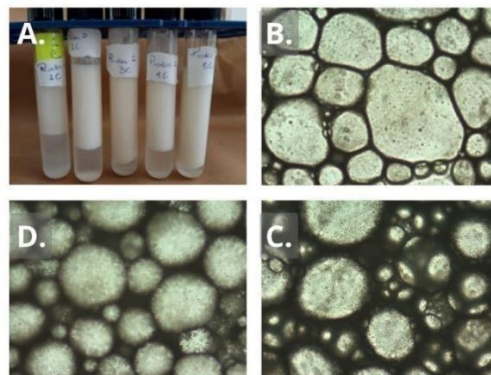


Figura 17 Barrido de formulación a porcentaje arcilla empleando proporciones 50:50 aceite:agua. 1. 0,5% caolin 2. 1,0% caolin. 3. 1,5% caolin 4. 2,0% caolin 5. 2,5% caolin A) Barrido de formulación B) Muestra 3C. Magnificación 10X C) Muestra 4C. D) Muestra 5C.

### 10.3 Determinar el efecto de las formulaciones de nanobiofertilizantes en el rendimiento agronómico (cultivo de piña) y en las comunidades microbianas del suelo asociadas al cultivo.



Figura 18 Campo de cultivo para la evaluación de las formulaciones de microalgas

#### 10.3.1 Realizar las aplicaciones de los nanobiofertilizantes a cultivos de piña y evaluar su efecto en desarrollo de la planta.

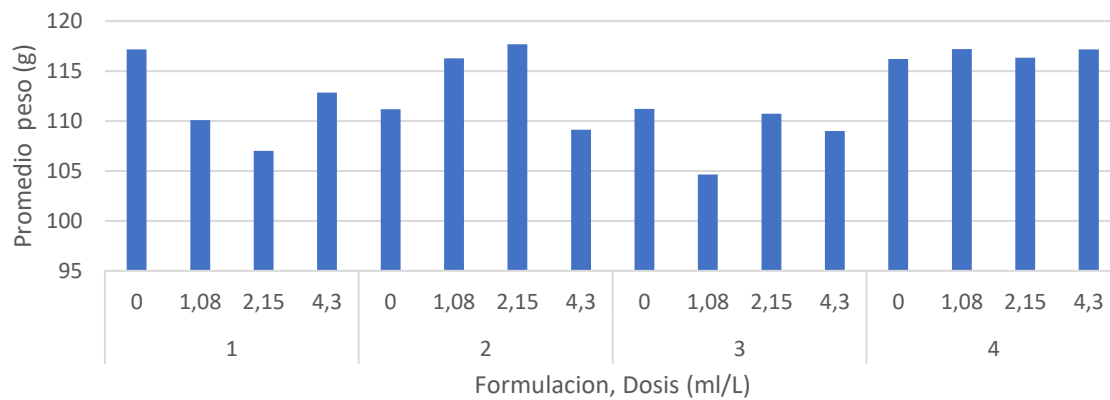


Figura 19 Evaluación del efecto de diferentes formulaciones de microalgas y dosis en el peso seco promedio de la hoja D de piña

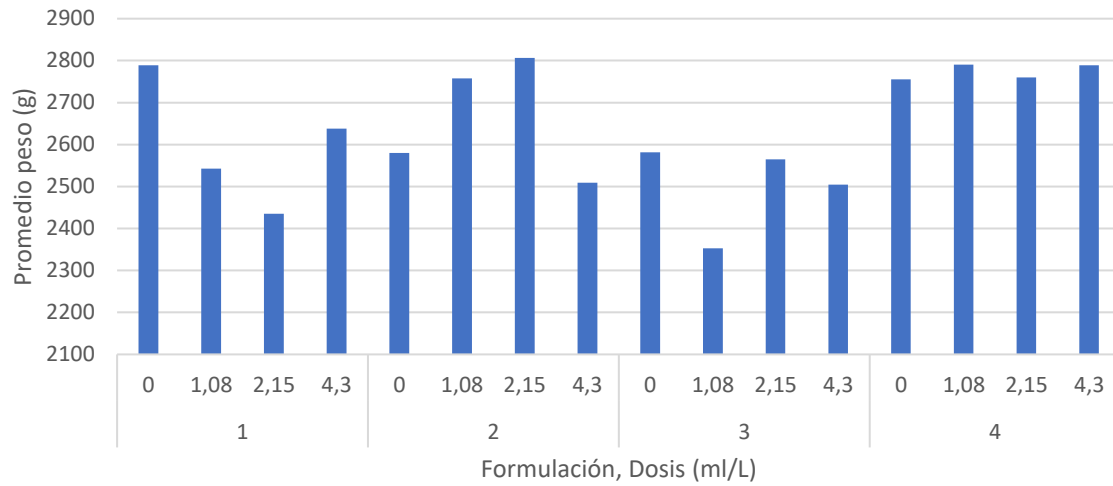


Figura 20 Evaluación del efecto de diferentes formulaciones de microalgas y dosis en el peso seco promedio de la planta de piña

