

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Dirección de Proyectos

Informe final del proyecto de investigación

**Determinación de las características fisicoquímica y
evaluación de la viabilidad económica de un prototipo de
biofertilizante a base de microalgas costarricenses (Fase
II)**

Julio 2023

Contenido

Código y Título del proyecto.....	4
Resumen	5
Palabras clave	5
Introducción	6
El problema de investigación y su importancia.	8
Marco Teórico.....	9
Metodología	16
OE1: Caracterizar las formulaciones de biofertilizantes a base de algas comerciales y las desarrolladas en el ITCR.	16
Actividad 1.1 Preparar formulaciones de microalgas de las especies con mayor potencial desarrolladas en el proyecto: “Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica” (1510091).	16
Actividad 1.2 Caracterización fisicoquímica de formulaciones comerciales y las desarrolladas en el ITCR.....	18
Actividad 1.3 Caracterización espectroscópica, microscópica y reológicas de las formulaciones comerciales y las desarrolladas en el ITCR.....	18
Actividad 1.4 Caracterización microbiológica de formulaciones comerciales y las desarrolladas en el ITCR.....	19
OE2: Implementar un protocolo de ultrasonido para generar emulsiones que mejoren la formulación y su estabilidad	20
Actividad 2.1 Realizar la rotura celular como pretratamiento de biomasa microalgal para la liberación de proteínas y preparación de emulsiones mediante el uso de un ultrasonido y enzimas.....	20
Actividad 2.2 Comparar la eficiencia de rotura de ambas técnicas	21
Actividad 2.3 Formulación de las emulsiones.....	21
Actividad 2.4 Caracterización y comprobación de la estabilidad de la formulación	21
Actividad 2.5 Caracterización reológica de las emulsiones	21
OE3 Determinar las dosis adecuadas y letales del Biofertilizante de microalgas.	22
Actividad 3.1 Establecer los cultivos de lechuga, cebolla y chile	22
Actividad 3.2 Evaluar el proceso de riego de los biofertilizantes según el tamaño de partícula en las plantaciones a evaluar	22
Actividad 3.3 Determinar dosis adecuada de los biofertilizantes a partir de microalgas que presenten mejor calidad de producción en los cultivos a evaluar.....	23
Actividad 3.4 Determinar la dosis Letal	23

OE4 Establecer una comparación de la formulación de microalgas desarrollada en cuanto a la composición química y producción biomásica en plantas de interés comercial con productos comerciales a base de microalgas.....	23
Actividad 4.1 Determinar la dosis más adecuada en términos de rendimiento y costos de producción para los biofertilizantes con microalgas del ITCR y el consorcio de microalgas del AyA.	23
Actividad 4.2 Ajustar los programas de fertilización y medición del rendimiento al final de la cosecha.....	23
Resultados	24
Caracterizar las formulaciones de biofertilizantes a base de algas comerciales y las desarrolladas en el ITCR.....	24
Implementar un protocolo de ultrasonido para generar emulsiones que mejoren la formulación y su estabilidad.....	52
Determinar las dosis adecuadas y letales del Biofertilizante de microalgas.	62
Discusión y conclusiones	81
Recomendaciones	84
Agradecimientos.....	84
Referencias	84
Apéndices (opcional).....	88

Código y Título del proyecto

Código del Proyecto: 1510191 y 1510142

Título del proyecto: Nombre del proyecto o actividad: Determinación de las características fisicoquímica y evaluación de la viabilidad económica de un prototipo de biofertilizante a base de microalgas costarricenses (Fase II)

Autores y direcciones

Investigador	Escuela	Contacto	Calidad comprobable
M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes*	Escuela de Biología	Teléfono: 25502479 Fax: 2550-2479 E-mail: mguerrero@itcr.ac.cr	Máster en Ciencias, con énfasis en Ecología de Poblaciones, Profesora Asociada (paso intermedio) e Investigadora del ITCR.
Dr. Fabián Villalta Romero	Escuela de Biología	Teléfono: 25509553 Fax: 25502479 E-mail: fvillalta@itcr.ac.cr	Doctor en Ciencias Profesor Investigador del ITCR.
Lic. Francinie Murillo Vega	Escuela de Biología	Teléfono: Fax: frmurillo@itcr.ac.cr	Licenciada en Biotecnología.
Dr. Luis Alvarado Marchena	Escuela de Biología	lalvarado@itcr.ac.cr	Dr. En Virología, Lic. En Biotecnología
M.Sc. Alejandro Medaglia Mata	Escuela de Biología	amedaglia@itcr.ac.cr	Bióloga con un Máster en Ecología
Ing. Marvin Villalobos	Escuela de Ing. Agrícola	mvillalobos@itcr.ac.cr	Ingeniero Agrícola
Ing. Milton Solórzano Quintana	Escuela de Ing. Agrícola	msolorzano@itcr.ac.cr	Ingeniero Agrícola
Dra. Natalia Gómez Calderón	Escuela de Ing. Agrícola	ngomez@itcr.ac.cr	Ingeniera agrícola

Resumen

El objetivo de este proyecto era Determinar las características fisicoquímico y evaluar la viabilidad económica de un formulado prototipo de biofertilizante a base de microalgas costarricenses, además se logró avanzar con la investigación y desarrollo de formulaciones, diseño fisicoquímico del producto, pruebas de estabilidad, ensayos de dosis a lo largo de ciclos productivos en cultivos en parcelas experimentales y pruebas de dosificación. Así mismo logró desarrollar un proceso que reduce operaciones unitarias que permitió generar un producto con las características necesarias para ser transferido al sector productivo agrícola, el cual está urgido de nuevas alternativas tecnológicas y económicas para una eficiente fertilización de sus cultivos. Se realizaron ensayos en parcelas experimentales en los Invernaderos de la Escuela de Ingeniería Agrícola del ITCR en cultivos de Lechuga, cebolla y chile con mejoras en la cantidad y calidad de productiva. Con los resultados generados en el proyecto se pretende impactar directamente en la economía nacional, seguridad alimentaria y medio ambiente.

Palabras clave

Microalgas, Biofertilizantes, formulaciones

Introducción

En la actualidad, el uso excesivo de fertilizantes en el sector agrícola han provocado un desequilibrio en la ecológica de los suelos; de tal manera que después de cada ciclo de cultivo el suelo se empobrece, y esto conlleva pérdidas ambientales, monetarias, y reduce la productividad de los suelos, que requieren descanso para evitar su empobrecimiento irremediable; por otra parte, los minerales de los fertilizantes por escorrentía y lixiviación terminan en los ríos, lagos y mares causando eutrofización de los mantos acuíferos, y con ello, diversos problemas ecológicos y daños a la salud humana (García-González & Sommerfeld, 2016)

Costa Rica es el país de Centroamérica que más fertilizantes aplica a sus cultivos, en el año 2009, el país usó 91,8 toneladas (t) de fertilizantes por cada 1000 hectáreas de área agrícola. A si mismo Belice con 58,3 t y El Salvador con 47,1 t. Costa Rica ha mantenido ese alto consumo a lo largo de la década con cifras por encima de las 50 t, llegando en el 2005 al año de máximo consumo, con 114,8 t. Un problema adicional radica en que los fertilizantes emanan óxido nitroso (N₂O), un gas de efecto invernadero (GEI) que contribuye al cambio climático y en este sentido, el sector agropecuario aporta el 40% de las emisiones nacionales de GEI (*Costa Rica Busca Bajar Las Emisiones de Carbono Con Menos Fertilizantes | La Nación*, n.d.)

Las prácticas de cultivo agrícola han evolucionado hacia sistemas sostenibles, la cual no solo se basa en mantener las necesidades nutricionales de las generaciones presentes y futuras, sino que busca mantener o mejorar la capacidad productiva, pero sin perturbar los ciclos ecológicos o contaminar el medio ambiente. También, busca promover la innovación, así como las tecnologías limpias, energías renovables, transporte e infraestructura verde, gestión de residuos y desarrollo de productos de origen biológico (Bulgari et al., 2015; Acuña Reyes, 2015).

El potencial del uso de las biomásas microalgales como biofertilizantes radica en que contienen altos niveles de micronutrientes y macronutrientes esenciales que tiene efecto

favorable en el crecimiento vegetativo, en el estado nutricional de las plantas y el rendimiento de los cultivos (García-González & Sommerfeld, 2016).

A pesar de los múltiples beneficios de las microalgas como biofertilizantes, es necesario realizar una adecuada formulación, ya que cuando éstas se aplican en suspensión (microalgas en agua) presentan varios problemas, uno de ellos es la sedimentación y con ello la formación de *pellets* que bloquean los sistemas de riego. Esto a su vez da problemas de homogenización en la aplicación del producto, ya que no se puede asegurar que el producto tenga una misma concentración de microalgas en cada dosis de aplicación. Por otra parte, para almacenar las microalgas en suspensiones se debe emplear un sistema de refrigeración, pero esto no evita problemas de fermentación ni de contaminación (Vandergheynst et al., 2013a).

En trabajos previos con emulsiones que contenían microorganismos han demostrado que la estabilidad biológica de las células se asoció positivamente con la estabilidad física de la emulsión. Por esta razón, es importante identificar la formulación adecuada que mantenga la estabilidad física y biológica del producto a generar (Fernández et al., 2015).

La estabilidad física de la emulsión puede favorecer la estabilidad biológica, debido a que el aceite empleado otorgaría condiciones anaerobias, ocasionando que las microalgas produzcan compuestos de fermentación como el ácido láctico que a su vez estabiliza la biomasa. Por otra parte, el medio acuoso puede tener una disminución del pH, con lo que se hidrolizan los carbohidratos a monómeros, favoreciendo la fermentación y a su vez reduciendo la actividad microbiana (Wendt et al., 2019).

Otro aspecto relevante es el emplear biomásas húmedas consiste en la eliminación de un secado previo, pues esta alternativa podría ahorrar hasta un 50% de la demanda de energía total del proceso de producción. Además, dependiendo del tipo de secado se muestran diferencias en el contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y ficocianinas, por ende, coloración (Costa et al., 2015).

Por esta razón, es que las emulsiones de microorganismos se muestran como una buena muestra como un buen bioinsumo en el sector agrícola para disminuir el uso de fertilizantes en los suelos costarricenses y con ello mitigar los daños ecológicos causados y los posibles daños a la salud.

El problema de investigación y su importancia.

El principal problema que se tiene en la actualidad es que, a nivel nacional, no se cuenta con el desarrollo de formulaciones de biofertilizantes comerciales estables a base de microalgas.

La investigación de formulaciones de biofertilizantes permite generar alternativas tecnológicas al sector agrícola nacional para mejorar el rendimiento de los cultivos, mejorar el uso de suelo, calidad del agua y a su vez conservar el medio ambiente. Las investigaciones han demostrado que las microalgas se pueden emplear como biofertilizantes ya que contienen algunos reguladores de crecimiento, poliaminas, enzimas, hidratos de carbono naturales, proteínas y vitaminas que tienen un efecto favorable en el crecimiento vegetativo, en el estado nutricional de las plantas y el rendimiento de los cultivos.

Por otra parte, 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 el pH, solubiliza los fosfatos, y aumentan la eficiencia del uso de fertilizante (Villalta-Romero et al., 2019)

Sin embargo, para hacer más eficiente la biodisponibilidad de todos estos componentes se debe de contar con una formulación apropiada, que sea estable a través del tiempo (Acuña reyes, 2015; Garcia-Gonzalez & Sommerfeld, 2016).

Mantener la estabilidad física de la emulsión y la viabilidad celular es fundamental para la aplicación a gran escala. Muchos agentes microbianos utilizan formulaciones de suspensiones acuosas que tienden a sufrir diferentes efectos como: sedimentación, problemas de la entrega uniforme, disminución de la eficacia biológica del producto y requerirán refrigeración.

Las formulaciones basadas en emulsiones de agua en aceite (W/O), han demostrado ser una alternativa para la estabilización a largo plazo de microorganismos. En estas las células se encuentran secuestradas en gotas de agua rodeadas de aceite, de tal forma que puede superar todas estas limitaciones al permitir que las células permanezcan hidratadas y prevenir su contaminación durante almacenamiento (Vandergheynst et al., 2013b).

Estas características promueven la emulsión como método de encapsular las microalgas, y a su vez un vehículo novedoso para aplicación en el sector agrícola, ya que presenta bajo costo de producción, preservan la integridad biológica, permiten una aplicación homogénea, son de fácil almacenamiento a temperatura ambiente, fácil de escalar y se puede aplicar con el equipo convencional en campo.

Marco Teórico

Los bioestimulantes agrícolas son compuestos que estimulan los procesos fisiológicos de las plantas con el fin de mejorar la disponibilidad y absorción de nutrientes. Estos compuestos pueden ser microorganismos, extractos vegetales o animales, o sustancias químicas naturales que estimulan el metabolismo de las plantas, con el objetivo de lograr un cultivo más eficiente y de mejor calidad (*Homepage | Zschimmer & Schwarz, n.d.*)

En particular, los bioestimulantes a base de microalgas se han destacado como una opción sostenible en la agricultura, ya que ofrecen múltiples beneficios para el suelo de los cultivos, el desarrollo de las plantas y la mejora en la calidad de la producción ((Parmar et al., 2023a). Estos bioestimulantes desempeñan un papel importante en el impacto positivo que pueden tener en el suelo, especialmente en la actividad microbiana del mismo. Al respecto Uyar y Mismil (2022) han reportado el desarrollo de relaciones simbióticas con las raíces de las plantas y los microorganismos presentes en el suelo. Estos lazos promueven una variedad de funciones, como mejorar la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico, la calidad del cultivo, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo y la formación de carbohidratos disponibles para las plantas. Además, estos bioestimulantes aumentan la

comunidad microbiana beneficiosa, lo que restablece el equilibrio de los procesos metabólicos del suelo y ha demostrado resultados excelentes en comparación con el uso de fertilizantes tradicionales (Uyar y Mismil, 2022; Parmar et al., 2023).

La fijación de nitrógeno es también uno de los beneficios reportados al emplear microalgas fijadoras, principalmente cianobacterias como *Arthrospira* sp, *Anabaena* sp. Y *Nostoc* sp. Consiguiendo aumentar el contenido de nitrógeno en el suelo, lo que maximiza el crecimiento de las plantas.

La solubilización del fósforo, un nutriente vital para las plantas, también se ve promovido por la actividad de las microalgas, este elemento forma parte de los enlaces del ADN y ARN, y es fundamental para los procesos vitales como la síntesis de ATP. Las microalgas liberan fósforo a un ritmo comparable al de los fertilizantes tradicionales, pero evitan la contaminación del suelo y los cuerpos de agua, ya que no se agrega de forma sintética.

En conjunto los beneficios demostrados al aumentar los nutrientes y minerales disponibles, aunado a la diversificación de la comunidad microbiana conllevan a una mejor retención de agua en el suelo, una mejora en la estructura de este y una mayor protección de los cultivos contra patógenos y plagas.

En conjunto el desarrollo de novedosos productos agrícolas y el desarrollo de prácticas agronómicas más sostenibles permiten tener un menor impacto por la actividad agrícola, a la vez que se maximiza la producción de alimentos (Shi et al., 2022).

La presión que se ha ejercido sobre el sector agrícola ha obligado a ser más eficientes en la utilización del agua para obtener más producción por gota (Shi et al., 2022). El riego por goteo es de los sistemas más conocidos, debido a que da un excelente apoyo respecto al retorno de la inversión inicial, debido a que en comparación con otros sistemas es sumamente eficiente. Cabe destacar que, el riego por goteo cuenta con el segundo puesto de utilización en Costa Rica, con un porcentaje del 5,7% (Angulo, n.d.), pero a nivel mundial

este se encuentra en quinto puesto de entre todos los seis sistemas de riego más utilizados en el mundo.

Salazar et al., (2010) definen sistema de riego como el conjunto interrelacionado de elementos físicos u obras de infraestructura, área de riego y elementos regantes, conformado con el objetivo de dotar agua para la producción agropecuaria a partir de la utilización de una fuente de agua. La aplicación del agua a los cultivos para su desarrollo normal se realiza por diversas técnicas desde los principios de la agricultura moderna. No obstante, a inicios del siglo XXI, se incorporan a la producción los sistemas de riego a presión, ya sea por aspersión o por goteo (Jiménez & Rodríguez, n.d.)

Sneh (2006), señala que si bien el riego por goteo es uno de los métodos de riego a presión, durante las últimas cuatro décadas, debido a su amplia difusión por el mundo entero, ha dejado de ser simplemente un método de riego y se ha convertido en una agrotecnología completa, la cual ha cambiado prácticas de los cultivos y ampliado los horizontes de la agricultura, debido a sus múltiples ventajas, entre las que enumera en primer lugar el incremento en la eficiencia del uso agua para el riego y seguidamente que marcó el inicio del desarrollo de la técnica del fertirriego, aplicación conjunta del agua y de los nutrientes, que permite aplicar el agua y los nutrientes en dosis adecuadas a la demanda dinámica de los cultivos a lo largo de la temporada.

El fertirriego consiste en la aplicación de una solución nutritiva a partir de fertilizantes solubles, aplicada a través del agua por los sistemas de riego a presión, creando así una solución nutritiva de riego, que se hace de manera localizada en la parte más activa del sistema radicular de la planta, lo cual favorece la absorción de nutrientes en una porción más pequeña del volumen de suelo (Jiménez & Rodríguez, n.d.). Con la aplicación mundial de la fertirrigación, desde el año 2018 la industria de sistemas de riego de agua por goteo ha desarrollado los sistemas considerando las complicaciones que representan el proceso de obstrucción de los emisores. Zaman et al. (2018) mencionan que los tipos y probabilidad de obstrucción de los emisores en el riego por goteo, según datos procedentes de las

estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, son principalmente biológicos (37%), físicos (31%), químicos (22%) y otros (10%).

Debido a las pequeñas dimensiones del conducto y la baja velocidad de flujo por el interior de los goteros, los sistemas de riego por goteo son susceptibles a su obturación. A fin de evitarla se requiere de filtración y además del tratamiento físico y químico del agua. Las impurezas del agua de riego se clasifican en cuatro categorías:

- Partículas inorgánicas en suspensión.
- Sustancias químicas en solución.
- La micro-flora y la micro-fauna.
- Partículas de materia orgánica

Existen diversos métodos de filtrado, empleando ya sea mallas, discos ranurados, arena y grava fina. Para la separación de la arena y del limo se emplean frecuentemente lagunas de sedimentación o decantación, tanques especialmente diseñados para ese objetivo o separadores centrífugos. En cultivos sobre sustratos artificiales en los cuales se recoge y recicla el agua de drenaje se instalan filtros de arena de filtración lenta para eliminar los fitopatógenos del sistema (Angulo, n.d.).

Existen diferentes tipos de mallas, cuya característica más destacable es el grado del filtrado, que se define con dos sistemas de unidades: *micrones* y *mesh*.

El grado de filtrado en micrones (1 micrón = 1 mili-milímetro = 10^{-6} m) expresa el diámetro de la partícula esférica de mayor dimensión que puede pasar por una malla. El número de mesh es el número de hilos por pulgada (25.4 mm). Los dos sistemas no son compatibles, es decir, no se pueden convertir directamente de uno al otro, ya que, en la práctica dos mallas con el mismo número de mesh pueden tener diferente capacidad de retención si se las fabrica con hilos de diferente espesor. En el rango de mesh empleado en instalaciones de riego, es posible aplicar la relación presentada por (*Cómo Determinar El Coeficiente de Uniformidad de Caudal En Riego Localizado - PortalFruticola.Com*, n.d.-a)

$$\text{Micrones} \times \text{número de mesh} \approx \text{constante} \approx 15\ 000$$

Al seleccionar el grado del filtrado se debe considerar tanto las dimensiones del conducto dentro del gotero como el carácter de las partículas que el agua arrastra consigo (Sneh, 2006).

Los filtros de *malla* más comunes en el mercado de Costa Rica poseen una estructura de polipropileno, donde en su interior se encuentra un cilindro recubierto por una malla de poliéster esto para evitar dificultades con los fertilizantes utilizados en el riego. Los filtros de *anillos* se caracterizan por tener un cuerpo y una tapa de polipropileno, siendo el elemento de filtrado unas anillas construidas de polipropileno. Ambos filtros tienen un grado de filtración de 120 mesh, también cuentan con una conexión estándar de 3/4" y 1" (rosca macho). Ambos son resistentes a fertilizantes ácidos utilizados en la agricultura (Núñez & Hurtado, 2015).

Conocer la eficiencia de un sistema de riego es de suma importancia, ya que es el indicador del efecto del riego en la plantación. Es la relación que se da entre la cantidad de agua que consume el cultivo y la cantidad de agua regada; se obtiene con los datos de la eficiencia de conducción en el canal principal (Ef_c), la eficiencia de distribución en los canales laterales (Ef_d), y por último la eficiencia de aplicación a nivel de parcela (Ef_a)(Núñez & Hurtado, 2015).

$$Ef_r = Ef_c * Ef_d * Ef_a \quad (1)$$

Un sistema de riego por goteo se diseña con el caudal nominal de cada emisor, definida por el fabricante. Sin embargo, el caudal puede variar por efectos de la presión, temperatura, obturaciones (físicas, biológicas o químicas) y por fallas en el diseño de los sistemas de riego, por lo que normalmente el caudal real, difiere del caudal nominal.

La variación en el caudal de los emisores implicara que algunas plantas reciban menos agua de la que realmente necesitan, mientras que otras recibirán más, con la respectiva pérdida de productividad asociada. Es por esto por lo que debe realizarse un chequeo continuo del sistema, midiendo el volumen de descarga de los emisores.

De esa manera, es posible comprobar si el sistema de riego presurizado se encuentra funcionando de la manera adecuada, lo que se verifica determinando el Coeficiente de Uniformidad de caudales (CU), para su cálculo se seleccionan una subunidad o subsector representativo de todo el sistema de riego, según topografía, tipo de suelo, condición de las plantas, etc. Un subsector corresponde a aquella unidad cuyas líneas laterales o emisores son abastecidos por la misma tubería terciaria o múltiple, con regulación de válvula manual o eléctrica.

En este subsector se elige un número determinado de emisores, distribuidos uniformemente dentro de la subunidad o subsector de riego, en general, se recomienda seleccionar 16 emisores para calcular el Coeficiente de Uniformidad, para ello, se elige el lateral más cercano y el más lejano del inicio de la subunidad. Entre ambas laterales se eligen otras 2 laterales intermedias, ubicadas a $1/3$ y $2/3$ de la longitud de la terciaria (Cómo Determinar El Coeficiente de Uniformidad de Caudal En Riego Localizado - PortalFruticola.Com, n.d.-b). En cada lateral se seleccionan 4 emisores, siguiendo el mismo criterio; es decir, el más cercano y el más lejano del inicio de cada lateral y dos emisores intermedios, según se muestra en la Figura 1.

