



UNIVERSIDAD DEL MAR

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ENCAPSULACIÓN DE *Fischerella TB22* CON POLÍMEROS
BIODEGRADABLES PARA MEJORAR
SU APLICACIÓN COMO BIOFERTILIZANTE**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA

M. en C. Andrés Francisco Martínez Rosales

DIRECTOR

Dr. Eustacio Ramírez Fuentes

CO-DIRECTOR

Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos

Puerto Ángel, Oaxaca, México. Septiembre, 2021

Resumen

Actualmente, los cultivos hortofrutícolas se enfrentan a muchos problemas, entre ellos está el continuo deterioro del suelo que impacta en la estabilidad y sustentabilidad de la producción de alimentos, generando hambre y pobreza. El objetivo del Capítulo 1 de este trabajo fue evaluar el crecimiento en biomasa por peso seco, densidad óptica, pH y amonio de *Fischerella TB22*. en medio de cultivo BG11⁰ durante 12 días. El noveno día de crecimiento de *Fischerella TB22* es el mejor para la aplicación como biofertilizante ya que tiene su máxima producción de amonio. Para el capítulo 2 el objetivo fue dilucidar las interacciones a nivel estructural entre los polímeros alginato de sodio, acrilato de potasio y quitosano, utilizando el software Spartan 14.0 y Discovery Studio 4.5. Las propuestas de los polímeros ALG, ACR y ALG+ACR (1:4), pueden ser considerados un buen medio para la supervivencia de cianobacterias y otros microorganismos debido a la estabilidad de la estructura y la interacción en los puentes de hidrógeno de los polímeros con los grupos amino de *Fischerella sp.* El capítulo 3 tuvo como objetivo evaluar el efecto de los fertilizantes biológicos microencapsulados y su combinación con un fertilizante químico durante la producción de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Se evaluó utilizando un diseño de bloques al azar con 5 tratamientos y 4 repeticiones. Los tratamientos con *Fischerella TB22* encapsulados en matriz de alginato de sodio y con película de quitosano mostraron los mejores resultados en la producción de NH_4^+ y podrían utilizarse en otros cultivos. Estos resultados del capítulo 3 demuestran el potencial para reducir el uso de fertilizantes químicos al utilizar biofertilizantes microencapsulados con un rendimiento y una calidad mejorados del fruto y al mismo tiempo reducir el impacto del exceso uso en el suelo.

Tabla de contenido

Resumen	2
Índice de Figuras	5
Agradecimientos.....	9
Dedicatoria	10
1 Introducción	11
2 Marco teórico	12
2.1 Generalidades del suelo	12
2.2 Fertilidad del suelo	14
2.3 Nitrógeno	15
2.4 Materia Orgánica	16
2.5 Potencial de Hidrógeno	16
2.6 Conductividad Eléctrica	18
2.7 Generalidades de los biofertilizantes.....	18
2.8 Generalidades de los bioencapsulados	20
2.8.1 Tipos de encapsulamiento	20
2.8.2 Alginato de Sodio.....	22
2.8.3 Quitosano	23
2.9 Cianobacterias	24
2.9.1 Cianobacterias fijadoras de nitrógeno	24
2.9.2 Fijación de nitrógeno.....	24
3 Antecedentes	26
4 Justificación.....	29
5 Hipótesis general	30
6 Objetivo general	30
7 Capítulo 1. Crecimiento y metabolismo de Fischerella TB22 en medio de cultivo BG110.....	31
7.1 Introducción.....	31
7.2 Hipótesis	34
7.3 Objetivo	34
7.4 Materiales y métodos.....	35
7.4.1 Condiciones experimentales del cultivo.....	35
7.4.2 Evaluación metabólica de Fischerella TB22	36
7.5 Análisis estadístico	37
7.6 Resultados y Discusión.....	37