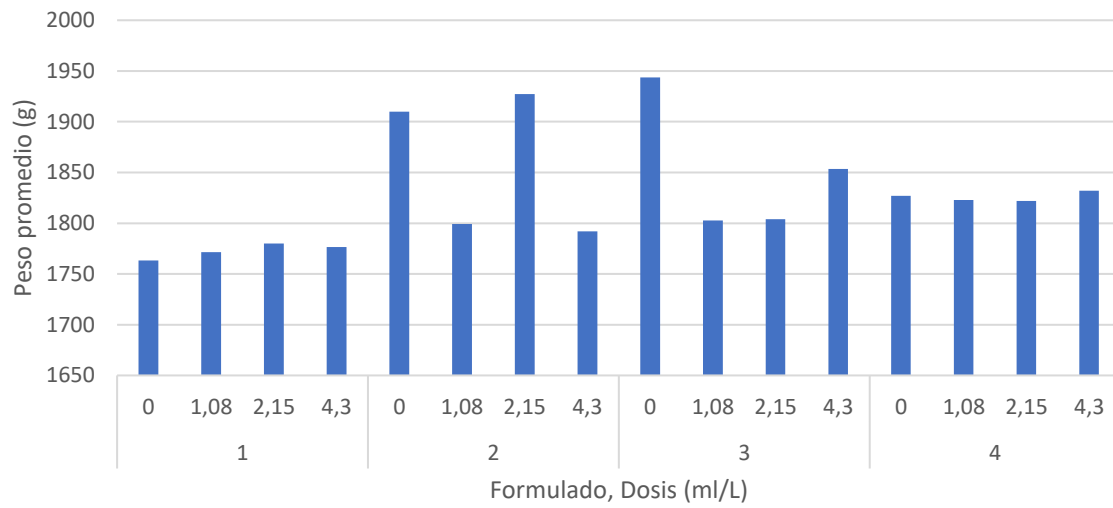


Figura 21 Evaluación del efecto de diferentes formulaciones de microalgas y dosis en el peso fresco promedio de los frutos de piña

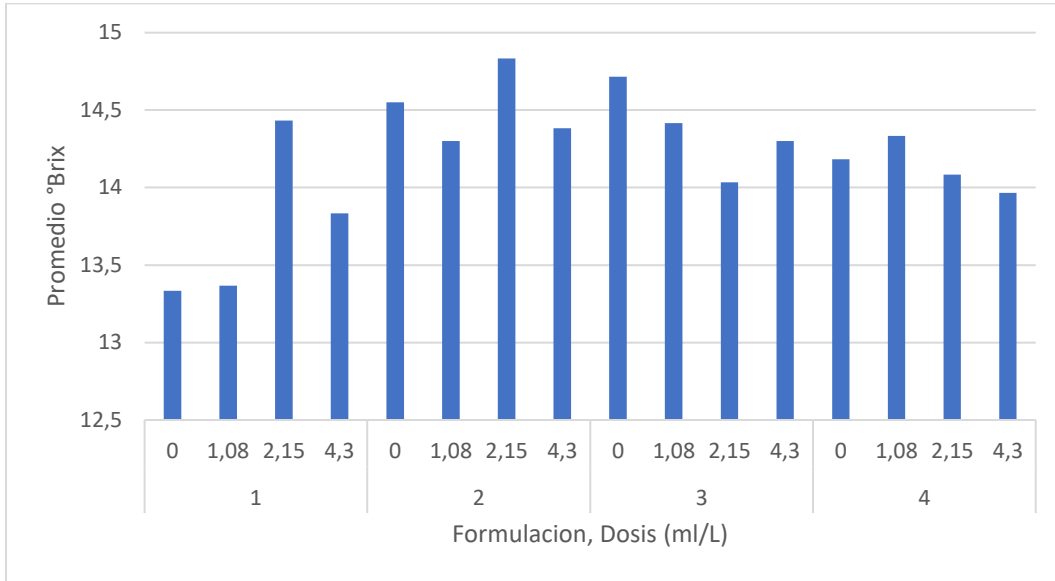


Figura 22 Evaluación del efecto de diferentes formulaciones de microalgas y dosis en los grados Brix promedio de los frutos de piña

### 10.3.2 Analizar y comparar la composición de las comunidades microbianas del suelo cuando se aplica en nanobiofertilizante a base de microalgas

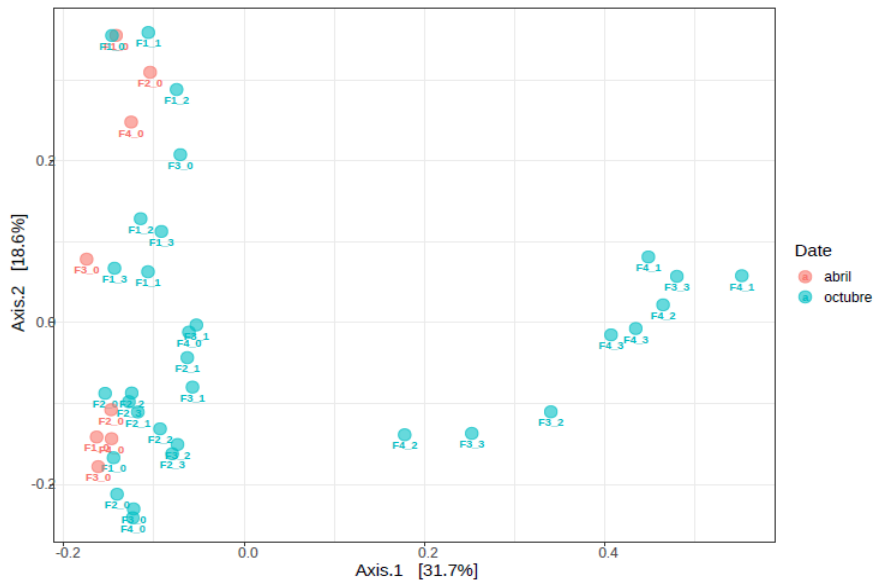


Figura 23 Análisis de ordenamiento de Coordenada Principales (PCoA) visualizado por inicio (abril) y final del experimento (octubre) de la comunidad de bacterias obtenida por secuenciación de amplicones de la región 16S rRNA.