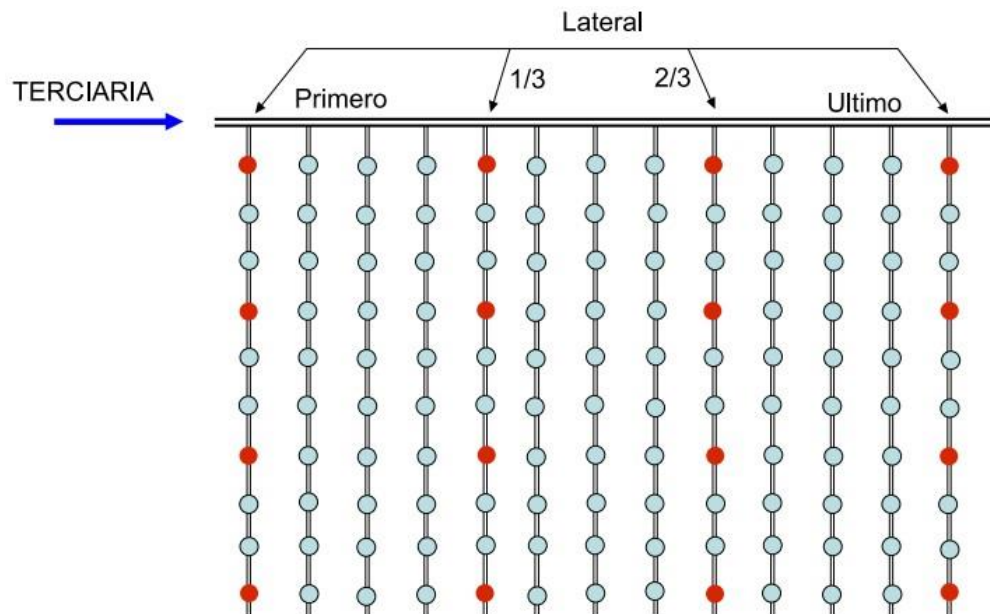


FIGURA 1. ESQUEMA DE DISTRIBUCIÓN DE LAS UNIDADES A MUESTREAR.

Se toman los datos de volumen recolectado en los goteros seleccionados en el tiempo establecido de cada prueba, y el caudal es el volumen de recolectados entre el tiempo establecido.

De acuerdo con Villalobos-Araya & Valverde-Conejo (2016) para valorar el grado de uniformidad, Christiansen en 1942, propuso la siguiente ecuación

$$CU = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n |Q_i - \bar{Q}|}{\bar{Q} \times n} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

CU: Es el coeficiente de uniformidad de Christhansen (%)

$Q_i - \bar{Q}$: Es la suma de n derivaciones del caudal recolectado en los diferentes puntos con respecto al valor medio de dichos caudales.

\bar{Q} : Media de los caudales recolectados.

n: Número total de caudales recolectados.

El objetivo general del proyecto fue *Determinar las características físicoquímico y evaluar la viabilidad económica de un formulado prototipo de biofertilizante a base de microalgas costarricenses*; para la consecución de este objetivo se desarrollaron los siguientes objetivos específicos.

Metodología

OE1: Caracterizar las formulaciones de biofertilizantes a base de algas comerciales y las desarrolladas en el ITCR.

Actividad 1.1 Preparar formulaciones de microalgas de las especies con mayor potencial desarrolladas en el proyecto: “Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica” (1510091).

A partir de los resultados obtenidos del proyecto: “Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica” (1510091) donde se evaluaron las biomásas microalgales obtenida de cultivos de las especies *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus sp* y *Arthrospira máxima* se desarrolló una formulación líquida. También se evaluó algunos consorcios microalgales presentes en las lagunas de tratamiento del AyA (Cañas, Guanacaste). Esta actividad fue desarrollada en el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR.

Para la obtención de las biomásas se desarrollaron las siguientes tareas.

Evaluación de crecimiento algas

Se evaluaron la especie de microalga que generó mejores resultados en el proyecto: *Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica*. La microalga seleccionada se escaló a partir de inóculos de microalgas disponibles en el Centro de Investigación en Biotecnología, estos se lleó a hasta 40000 L. La tasa de crecimiento se determinará midiendo densidad óptica a 750 nm (OD750), densidad celular por medio de conteos cada 24-72 horas haciendo uso de cámara de Neubauer y el peso seco. También se monitoreará algunos parámetros físicoquímicos como temperatura, pH y nutrientes (nitratos, nitritos, amoníaco, potasio y fosfatos) que serán determinados utilizando el método semicuantitativo QUANTOFIX® test strips (Macherey-Nagel).

Evaluación de mejores flocculantes.

Se realizarán ensayos de floculación mediante el empleo de floculantes que presentes cationes divalentes como Calcio (II) y Magnesio (II) y se comparará con los resultados de floculación obtenidos mediante el empleo del Floculante comercial TanFloc®.

Se realizarán ensayos de tiempo de floculación y concentración de floculante para la máxima recuperación de biomasa; la suspensión microalgal se mezclará intensivamente (350 rpm) por 10 min, para permitir la dispersión uniforme del floculante. Seguido de una mezcla (250 rpm) por 20 min para permitir la formación de los flóculos. Después, la suspensión microalgal se deja sedimentar por 30 min y se colectan muestras en el medio de la zona clarificada. Se medirá la densidad óptica a 750 nm antes de la adición del floculante (OD_i) y al finalizar el proceso (OD_f). La eficiencia de floculación n_a se calcula utilizando la siguiente fórmula.

$$n_a = \frac{(OD_i - OD_f)}{OD_f} \times 100$$

A la biomasa obtenida después del proceso de floculación se le realizarán tres lavados para eliminar el exceso de sales y se conserva para someterla a un tratamiento mecánico por ultrasonido u homogenización por alta presión.

Secado de la Biomasa microalgales

Para poder desarrollarla formulación de biofertilizante a base de biomasa microalgas, se debe llevar la biomasa obtenida del proceso de floculación a una concentración de un 10-30% m/m, esto implica llevar a cabo un proceso de secado o concentración por centrifugado.

Para el proceso de secado se utilizará el secador diseñando en el proyecto *Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica* (1510091). Las biomásas secas serán utilizadas para la formulación del biofertilizante y para la caracterización fisicoquímica.

Molienda de las Biomásas microalgales

Las biomásas que se obtuvieron del proceso de secado serán sometidas a un proceso de molienda, en donde se determinará el tamaño de partícula necesario para poder elaborar una apropiada suspensión. Para determinar el tamaño de las partículas de polvo se realizará la técnica de tamizado siguiendo el procedimiento indicado en la Farmacopea Argentina en el procedimiento 290 (Argentina, 2003).

Las biomásas secas obtenidas después de la molienda serán procesadas químicamente para su observación mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Se realizará 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 realizará una post-fijación de alrededor de 2 horas empleando tetraóxido de osmio (OsO_4) con el fin de fijar lípidos insaturados presentes en la muestra.

Consecutivamente, se realizará 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 realizarán lavados con acetona:resina (1:1) para promover la transición entre solventes y la infiltración de la resina. Finalmente, se realizarán lavados con resina pura y luego, se transferirán las muestras a un molde en el cual se realizará 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 serán cortadas empleando un ultramicrotomo (Leica, EM UC7) con el fin de obtener segmentos de aproximadamente 80 nm de grosor. Dichos cortes serán colocados en rejillas de cobre de 200 mesh (TedPella Inc.) y analizados 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 realizará en el Laboratorio Institucional de Microscopía del ITCR.

Actividad 1.2 Caracterización fisicoquímica de formulaciones comerciales y las desarrolladas en el ITCR.

Se adquirieron formulaciones comerciales y junto con las formulaciones desarrolladas en la Actividad 1.1. Se realizará la determinación de parámetros fisicoquímicos por medio del servicio de análisis del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica:

- Sólido Químico Completo (C, N, C/N, P, Ca, Mg, K, Cu, Fe, Zn, Mn, B, S, %H, pH +CE)
- Líquido Químico Completo (N, P, Ca, Mg, K, Cu, Fe, Zn, Mn, B, S)
- Carbón Orgánico (CO),
- N-NH₄ y N-NO₃ (Nitrógeno Amoniacal y Nitrógeno Nítrico)
- Aluminio (Al), Sodio (Na)
- Cloruro (Cl)
- Metales Pesados: Cd, Cr, Co, Pb, Ni
- Perfil de aminoácidos

Actividad 1.3 Caracterización espectroscópica, microscópica y reológicas de las formulaciones comerciales y las desarrolladas en el ITCR.

Para la completar caracterización de las formulaciones se realizaron las mediciones haciendo uso de técnica de espectrometría UV-visible, y determinación del tamaño de partícula por Dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de transmisión.

Caracterización por espectroscopía UV-visible

Las muestras sólidas fueron disueltas en agua destilada. Se realizó un espectro de absorbancia de las muestras en el rango de los 200-800nm haciendo uso de cubetas de cuarzo en un Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 del Centro de Investigación de

Biotecnología. Se realizaron las diluciones correspondientes hasta obtener absorbancias que no saturen las señales, menor a la 1 U.A.

Caracterización por determinación del tamaño de partícula (DDL)

Para determinar el tamaño de partícula se realizaron mediciones de Dispersión dinámica de luz (DDL) con el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern) del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Se utilizarán cubetas de poliestireno cuadradas de 12 mm (DTS0012) y Celda capilar plegada desechable (DTS1070). Las muestras fueron diluidas en agua y analizadas a un ángulo de observación de 90°, 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 compararon el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de las mezclas haciendo uso de métodos de comparación estadísticos.

Caracterización por medio de Microscopía electrónica de Transmisión (MET)

Las muestras fueron 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.

Determinación de la viscosidad y estabilidad

Para cada una de las muestras se determinó mediante el uso de un reómetro rotatorio, la viscosidad empleando una temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C. Posteriormente se realizará la determinación de la estabilidad de cada una de las emulsiones con respecto a la temperatura, se midió la viscosidad entre 20-40°C.

Caracterización del tipo de fluido

Para la determinación del barrido oscilatorio de esfuerzo se usó el reómetro rotatorio a una frecuencia de 1Hz, mientras que para la determinación del barrido de frecuencia se empleó un esfuerzo 1Pa; estas mediciones se realizaron a $20,0 \pm 0,1$ °C. Mediante estos barridos se determinó 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.

Pruebas de los biofertilizantes en los sistemas de riego.

Se realizaron ensayos con las formulaciones comerciales aplicándolas en los sistemas de riego para determinar si estas presentan problemas de obstrucción de los filtros o boquillas de los sistemas empleados, esta actividad fue desarrollada en la Escuela de Ingeniería Agrícola del ITCR.

Actividad 1.4 Caracterización microbiológica de formulaciones comerciales y las desarrolladas en el ITCR.

Se realizaron el análisis microbiológico de las formulaciones mediante la Identificación de bacterias, hongos, recuento de colonias, de coliformes fecales, *Salmonella*, Huevos de Helminthos y *Escherichia coli*.

Actividad 1.5 Evaluar algunos consorcios microalgales presentes en las lagunas de tratamiento del AyA.

Las biomásas fueron recolectadas de las lagunas del AyA en Guanacaste en colaboración con el Ing. Andrés Lazo.

OE2: Implementar un protocolo de ultrasonido para generar emulsiones que mejoren la formulación y su estabilidad

Actividad 2.1 Realizar la rotura celular como pretratamiento de biomasa microalgal para la liberación de proteínas y preparación de emulsiones mediante el uso de un ultrasonido y enzimas.

Rotura celular por método de ultrasonificación

Se tomó la biomasa microalga y se disolvió en agua destilada a una proporción de 10% m/v. Se colocó la disolución en un frasco y por medio de una bomba peristáltica se recircula en la camisa térmica del equipo de ultrasonido. Se realizó 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 colocará 5 mL de muestra de cada tiempo en tubos de vidrio PYREX. Se centrifugó (Heraeus Labofuge 200) cada tubo a 5000 rpm durante 10 minutos. Se toma el sobrenadante después de la centrifugación para realizar una medición de absorbancia. Se midió a 220, 260 y 280 nm para cuantificar la cantidad de proteína y ácidos nucleicos libres. Se utiliza la longitud de onda de 340 nm para cuantificar aminoácidos libres realizando una derivatización previa con o-ftaldialdehído según el método descrito por Nielsen (Nielsen et al., 2001) y finalmente se mide a 750 nm para cuantificar turbidez (Espectrofotómetro Shimadzu UV-180)

Rotura celular por método de homogenización

Se tomó la biomasa de microalga y se disolvió en agua destilada a una proporción de 10% m/v. Se realiza la homogeneización (GEA, Panda Plus 2000) a 300-1000 Bares de presión y se tomaron muestras a los 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 pasos. Se colocó 5 mL de muestra de cada tiempo en tubos de vidrio. Se centrifugó (Eppendorf 5810) cada muestra a 5000 rpm durante 10 minutos. Se tomó muestra del sobrenadante después de la centrifugación para medir la absorbancia. Se utilizó la longitud de onda de 340 nm para cuantificar aminoácidos libres realizando una derivatización previa con o-ftaldialdehído según el método descrito por Nielsen (Nielsen et al., 2001) y finalmente se medirán a 750 nm para cuantificar turbidez (Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800)

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de las formulaciones se realizó con el objetivo de obtener la mayor cantidad de aminoácidos libres. Luego de aplicar alguna de las técnicas de rotura celular se libera mayor cantidad de proteína soluble, lo cual aumenta los resultados de hidrólisis enzimática.

Se tomó la biomasa previamente tratada y se colocó en los reactores de hidrólisis. Se ajustará el pH, la temperatura a las condiciones enzimáticas óptimas y se añadirán las enzimas a una concentración de 1% v/m respecto a la biomasa seca. Las enzimas se dejaron por 24 h.

Se utilizó el método de o-ftaldialdehído (OPA), descrito por Nielsen (2001), que presenta gran sensibilidad cuantificar la hidrólisis enzimática.

Actividad 2.2 Comparar la eficiencia de rotura de ambas técnicas

Para determinar la eficiencia de ruptura se realizó la cuantificación de proteínas extraídas en el citoplasma utilizando el método de cuantificación de Bradford (Bradford, 1976).

Actividad 2.3 Formulación de las emulsiones

Se determinó la combinación más estable realizando barridos de formulación. Estos consisten en cambiar una variable y observar el tipo de emulsión que se obtiene. Se realizarán barridos de las siguientes variables: relación agua/medio oleoso, concentración y tipo de surfactante, temperatura, para cada diferente tipo de emulsión. Se seleccionó la emulsión que cumplió con las condiciones de estabilidad, menor impacto ecológico y bajo costo de producción.

Actividad 2.4 Caracterización y comprobación de la estabilidad de la formulación

Se realizó una serie de ensayos que permitirá determinar:

1. Agregación de partículas
2. Separación de fases
3. Formación de espuma
4. Estabilidad en condiciones de frío (-10°C)

Estas pruebas se realizaron de acuerdo con los protocolos establecidos por los estándares de la industria CIPAC MT 185 (Dobrat & Martijn, 1993)

También, se realizaron pruebas de estabilidad mediante observación visual en función del tiempo captando imágenes de las formulaciones para apreciar si existe algún tipo de inestabilidad, así como por medidas del tamaño de gota por DDL (Lendínez Gris, 2015). También se determinó la estabilidad de las formulaciones con respecto al tiempo de almacenamiento, las formulaciones serán almacenadas durante siete días con el fin de realizar nuevamente los procedimientos detallados en la Actividad 1.3.

Actividad 2.5 Caracterización reológica de las emulsiones

Determinación de la viscosidad y estabilidad

Para cada una de las emulsiones se determinó mediante el uso de un reómetro rotatorio, la viscosidad empleando una temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Posteriormente se realizó la determinación de la estabilidad de cada una de las emulsiones con respecto a la temperatura, se midió la viscosidad entre $20-40^\circ\text{C}$.

Caracterización del tipo de fluido

Para la determinación del barrido oscilatorio de esfuerzo se usó el reómetro rotatorio a una frecuencia de 1Hz, mientras que para la determinación del barrido de frecuencia se empleó un esfuerzo 1Pa; estas mediciones se realizaron a $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Mediante estos barridos se determinó 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.

Optimización de las formulaciones.

A partir de los resultados obtenidos de la rotura mecánica con ultrasonicación, homogeneización de alta presión e hidrólisis enzimática se realizó una segunda etapa de optimización de parámetros para la formación de formulación. Se analizó la adición de emulgentes naturales tales como lecitina de soya, proteína de soya y almidón modificado o sintéticos como polisorbato o algún éster de sorbitano y arcillas para mejorar parámetros como tamaño de partícula, polidispersidad y estabilidad las formulaciones frente a cambios de pH, temperatura (congelación y descongelación) y adición de sales.

OE3 Determinar las dosis adecuadas y letales del Biofertilizante de microalgas.

Una vez realizada la caracterización fisicoquímica y microbiológica de los biofertilizantes comerciales y de las formulaciones desarrolladas con cultivos de microalgas en el ITCR y con biomásas de los consorcios microalgales de las lagunas del AyA, se realizaron ensayos en cultivos hortícolas

Actividad 3.1 Establecer los cultivos de lechuga, cebolla y chile

Se preparará el campo de siembra para cada uno de los cultivos a evaluar, realizando análisis del suelo y aplicación de enmiendas agrícolas de ser necesario. Para cada cultivo se realizará la rotulación de cada uno de los bloques de tratamiento y se realizará la siembra y aplicación de biofertilizantes según el manejo agronómico recomendado por los Ingeniero Agrónomo encargado.

Actividad 3.2 Evaluar el proceso de riego de los biofertilizantes según el tamaño de partícula en las plantaciones a evaluar

Para los cultivos a evaluar, se desarrollará el diseño del sistema de riego más apropiado en donde se pueda realizar la incorporación del biofertilizante. Se evaluará el grado de eficiencia y vida útil de los filtros empleados y demás accesorios.

Actividad 3.3 Determinar dosis adecuada de los biofertilizantes a partir de microalgas que presenten mejor calidad de producción en los cultivos a evaluar

De las formulaciones que presenten mayor estabilidad se realizaron los experimentos que permitan determinar la dosis adecuada para incrementar el rendimiento agronómico de los cultivos a evaluar, esto ensayos se realizaron en los invernaderos de la Escuela de Agrícola y en diferentes parcelas.

Se utilizarán cultivos de ciclo corto de cultivo como **la lechuga, cebolla y de ciclo largo como el chile**. Se evaluará el uso de boquillas y filtros en los sistemas de fertilización en relación con el tamaño de la partícula de cada fertilizante desarrollado por el ITCR

De los resultados obtenidos se realizará un análisis estadístico aplicando R.

Actividad 3.4 Determinar la dosis Letal

Para la determinación de la dosis letal se usará como modelo la lechuga (*Lactuca sativa*) siguiendo la metodología de la CEN/TC 223 (2003-07): *Growing media-Biotest for assessment of phytotoxicity*. Se usará turba donde se suministrará diferentes dosis del biofertilizante: sin diluir, 1:5,1:10, 1:50, 1:100, 1:500 y 1:1000

OE4 Establecer una comparación de la formulación de microalgas desarrollada en cuanto a la composición química y producción biomásica en plantas de interés comercial con productos comerciales a base de microalgas.

Actividad 4.1 Determinar la dosis más adecuada en términos de rendimiento y costos de producción para los biofertilizantes con microalgas del ITCR y el consorcio de microalgas del AyA.

De la información recolectada en el objetivo anterior, se determinará la dosis más adecuada en términos de rendimiento y costos de producción para los biofertilizantes con microalgas del ITCR y el consorcio de microalgas del AyA. Una vez seleccionada la mejor formulación se realizará nuevamente el ensayo en producciones comerciales, se ajustará los programas de fertilización y se medirá el rendimiento al final de la cosecha. Esta información se correlacionará con la información composicional de las formulaciones, tamaño de partícula y la dosis empleada.

Actividad 4.2 Ajustar los programas de fertilización y medición del rendimiento al final de la cosecha.

A partir de los datos comparativos de rendimiento en los tratamientos con las formulaciones y se determinó las recomendaciones de aplicación

Resultados

Caracterizar las formulaciones de biofertilizantes a base de algas comerciales y las desarrolladas en el ITCR.

Las microalgas *A. maxima*, *Scenedesmus quadricauda* y *C. sorokiniana* cultivadas en biorreactores cilíndricos de 30 cm de alto por 25 cm de diámetro, con aireación constante e iluminación superficial de 1000 luxes, alcanzaron densidades celulares de 2×10^5 , 21×10^6 y 32×10^6 respectivamente, tras 3 semanas en producción continua. Posteriormente con muestras de 1 L de cultivo, por triplicado se realizó la evaluación del Floculante Tanfloc para la cosecha de la biomasa, el experimento evidenció una concentración adecuada de 40 mg/L ya que la eficiencia a mayor concentración no mostró una diferencia significativa respecto a concentraciones mayores de floculante (Figura 2)

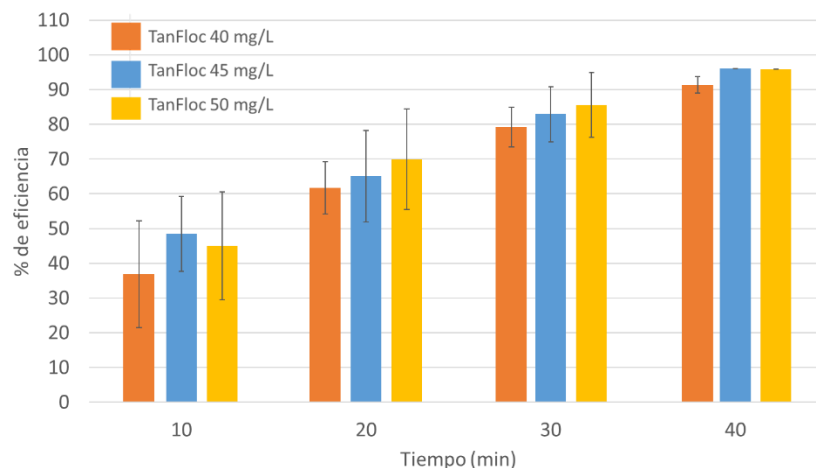


FIGURA 2 PORCENTAJE DE EFICIENCIA EN LA FLOCULACIÓN DE MICROALGAS A LO LARGO DEL TIEMPO

Para dimensionar a gran escala la cosecha con Tanfloc se evidenció falta de infraestructura

y una complejidad técnica asociada, por lo que se gestionó en el proyecto la puesta en marcha del equipo centrífugo GEA Westafalia para la cosecha de las microalgas, por lo que tras 4 meses de trabajo y con el apoyo de la VIE y el Departamento de Mantenimiento para el desarrollo de una contratación del Servicio, por un monto de 1.8 millones de colones, se logró cosechar la biomasa de las tres especies microalgales a 4 000 rpm por un tiempo de 25 min. Seguidamente se implementaron los experimentos de formulación.

Se realizó la determinación del porcentaje máximo de biomasa de microalgas que se puede dispersar en agua, se realizaron pruebas de suspensión de la biomasa seca y la biomasa húmeda, con el fin de ver si existe un porcentaje de saturación y conocer los límites con los que se puede trabajar. En el Cuadro 1, se observa los porcentajes de biomasa a evaluados; para la biomasa seca se obtiene que el valor máximo de dispersabilidad es de 10%, ya que al aumentar este contenido se puede observar que se genera una pasta. Mientras que, la muestra húmeda se puede utilizar hasta el 30%, además de poseer la ventaja de dispersarse con facilidad en agua. Lo cual correspondería a un valor de 21% de biomasa si se realiza la corrección por humedad que contiene la muestra.

CUADRO 1 PORCENTAJE DE BIOMASAS DE MICROALGAS DISUELTO EN AGUA

Porcentaje de Biomasa	Tipo de Biomasa	
5% 10% 15% 20% 25% 30%	Seca	Húmeda

En la Figura 3 se muestra la biomasa seca (Figura 3 A) la cual se queda adherido a la propela del agitador, mientras que la biomasa húmeda (Figura 3 B) presenta una mejor dispersabilidad en agua (Figura 3 C) favoreciendo la homogenización de la formulación.



FIGURA 3 MUESTRA BIOMASA A) SECA B) HÚMEDA C) HÚMEDA DISPERSADA EN AGUA.

Posteriormente se realizó un barrido de formulación, el cual consistió en probar diferentes concentraciones de agua, aceite y surfactante. Como primer paso se evaluó el uso de surfactantes no iónico del tipo hidrofílicos (A1, A2) e hidrofóbicos (B1, B2), hay que destacar que se escogen este tipo de aditivos debido a que presentan un grado de biodegradabilidad y siendo así amigables con el ambiente

Se utilizó la mezcla de estos aditivos con el fin de mejorar la estabilidad de la formulación. Se empleó el equipo de agitación Caframo modelo 6015 a 1500 rpm por un periodo de 5 min, contenido de aceite 87%, agua 10% y surfactante 3%, en donde se estudiaron las siguientes mezclas de surfactantes.