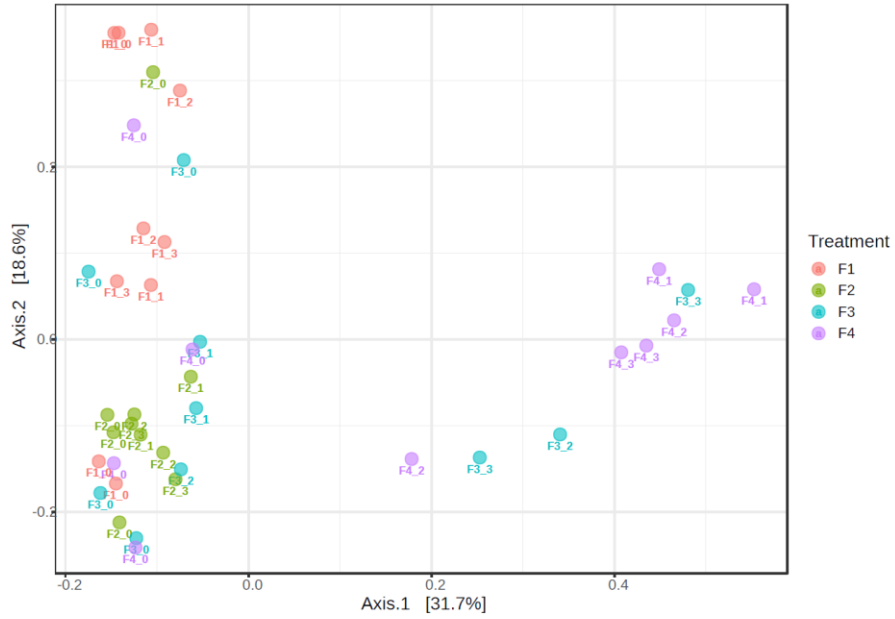


Figura 25 Análisis de ordenamiento de Coordenada Principales (PCoA) visualizado por tratamiento (formulado) y concentración del formulado de la comunidad de bacterias obtenida por secuenciación de amplicones de la región 16S rRNA.

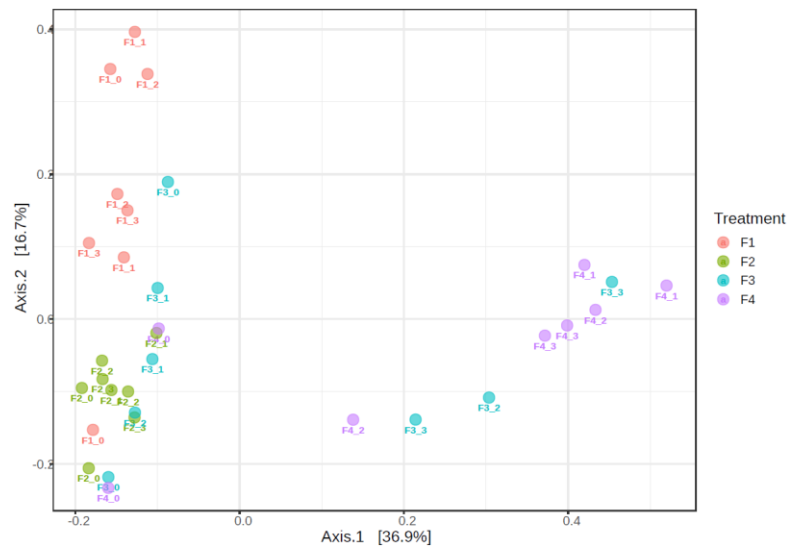


Figura 24 Análisis de ordenamiento de Coordenada Principales (PCoA) visualizado por tratamiento (formulado) y concentración del formulado, de la comunidad de bacterias al final del experimento

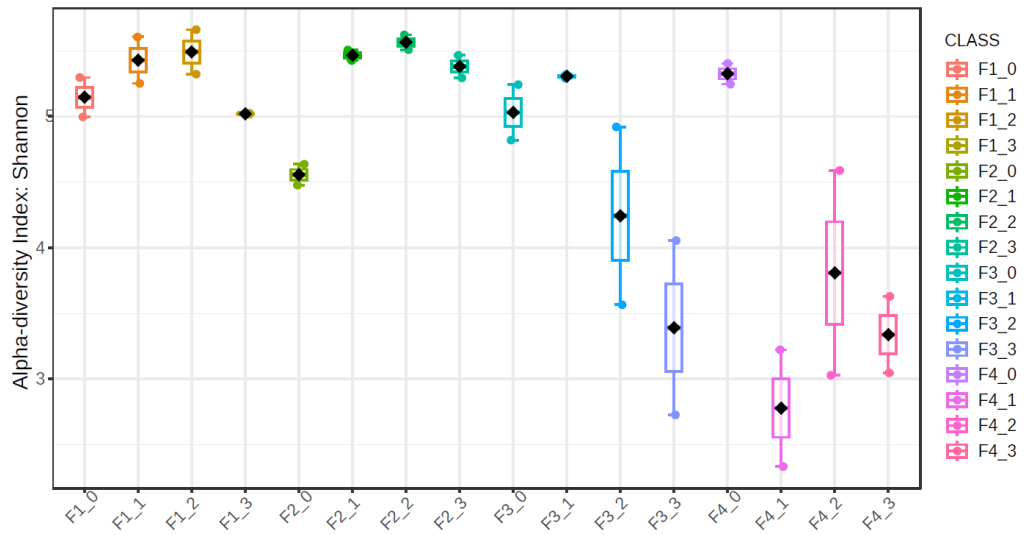


Figura 26 Diversidad alfa expresada con el índice de Shannon de las comunidades bacterianas para 4 tratamientos de microalgas

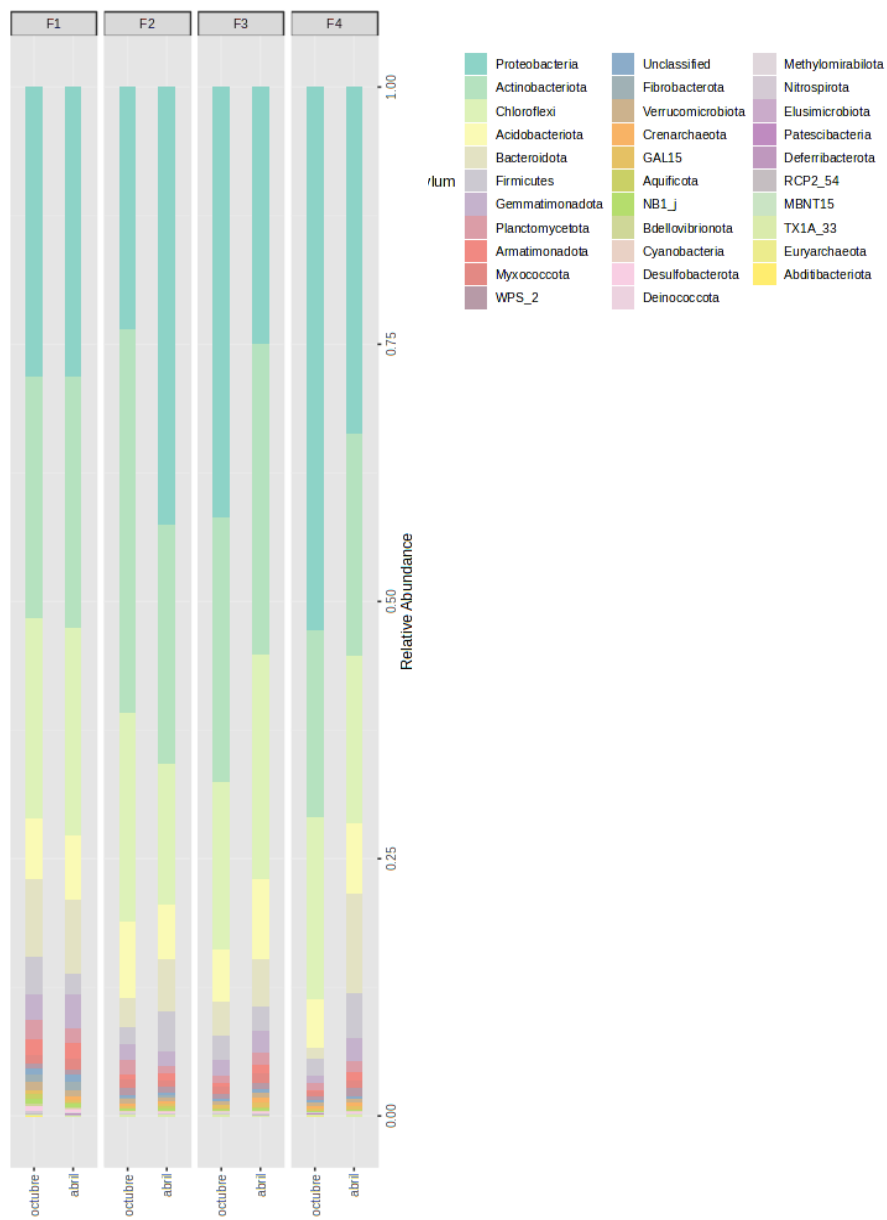


Figura 27 Abundancia relativa de la comunidad de bacterias al nivel al inicio (abril) y al final (octubre) de experimento.

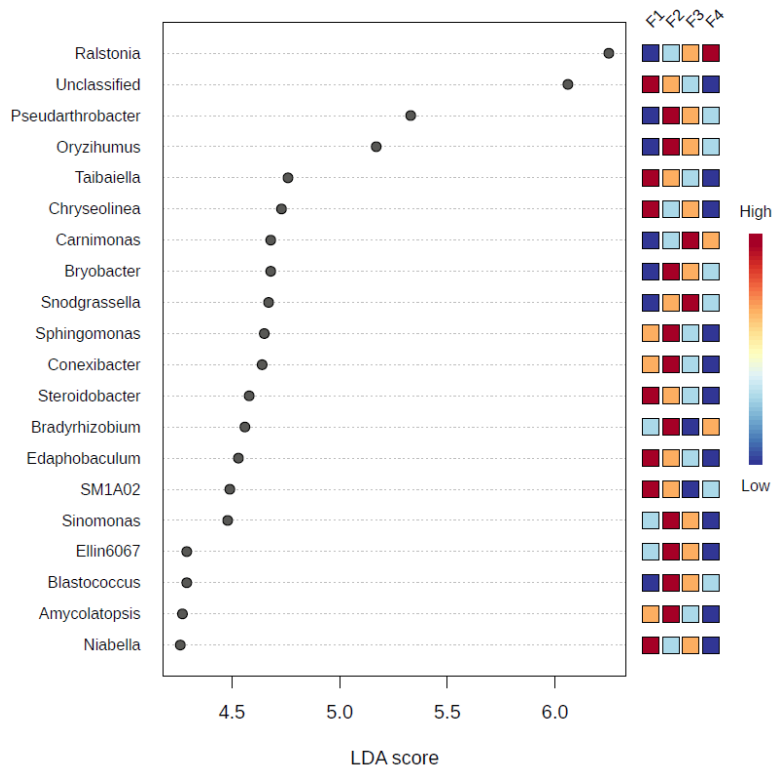


Figura 28 Análisis de prevalencia (LEFse) de los géneros con mayor presencia en cada uno de los tratamientos al final del experimento. Los colores rojo y naranja significan prevalencia alta y media-alta, respectivamente. Los colores celeste y azul son de prevalencia baja-media y baja, respectivamente.