- A1 – B1
- A2 – B1
- A1 – B2
- A2 – B2

A partir de estos resultados se determinó la combinación de surfactantes más estables siendo este A2 y B2, seguido por la mezcla A1 y B1. Por tanto, se procedió a realizar un barrido de formulación con diferentes porcentajes de surfactantes, siendo estos de 1%, 2%, 3%, 4% y 5%. Obteniendo que cuando se emplea al 5% en las formulaciones de emulsiones se obtiene un producto estable por un periodo de más de 24 horas y totalmente autodispersable en agua; logrando determinar una concentración microalgal

en el bioformulado entre 8×10^8 a 24×10^9 #cel/mL.

La emulsión realizada con los surfactantes A2 y B2 obtuvo la combinación con mejores resultados de estabilidad. En la Figura 4 (A) se muestra la emulsión con y sin biomasa en ambos casos se puede observar la homogeneidad de la muestra, ya que no presenta separación de fases. Mientras que en la Figura 4 (B) se observa la dispersión de la emulsión en agua, donde en la sección superior del frasco se denota una franja de color blanco que indica el proceso de inestabilidad causado por la flotación esto se debe a la inversión de fase de la emulsión; no obstante, es muy pequeño, indicando que hay un alto porcentaje de estabilidad.



FIGURA 4 FORMULACIÓN DE EMULSIÓN CON MUESTRAS HÚMEDA. A) LA MANO IZQUIERDA ESTÁ A EMULSIÓN ESTABLE SIN MICROALGAS Y A LA DERECHA CON MICROALGAS; B) DISPERSIÓN DE 1 ML EMULSIÓN EN 500 ML DE AGUA.

En la Figura 5 se observa en el microscopio óptico la emulsión, Figura 5 (A) y la dispersión para determinar el tamaño de gota Figura 5 (B).

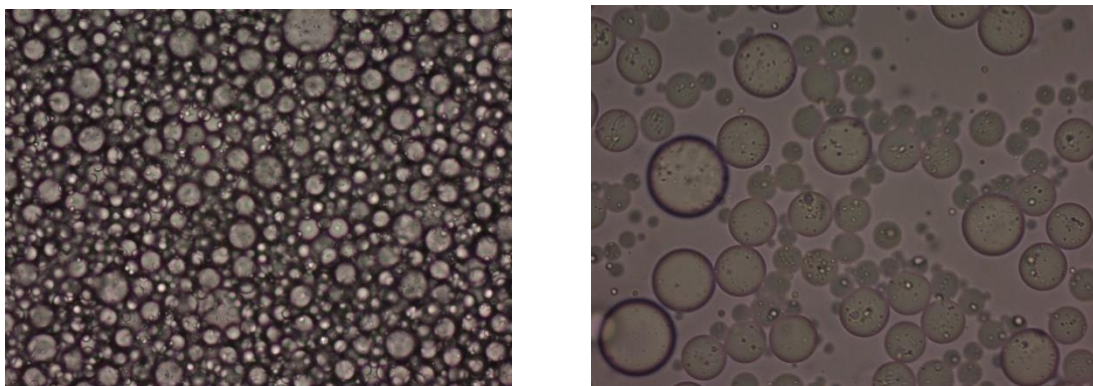


FIGURA 5 A) EMULSIÓN CON A2 YB2 AL 5%. MAGNIFICACIÓN 20X. B) DISPERSIÓN EN AGUA DE LA EMULSIÓN CON A2 YB2 AL 5% MAGNIFICACIÓN 40X.

Como otra alternativa se procedió a utilizar los surfactantes A1 y B1 que presentara mayor accesibilidad a nivel de mercado nacional e internacional en comparación con los surfactantes A2 y B2. Se variaron los porcentajes de ambos surfactantes con el fin de encontrar una mezcla ideal que demuestre estabilidad y dispersabilidad en agua. Las emulsiones formuladas presentaron una estabilidad por debajo de las 24 horas, pues se observa una sedimentación lechosa en el fondo de todas las formulaciones realizadas. Sin embargo, al realizar la prueba de la dispersabilidad de las emulsiones se denota que si son dispersables en agua (Figura 6).

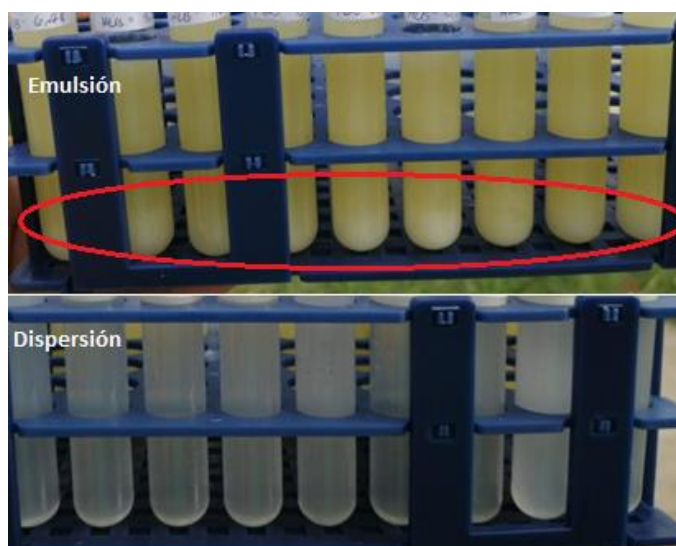


FIGURA 6 EMULSIONES Y DISPERSIONES EN AGUA FORMADAS CON MEZCLAS DE SURFACTANTES A1 Y B1 AL 5%.

Para poder escoger la proporción de surfactantes adecuadas del tipo A1, B1 se procedió a observar el tamaño de partícula de las dispersiones mostradas al microscopio con el fin de relacionar el tamaño de la gota con la estabilidad de la dispersión (Figura 7).

En las dispersiones se observó, que a medida que aumenta la proporción de surfactante A1 aumenta el tamaño de partícula (muestras de A, B, C y D) indicando con ello menor estabilidad en la dispersión. Mientras que en la muestra E al 50% de A1, solamente se puede

observar la fracción de partícula más pequeña, ya que las gotas son tan grandes tienden a coalescer a simple vista (Figura 7).

Por lo tanto, la emulsión con la combinación 10% de surfactante A1 y 90% de B1, es la seleccionada por presentar el menor tamaño de partícula y, por ende, la mayor dispersabilidad en agua.

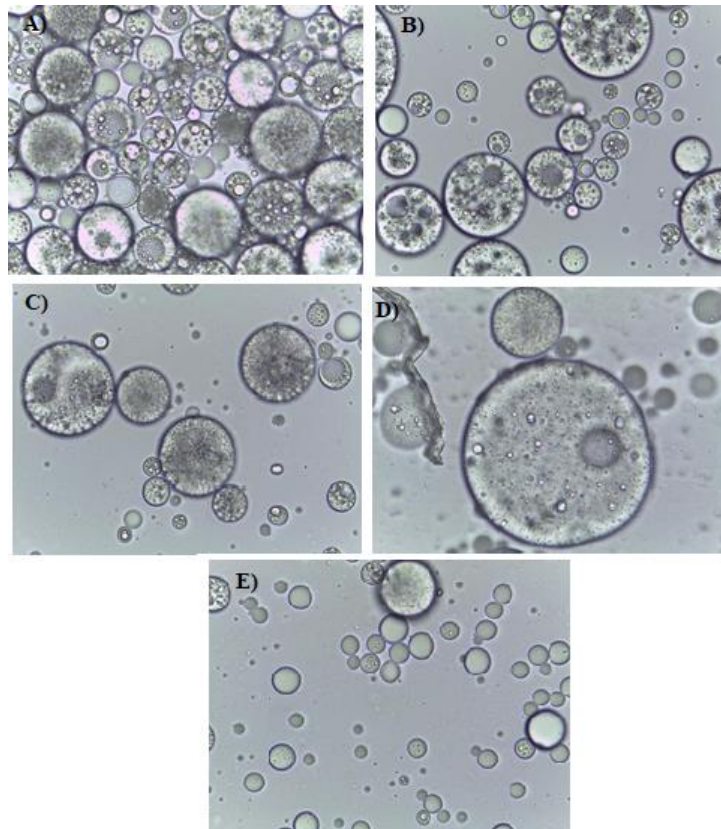
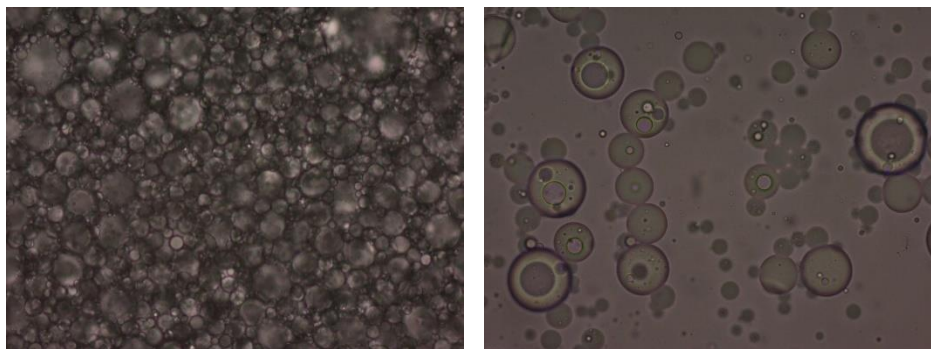


FIGURA 7 DISPERSIONES EN AGUA FORMADAS CON MEZCLAS DE SURFACTANTES A1 Y B1 MAGNIFICACIÓN 40X. A) 10% A1 B) 20% A1 C) 30% A1 D) 40% A1 E) 50% A1.

Al comparar la emulsión y la dispersión de la Figura 5, obtenida con la mezcla de surfactantes A2, B2 con la Figura 8 que es la formulación con surfactantes A1, B1, ambas al 5 % se puede observar que al emplear la mezcla A1, B1 se genera una mayor heterogeneidad entre las gotas. Sin embargo, se presenta como alternativa en comparación con a la mezcla A2 y B2, pues la emulsión presenta estabilidad, dispersable en agua y posee accesibilidad de compra en el mercado nacional e internacional.



**FIGURA 8 A) EMULSIÓN CON A1 (10%) Y B1 (90) AL 5%.
MAGNIFICACIÓN 20X. B) DISPERSIÓN EN AGUA DE LA EMULSIÓN
CON A1 Y B1. MAGNIFICACIÓN 40X.**

Como segunda alternativa se procedió a evaluar algunos productos comerciales de venta a nivel nacional, Figura 9. Cabe destacar que en la mayoría no se conocen los ingredientes activos y en el mercado se conocen como penetrantes o coadyuvantes.



FIGURA 9 SURFACTANTES COMERCIALES.

Para proceder a estudiar estos surfactantes comerciales se realizó pruebas de solubilidad en agua y en aceite, esto con el fin de observar si poseen características hidrofílicas o hidrofóbicas. Al realizar el estudio en agua se observa que G y H son solubles, mientras que los demás tienden a formar una dispersión lechosa o emulsificarse (C, D y E). En el caso del

estudio con el aceite se tiene que C y E son solubles, pero D, F y H tienden a formar una dispersión lechosa o emulsificarse y G se observan dos fases (Figura 10).



FIGURA 10 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD EN AGUA Y ACEITE PARA SURFACTANTES COMERCIAL

Posteriormente, se procede a realizar mezclas entre todos surfactantes que presentaron características hidrofílicas con los que poseen características hidrofóbicas, descartando todas aquellas combinaciones en donde se observa que hay separación de fases y se seleccionó las mezclas que forma una emulsión (marcadas en el círculo rojo), escogiendo la emulsión que presenta mayor estabilidad con respecto al tiempo, llamándola combinación D, F (Figura 11).

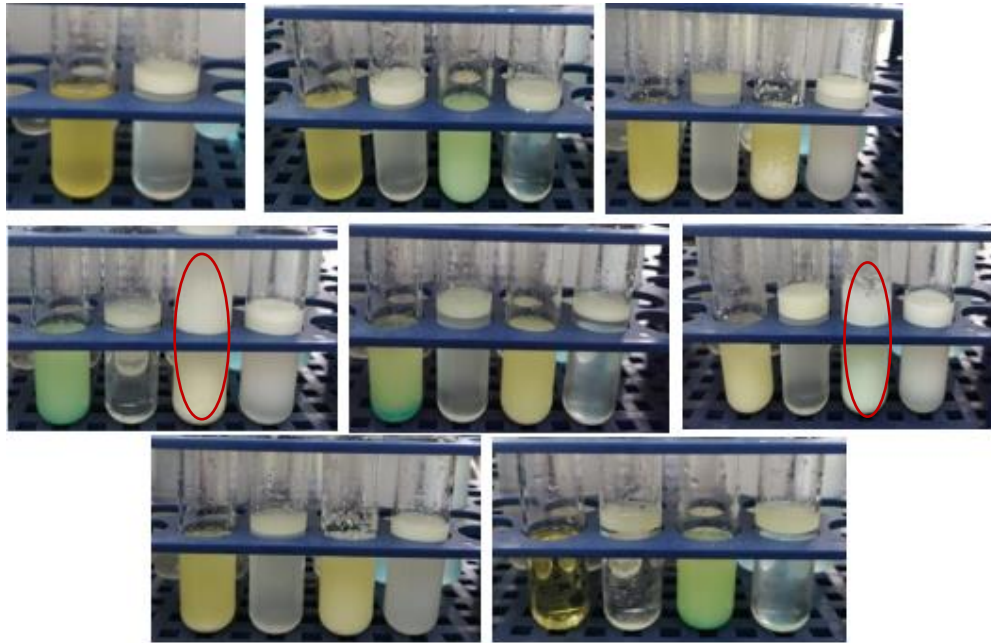


FIGURA 11 PRUEBAS DE MEZCLAS CON SURFACTANTES COMERCIALES.

Cabe destacar que al ser productos comerciales no están puros y por esta razón se debe aumentar el porcentaje de surfactante en la emulsión, con el fin lograr obtener una estabilidad mayor a 24h. Es por ello que el bioformulado resultante de la mezcla de surfactantes comerciales D, F requiere de un 20% en proporciones iguales, con una estabilidad de la emulsión mayor a las 48h y fácil dispersabilidad en agua (Figura 12). Presentándose como una alternativa de baja costo y fácil adquisición a nivel nacional.

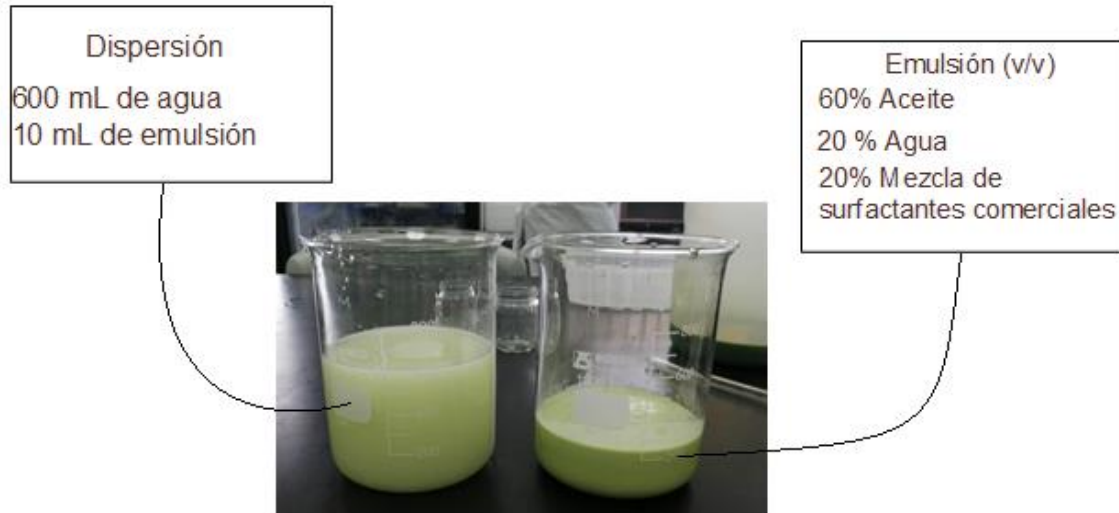


FIGURA 12 EMULSIÓN Y DISPERSIÓN REALIZADA CON SURFACTANTES COMERCIALES.

Al observar la imagen al microscopio de la emulsión anterior se obtiene que posee un tamaño de gota mayor a las mostradas en la Figura 13 y Figura 8, que corresponden a las mezclas de surfactantes puros de las líneas A y B. También se puede denotar que hay variabilidad en el tamaño de las gotas; estas características hacen que esta emulsión sea menos estable que las propuestas con anterioridad, ya que a mayor tamaño de gota más fácil es que ocurran los fenómenos de coalescencia y floculación, que a su vez llevan a procesos de separación como la sedimentación o la flotación.

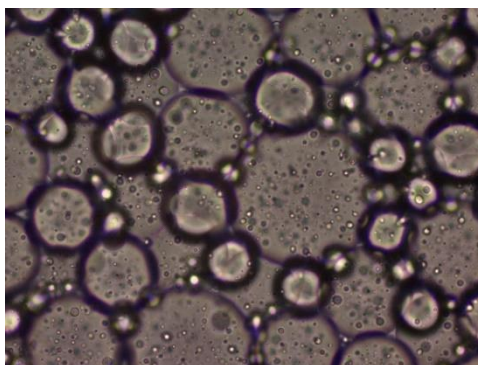


FIGURA 13. EMULSIÓN BASADA EN SURFACTANTES PRODUCTOS COMERCIALES. MAGNIFICACIÓN 40X. Como tercera alternativa, para mejorar la estabilidad de la emulsión anterior se procede a realizar la combinación de mezcla de surfactante A1 con producto comercial D, con la finalidad de reducir la cantidad total de surfactante empleada en la formulación, obtenido una mejor estabilidad en la emulsión al disminuir el tamaño de gota (Figura 14).



FIGURA 14. EMULSIÓN Y DISPERSIÓN CON MEZCLAS DE SURFACTANTES A1

De tal forma que esta mezcla presenta características interesantes, pues su dispersión tiene los menores tamaños de partícula, aunque sea de las más heterogéneas, por otra parte, ambos surfactantes empleados se encuentran con facilidad en el mercado nacional, el valor del surfactante es de 15%, mostrando una reducción de 5% con respecto a la mezcla D, F.

Se realizó la extracción de la *Arthrospira máxima* de la emulsión, esto para evidenciar si los productos utilizados, así como el proceso de formulación afectaban la estructura de la microalga. Por ende, se identificó mediante el uso de microscopía de luz la estructura de la misma, y no se logró observar fragmentos (Figura 15). Es por ello, que se decide realizar una microscopía electrónica de barrido a las microalgas extraídas de la emulsión y compararla con el producto comercial alga 600 que es un fertilizante con una mezcla balanceada de algas (Sargassum), rica en minerales, vitaminas y aminoácidos, cabe destacar que la presentación de este producto es sólida (Figura 16). En este caso se denota como las microalgas no posee daño estructural, mientras que el producto Alga 600 al ser un polvo, se observan partículas sin forma definida.

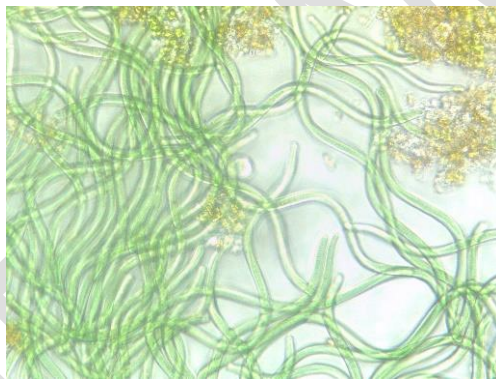


FIGURA 15. ARTHROSPIRA MÁXIMA EXTRAÍDA DE LA EMULSIÓN CON SURFACTANTES A1Y D. MAGNIFICACIÓN 100X.

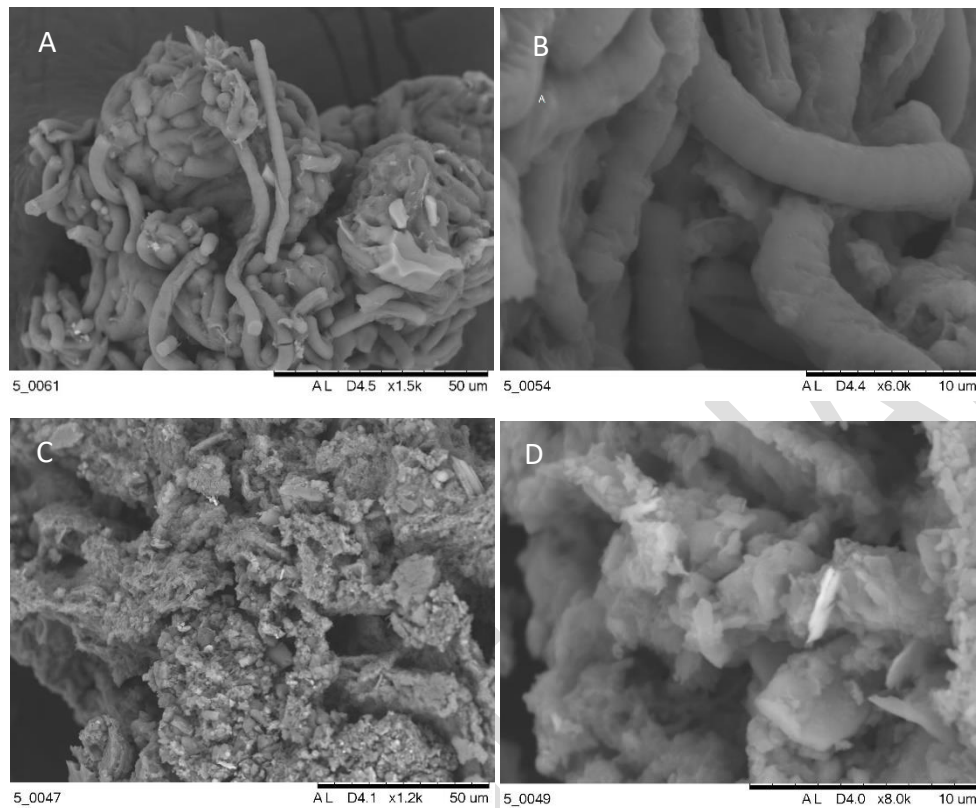


FIGURA 16. A) ARTHROSPIRA MÁXIMA EXTRAÍDA DE EMULSIÓN CON SURFACTANTES A1, D. MAGNIFICACIÓN 1,5K B) ARTHROSPIRA MÁXIMA EXTRAÍDA DE EMULSIÓN CON SURFACTANTES A1, D MAGNIFICACIÓN 6K C) PRODUCTO COMERCIAL ALGA 600 MAGNIFICACIÓN 1,2K D) PRODUCTO COMERCIAL ALGA 600 MAGNIFICACIÓN 8K.