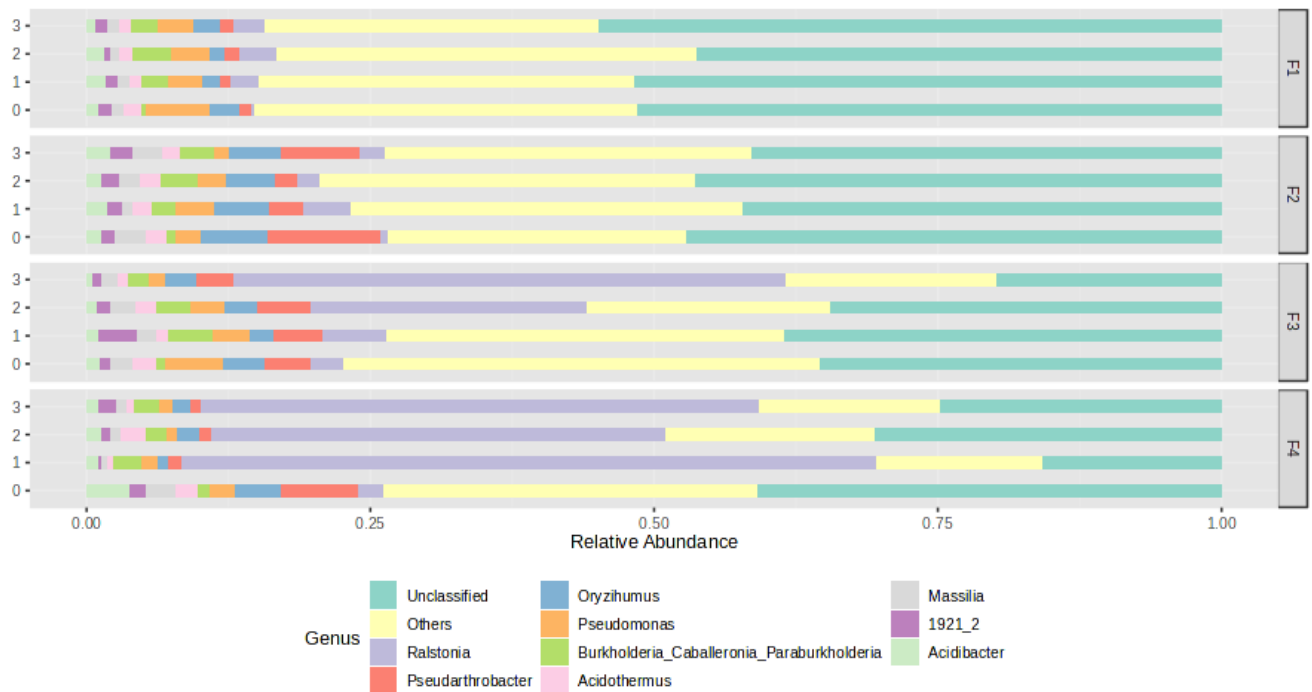


Figura 29 Análisis de abundancia relativa a nivel de filo en cada uno de los tratamientos y concentraciones del experimento.

## 11 Discusión

En investigaciones previas se demostró el potencial de las microalgas como insumo agrícola específicamente en los proyectos: 1) Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica y 2) Determinación de las características fisicoquímica y evaluación de la viabilidad económica de un prototipo de biofertilizante a base de microalgas costarricenses. En esta investigación se utilizó la *A máxima* como biomasa para la generación de nuevas formulaciones con aplicaciones agrícolas. Esta se sometió a diferentes procesos de hidrólisis para disminuir el tamaño de partícula y mejorar la estabilidad de las formulaciones. Se realizaron procesos de rotura e hidrólisis con enzimas comerciales y enzimas secretadas por el *Trichoderma Hazcianum* y el *Bacillus subtilis*, mostrando que las enzimas presentan una mayor liberación de ácidos nucleicos y proteínas al ser incubadas con la biomasa de microalgas, seguido de *B. subtilis* y en menor cantidad el *Trichoderma Hazcianum* (Figura 7 y Figura 8.) .

Una vez generado el hidrolizado se procedió a utilizar arcillas para estabilizar la formulación. Para poder emplear las arcillas como estabilizante de emulsiones se redujo el tamaño, *Figura 14*, pues medirlas inicialmente da para la bentonita poblaciones de 5120nm, 1865nm y 265nm y el caolín de 4089nm. Posteriormente se realizó la reducción por sonicador de altapotencial dando valores de 395nm y 17nm respectivamente. En el caso de molino de bolas planetariola reducción fue de la población mayoritaria fue de 695nm para bentonita y en el caolín hubo agregación y se encuentra fuera de rango. Este estudio de reducción de tamaño es de suma relevancia, ya que para poder estabilizar emulsiones mediante partículas se debe tener los materiales en escala nanométrica. Es por ello, que los barridos de formulación se realizaron empleando la arcilla obtenida con el sonicador de alta potencial.

Además, es importante destacar que las arcillas poseen carga eléctrica en su superficie, pues al ser un mineral en suspensión las partículas se genera un desbalance eléctrico por la ruptura de enlaces en la superficie y eso ocasionará que desestabilización en la emulsión, razón por la cual se caracterizó el potencial Z de la bentonita en -37.8 y el del caolín es -1.4. Es importante destacar que cuanto se tienen partículas como estas, el efecto en la variación del pH o de la salinidad del medio pueden ocasionar que cambien su hidrofiliidad y el grado de humectación, como resultado de las diferentes densidades de cargas superficiales.

Es por ello que para hacer los estudios preliminares para la emulsión se evaluó un sistema 50:50 aceite:agua, como surfactante 0,5% arcilla, variando la salinidad de mediante el empleo de NaCl o KNO<sub>3</sub>, pues el cloruro de sodio se emplea como control por excelencia. No obstante, debido a la aplicación se busca una alternativa que sea más compatible con la aplicación agrícola y no afecte al microorganismo con actividad bioestimulante se emplea el nitrato de potasio, que a su vez se emplea como fertilizante y puede considerarse como un enriquecimiento de la formulación.

En la Figura 15 observan en el barrido de formulación realizada con bentonita, en donde los óvalos amarillos muestran las secciones clarificadas producto de los fenómenos de desestabilización que llevan a la coalescencia, y por ende a la separación de las fases. En la Figura 16 (B) se muestra el barrido de formulación con caolín. En este caso se denota como al agregar sales o ajustes de pH se da un aumento en la clarificación hasta llegar a una separación total. En el caso de la Figura 17 (C) y Figura 17 (D) estas son fotos tomadas mediante un microscopio de luz de las muestras 4B (Figura 15 C) y 5B (Figura 15 D), que son las que presentan mejor estabilización, sin embargo, su tamaño de partícula aun es grande en ambos casos, siendo su mayor diferencia la cantidad de etapas requeridas para su

elaboración. Cabe destacar que para el caso del barrido con caolín las gotas son tan grandes que colapsan y por esa razón no pueden observarse al microscopio, siendo la de mayor estabilización la muestra 1C que no presenta ajuste de salinidad ni de pH.

Estas condiciones concuerdan con los potenciales Z medidos con anterioridad, pues el que presenta mayor cantidad de cargas superficiales es la bentonita por ende al emplear una sal en el medio se disminuiría la repulsión y así provee una mayor hidrofobicidad a las capas adsorbidas, generando a su vez mejores propiedades para que migre a la interfaz de una emulsión y logre estabilizara

Posteriormente, se realizó un barrido de formulación aumentando la concentración de arcilla en el medio la Figura 16 se muestra los resultados empleando bentonita. Donde se puede observar que un aumento en la estabilidad al incrementar el contenido de bentonita en el medio, pues no se destacan zonas clarificadas. Sin embargo, en la muestra 3B se denota la arcilla en la parte superficial de las gotas cuanto esta se encuentra al 1%.

Para el caso del barrido empleando caolín, Figura 17, esta debió llevarse a valores más altos de concentración, siendo el mayor 2,5%, no obstante, aún se muestra una ligera clarificación en la parte inferior. En cuanto a las fotos de microscopio, se observa una disminución del tamaño de partícula que como consecuencia da una mejor estabilización. Además, al tener el valor de 2,5%, de caolín se logra distinguir las partículas de arcilla recubriendo las gotas de aceite

Para su evaluación en campo se procedió a codificar las formulaciones y se evaluaron en Buenos Aires de Puntarenas en Pindeco. El estudio inició desde la preparación del terreno, la plantación del cultivo de piña y su desarrollo hasta la cosecha. En el diseño experimental se evaluaron diferentes formulaciones y dosis para cada tratamiento. Del cultivo se evaluó el peso promedio de la Hoja D, no se observó diferencias significativas entre los diferentes tratamiento (Figura 19) el mismo comportamiento se obtien con respecto al peso promedio de la planta al final de la cosecha (Figura 20). Con respecto al peso fresco promedio de los frutos, se observa tratamientos en los los controles (Dosis 0), el peso es muy superior al tratamiento con las formulaciones (Figura 21). Con respecto a los grados Brix, se observa un ligero incremento con respecto los controles de cada tratamiento.

Adicionalmente se realizó toma de muestras de suelo lo cual permitió evaluar la diversidad microbiana. El análisis de diversidad beta se hizo con un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para determinar si los tratamientos ejercieron alguna diferencia en la estructura de la comunidad microbiana (Figura 23 y Figura 25). La primera observación es que entre el inicio del experimento (abril) y el final (octubre) solamente hay una diferenciación clara de la comunidad microbiana para el tratamiento F4 en sus tres concentraciones del formulado (F4\_1, F4\_2, F4\_3), así como para F3 en dos concentraciones (F3\_2 y F3\_3). Se nota que inclusive los puntos de F3 y F4 en octubre también difieren de la concentración cero del formulado, es decir, estos dos tratamientos están modificando la comunidad microbiana del suelo. También se observó una tendencia con las muestras de suelo del tratamiento F1 que se agruparon en el cuadrante superior izquierdo y los del F2 en cuadrante inferior izquierdo del PCoA (Figura 23 y Figura 25) Posteriormente, el PCoA se corrió solamente para las muestras de suelo del punto final del experimento (octubre) donde se confirmó que el tratamiento F1 y F2 se agrupan en el cuadrante superior izquierdo y el inferior izquierdo, respectivamente (Figura 24), ambos con puntos dispersos con respecto a las concentraciones evaluadas. Esto sugiere que estos tratamientos no tuvieron influencia significativa en la composición de la comunidad microbiana. Por otro lado, las concentraciones 1, 2 y 3 de los tratamientos F3 y F4 si generaron una modificación de la comunidad microbiana, tal y como se observan en la Figura 23, Figura 25 y Figura 24.

Esta modificación en las comunidades de bacterias de los tratamientos F3 y F4 se vio reflejada en el análisis de diversidad alfa (Figura 26). Para el tratamiento F3 (concentraciones 2 y 3) y el tratamiento 4 (las tres concentraciones), se observó una reducción significativa de la diversidad de bacterias con respecto al tratamiento control (F3\_0 y F4\_0). En este sentido, el perfil de la abundancia de la comunidad de bacterias al nivel taxonómico de filos, permaneció casi invariable en el tratamiento F1 entre el inicio y el final de experimento. En F2, se observó al final del experimento un aumento del filo Proteobacteria y una reducción de la Actinobacteria. Por el contrario, en F3 y F4 se redujo el filo Proteobacteria y un ligero aumento de Actinobacteriota, Acidobacteria y Bacteroidota (Figura 27). Para conocer a nivel taxonómico de género cuáles son los que están haciendo esta diferencia, se realizó un análisis de prevalencia de los géneros más abundantes. Se observó que en los tratamientos F3 y F4 hay una alta prevalencia de *Ralstonia* spp. (Figura 28) al finalizar el experimento, las cuales son especies que pertenecen al filo Proteobacteria. Además, el aumento en la abundancia de este género fue notable cuando se visualiza el efecto del tratamiento en cada una de las concentraciones evaluadas (Figura 29).