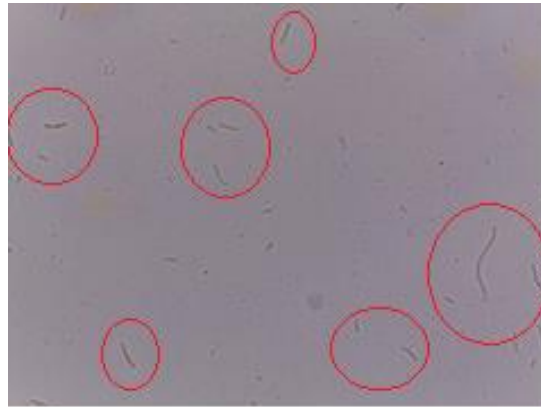
Se procedió a comparar el bioformulado con respecto al producto comercial Alga 600 y suspensión de microalga en agua. Esto se realizó a diferentes tiempos de formulación, mediante uso de espectroscopia UV- Visible, empleando las longitudes de onda de la clorofila a y b presentes en la biomasa. En el Cuadro 2 Valores de absorbancia para la clorofila a y b de la microalga en diferentes medios al 10% de biomasa. se muestra como la emulsión no produce ninguna interferencia en las absorbancias de interés. También, se puede ver como con el pasar del tiempo la microalga en agua pierde la viabilidad celular, ya que no se presentan valores de absorbancia a los dos meses de estar en este medio. Otro factor que destacar, es que cuando la microalga pasa por el proceso de secado sus valores

de absorbancia disminuyen, producto de la fragmentación y la temperatura Haga clic o pulse aquí para escribir texto.. Mientras en la emulsión se observa una respuesta de absorción de clorofilas a los 6 meses de haberse formulado. Es importante destacar que este método se ha estudiado para la determinación de la viabilidad de microalgas relacionando la perdida de clorofila con la perdida de viabilidad celular Haga clic o pulse aquí para escribir texto..

CUADRO 2 VALORES DE ABSORBANCIA PARA LA CLOROFILA A Y B DE LA MICROALGA EN DIFERENTES MEDIOS AL 10% DE BIOMASA.

Muestra	Tiempo	Absorbancia	
		413	670
Emulsión sin microalgas	0 días	0,000	0,000
Microalga seca en agua	0 día	0,209	0,000
Microalga húmeda en agua	0 día	0,398	0,561
Microalga húmeda en agua	2 meses	0,000	0,000
Emulsión con 10% biomasa	6 meses	0,332	0,227
Alga 600	0 día	0,050	0,270

Posteriormente se procedió con las pruebas para comprobar la viabilidad de la microalgal en la bioformulado que contaba con seis meses de haberse formulado y almacenado a temperatura ambiente, en donde se extrajo la biomasa mediante centrifugación y se colocó una alícuota de un 1 mL de muestra de cada tratamiento por triplicado, se adicionó en el medio de crecimiento BG11, el cual se deja bajo luz artificial y con agitación por un periodo de 7 días Haga clic o pulse aquí para escribir texto.. Después de este periodo se observa el crecimiento del inculo de microalgas en la muestra, los cuales se señalan en los círculos de color rojos, indicando viabilidad de la biomasa en la emulsión (Figura 17).



**FIGURA 17. ARTHROSPIRA MÁXIMA OBTENIDA DE LA EMULSIÓN Y CRECIDA EN MEDIO BG11.
MAGNIFICACIÓN 40X.**

Aunado a ello se realizó pruebas de microscopía de fluorescencia, donde se observó una coloración rojiza ocasionada por la autofluorescencia de la clorofila. Al contrastar las imágenes mediante microscopía de luz y de fluorescencia, la muestra 1 corresponde a la microalga con peróxido de hidrógeno, la cual ocasiona la muerte de las células; en este caso se denota cómo la intensidad en la autofluorescencia se ve disminuida, mientras que muestra 2 se observa la microalga fragmentada y la coloración es tenue, en la muestra 3 se observa la emulsión con la *Arthrospira máxima* húmeda, donde se ve su estructura completa y coloración más intensa que la seca (Figura 18).

Estas imágenes concuerdan con los resultados del cuadro 3, donde se observa una absorbancia menor cuando las microalgas sufren el proceso de secado, de tal forma que tanto la coloración rojiza así como la intensidad son indicativos de viabilidad Haga clic o pulse aquí para escribir texto..

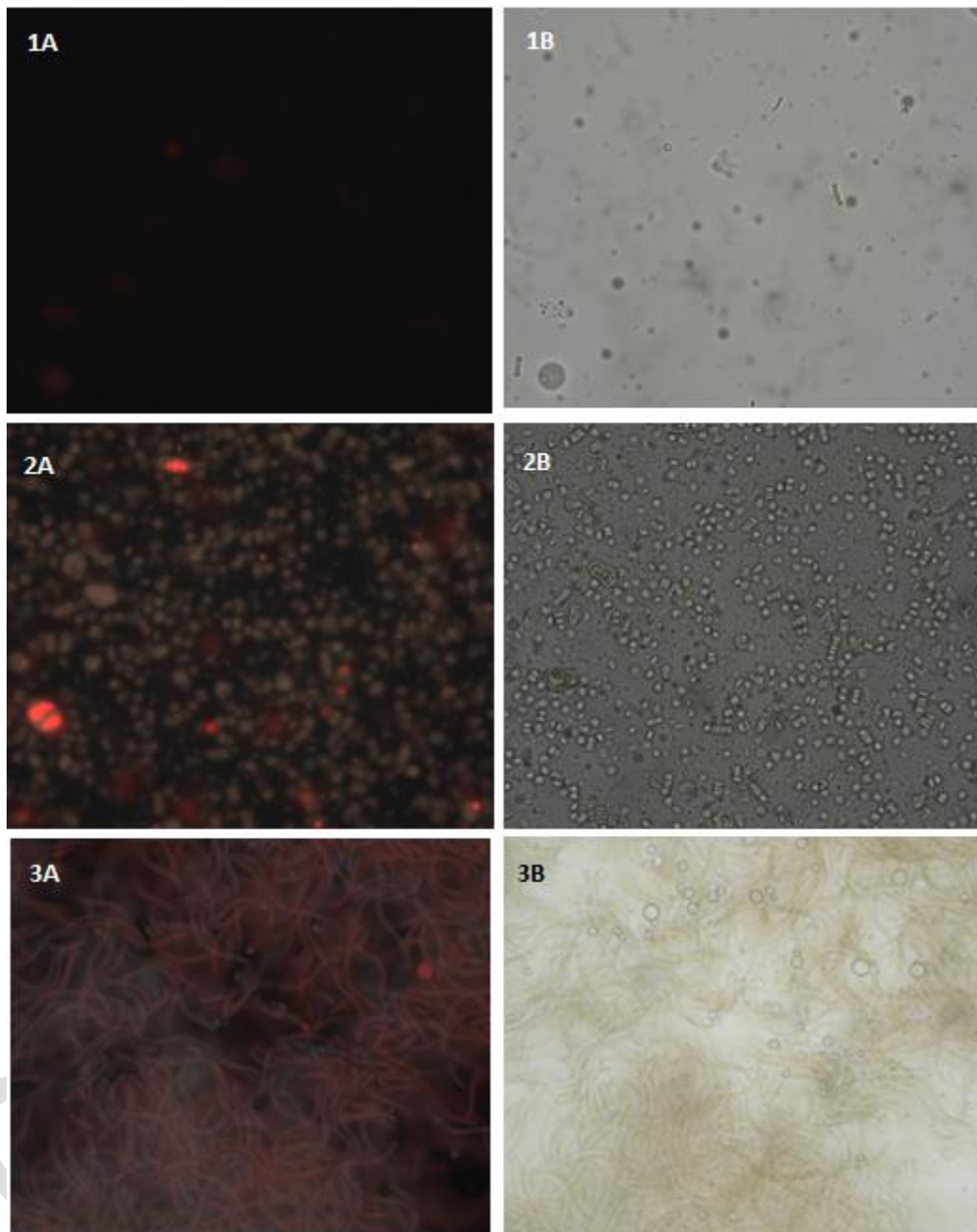


FIGURA 18. A) MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA B) MICROSCOPÍA DE LUZ. MUESTRA 1. CONTROL, ARTHROSPIRA MÁXIMA CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. MUESTRA 2. EMULSIÓN CON ARTHROSPIRA MÁXIMA SECA. MUESTRA 3. EMULSIÓN CON ARTHROSPIRA MÁXIMA HÚMEDA.

Otro de los estudios consiste en observar si al variar la temperatura de almacenaje de la emulsión se vería afectado la viabilidad de la microalga, por lo tanto, se almacenan las emulsiones por un tiempo de 35 días a tres valores diferentes de temperatura, en este caso, se muestra que a pesar de la temperatura se da la producción de clorofila y a su vez se tendría que todas las muestras poseen viabilidad celular (Cuadro 3).

CUADRO 3 VALORES DE ABSORBANCIA PARA LA CLOROFILA A Y B DE LAS MICROALGAS EN EMULSIÓN A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Temperatura	Absorbancia $\lambda= 413$		Absorbancia $\lambda= 670$	
	0 días	35 días	0	35 días
0-5°C	0,609	0,564	0,602	0,571
25°C	0,493	0,600	0,503	0,614
45°C	0,477	0,989	0,492	1,028

Otro de los aspectos importantes para evaluar el bioformulado es la contaminación, ya que dependiendo de los resultados del análisis microbiológico el producto no podría aplicarse en campo. En el Cuadro 4, se muestra los valores dependiendo de la temperatura de almacenaje en donde solamente tienen presencia de microorganismos aerobios y anaerobios en las temperaturas menores a 25°C, además de no presentar a ninguna temperatura de almacenaje mohos, levaduras o salmonela; por consiguiente, se obtiene que el producto se puede emplear en campo a cualquier temperatura de almacenaje de las estudiadas.

CUADRO 4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO A LAS EMULSIONES VARIANDO LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

Temperatura	Conteo UFC/mL					
	* E coli/ coliformes	Anaerobios	Mohos	Levaduras	Salmonela	Aerobios
0-5°C	3> NMP/mL	1150	0	0	Ausente	60

25°C	3> NMP/mL	500	0	0	Ausente	100
45°C	3> NMP/mL	0	0	0	Ausente	0

*NMP =Método de Número más probable

Una vez obtenido que la emulsión logra preservar la viabilidad de las microalgas y que el contenido microbiológico en el proceso de almacenamiento permite su uso en campo, se procede a analizar los estudios de tamaño de partícula para las diferentes emulsiones, así como las dispersiones en agua.

La emulsión obtenida con los surfactantes puros A2 y B2, son los que poseen menor tamaño, seguido por la mezcla A1 y B1. Mientras que, en el caso de la combinación de productos comerciales D, F; se denota que aumenta a casi el doble con respecto a los surfactantes puros de la línea A, B. Además, posee una desviación del doble, ampliando en ancho de la curva y ocasionando que haya varios tamaños de partícula (Figura 19). Otro aspecto es que, al realizar la mezcla de surfactantes entre puros y comerciales, A1, D; se obtiene un tamaño de partícula similar al de los productos puros, y también se ve una disminución de la desviación estándar (Cuadro 5).

De tal forma que se puede indicar cómo la adición del surfactante puro A1, mejora la emulsión, ocasionando un mejor tamaño de partícula y como consecuencia mayor estabilidad.



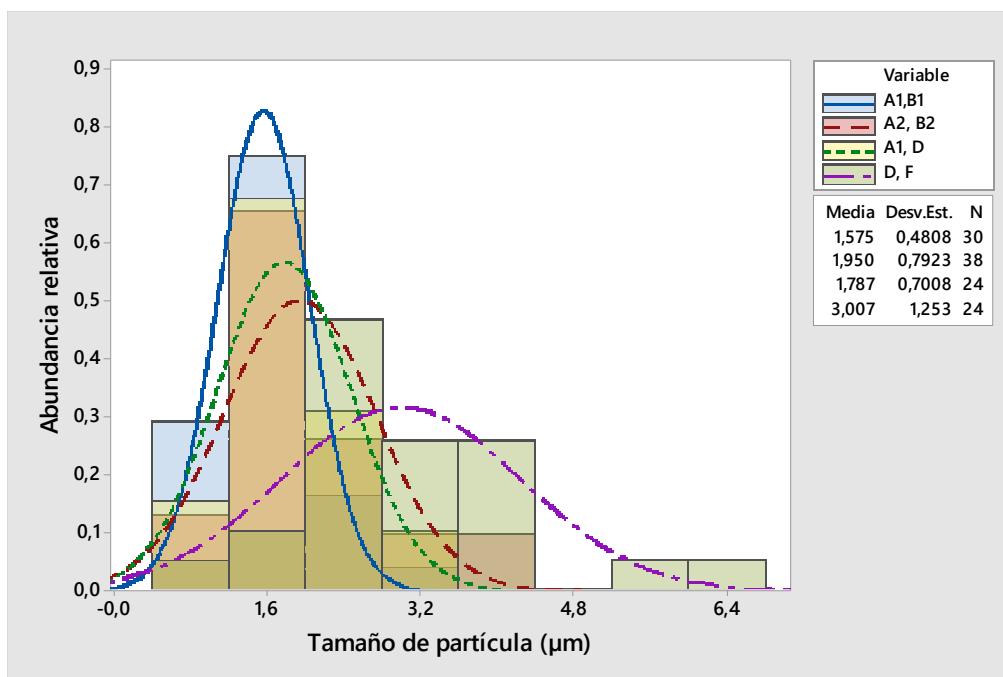


FIGURA 19. HISTOGRAMAS DE TAMAÑO DE PARTÍCULAS (μm) PARA LAS DIFERENTES EMULSIONES EMPLEANDO MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.

Primeramente, se procede a realizar la comparación de varianzas con un nivel de significancia $\alpha=0,05$ donde se obtiene un valor de $p=0,002$ indicando que al menos una varianza muestra diferencia significativa. (Figura 23).

CUADRO 5. VALORES DE INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.

Muestra	N	Desv.Est.	IC
A12 B2	30	0,48080	(0,306113; 0,82377)
A1, B1	38	0,79227	(0,540001; 1,24416)

A1, D 24 0,70081 (0,508645; 1,07772)

D, F 24 1,25270 (0,808678; 2,16595)

Nivel de confianza individual = 98,75%

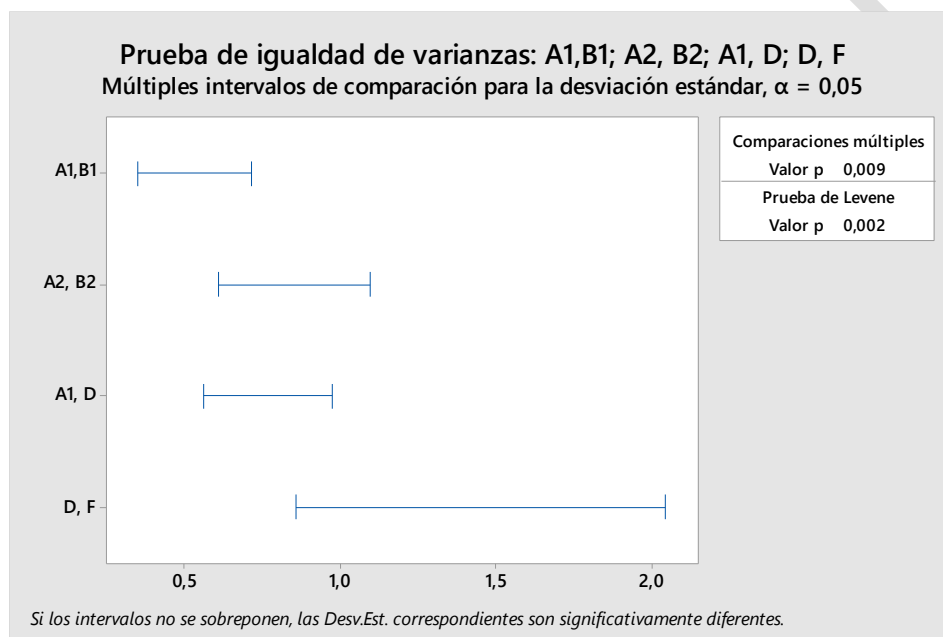


FIGURA 20. RESULTADOS DE COMPARACIÓN DE VARIANZAS PARA EL TAMAÑO DE PARTÍCULA.

Posteriormente, se procede a realizar la comparación de medias para el tamaño de partícula, en donde se emplea la prueba de Welch debido a las varianzas no son iguales, obteniendo un valor de $p < 0,05$ por tanto hay diferencia significativa entre las medias. Por esta razón se decide hacer una agrupación de las medias, en este caso se muestra que la única emulsión que posee diferencia significativa es la realizada con productos comerciales D, F. De tal forma que se puede indicar que al combinar el surfactante comercial con el puro de A1 se logra un tamaño de partícula semejante al de las emulsiones obtenidas con

la línea A, B, donde ambos son surfactantes puros (Cuadro 6 y Resultados de comparación de medias por el tamaño de partícula.).

CUADRO 6. COMPARACIÓN Y AGRUPACIÓN DE MEDIAS DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.

Factor	N	Media	Agrupación
D, F	24	3,007	A
A1, B1	38	1,950	B
A1, D	24	1,787	B
A2, B2	30	1,5753	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

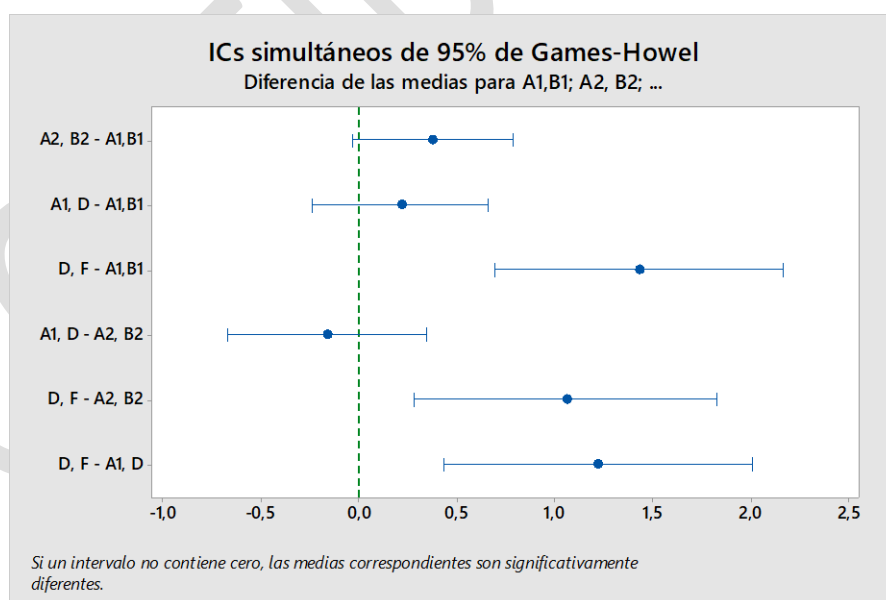


FIGURA 21. RESULTADOS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS POR EL TAMAÑO DE PARTÍCULA.

Se determinó el tamaño de partícula de la dispersión en agua, acá se puede denotar como la emulsión realizada con los surfactantes A2 y B2 posee los menores tamaños de partícula, siendo estos de $0,178 \mu\text{m}$ y $0,564 \mu\text{m}$ los cuales al ser tan pequeños mejoran la estabilidad de la dispersión. Mientras que la muestra con A1, B1 presenta dos grandes distribuciones de tamaño $0,204 \mu\text{m}$ y $4,94 \mu\text{m}$, siendo esta última su población mayoritaria. Por otra parte, la muestra con la mezcla de surfactante A1, D se observan tres distribuciones de tamaño $0,159 \mu\text{m}$, $2,64 \mu\text{m}$ y $5,60 \mu\text{m}$, siendo la población mayoría la más pequeña con un 61,8%, (Figura 22 y cuadro 10).

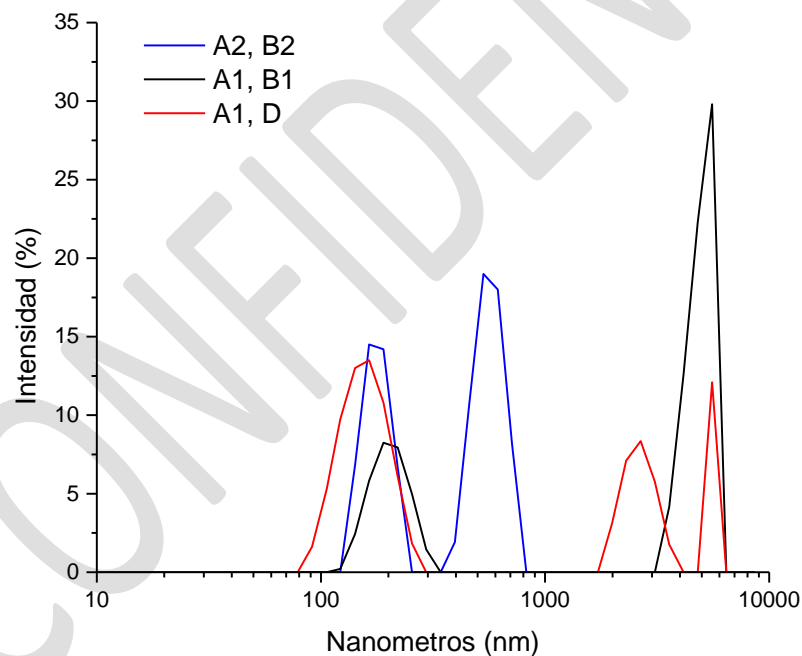


FIGURA 22. TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LAS DISPERSIONES EN AGUA DE LAS EMULSIONES DETERMINADAS POR EL EQUIPO NANOSIZER.

Al efectuar la comparación entre el producto comercial Alga 600 en donde obtuvo un tamaño de partícula de $0,079 \mu\text{m}$ contra la emulsión y la emulsión con microalga se denota que posee un tamaño de partícula menor, lo cual es de esperar, ya que este posee una presentación en polvo que puede ser homogeneizado fácilmente bajo un proceso de molienda. Otro aspecto relevante es la comparación de las dispersiones de la emulsión sin y con biomasa microalgal, en donde al incorporar la microalga se genera solamente dos distribuciones de tamaño de partículas a $0,110 \mu\text{m}$ y $5,56 \mu\text{m}$ siendo mayoritaria la que menor tamaño. (Figura 23, Cuadro 7).

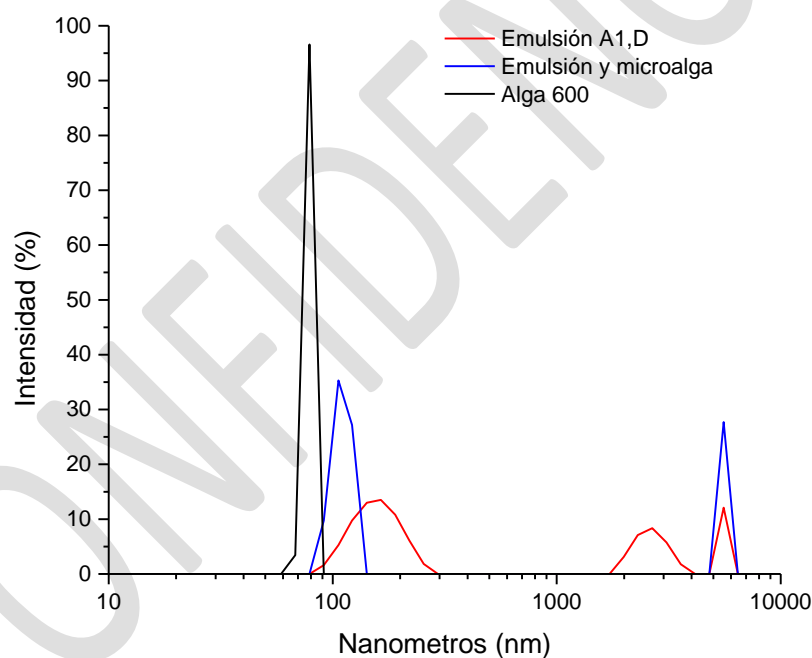


FIGURA 23. TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LAS DISPERSIONES CON MICROALGA DETERMINADAS CON EL EQUIPO NANOSIZER.

CUADRO 7. VALORES DE TAMAÑO DE PARTÍCULA PARA LAS DISPERSIONES REALIZADAS A PARTIR DE LAS EMULSIONES.