## 12 Conclusiones y recomendaciones

El uso de arcillas permitió estabilizar la biomasa de *A. máxima* para la formulación de insumos agrícola. Fue posible generar diferentes formulaciones, y se procedió a someter a Secreto la que presentó mejor estabilidad. Al evaluar las formulaciones en cultivo de piña se observó un pequeño incremento en el contenido de grado brix de los frutos, y un cambio en la abundancia y diversidad de los microorganismos presentes en el suelo.

Se recomienda poder evaluar la compatibilidad de las formulaciones desarrolladas con algunos insumos empleados en el manejo agronómico del cultivo de piña como herbicidas y otros agroquímicos.

## 13 Referencias

Auweter, H., Behrens, S. H., & Ngai, T. (2009). Novel agrochemical formulations Google Patents. Obtenido de <https://encrypted.google.com/patents/EP1928593B1?cl=en>

Bhardwaj D., Mohammad W. A., Ranjan K. S. and Narendra T. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories* 2014, 13:66

Coppens, J., Grunert, O., Van, D. H., Vanhoutte, I., Boon, N., Haesaert, G., & De Gelder, L. (2016). The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2367-2377. 10.1007/s10811-015-0775-2 Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0775-2>

Dineshkumar R., Subramanian J., Gopalsamy J., Jayasingam P., Arumugam A., Kannadasan S., Sampathkumar P. (2017). The Impact of Using Microalgae as Biofertilizer in Maize (*Zea mays* L.) *J. Waste Biomass Valor.* DOI 10.1007/s12649-017-0123-7.

Fagerström, A. (2014). Effects of surfactant adjuvants on plant leaf cuticle barrier properties Malmö University, Faculty of Health and Society.

Frelichowska, J., Bolzinger, M., & Chevalier, Y. (2010). Effects of solid particle content on properties of o/w pickering emulsions//doi.org/10.1016/j.jcis.2010.08.019. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979710009148>

Garcia-Gonzalez, J., & Sommerfeld, M. (2015). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *acutodesmus dimorphus*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1051-1061. 10.1007/s10811-015-0625-2 Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789255/>

Grunert, O., Coppens, J., Van, D. H., Vanhoutte, I., Boon, N., Haesaert, G, Gelder, L. (2016). The application of microalgae as a slow-release fertilizer: Tomato cultivation as a model

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2018). Consumo de fertilizantes (kilogramos por hectárea de tierras cultivables). Obtenido de <https://datos.bancomundial.org/>

Pérez, Á. (2018). El sector de fertilizantes vivirá cambios "que no tienen precedentes". Obtenido de <https://www.interempresas.net/>

Schreiber, L., & Schonherr, J. (2009). Water and solute permeability of plant cuticles Springer.

Tripathi, R. D., Dwivedi, S., Shukla, M. K., Mishra, S., Srivastava, S., Singh, R., ... & Gupta, D. K. (2008). Role of blue green algae biofertilizer in ameliorating the nitrogen demand and fly-ash stress to the growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Chemosphere*, 70(10), 1919-1929.

Uysal, O., Uysal, F. O., & Ekinci, K. (2015). Evaluation of microalgae as microbial fertilizer. *European Journal of Sustainable Development*, 4(2), 77-82. Obtenido de <http://ecsdev.org/ojs/index.php/ejsd/article/view/238>

Vindas Segura, M. Miden gases de efecto invernadero en actividades agrícolas y ganaderas. Obtenido de <https://vinv.ucr.ac.cr/es/noticias>

Zhang, S., Wang, L., Wei, W., Hu, J., Mei, S., Zhao, Q., & Tsang, Y. F. (2017). Enhanced roles of biochar and organic fertilizer in microalgae for soil carbon sink. *Biodegradation*, 10.1007/s10532-017-9790-0. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s10532-017-9790-0>

Zoppe, J. O., Venditti, R. A., & Rojas, O. J. (2012). Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes//doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.011 Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979711015001>

## 14 Anexos

Congreso Sofilac 2024: <https://cindyfdez.my.canva.site/>

### Uso de microalgas como bioestimulantes en diferentes cultivos en Costa Rica

Fabián Villalta Romero<sup>1</sup>, Francinie Murillo Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microalgas, Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, [fvillalta@itcr.ac.cr](mailto:fvillalta@itcr.ac.cr);

**Introducción:** En los últimos años la agricultura se enfrenta al reto de poder cubrir la demanda de alimentos a nivel mundial de forma sostenible. Los suelos agrícolas requieren de nuevos insumos que les permita regenerarse para poder aumentar los rendimientos productivos. Las microalgas se han propuesto como una solución para el sector agrícola, sin embargo, aún es necesario profundizar en el modo de acción de las microalgas en la interacción con las plantas y el suelo, además en el desarrollo de una tecnología disponible para los agricultores. **Objetivo:** Implementa diferentes herramientas de las ómicas en la Biotecnología Microalgal para comprender el efecto de las microalgas en la productividad, la fisiología de las plantas y la dinámica del suelo. **Métodos:** Por medio de los ensayos en campo en los que se ha evaluado formulaciones de bioestimulantes a base de microalgas. Se ha diseñado formulaciones de bioinsumos que se integren a las prácticas agronómicas de diferentes cultivos como café, piñas melón, sandía, hortalizas y pasturas para la ganadería. Estas evaluaciones se han realizado desde el año 2017 hasta el presente año en los diferentes cultivos. El tamaño de la muestra para cada evaluación de cultivo ha sido variable, se han hecho evaluaciones en cultivos en campo en áreas de 4m<sup>2</sup> hasta 1 hectárea. La evaluación de parámetros como tipo de microalga, dosis, frecuencia de aplicación y momento de aplicación se han estudiado para el correcto manejo de las microalgas como bioinsumo agrícola. Además. Se ha realizado la extracción de metabolitos del suelo para su evaluación por espectrometría de masas y la extracción de ADN para evaluar las comunidades microbiológicas del suelo se ha generado información para el correcto diseño de planes de manejo en diversos cultivos. **Conclusiones:** se ha demostrado que la aplicación de bioinsumos de microalgas modifica las comunidades microbiológicas incrementando los organismos benéficos para los cultivos y la reducción de gases de efecto invernadero. La aplicación de microalgas al suelo posibilita el aprovechamiento de los gases como el dióxido de carbono producido por levaduras y bacterias para la generación de factores de crecimiento y azúcares que juegan papeles claves en la resistencia al estrés abiótico, en la retención de humedad en época de estrés hídrico y en la activación de algunos genes por parte de las plantas.

**Palabras claves:** Acondicionadores, compuestos moleculares, desafíos, fertilidad, microbiota.

## Congresso Brasileiro do Potencial Energético de Microalgas 2024

### EFFECT OF MICROALGAE BIOSTIMULANT ON TROPICAL CROPS

Autores: Fabián Villalta Romero (Instituto Tecnológico de Costa Rica, [fvillalta@itcr.ac.cr](mailto:fvillalta@itcr.ac.cr)), Francinie Murillo Vega (Instituto Tecnológico de Costa Rica, [fmurillo@itcr.ac.cr](mailto:fmurillo@itcr.ac.cr)).

*Área temática: Microalgas e Agricultura*

#### Resumo

The heightened awareness concerning food safety, and sustainable and efficient agriculture has engendered the need to integrate production systems.. Microalgae bioproducts have a great potential to be used as biostimulant in conventional agriculture. The research aimed to examine the impact of microalgae biostimulant on the productivity of crops such as sweet pepper and pineapple. The research results show that the microalgae biostimulants can increase productivity, quality, and soil microbiology community. This demonstrates the potential of microalgae for agriculture applications.

**Palavras-Chave:** microalgae, agriculture, biostimulant, tropical

#### Introdução

Microalgae have commercial potential in modern agriculture, they can be used because they can supply nutrients to the soil and supply some metabolites as plant growth hormones, and saccharides, that improve agricultural productivity[1] and the microbiology community [2]. Therefore, products formulated from microalgae as biofertilizers and biostimulants, the correct application over the soil or plant leaves, the moment of application, frequency, and compatibility with other agriculture products turn out to be beneficial for agriculture and are positioned as a novel and environmentally friendly strategy. However, these bioproducts present challenges in preparation, correct application, and experience of effect in different crops

#### Objetivos

Evaluated the effect of microalgae biostimulants in tropical crops.

#### Material e Métodos

The experiment was carried out in the experimental greenhouse of the Department of Agricultural Engineering, located in the Technological Institute of Costa Rica., Cartago-Costa Rica, crop fields of PINDECO in Buenos Aires Puntarenas Costa Rica and Cariari Costa Rica. The tested biostimulant was compared with commercial marine algae biostimulant was used as a control. Parameters such as quantity and frequency of applications were evaluated based of the crop manager.

#### Resultados e discussão

The application of microalgae biostimulant on sweet pepper shows a positive effect on the quality and quantity of the fruits. It was also determined that the number of fruits increased with the application of microalgae. The increase in the length, weight, and width of the fruits was higher with the application of microalgae biostimulant compared with the macroalgae commercial biostimulant. The microalgae biostimulant can increase the abundance of metabolites as grown factors and saccharides in soil.

In the case of pineapple, not significant differences were obtained in the yield production. A little increase in the degree Brix in fruits. Another difference obtained was the microbiology community. To know at the taxonomic level of genus which are making this difference, a prevalence analysis of the most abundant genera was carried out. It was observed that in treatments macroalgae there is a high prevalence of *Ralstonia* spp. at the end of the experiment, which are species that belong to the phylum *Proteobacteria*. Furthermore, the increase in the abundance of this genus was notable when the effect of the treatment was visualized in each of the concentrations evaluated.

### Conclusão

This study confirms that microalgae biomass can be used as biostimulator for sweet pepper cultivation. The microalgal fertilizers improve the quality of the fruits produced and the size of the root. In the case of pineapple the microalgae improve the degree Brix and reduce the abundance of *Ralstonia* spp. Further research is required to determine the optimal formulation process to be applied for high-quality fruits with satisfactory yields for the producer.

### Agradecimentos

This investigation was supported by the Vice-Rector for Research and Extension (VIE) of the Technological Institute of Costa Rica.

### Referências bibliográfica

1.Miranda, A. M., Hernandez-Tenorio, F., Villalta, F., Vargas, G. J., & Sáez, A. A. (2024). Advances in the Development of Biofertilizers and Biostimulants from Microalgae. *Biology*, 13(3), 199.

2.Marks, E. A., Montero, O., and Rad, C. (2019). The biostimulating effects of viable microalgal cells applied to a calcareous soil: Increases in bacterial biomass, phosphorus scavenging, and precipitation of carbonates. *Sci. Total Environ.* 692, 784–790

## SUBMISSÃO AVALIADA (EVALUATED SUBMISSION)



Caro autor(a) Fabián Gilberto,  
O resumo submetido ao **IV Congresso Brasileiro do Potencial Energético das Microalgas: empreendedorismo e inovação & Conferência RENUWAL** foi analisado e **ACEITO (ACEPTADO/ACCEPTED)** pela equipe avaliadora.

Obrigado(a) por sua participação, nos vemos no congresso!

IV Congresso Brasileiro  
do Potencial Energético  
das *Microalgas*:  
empreendedorismo e inovação  
e Conferência Renuwal

UFRN  
UFRSA  
RENUWAL  
CYTED

**SAVE** **THE DATE**  
OUTUBRO  
**16**

congressomicroalgas.com

[Visite nosso site](#)

Visite nossas redes sociais



Este email foi criado com Wix. Saiba mais