Muestra	Tamaño de partícula (μm)	Porcentaje de volumen (%)
Emulsión A2, B2	0,178	42,3
	0,565	57,8
Emulsión A1, B1	0,204	31,1
	4,96	69,9
Emulsión A1, D	0,159	61,8
	2,65	26,1
	5,56	12,1
Emulsión A1, D con microalga	0,110	78,1
	5,56	21,9
Alga 600	0,785	100

Hay que destacar que la estabilidad de una emulsión se puede relacionar con la distribución del tamaño de partículas, el cual se ve afectado por fenómenos como coalescencia y floculación que tiende a desestabilizar las fases. Sin embargo, es de suma importancia estudiar la relación entre la estabilidad y la temperatura. La estabilidad de una emulsión se puede ver afectada por fenómenos de desestabilización, que también se pueden relacionar con el tamaño de partícula el cual disminuye los procesos de coalescencia y floculación.

Sin embargo, un punto a investigar es la estabilidad con respecto a la temperatura, pues como se reporta en investigaciones, la estabilidad de la emulsión está directamente relacionada con la estabilidad del microorganismo. Haga clic o pulse aquí para escribir texto.. En el Cuadro 8 se muestra los porcentajes de separación de la emulsión a tres diferentes temperaturas en un tiempo posterior de 35 días de la formulación, observando que conforme aumenta la temperatura hay mayor separación en la emulsión, sin embargo, es importante destacar nunca ocurrió una separación total de las fases.

Aunado a ello, se realizó un estudio de pH con respecto al tiempo como se muestra en el Cuadro 9, en donde se puede observar que a distintas temperaturas no hay un cambio de pH, en comparación con la muestra recolectada de estanque el cual se observa un aumento en el valor de pH, así como un crecimiento de contaminantes (Figura 24).

CUADRO 8. PORCENTAJE DE SEPARACIÓN DE LA EMULSIÓN CON RESPECTO A LA TEMPERATURA LUEGO DE 35 DÍAS DE LA FORMULACIÓN.

Temperatura	Porcentaje de separación (%)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
0-5°C	8,86	8,67	8,44	14,38	0,69
25°C	13,98	13,98	15,17	8,66	0,21
45°C	23,72	23,46	22,58	14,38	0,69

CUADRO 9. VALORES DE pH DE LAS EMULSIONES AL VARIAR LA TEMPERATURA.

Muestra	Temperatura	pH		Desviación
		0 días	35 días	
Emulsión	0-5°C	3,40	3,40	0,02
Emulsión	25°C	3,48	3,50	0,06
Emulsión	45°C	3,47	3,49	0,08
Control (microalga en agua)	25°C	5,81	6,72	0,02



FIGURA 24. ARTHROSPIRA MÁXIMA EN AGUA Y EN EMULSIÓN A) VISTA SUPERIOR DE MICROALGA EN AGUA B) VISTA LATERAL DE MICROALGA EN AGUA C) EMULSIÓN CON BIOMASA MICROALGAL.

Con respecto a la viscosidad, la emulsión que está realizada a partir de los surfactantes comerciales D, F es la menos viscosa y que cuando se realiza la mezcla entre el producto comercial con el surfactante puro de línea A, se obtiene que es la que presenta mayor viscosidad, superando las emulsiones realizadas con los surfactantes de las líneas A, B (Figura 25).

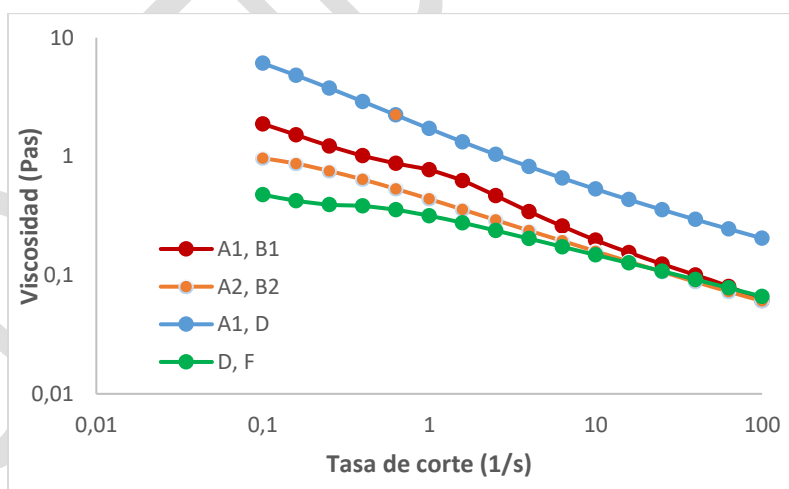


FIGURA 25. VISCOSIDAD PARA LAS EMULSIONES.

Cuando se tienen emulsiones que no presentan estabilidad al aumento de temperatura lo que ocurre es que estas coalescen, generando que se dé la liberación del agua de la fase interna y ocasione una disminución drástica en la viscosidad (Figura 28).

Al comparar el cambio en la viscosidad con respecto a la temperatura, se denota que la variación en las viscosidades se debe al aumento de la temperatura y no a la pérdida de la estabilidad en la emulsión. Esto se debe a que los cambios son pequeños, propios de un aumento en la energía cinética ocasionó por un ΔT , de tal forma que fluye con mayor facilidad y se ve reflejado en una disminución de la viscosidad. Con ello se puede decir que las emulsiones estudiadas presentan estabilidad en un rango de 20-60°C (Figura 26).

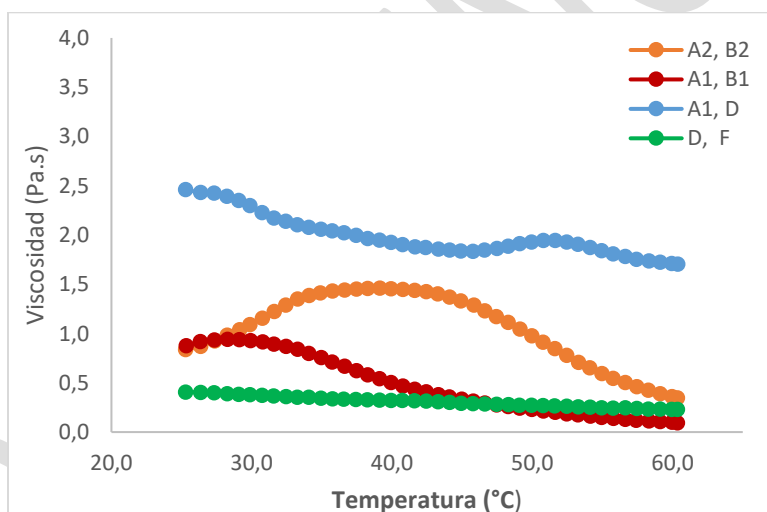


FIGURA 26. VISCOSIDAD CONTRA LA TEMPERATURA PARA LAS DIFERENTES EMULSIONES.

Se realizaron análisis de barridos oscilatorios de esfuerzo y frecuencia para cada una de las emulsiones, como medio de clasificar las formulaciones dentro de fluidos viscosos o viscoelásticos. Al realizar los barridos oscilatorios de esfuerzo se determinan los módulos viscosos y elásticos identificados con G'' y G' respectivamente, empleando una frecuencia constante de 1Hz. Estos son graficados contra la deformación. En este caso se busca la

región constante en las rectas, de tal forma que se toman los valores de los módulos viscoso y viscoelástico generado la relación G''/G' , cuando esta relación es mayor a 1 se tiene un fluido viscoso, mientras que si es menor a 1 es viscoelástico

Los valores obtenidos a partir del análisis de los barridos oscilatorios de esfuerzo demuestran como la emulsión realizada con los productos comerciales es el único que presenta características viscosas, las demás emulsiones son viscoelásticas. El término viscoelasticidad engloba el comportamiento de muchos fluidos que pueden exhibir elasticidad y flujo cuando son sometidos a un cizallamiento a bajas deformaciones, el fluido viscoelástico se comporta literalmente como un sólido elástico. A altas deformaciones, estos fluyen de forma viscosa; es decir, como líquidos (Cuadro 10).

Además, al ver el valor de λ se nota que los tiempos necesarios para que fluyan son muy pequeños, por lo tanto, eso es una ventaja si se piensa en que haya una segunda etapa de investigación para producción a gran escala, pues eso facilita los procesos de transporte, ya que no requiere de bombas con alta presión para poder hacer que fluya el producto.

CUADRO 10. RESUME DE DATOS REOLÓGICOS DE LAS EMULSIONES.

Emulsión	G''/G'	λ (s)
A1- D	0,28 viscoelástico	No se logra determinar en el rango de medición 0,01-100s
F- D	1,13 viscoso	11,62
A1 -B1	0,42 viscoelástico	1,85
A2-B2	0,39 viscoelástico	2,15

Implementar un protocolo de ultrasonido para generar emulsiones que mejoren la formulación y su estabilidad

Los procesos de rotura celular fueron realizados a través de métodos mecánicos, esto con el fin de que puedan ser escalables a nivel industrial.

Se utilizó el método de ultrasonificación (260 W) para la rotura celular de las microalgas. Esta técnica de rotura celular se aplicó en ambas especies de microalgas. En el caso de *Scenedesmus sp*, a 260 W con forme pasaba el tiempo aumentaba el porcentaje de rotura (Figura 27). Para el caso de *Arthrospira sp*, se aprecia que al minuto 8 se logra el mayor porcentaje de rotura celular (Figura 28).

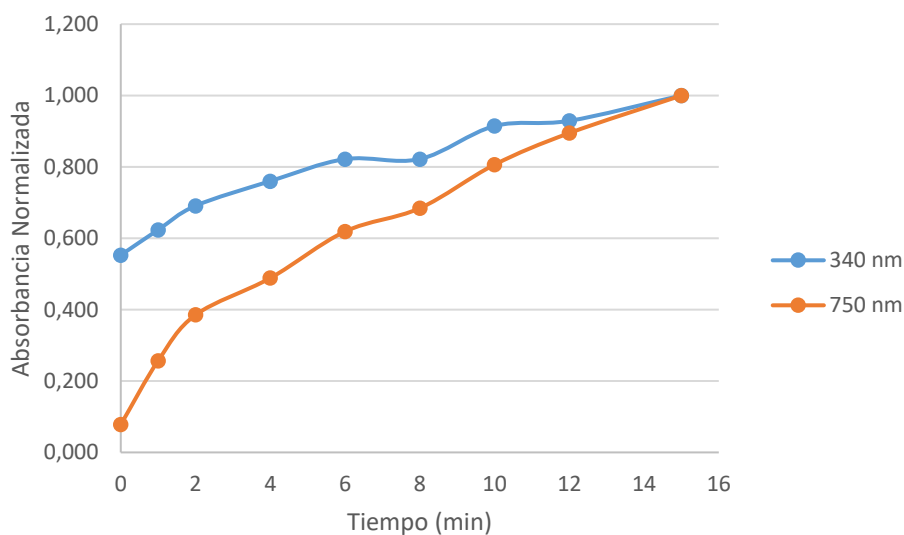


FIGURA 27 ABSORBANCIA NORMALIZADA DE LA BIOMASA DE SCENEDESMUS SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTOS TIEMPOS DE ULTRASONIFICACIÓN A 260W COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

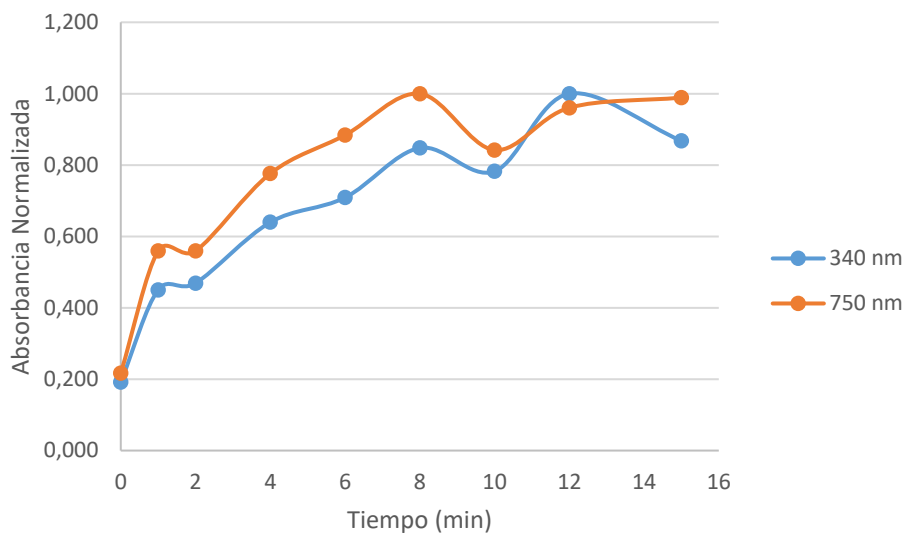


FIGURA 28. ABSORBANCIA NORMALIZADA DE LA BIOMASA DE ARTHROSPIRA SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTOS TIEMPOS DE ULTRASONIFICACIÓN A 260W COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

Al aplicar una frecuencia de 325 W en la biomasa de *Scenedesmus sp*, con forme pasaba el tiempo aumentaba el porcentaje de rotura (Figura 29). Para el caso de *Arthrospira sp*, se aprecia que al minuto 12 se logra el mayor porcentaje de rotura celular (Figura 30).

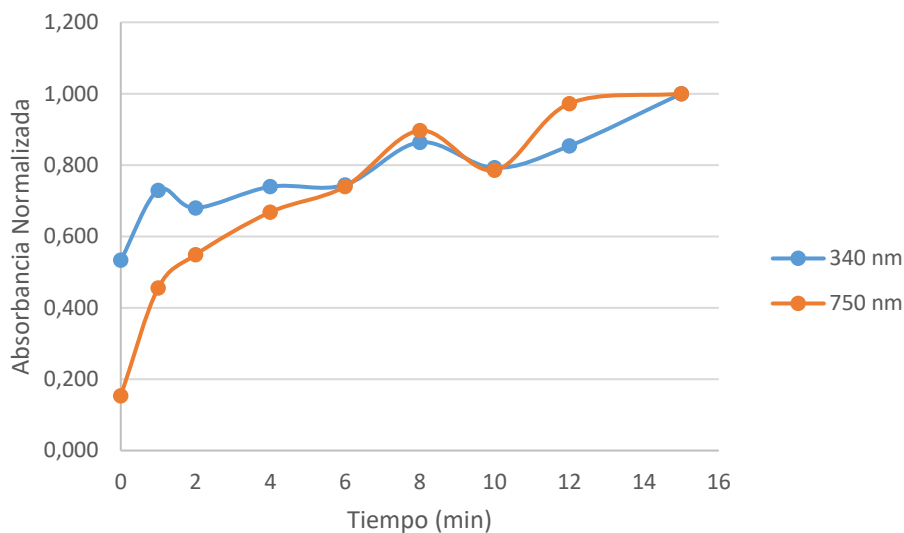


FIGURA 29. ABSORBANCIA NORMALIZADA DE LA BIOMASA DE SCENEDESMUS SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTOS TIEMPOS DE ULTRASONIFICACIÓN A 325W COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

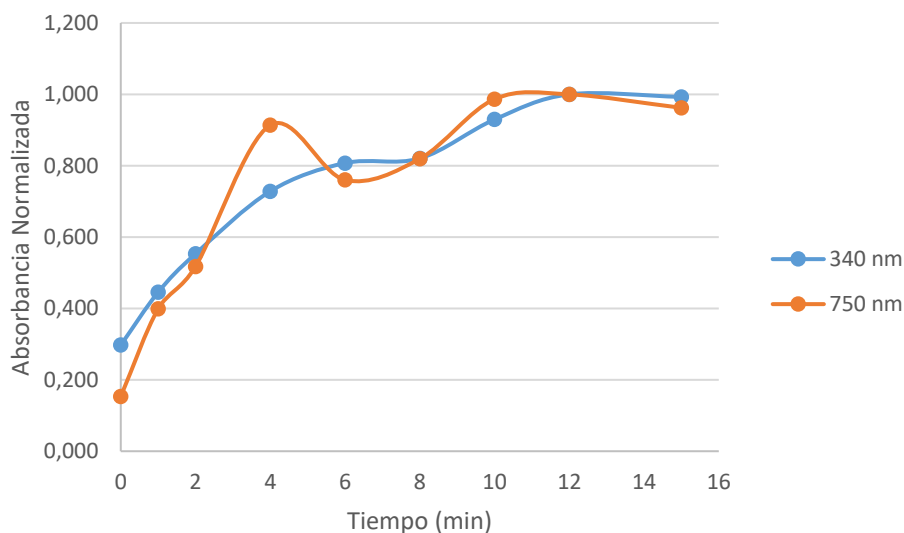


FIGURA 30. ABSORBANCIA NORMALIZADA DE LA BIOMASA DE ARTHROSPIRA SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTOS TIEMPOS DE ULTRASONIFICACIÓN A 325W COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR

Al utilizar la rotura celular por método de homogenización en ambas especies de microalgas, se observó que conforme aumentan los números de pasos en el caso de *Scenedesmus sp*, aumenta la rotura celular (Figura 31). En el caso de la *Arthrospira sp*, se

obtuvo que a partir del paso número 3 se logró la máxima cantidad de rotura celular (Figura 32).

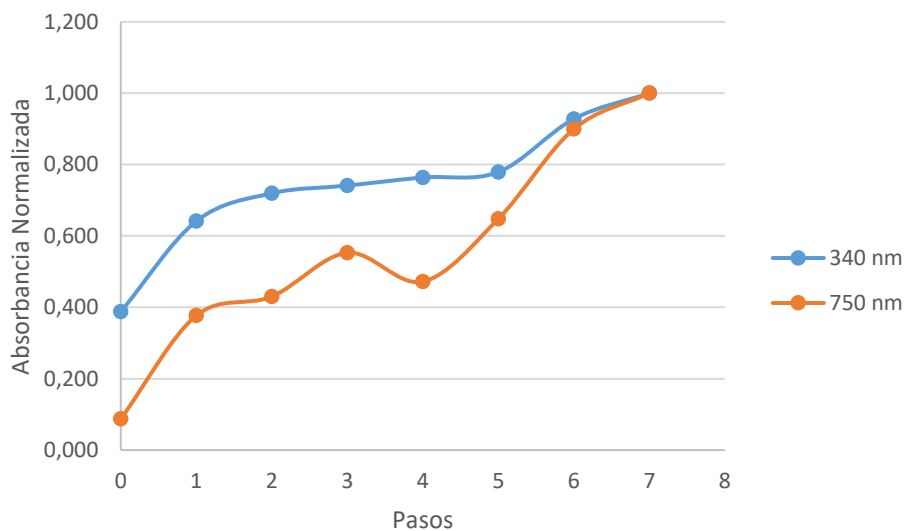


FIGURA 31. ABSORBANCIA NORMALIZADA DE LA BIOMASA DE SCENEDESMUS SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTOS PASOS DE HOMOGENIZACIÓN DE ALTA PRESIÓN COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

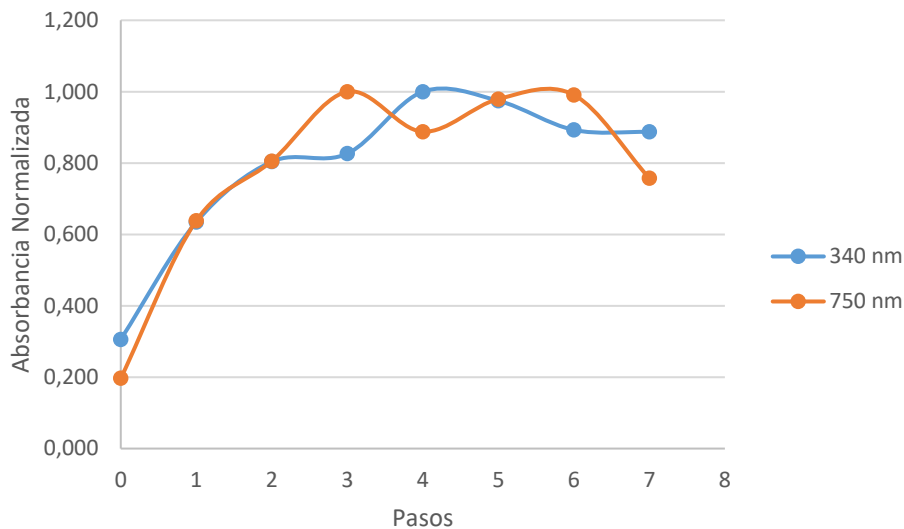


FIGURA 32. ABSORBANCIA NORMALIZADA DE LA BIOMASA DE ARTHROSPIRA SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTOS PASOS DE HOMOGENIZACIÓN DE ALTA PRESIÓN COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

Posteriormente se realizó la optimización de la técnica de rotura celular por el método de ultrasonificación. Se buscó obtener la menor cantidad de potencia aplicada y el menor número de pasos necesarios para obtener la mayor cantidad de rotura posible. Para el caso de *Scenedesmus sp*, se observó que a partir del paso número 5 a 325W de potencia se logra la mayor cantidad de rotura celular (Figura 33). En el caso de *Arthrospira sp*, debido a su dificultad para ser centrifugada, los datos no se comportan de manera normal. Se aprecia que a partir del tercer paso a 325W se logra la máxima rotura celular, con las demás potencias se logra niveles de rotura mucho más bajos (Figura 34).

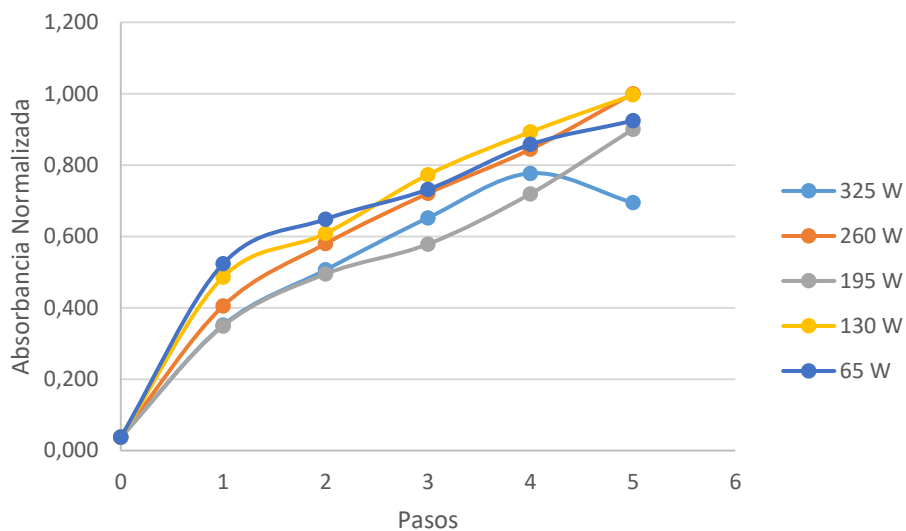


FIGURA 33. ABSORBANCIA NORMALIZADA A 750 NM DE LA BIOMASA DE SCENEDESMUS SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTAS POTENCIAS Y PASOS DE ULTRASONIFICACIÓN COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

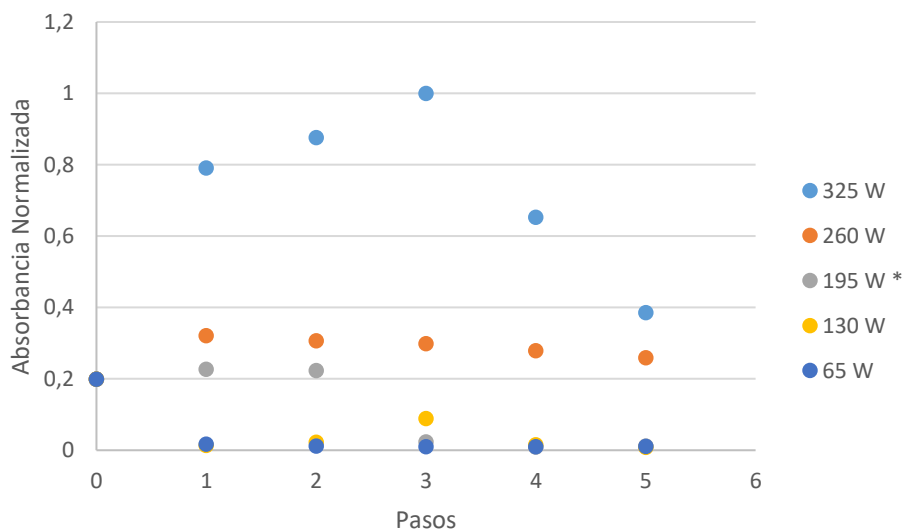


FIGURA 34. ABSORBANCIA NORMALIZADA A 750NM DE LA BIOMASA DE ARTHROSPIRA SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTAS POTENCIAS Y PASOS DE ULTRASONIFICACIÓN COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

Al igual que en el caso de la ultrasonificación, con el homogenizador se buscó obtener el mayor porcentaje de rotura celular con la menor presión y número de pasos requeridos. Para el caso de la biomasa de *Scenedesmus sp*, se observó que la presión que logro mayor rotura fue a 500 Bar y conforme se aplicaban más pasos el porcentaje de rotura aumentaba (Figura 35). En el caso de *Arthrospira sp* se observó que la presión que presentó mayor rotura celular fue la de 300 Bar y conforme se aplicaban más pasos el porcentaje de rotura celular aumentaba (Figura 36).

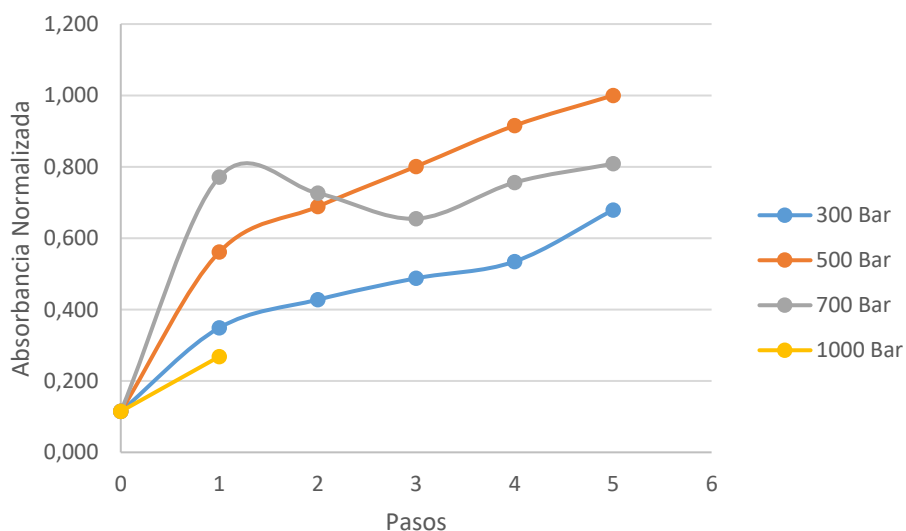


FIGURA 35. ABSORBANCIA NORMALIZADA A 750NM DE LA BIOMASA DE SCENEDESMUS SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTAS PRESIONES Y PASOS DE HOMOGENIZACIÓN DE ALTA PRESIÓN COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

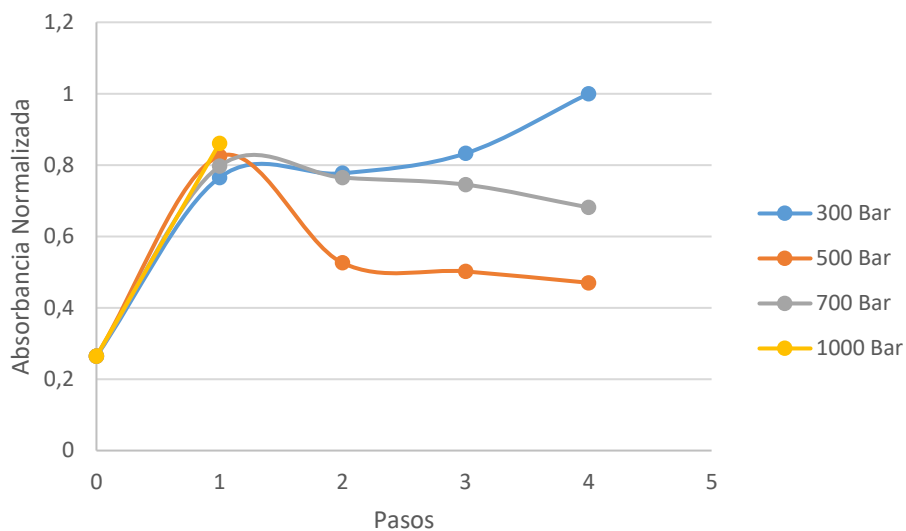


FIGURA 36. ABSORBANCIA NORMALIZADA A 750NM DE LA BIOMASA DE ARTHROSPIRA SP DESPUÉS DE APLICAR DISTINTAS PRESIONES Y PASOS DE HOMOGENIZACIÓN DE ALTA PRESIÓN COMO MÉTODO DE ROTURA CELULAR.

Al comparar los resultados optimizados de las técnicas de rotura celular, ultrasonificación y homogenización, junto con las anteriores, se obtuvo que la técnica de ultrasonificación presenta mayor grado de rotura celular seguido de la homogenización de alta presión, Figura 37.

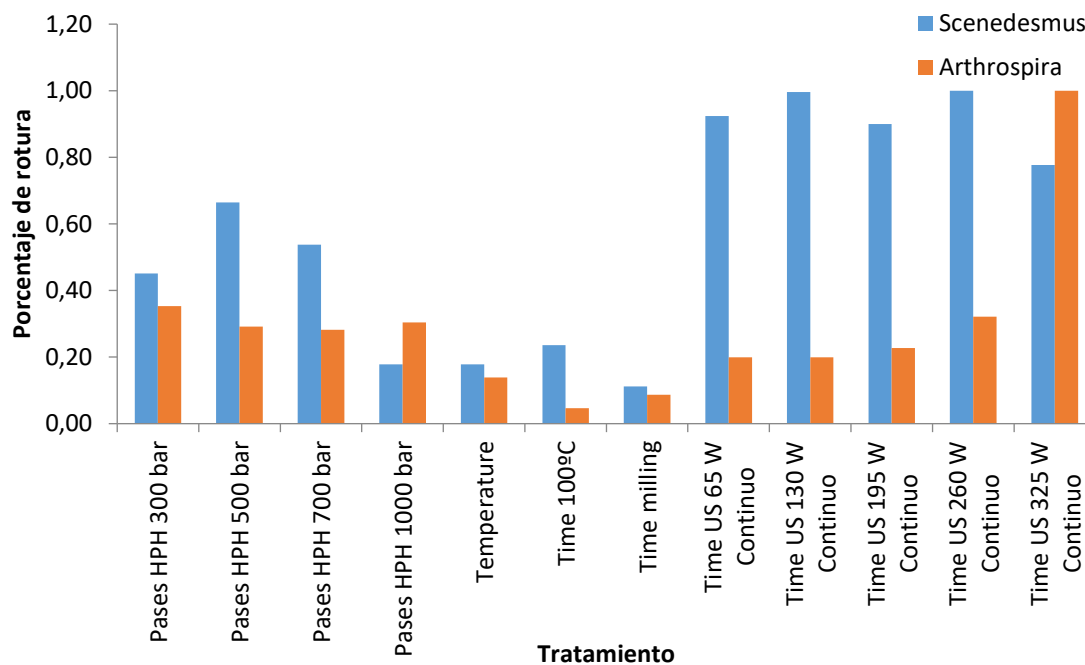


FIGURA 37. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE ROTURA CELULAR OBTENIDO EN SCENEDESMUS SP Y ARTHROSPIRA SP A PARTIR DE TODAS LAS TÉCNICAS DE ROTURA CELULAR APLICADAS.

Al aplicar la hidrólisis enzimática se realizó la cuantificación del porcentaje de hidrólisis enzimática de la biomasa de *Scenedesmus sp*, se obtuvo que la técnica de ultrasonificación presenta mayor porcentaje de hidrólisis respecto a la técnica de homogenización de alta presión tanto en el caso de *Scenedesmus sp*, así como, el de *Arthrospira sp*. En el caso de *Scenedesmus sp* se observa que luego del paso 4 con ambas técnicas el porcentaje de hidrólisis se estabiliza (Figura 36).

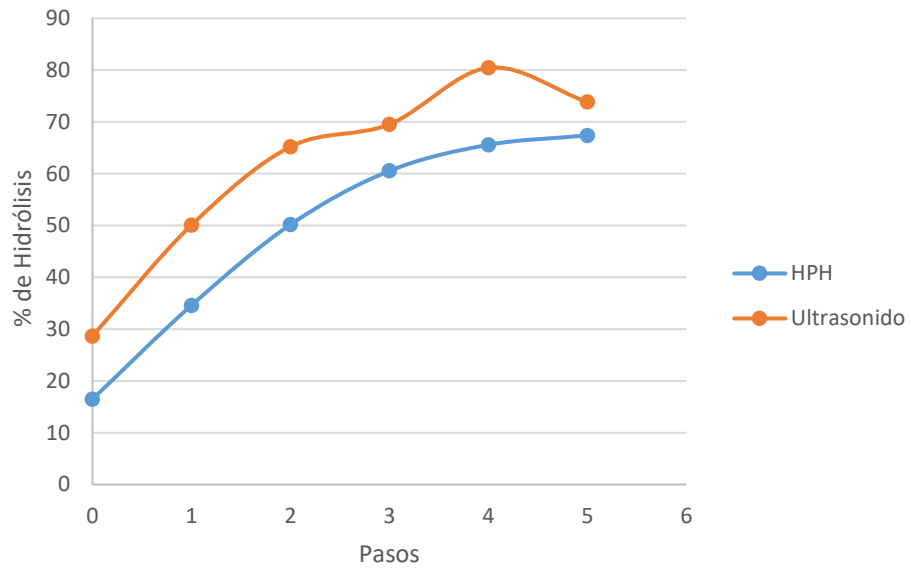


FIGURA 38. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA OBTENIDO DE SCENEDESMUS SP A PARTIR DE LAS TÉCNICAS DE ROTURA CELULAR, ULTRASONIFICACIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE ALTA PRESIÓN, A DISTINTOS PASOS.

Determinar las dosis adecuadas y letales del Biofertilizante de microalgas.

Se procede a realizar pruebas con la emulsión a nivel de campo en diferente cultivos entre ellos chile, lechuga, y cebolla

Las evaluaciones en chile dulce, se realizaron con las variedad Nathalie y Dulcítico para evaluar la efectividad del bioformulado. En el Cuadro 11 se muestran los tratamientos que se emplearon en el cultivo de Chile.

CUADRO 11 TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN LA EVALUACIÓN DE BIOFORMULADOS DE MICROALGAS EN CULTIVO DE CHILE DULCE DE LA VARIEDAD NATHALIE Y DULCÍTICO

Tratamiento	Simbología de Tratamiento	Dosis	Número de Tratamiento
H ₂ O (1)	a	0	1
		200	2
		400	3
AyA (1)	b	800	4
		1000	5
		2000	6
		200	7
		400	8
Nano Humedo (1)	c	800	9
		1000	10
		2000	11
Alga 600 (1)	d	1000	12
Nano Seco (1)	e	1000	13
Comercial (1)	f	1000	14

En este caso se evaluó siete cosechas, midiendo cantidad, calidad y masa de frutos (Figura 39). Para ello se estudiaron diferentes dosis de la emulsión, cada uno los valores se diluyeron en 200L de agua y se aplicó 20 mL a cada planta en la base.

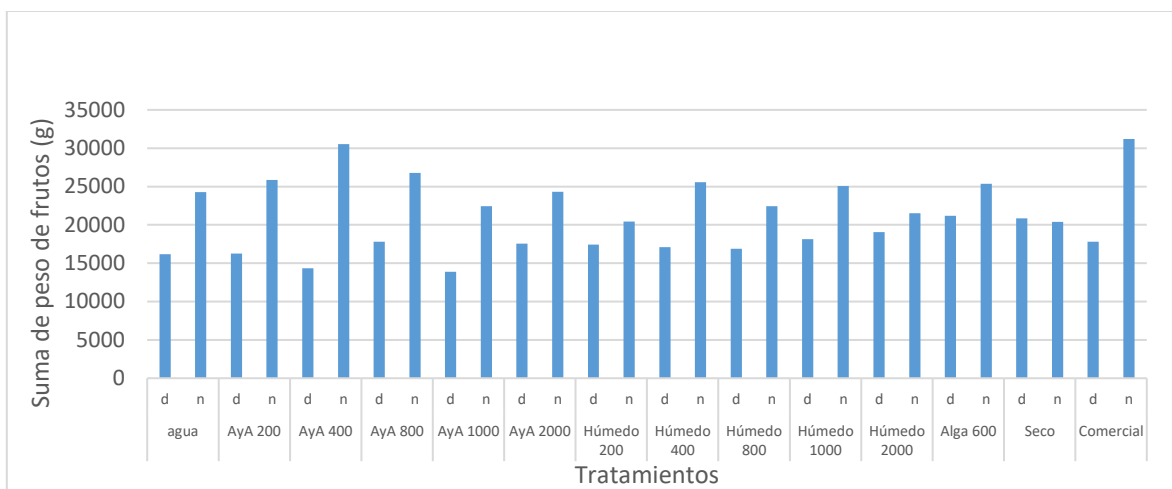


FIGURA 39. RENDIMIENTO TOTAL EN MASA DE LA PRODUCCIÓN EN CHILE VARIEDAD NATHALIE Y DULCÍTICO.

Al analizar la producción de chile dulce con respecto a la calidad del producto se muestra que el tratamiento de AyA y el producto comercial posee mayores cantidades en productos de primera (Cuadro 12).

CUADRO 12 PORCENTAJE DE INCREMENTO DE PESO DE FRUTOS POR TRATAMIENTO CON RESPECTO AL CONTROL DE AGUA

Variedad	Nathalie			Dulcítico		
	Primera (%)	Segunda (%)	Tercera (%)	Primera (%)	Segunda (%)	Tercera (%)
Agua	0	0	0	0	0	0
AyA 200	4	11	13	10	11	13
AyA 400	0	-6	-18	0	-6	-18
AyA 800	50	-8	-22	-2	-8	-22
AyA 1000	18	-21	-28	-17	-21	-28
AyA 2000	34	-11	-19	-7	-11	-19
Húmedo 200	-2	-12	-16	-11	-12	-16
Húmedo 400	-16	18	19	14	18	19
Húmedo 800	2	-1	2	0	-1	2
Húmedo 1000	-9	17	22	15	17	22
Húmedo 2000	-2	3	4	2	3	4
Alga 600	50	4	-3	9	4	-3
Seco	2	7	9	7	7	9
Comercial	36	15	11	17	15	11

Nota: Se tomó el criterio de Primera $\geq 119g$, segunda $< 119g$ y $\geq 86g$; tercera $< 86g$ y $> 51g$

Para determinar si el efecto en la producción de chiles se debe a la biomasa microalgal o al aceite que contiene la emulsión propuesta se realizan varios controles: la emulsión sin biomasa, agua y la biomasa en agua, esto con la finalidad de demostrar que factor genera el estímulo.

Para determinar el efecto de la longitud y la masa de cada fruto se procede a analizar cada variable por separado. Al analizar la distribución de longitudes por tratamiento, se puede denotar que la media mayor se encuentra en la biomasa en agua y la menor en el agua. Además, se muestra que hay valores atípicos para la emulsión en biomasa y la biomasa en agua, los cuales se muestran con un asterisco y se pueden generar debido a diversos factores ambientales que dificultaron el proceso de crecimiento (Figura 40).

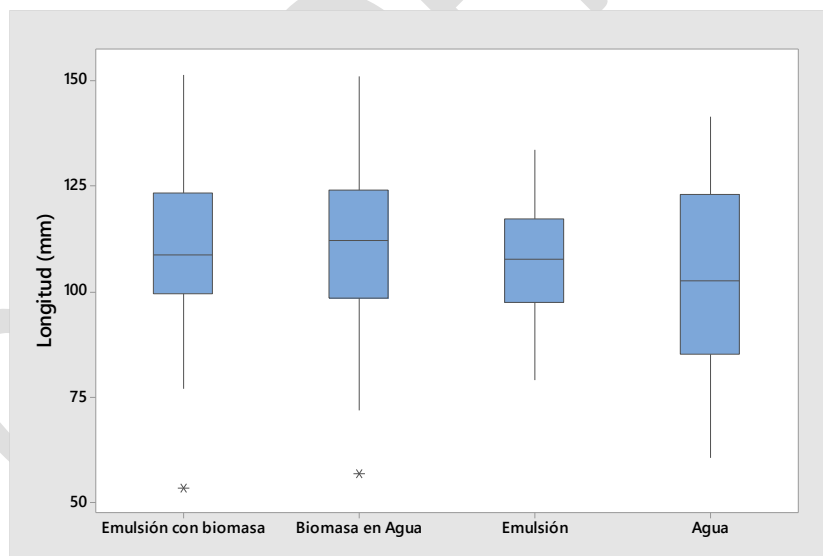


FIGURA 40. DISTRIBUCIÓN DE LA LONGITUD DE FRUTO EN CHILE VARIEDAD NATHALIE.

Seguidamente se procede a realizar el análisis de comparación varianzas para la longitud de chile Nathalie, al aplicar la prueba de Levene se obtienen como resultado un valor de $p > 0,05$ indicando que todas las varianzas son iguales. No obstante, al analizar el valor de la prueba

de comparaciones múltiples este da con un $p < 0,05$, indicando que al menos una varianza es significativamente diferente (Figura 41).

Es importante destacar que la prueba de comparaciones múltiples no se debe emplear si las distribuciones normales son asimétricas y con colas pesadas, que tienen más datos en la parte inferior o superior. Por tanto, se trabajó únicamente con el valor de p de Levene.

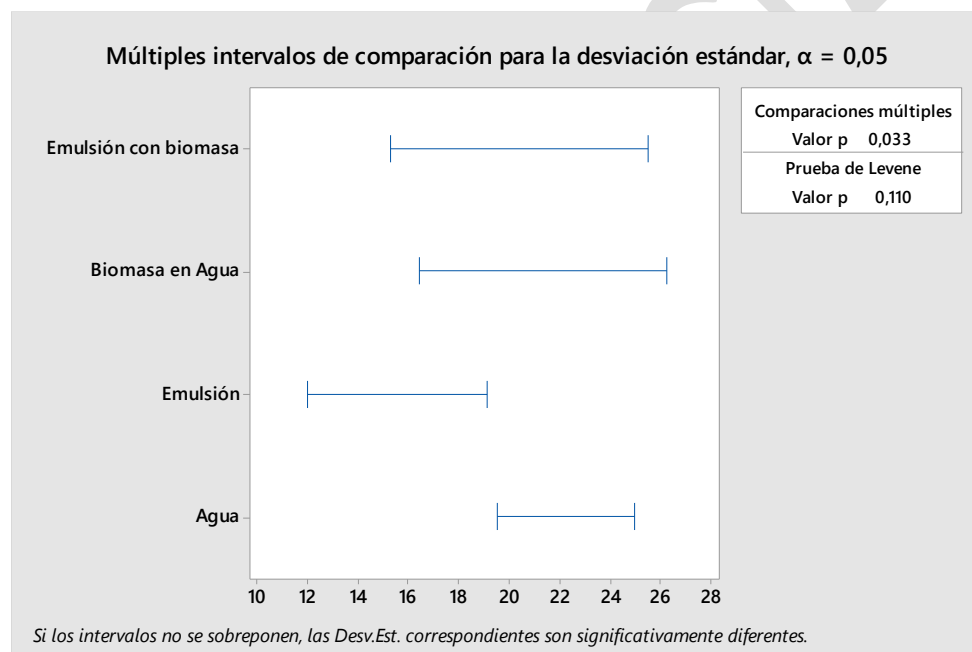


FIGURA 41. ANÁLISIS DE VARIANZAS PARA LA LONGITUD DE FRUTO.

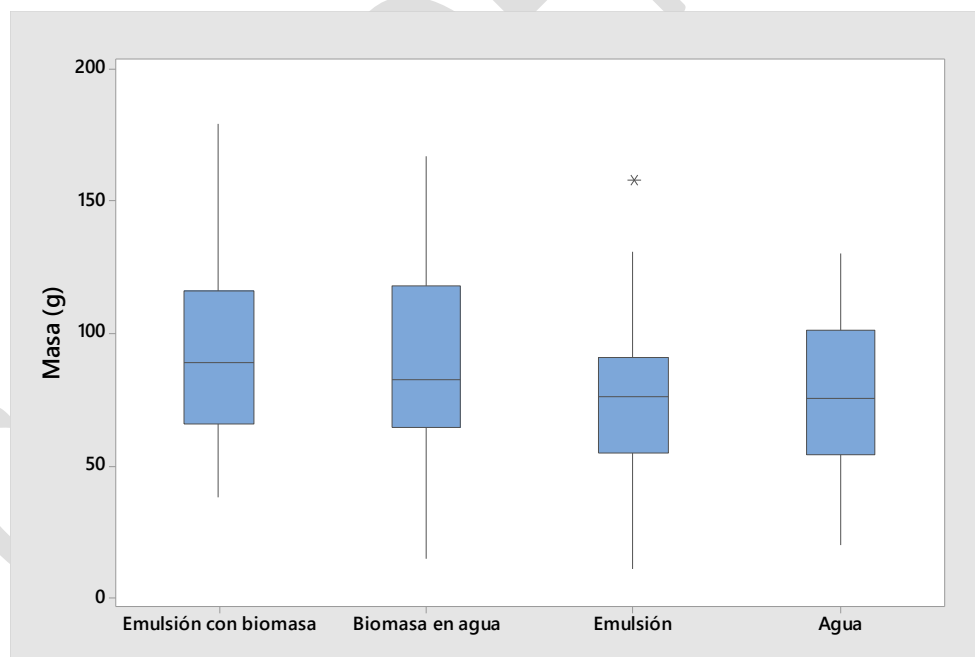
Al comprobar que las varianzas son iguales se debe realizar el análisis de ANOVA para la comparación de las medias. En donde obtiene un valor de $p = 0,276$ por indicando que no hay diferencia significativa entre las medias para el valor de la longitud del chile dulce, variedad Nathalie. En el Cuadro 13 se muestran los valores de la media, así como la cantidad de datos y el intervalo de confianza obtenido para cada tratamiento.

CUADRO 13. ANÁLISIS DE MEDIAS PARA LA LONGITUD DEL FRUTO.

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Emulsión con biomasa	40	110,14	19,11	(104,16; 116,12)
Biomasa en Agua	39	111,32	20,07	(105,26; 117,38)
Emulsión	37	107,41	14,63	(101,19; 113,63)
Agua	46	103,81	21,47	(98,23; 109,39)

Desv.Est. agrupada = 19,1571

Por otra parte, al realizar el análisis de la masa del fruto, se puede observar que la media mayor se encuentra en el tratamiento emulsión con biomasa y la menor el tratamiento de emulsión que se encuentra muy cercano con el valor del agua (Figura 42).

**FIGURA 42. DISTRIBUCIÓN DE MASA DE FRUTO EN CHILE VARIEDAD NATHALIE.**

Al realizar la comparación varianzas para la masa de chile Nathalie y aplicar la prueba de Levene se obtienen como resultado un valor de $p=0,781$ indicando que todas las varianzas son iguales (Figura 43).

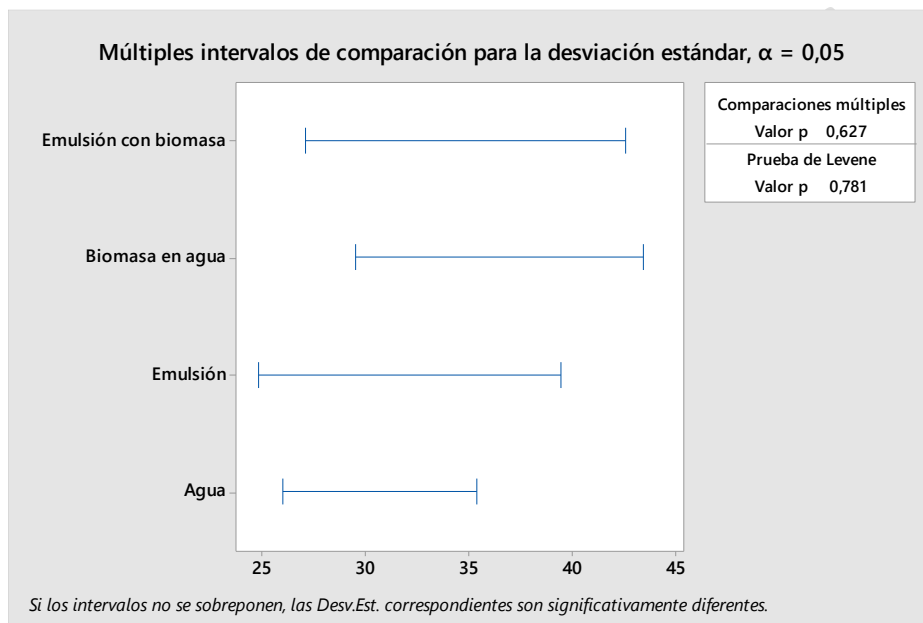


FIGURA 43. ANÁLISIS DE VARIANZAS PARA LA MASA DE LOS FRUTOS EN CHILES VARIEDAD NATHALIE.

Al comprobar que las varianzas son iguales se aplica el ANOVA para la comparación de las medias, con un valor de $p=0,070$; por tanto, no se encuentra diferencia significativa entre las medias de masa de fruto. En el

Cuadro 14 se muestran los valores de la media, así como la cantidad de datos y el intervalo de confianza obtenido para cada tratamiento.

CONFIDENCIAL

CUADRO 14. ANÁLISIS DE MEDIAS PARA LA MASA DEL FRUTO EN CHILE VARIEDAD NATHALIE.

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Emulsión con biomasa	40	92,86	32,88	(82,93; 102,79)
Biomasa en agua	39	88,45	34,62	(78,39; 98,50)
Emulsión	37	76,58	30,19	(66,26; 86,91)
Agua	46	78,65	29,50	(69,39; 87,91)

Desv.Est. agrupada = 31,7918

Por otra parte, si se analizó la producción en masa total de cada tratamiento se destaca que al emplear la emulsión con la biomasa microalgal se obtiene la mayor producción, seguido por el tratamiento control de agua, posteriormente la emulsión y por último la biomasa en agua. De tal forma que si se analiza el peso total de producción se podría indicar que si hay diferencia y se da un aumento en la producción de chile dulce variedad Nathalie (Figura 44).

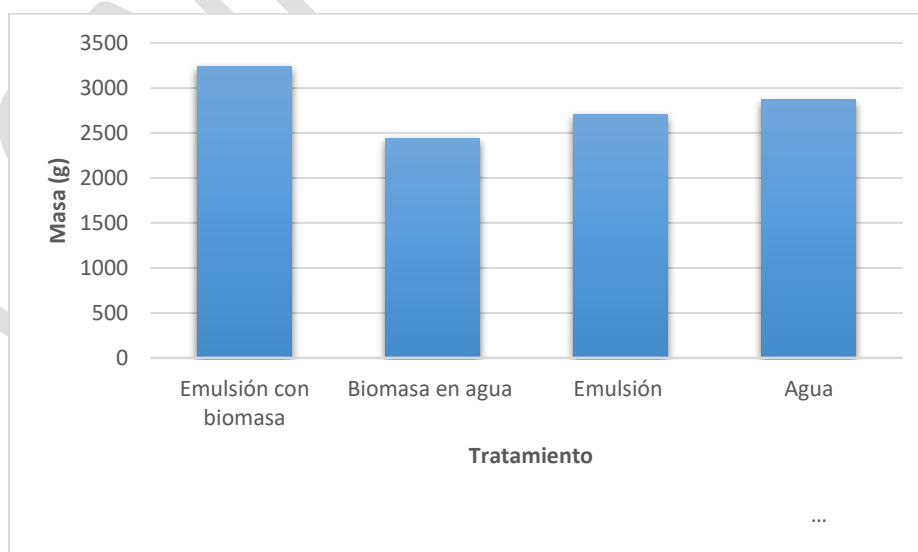


FIGURA 44. PRODUCCIÓN EN MASA POR TRATAMIENTO EN CHILES VARIEDAD NATHALIE.

Al analizar la calidad del fruto acorde a los parámetros establecidos en la metodología, se puede denotar que el tratamiento con biomasa en agua es el que posee el mayor rendimiento para la primera calidad, seguido por el tratamiento de emulsión con biomasa microalgal. No obstante, es importante destacar que el comportamiento de la emulsión con biomasa se asemeja más a los controles de agua y emulsión, indicando con ello que no se genera un efecto relevante en la calidad si esta es determinada por la longitud del fruto (Figura 45).

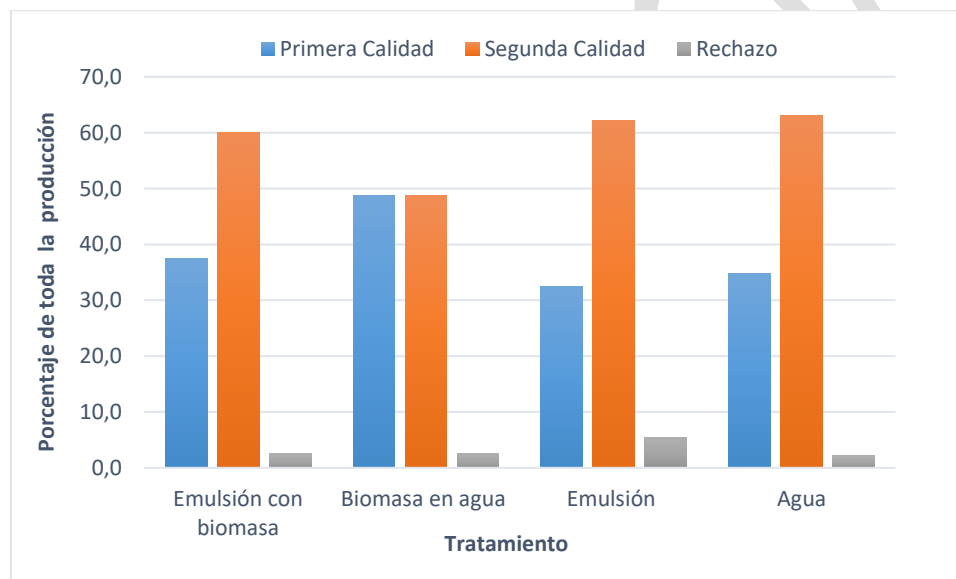


FIGURA 45. PRODUCCIÓN CALIDAD DE PRODUCCIÓN POR LONGITUD EN CULTIVO DE CHILE VARIEDAD NATHALIE.

Para determinar la calidad con respecto a la masa del fruto los resultados demostraron que se obtienen rendimiento en primera calidad de los tratamientos de emulsión con biomasa y biomasa en agua es similar, pero se diferencian en la distribución de productos de segunda calidad, en donde se observa un aumento entre ellas de más del doble, resultado más productivo el tratamiento de emulsión con biomasa. Aunado a ello si vemos la cantidad de productos de rechazo se destaca como es el que posee menor cantidad de frutos rechazados.

Otro detalle que destacar es que, al emplear la emulsión, si se compara con el agua se denota como se genera un deterioro de la calidad, de tal forma que aumenta la cantidad de producto en tercera calidad, al igual que aumenta el rechazo, Figura 46. Por lo tanto, se podría indicar que en el tratamiento de emulsión con biomasa el efecto es generado por la biomasa. Además, se podría asumir que diferencia entre la emulsión con biomasa y la biomasa en agua se debe al estado de preservación de las microalgas, pues como se indicó, las microalgas permanecen viables a mediano plazo al ser emulsificadas.

Estos resultados convierten al producto en estudio en un prototipo con potencial, por lo que es imperativo realizar más estudios para comprender más su comportamiento en otro tipo de cultivos y/o condiciones.

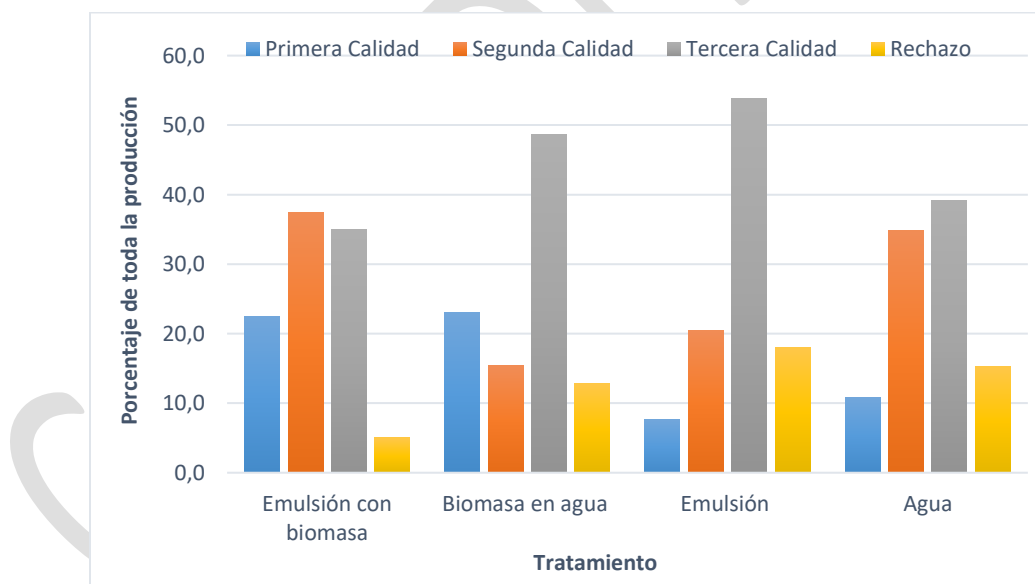


FIGURA 46 CALIDAD DE FRUTOS DE CHILE CON FORMULACIONES DE MICROALGAS

Se evaluó la dosis letal de microalgas en lechuga para determinar si esta podría presentar un efecto a la dosis recomendada de usar en el campos. En el Cuadro 15 se indica la concentra inhibitoria media del 50% y el intervalo de confianza del 95%

CUADRO 15 ENSAYO DE FITOTIXICIDAD DE GERMINACIÓN Y LETALIDAD EN LECHUGA

Muestra	Cl ₅₀ 144 horas	I.C. 95%
Bioformulado de Microalgas	12,8%	11,7%; 14%

Para evaluar el uso de los bioformulados en sistemas de riego se desarrollaron pruebas en el campo de prácticas de la Escuela de Ingeniería Agrícola del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en el área cultivada con lechugas por estudiantes del curso Sistemas y Técnicas de Producción.

Se seleccionaron dos eras sembradas de 40 metros de longitud, con cuatro hileras de lechugas simétricamente espaciadas, colocadas a lo largo de las mismas. El sistema de riego consiste en laterales de manguera con goteros incorporados con un caudal de operación de 1,9 l/h a una presión de 10 psi, espaciados cada 40 cm. El sistema de riego cuenta con equipo de inyección de fertilizantes, que se utilizó para aplicar el Bioformulado en una dosis de 0,5 L por cada 50 L de agua.

Se instaló un sistema de filtrado intercambiable con el fin de evaluar filtros con elementos de anillos y de malla, ambos de 120 mesh, con diámetro nominal de 1", ya que son los filtros disponibles en el mercado y comúnmente utilizados por los productores que usan sistemas de riego por goteo. En la Figura 47, se muestra la distribución de la tubería, que consistió en la instalación de porta filtros intercambiables para hacer las pruebas.

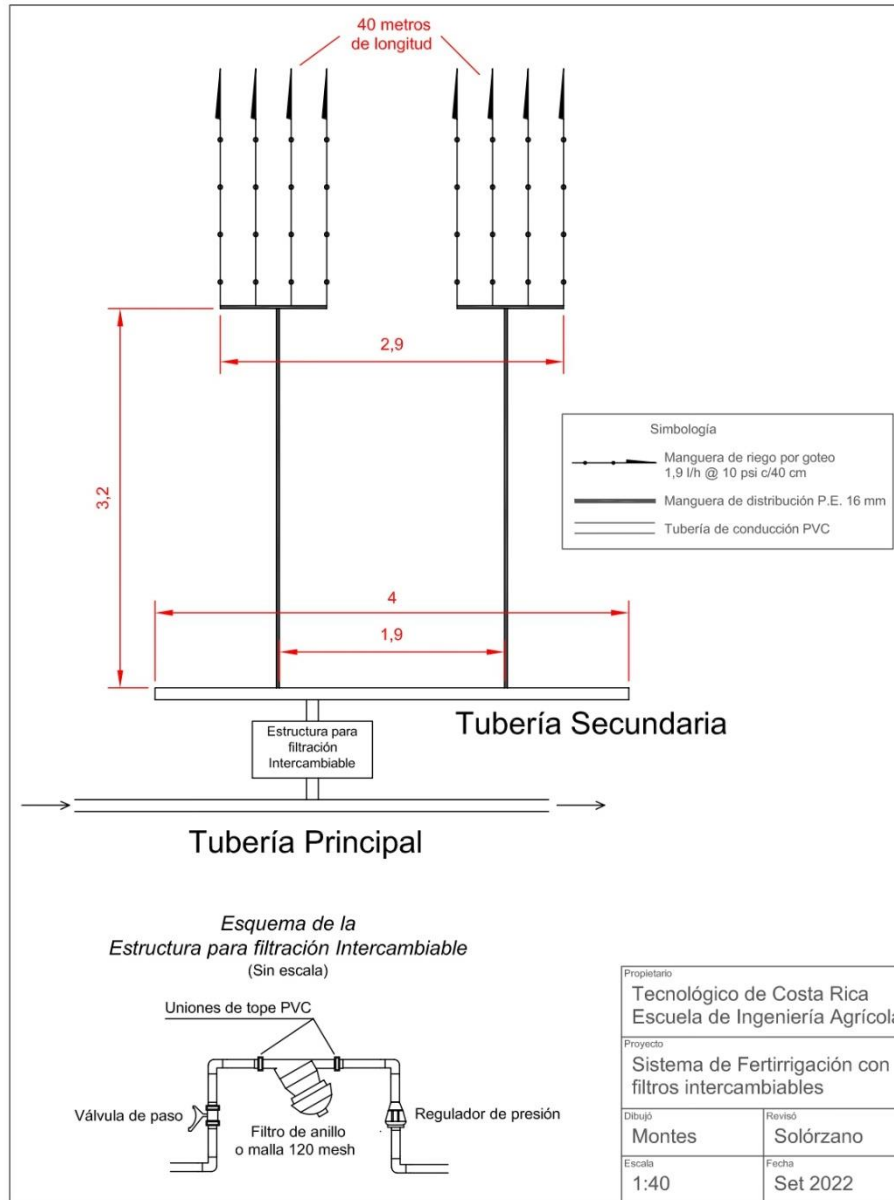


FIGURA 47 PLANO DE FILTRADO INTERCAMBIABLE PARA PRUEBAS CON FERTIRRIEGO CON MICROALGAS



(a)

(b)

FIGURA 48 FILTRO DE ANILLOS (A) Y FILTRO DE MALLA (B) UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS

Se realizó la medición del caudal en seis puntos a lo largo de cada lateral de goteo, en recipientes plásticos colocados a 0 m, 6,1 m, 12,7 m, 28,02 m y 37 m, durante 2 minutos (Figura 49, Figura 50 y Figura 51).

Se realizaron 6 repeticiones para cada prueba manteniendo la presión de operación a 10 psi, bajo los siguientes parámetros:

- A. Prueba del sistema de riego por goteo solamente agua, sin filtros
- B. Prueba del sistema de riego por goteo solamente agua, con filtros de anillos
- C. Prueba del sistema de riego por goteo solamente agua, con filtros de malla
- D. Prueba del sistema de riego por goteo con la dosis de microalgas, con filtros de anillos
- E. Prueba del sistema de riego por goteo con la dosis de microalgas, con filtros de malla

La medición de los volúmenes obtenidos se realizó con probetas de 150 ml graduadas cada mililitro, a partir de lo recolectado en recipientes plásticos.



FIGURA 49 DISPOSICIÓN DEL SISTEMA DE RIEGO UTILIZADO PARA LA PRUEBA DE LOS FILTROS



FIGURA 50 RECIPIENTES UTILIZADOS POR EMISOR Y MEDICIÓN DE LAS PRUEBAS DE CAMPO

Los datos de los caudales recolectados en los goteros indicados fueron analizados estadísticamente y comparados con un análisis de varianzas para determinar similitudes y comparar el filtrado de cada tipo de elemento con agua y con el producto, además se determinó el coeficiente de uniformidad en el sistema de riego por goteo con dos tipos distintos de filtros (mallas y anillos).

Se obtuvieron los caudales de los goteros medidos cuando se aplicó solo riego y cuando se aplicó riego con la dosis del producto. En el Cuadro 16, se muestra el resumen de las mediciones realizadas.



FIGURA 51 DIFERENCIA EN LA APARIENCIA DEL LÍQUIDO RECOLECTADO SIN LA DOSIS DEL BIOESTIMULANTE A BASE DE ALGAS (TRANSPARENTE) Y CON LA DOSIS DEL BIOESTIMULANTE A BASE DE ALGAS (BLANCUZCO).

CUADRO 16 PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y UNIFORMIDAD DE LOS CAUDALES OBTENIDOS PARA CADA TRATAMIENTO DEL SISTEMA POR GOTEO EVALUADO EN LAS PRUEBAS DE CAMPO

Tratamiento	Caudal obtenido* (L/h)	Uniformidad (%)
[A] Sin filtro solamente con agua Sin dosis de microalgas	2,02 ± 0,30 ^a	88,06
[B] Sin filtro Con dosis de microalgas	2,02 ± 0,39 ^a	85,32
[C] Filtro de Anillos solamente con agua Sin dosis de microalgas	1,73 ± 0,34 ^c	80,07
[D] Filtro de Anillos Con dosis de microalgas	1,98 ± 0,53 ^{ba}	75,70
[E] Filtro de Malla solamente con agua Sin dosis de microalgas	1,74 ± 0,62 ^{cb}	65,53
[F] Filtro de Malla Con dosis de microalgas	1,71 ± 0,44 ^c	69,75

*Las letras iguales no representan diferencias significativas según Tukey $p > 0,05$

El caudal del emisor disminuye significativamente al colocar el sistema de filtrado debido a que los accesorios en las tuberías aumentan las pérdidas de carga en sistemas presurizados (Villalobos Araya, 2016). Únicamente cuando se usó filtro de anillos con la dosis de microalgas [D], el caudal de los emisores en promedio fue similar estadísticamente cuando el sistema no tuvo filtrado.

Debido a la alta variación presentada en el sistema cuando se usa filtro de malla con y sin la dosis del bioestimulante, se recomienda la filtración de anillos cuando se use el fertirrigado con microalgas. En la Figura 52, se muestran los datos estadísticos para cada tratamiento.

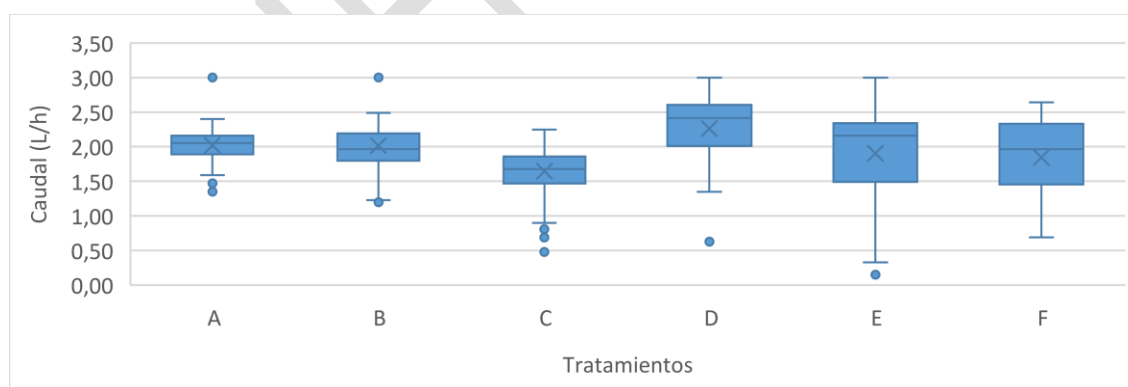


FIGURA 52 CAUDALES MEDIDOS EN LOS GOTEROS PARA CADA TRATAMIENTO EN EL CAMPO.

Durante las mediciones, se determinó de forma visual que la dosis de microalgas tardó en 5 minutos en recorrer el sistema de fertirrigado hasta los emisores, por lo que es recomendable que, una vez aplicada la cantidad indicada por el regente, se mantenga el flujo de agua en las

tuberías, por lo que el tiempo de riego debe incluir el tiempo de transporte de la dosis, la aplicación y la posterior eliminación de residuos de microalga que puedan contribuir a la obstrucción del emisor. Ramachandrupa y Kasa (2022), mencionan que luego de los tratamientos de fertirriego, se debe intentar tratar y eliminar los materiales de obstrucción, una vez que se depositan en las zonas de flujo de los emisores, por medio del lavado de los laterales de riego.

Por otra parte, con respecto a los filtros de anillos utilizados, presentan una longitud de deslizamiento mayor entre los elementos, lo que aumenta la pared mojada por donde fluye la dosis de microalgas aplicada. Abdelraouf et al. (2021), mencionan que la condición límite requiere el cálculo de las fuerzas de fricción utilizando la longitud de deslizamiento del fluido en los filtros, lo que depende de las interacciones del líquido con la superficie sólida y su condición adhesiva (contorno de pared mojada), por lo que se recomienda estudiar la adhesividad de la mezcla de la dosis de microalgas con el agua y justificar la menor resistencia con respecto al filtro de mallas utilizado.

En el Cuadro 17 se resume el efecto de los bioformulados en el peso promedio y el diámetro de la lechugas evaluadas.

CUADRO 17 RESULTADO PROMEDIO DE PESO Y DIÁMETRO DE LECHUGAS DONDE SE APLICÓ LOS BIOFORMULADOS DE MICROALGAS

Tratamiento	Promedio de Peso (g)	Promedio de Diametro (cm)
A y A 1ml/L	240,85	33,4
A y A 10 mL/L	123,10	24,8
A y A 5 mL/L	246,95	34,5
Agua	240,76	32,0
Alga 600	181,30	30,6
TEC 1 1mL/L	107,60	23,7
TEC 1 10 mL/L	175,25	31,9
TEC 1 5 mL/L	232,40	31,3
TEC 2 1 mL/L	229,25	30,95
TEC 2 10 mL/L	78,70	22,7
TEC 2 5 mL/L	165,30	31,1

TEC 3 1 mL/L	197,40	28,4
TEC 3 10 mL/L	180,25	31,9
TEC 3 - 5 %	215,70	31,0

En la Figura 53 se resume el efecto de la microalgas en el peso promedio del bulbo de la cebolla que ha sido trata con microalgas en comparación con el producto comercial a base de macroalgas y el control de agua.

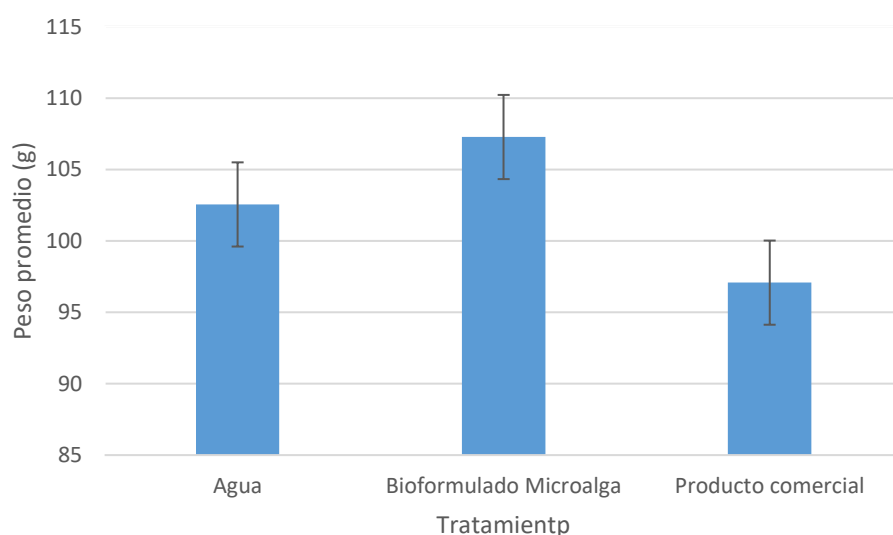


FIGURA 53 PESO PROMEDIO DE CEBOLLA TRATADA CON MICROALGAS COMPARADA CON PRODUCTOS COMERCIALES

Se realizó el análisis químico de los bioformulados donde se indica la composición de los macroelementos en porcentaje masa/masa de elementos como el nitrógeno (N), Fósforo(P), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), potasio (K) y azufre (S) además de algunos microelementos (Fe,Cu, Zn, Mn y B) , Cuadro 18. En el Cuadro 19 se muestra el análisis de la presencia de metales pesados onde se puede observar que estos están por debajo de los límites de detección del método empleado.

CUADRO 18 ANÁLISIS QUÍMICO COMPLETO DE LOS BIOFORMULADOS DESARROLLADOS

Muestra	% masa						mg/kg					pH	mS/cm CE	g/mL Dens
	N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B			
Bioformulado Spirulina	0,10	0,01	ND	ND	0,02	0,01	10	<1	1	1	2	5,3	2,0	1,00
Bioformulado Scenedesmus	0,07	0,01	ND	ND	0,01	0,01	70	1	2	2	2	4,4	0,7	1,00
AYA	0,01	ND	ND	ND	0,01	ND	3	<1	1	<1	4	2,9	0,5	1,00

CUADRO 19 ANÁLISIS QUÍMICO DE METALES PESADOS EN LOS BIOFORMULADOS DESARROLLADOS

ID USUARIO	mg/L			mg/kg							
	N-Ureico	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	As	Cd	Co	Cr	Ni	Pb	Mo	Ba
Bioformulado Spirulina	111	356	ND	<0,03	<0,03	<0,03	<0,5	ND	<0,5	<0,5	<2
Bioformulado Scenedesmus	695	160	ND	0,08	<0,03	0,03	<0,5	ND	<0,5	<0,5	<2
AYA	269	37	1	<0,03	<0,03	<0,03	<0,5	ND	<0,5	<0,5	<2

En el Cuadro 20, se presenta el análisis químico de los productos comerciales utilizados como producto de compasión.

CUADRO 20 ANÁLISIS QUÍMICO DE PRODUCTOS COMERCIALES EVALUADOS

ANÁLISIS QUÍMICO DE ABONOS ORGÁNICOS LÍQUIDOS														
ID USUARIO	% masa						mg/kg					pH	mS/cm CE	g/mL Densidad
	N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B			
Comercial A	0.22	3.67	0.06	0.01	10.83	0.70	133	2	5	4	15	7.6	152.3	1.25
Comercial B	0.21	0.46	0.01	ND	0.98	0.06	1	ND	1	1	ND	2.9	30.2	1.09
Comercial C	0.44	0.17	0.14	0.10	0.84	0.24	20	473	25	16	287	4.9	29.1	1.07

Discusión y conclusiones

A partir del proyecto “Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica” se demostró el potencial de las microalgas para la generación de bioinsumos agrícolas. Sin embargo, para lograr potenciar los bioinsumos de microalgas se requería poder desarrollar formulaciones eficientes para almacenar las microalgas a temperatura ambiente y lograr suspenderlas en medio acuoso evitando los

problemas de obstrucción de los equipos empleados para aplicarlas como boquillas y filtros de sistemas de riego.

Una estrategia para lograrlo es realizar procesos de rotura e hidrólisis como ultrasonidos y enzimas; sin embargo, esta estrategia requiere de procesos unitarios que incrementarían el costo de los productos generados, así como el diseño de reactores que controlen parámetros como temperaturas para el caso de las hidrólisis con enzimas (Navarro-López et al., 2020). Además, el precio de las enzimas tiene un valor elevado.

En la fase I de esta línea de investigación se demostró que las formulaciones que no son sometidas a proceso de rotura e hidrólisis generan una mejor repuestas en la productividad del cultivo evaluados, incrementando la cantidad y calidad de los frutos.

En la Figura 24, se observa que las formulaciones en agua requieren procesos de estabilización adecuadamente para evitar contaminación con hongos. Para el caso de las formulaciones en aceite se estas logran estabilizar a nivel microbiológico las biomásas de microalgas a temperatura ambiente (Dorobantu et al., 2004; Vassilev et al., 2020). Sin embargo, al adicionar aceite a la biomasa de microalgas se presenta un problema de separación de fases, (Figura 3, Figura 5, Figura 6. El caso de biomasa seca se tiene una porción que se aglomera dificultando su distribución de manera homogénea, lo que implica tener que aplicar procesos de mezclado mecánicos para homogenizar las muestras. Por otro lado, la biomasa húmeda presenta una separación de fases en donde la fase acuosa se presenta en la porción inferior y la fase oleosa en la porción superior. En ambos casos, el uso de aceite implica un reto mayor que es lograr que en el momento de aplicación se logre una dispersión homogénea, para ello se tiene que emplear surfactantes que permitan estabilizar la biomasa de microalga en la fase acuosa y en el momento de disolverla en agua permita que se pueda revertir la fase y generar micelas de tamaños de partículas entre micras y nanómetros.

Al implementar procesos de cosecha continua con la centrífuga Wesfalia se logró mejorar los procesos de cosecha de las microalgas (*Accompanying the Game-Changers in the Growing Algae Industry*, n.d.), evitando el uso de aditivos para floculación los cuales limitan la aplicación de las biomásas cosechadas, el aprovechamiento del medio rico en nutrientes para retornarlo nuevamente al estanque y la implementación de proceso de producción continuos.

El empleo de emulsiones oleosas se tomó como estrategia para el desarrollo de una tecnología de generación de bioinsumos de microalgas. Esta tecnología presenta múltiples ventajas, la primera es que se logra reducir los procesos de producción de los bioformulados

evitando etapas costosas como es el uso de enzimas y el uso de equipos de alto costo para la rotura en los que se debe de aplicar mucha energía.

Se realizó un barrido con diferentes surfactantes hasta encontrar una mezcla ideal que demuestre estabilidad y dispersabilidad en agua, Figura 10. Se evaluaron tantos surfactantes puros donde se conocían el parámetro HLB (por sus siglas en inglés: Hydrophile Lipophile Balance) (gorodenkoff, n.d.) y mezcla de surfactantes de origen comercial en donde este valor no se reportaba.

Las mejores formulaciones fueron caracterizadas y comparadas con producto comerciales los cuales son extractos de macroalgas.

A nivel de microscopia electrónica se logra apreciar que los bioformulados de microalgas logran mantener la estructura celular sin daños mecánicos, Figura 16, mientras que los formulados comerciales evaluados presentan estructuras amorfas. Además, al evaluar la viabilidad por diferentes técnicas como espectrofotometría UV-Visible y Microscopia de fluorescencia se evidencia que las células preservan la viabilidad, Figura 16 y Figura 18.

Finalmente, se evaluó los bioformulados en cultivos como el chile en dos variedades Nathalie y Dulcítico. El efecto de la microalga varía en función de la fuente de la microalga (consorcio de AyA o las del TEC), la dosis y la variedad de chile. En algunos casos el efecto fue muy positivo y en otros la respuesta no fue favorable para la cantidad total de peso de los frutos, Figura 39 y Cuadro 12. Además, se logró demostrar que al utilizar el bioformulado, emulsión con biomasa, se logra reducir la cantidad de frutos de rechazo, Figura 46.

Al evaluar la fitotoxicidad de los bioformulados se determina que las dosis utilizadas, 0,1 al 1% están por debajo de la dosis inhibitoria media para la germinación y letalidad en lechuga (CI_{50} 144 horas 12,8%).

Al evaluar las emulsiones en los sistemas de riego no se presentaron problemas de precipitación u obstrucción de los filtros o las mayas empleadas.

Al aplicar el bioformulado en el cultivo de cebolla se logra tener un efecto positivo sobre el peso promedio de los bulbos obtenidos, generando mejores resultados que el producto comercial utilizado para comparar.

A partir de los resultados se plantea que el uso de bioformulados son una tecnología que permite poder tener mejoras en la calidad y cantidad de frutos, pero que es necesario determinar la dosis adecuada, así como el mejor momento de aplicación según la etapa fenológica de cada cultivo. Analizando la composición química de macro y microelementos,

Cuadro 18. Al comparar con los productos comerciales, Cuadro 20, se muestra que estos presentan una cantidad mayor de algunos elementos químicos, en algunos casos hasta 10 veces más. Sin embargo, esto no garantiza que la respuesta en los rendimientos en los cultivos evaluados fuera superior, en la mayoría de los ensayos realizados los bioformulados desarrollados presentaron mejores respuestas.

Se concluye que el desarrollo de bioformulados de microalgas usando emulsiones oleosas son una tecnología eficiente en la estabilización de las biomásas de microalgas. Se logró desarrollar una formulación con capacidad de dispersar de forma homogénea las microalgas sin problemas para ser implementada en sistema de riego. Su implementación en los cultivos evaluados permitió mostrar incrementos en parámetros productivos.

Recomendaciones

Se recomienda evaluar el uso de microalgas en ensayos donde se determine frecuencias de aplicación y momentos críticos en el desarrollo fenológico para potenciar la respuesta de las microalgas en los cultivos, además, evaluar la compatibilidad de las microalgas con otros insumos usados en los distintos planes de manejos de los cultivos como herbicidas, fungicidas entre otros

Agradecimientos

Se agradece a la Escuela de Ingeniería Agrícola del ITCR por la oportunidad de evaluar los biofertilizantes en los invernaderos.

Referencias

Accompanying the game-changers in the growing algae industry. (n.d.). Retrieved June 27, 2023, from <https://www.gea.com/en/stories/game-changers-algae-industry.jsp>

Acuña reyes, D. (2015). *Agricultura sostenible: antecedentes e iniciativas.* www.odepa.gob.cl

Angulo, Á. (n.d.). *Caracterización del riego en el cultivo caña de azúcar, de Costa Rica.* Retrieved July 18, 2023, from <https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/JyippAhLnLAtMcNOczoJxHBFcRAiqckU>

- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., & Ferrante, A. (2015). Biostimulants and crop responses: a review. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/01448765.2014.964649*, 31(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/01448765.2014.964649>
- Cómo determinar el coeficiente de uniformidad de caudal en riego localizado - PortalFruticola.com.* (n.d.-a). Retrieved July 19, 2023, from <https://www.portalfruticola.com/noticias/2021/10/05/como-determinar-el-coeficiente-de-uniformidad-de-caudal-en-riego-localizado/>
- Cómo determinar el coeficiente de uniformidad de caudal en riego localizado - PortalFruticola.com.* (n.d.-b). Retrieved July 19, 2023, from <https://www.portalfruticola.com/noticias/2021/10/05/como-determinar-el-coeficiente-de-uniformidad-de-caudal-en-riego-localizado/>
- Costa, B. R., Rocha, S. F., Rodrigues, M. C. K., Pohndorf, R. S., Larrosa, A. P. Q., & Pinto, L. A. A. (2015). Physicochemical characteristics of the *Spirulina* sp. dried in heat pump and conventional tray dryers. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(12), 2614–2620. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12930>
- Costa Rica busca bajar las emisiones de carbono con menos fertilizantes | La Nación.* (n.d.). Retrieved July 18, 2023, from <https://www.nacion.com/el-pais/costa-rica-busca-bajar-las-emisiones-de-carbono-con-menos-fertilizantes/ASCYG6RA7NBR5NU3C6MDHBVRWA/story/>
- Dorobantu, L. S., Yeung, A. K. C., Foght, J. M., & Gray, M. R. (2004). Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6333–6336. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6333-6336.2004>
- Fernández, L., Scher, H., Jeoh, T., & VanderGheynst, J. S. (2015). Room-temperature storage of microalgae in water-in-oil emulsions: influence of solid particle type and concentration in the oil phase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(12), 2451–2460. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1482-8>
- García-González, J., & Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2>
- gorodenkoff. (n.d.). *Smart science to improve lives™ Croda Crop Protection.* www.incotec.com

- Homepage | Zschimmer & Schwarz. (n.d.). Retrieved July 19, 2023, from <https://www.zschimmer-schwarz.com/en/divisions/agrochemicals-plant-nutrition/areas-of-application/biostimulants/>
- Jiménez, J., & Rodríguez, J. (n.d.). *Fertirrigación*. Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA). <http://www.infoagro.go.cr/InfoRegiones/Publicaciones/fertirrigacion.pdf>
- Marcano, L., Carrujo, I., Morales, C., Montiel, X., & Moreno, P. (2010). Evaluación de los cambios ultraestructurales de adaptación de la microalga *Scenedesmus* sp al estrés inducido por cadmio y vanadio. *Acta Microscópica*, 19(3), 214–220.
- Martinez, A., Trujillo, M., & Ramirez, E. (2020). Crecimiento y metabolismo de *Fischerella* TB22 en medio de. *Boletín Micológico*, 35(1), 26–34. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2020.35.1.2425>
- Navarro-López, E., Ruíz-Nieto, A., Ferreira, A., Gabriel Acién, F., & Gouveia, L. (2020). Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030664>
- Núñez, A., & Hurtado, E. (2015). *MANUAL PARA EL CÁLCULO DE EFICIENCIA PARA SISTEMAS DE RIEGO*.
- Parmar, P., Kumar, R., Neha, Y., & Srivatsan, V. (2023a). Microalgae as next generation plant growth additives: Functions, applications, challenges and circular bioeconomy based solutions. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1073546. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1073546/BIBTEX>
- Parmar, P., Kumar, R., Neha, Y., & Srivatsan, V. (2023b). Microalgae as next generation plant growth additives: Functions, applications, challenges and circular bioeconomy based solutions. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1073546. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1073546/BIBTEX>
- Roldán Barreda, S. (2015). *Puesta a punto de un método para la determinación de la viabilidad de microalgas en sistemas de tratamiento de agua residual*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Salazar, L., Saravia, R., & Rafael, R. (2010). *Sustentabilidad y Autogestión de Sistemas de Riego*. https://wocatpedia.net/images/2/26/GIZ%2C_PROAGRO%2C_Salazar%2C_L.%2C_Saravia%2C_R.%2C_Rafael%2C_R._%282010%29_Sustentabilidad_y_Autogesti%C3%B3n_de_Sistemas_de_Riego.pdf

- Shi, K., Lu, T., Zheng, W., Zhang, X., & Zhangzhong, L. (2022). A Review of the Category, Mechanism, and Controlling Methods of Chemical Clogging in Drip Irrigation System. *Agriculture*, 12(2), 202. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020202>
- Sneh, M. (2006). *EL RIEGO POR GOTEIO* (Primera edición). Centro de Cooperación Internacional para el desarrollo agrícola (CINADCO). <https://repositorio.ana.gob.pe/handle/20.500.12543/2937?show=full>
- Terry, P. A., & Stone, W. (2002). Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. *Chemosphere*, 47(3), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00303-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00303-4)
- Vandergheynst, J. S., Guo, H. Y., Cheng, Y. S., & Scher, H. (2013a). Microorganism viability influences internal phase droplet size changes during storage in water-in-oil emulsions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(10), 1427–1434. <https://doi.org/10.1007/S00449-013-0886-6/FIGURES/7>
- Vandergheynst, J. S., Guo, H. Y., Cheng, Y. S., & Scher, H. (2013b). Microorganism viability influences internal phase droplet size changes during storage in water-in-oil emulsions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(10), 1427–1434. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0886-6>
- Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Garcia del Moral, L. F., Kowalska, J., Tylkowski, B., & Malusá, E. (2020). Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>
- Villalobos-Araya, & Valverde-Conejo. (2016). *Principios de Riego y Drenaje en Suelos Tropicales*. 236.
- Villalta-Romero, F., Murillo-Vega, F., Martínez-Gutiérrez, B., Valverde-Cerdas, J., Sánchez-Kopper, A., & Guerrero-Barrantes, M. (2019). Biotecnología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional. *Revista Tecnología En Marcha*, 32, 85–93. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4634>
- Wendt, L. M., Kinchin, C., Wahlen, B. D., Davis, R., Dempster, T. A., & Gerken, H. (2019). Assessing the stability and techno-economic implications for wet storage of harvested microalgae to manage seasonal variability. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1420-0>

Zaman, M., Shahid, S. A., & Heng, L. (2018). Irrigation Water Quality. In *Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques* (pp. 113–131). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_5

Apéndices (opcional)

Datos del ensayo en Lechuga

Tratamiento	Peso (g)	Diametro (cm)
Agua	332,5	36
Agua	120,5	28
Agua	257,5	32
Agua	166	28
Agua	374	39
Agua	133,5	26
Agua	292	37
Agua	161,5	30
Agua	179	30
Agua	391,1	34
Alga 600	213	32
Alga 600	225,5	33
Alga 600	150,5	31
Alga 600	280	38
Alga 600	239	35
Alga 600	114	27
Alga 600	327	34
Alga 600	49	23
Alga 600	100	26
Alga 600	115	27

AyA 1 %	392,5	41
AyA 1 %	341	37
AyA 1 %	338	40
AyA 1 %	227	34
AyA 1 %	136	28
AyA 1 %	278	36
AyA 1 %	180	29
AyA 1 %	139	25
AyA 1 %	152,5	32
AyA 1 %	224,5	32
TEC 1 - 1 %	147	32
TEC 1 - 1 %	39	20
TEC 1 - 1 %	115	30
TEC 1 - 1 %	147	31
TEC 1 - 1 %	165,5	30
TEC 1 - 1 %	192,5	32
TEC 1 - 1 %	228	32
TEC 1 - 1 %	33	16
TEC 1 - 1 %	5,5	7
TEC 1 - 1 %	3,5	7
TEC 2- 1 %	153,5	30
TEC 2- 1 %	367	37
TEC 2- 1 %	239	31
TEC 2- 1 %	105,5	28
TEC 2- 1 %	163,5	30
TEC 2- 1 %	61,5	20
TEC 2- 1 %	308,5	35
TEC 2- 1 %	443,5	37
TEC 2- 1 %	30,5	21,5
TEC 2- 1 %	420	40
TEC 3 - 1 %	267	36
TEC 3 - 1 %	105	28
TEC 3 - 1 %	281,5	34
TEC 3 - 1 %	339	35
TEC 3 - 1 %	487	45
TEC 3 - 1 %	163,5	32
TEC 3 - 1 %	265	35

TEC 3 - 1 %	60	24
TEC 3 - 1 %	5,5	9
TEC 3 - 1 %	0,5	6
Agua	332,5	36
Agua	120,5	28
Agua	257,5	32
Agua	166	28
Agua	374	39
Agua	133,5	26
Agua	292	37
Agua	161,5	30
Agua	179	30
Agua	391,1	34
Alga 600	213	32
Alga 600	225,5	33
Alga 600	150,5	31
Alga 600	280	38
Alga 600	239	35
Alga 600	114	27
Alga 600	327	34
Alga 600	49	23
Alga 600	100	26
Alga 600	115	27
A y A 5 %	331	39
A y A 5 %	288,5	34
A y A 5 %	204,5	34
A y A 5 %	180	36
A y A 5 %	298,5	35
A y A 5 %	131,5	29
A y A 5 %	259	34
A y A 5 %	296,5	36
A y A 5 %	367	40
A y A 5 %	113	28
TEC 1 - 5 %	347,5	36
TEC 1 - 5 %	374,5	38
TEC 1 - 5 %	297	32
TEC 1 - 5 %	192,5	32

TEC 1 - 5 %	136	26
TEC 1 - 5 %	327,5	35
TEC 1 - 5 %	112,5	27
TEC 1 - 5 %	310	34
TEC 1 - 5 %	188,5	33
TEC 1 - 5 %	38	20
TEC 2- 5 %	252,5	33
TEC 2- 5 %	165	34
TEC 2- 5 %	131	34
TEC 2- 5 %	104	29
TEC 2- 5 %	274	36
TEC 2- 5 %	135	32
TEC 2- 5 %	58	22
TEC 2- 5 %	95,5	28
TEC 2- 5 %	86,5	25
TEC 2- 5 %	351,5	38
TEC 3 - 5 %	178	34,5
TEC 3 - 5 %	151,5	27
TEC 3 - 5 %	232,5	34
TEC 3 - 5 %	321	36,5
TEC 3 - 5 %	148	29
TEC 3 - 5 %	399,5	40
TEC 3 - 5 %	349,5	35
TEC 3 - 5 %	284,5	33
TEC 3 - 5 %	27,5	17
TEC 3 - 5 %	65	24
Agua	332,5	36
Agua	120,5	28
Agua	257,5	32
Agua	166	28
Agua	374	39
Agua	133,5	26
Agua	292	37
Agua	161,5	30
Agua	179	30
Agua	391,1	34
Alga 600	213	32

Alga 600	225,5	33
Alga 600	150,5	31
Alga 600	280	38
Alga 600	239	35
Alga 600	114	27
Alga 600	327	34
Alga 600	49	23
Alga 600	100	26
Alga 600	115	27
A y A 10%	43	20
A y A 10%	90	27
A y A 10%	93,5	23
A y A 10%	13	14
A y A 10%	241	34
A y A 10%	37	20
A y A 10%	193	30
A y A 10%	387,5	38
A y A 10%	116	28
A y A 10%	17	14
TEC 1 - 10 %	450	41
TEC 1 - 10 %	192,5	38
TEC 1 - 10 %	251,5	35
TEC 1 - 10 %	103,5	30
TEC 1 - 10 %	88,5	28
TEC 1 - 10 %	229,5	33
TEC 1 - 10 %	193,5	36
TEC 1 - 10 %	152,5	30
TEC 1 - 10 %	60,5	25
TEC 1 - 10 %	30,5	23
TEC 2- 10 %	116,5	30
TEC 2- 10 %	180	33
TEC 2- 10 %	112	32
TEC 2- 10 %	126	30
TEC 2- 10 %	66,5	26
TEC 2- 10 %	97,5	29
TEC 2- 10 %	0	6
TEC 2- 10 %	0	7

TEC 2- 10 %	4	8
TEC 2- 10 %	84,5	26
TEC 3 - 10 %	93,5	29
TEC 3 - 10 %	50,5	40
TEC 3 - 10 %	400	34
TEC 3 - 10 %	272	25
TEC 3 - 10 %	50,5	35
TEC 3 - 10 %	264,5	35
TEC 3 - 10 %	280	35
TEC 3 - 10 %	265,5	36
TEC 3 - 10 %	80	26
TEC 3 - 10 %	46	24

CONFIDENCIAL