7.7	Conclusiones.....	41
8	Capítulo 2. Modelo molecular de biocompositos (alginato, acrilato y quitosano) para su uso en la encapsulación de cianobacterias.....	42
8.1	Introducción.....	42
8.2	Hipótesis	44
8.3	Objetivo	44
8.4	Materiales y métodos.....	45
	8.4.1 Obtención de estructuras para modelado molecular	45
8.5	Resultados y discusión	47
8.6	Conclusiones.....	50
9	Capítulo 3. Microencapsulación de Fischerella TB22 con polímeros biodegradables para mejorar su aplicación como biofertilizante.....	51
9.1	Introducción.....	51
9.2	Hipótesis	55
9.3	Objetivo	55
9.4	Materiales y métodos.....	56
	9.4.1 Cultivo de Fischerella TB22	56
	9.4.2 Síntesis de microcápsulas de Fischerella TB22.	57
	9.4.3 Caracterización de microcápsulas	58
	9.4.4 Crecimiento de Fischerella TB22 encapsulada	59
	9.4.5 Cuantificación de amonio.....	59
9.5	Aplicación de microcápsulas durante el crecimiento de la plantas de espinaca y tomate.....	60
	9.5.1 Experimento con plantas de espinaca (Spinacia oleracea).....	60
	9.5.2 Experimento con plantas de tomate (Solanum lycopersicum var. lycopersicum)	60
9.6	Análisis estadístico	61
9.7	Resultados y discusión	62
	9.7.1 Microcápsulas.....	62
	9.7.2 Cultivo de las cianobacterias.....	67
	9.7.3 Producción de amonio	67
	9.7.4 Efecto de la aplicación de los microencapsulados en Spinacia oleracea. .	69
	9.7.5 Efecto de la aplicación de los microencapsulados en Solanum lycopersicum var. Lycopersicum.	71
9.8	Conclusiones.....	76
10	Conclusiones generales	77
11	Recomendaciones generales.....	78
12	Bibliografía.....	79
13	Anexo	105

Índice de Figuras

Figura 1. Raíz de la planta en contacto con la solución del suelo, el humus y la arcilla. (Modificado de Havlin et al., 2016).....	14
Figura 2. Valor de pH y su relación con la disponibilidad de los nutrientes en el suelo. (Castellanos, 2014)	17
Figura 3. Valor de pH para el crecimiento de diferentes plantas cultivadas. (Modificado Venegas, 1993) 17	
Figura 4. Clasificación de encapsulados. (Lupo, 2012)	20
Figura 5. Curva típica de crecimiento microbiano. 1.- Fase lag, 2.- Fase de aceleramiento, 3.- Fase exponencial, 4.- Fase de desaceleración, 5.- Fase estacionaria, 6.- Fase de muerte (Modificado de Lazcano, 2016).....	31
Figura 6. Modelo de un heterocisto con uniones a una célula vegetativa a cada lado. (Traducido de Stal, 2017)	33
Figura 7. Identificación de células especializadas de Fischerella TB22 con fotografía en microscopio a 40X.....	35
Figura 8. a) Biomasa en peso seco. b) Concentración de amonio. c) Clorofila “a”. d) Medición de pH de Fischerella TB22. T1= (○) Ajuste de pH, T2= (□) Ajuste de volumen de medio BG110, T3= (●) Ajuste de pH y volumen de medio BG110, T4= (■) control sin ajustes.	39
Figura 9. Densidad óptica de Fischerella TB22. T1= (○) Ajuste de pH, T2= (□) Ajuste de volumen de medio BG110, T3= (●) Ajuste de pH y volumen de medio BG110, T4= (■) control sin ajustes.	40
Figura 10. Relación entre la densidad óptica y el peso seco de Fischerella TB22.....	40
Figura 11. Estructura química del Alginato de sodio. (Mares, 2017)	45
Figura 12. Estructura química del Acrilato de potasio (Valderrama, 2016).	45
Figura 13. Estructura química del Quitosano (Mármol et al., 2011).	46
Figura 14. Estructura molecular de un fragmento de estructura de DNA de la proteína de Fischerella sp. (Kim et al., 2013)	46
Figura 15. Estructuras estables obtenidas del modelado estructural de ALG y ACR: A (1:1), B (1:2) y C (1:4).....	49
Figura 16. Zona de interacción entre polímero de ALG (Izq.) y el fragmento de proteína de Fischerella sp (Der.) por medio de puentes de hidrógeno entre el polímero y los grupos amino de la proteína de las cianobacterias.....	49
Figura 17. Proceso para la microencapsulación de Fischerella TB22 (Elaboración propia).	58

Figura 18. (A) Fischerella TB22 antes de la inoculación, (B) Microcápsulas de alginato inoculadas con Fischerella TB22 el día 0, (C) día 10, (D) día 20, (E) día 30 y (F) día 40.....	63
Figura 19. Microcápsulas de alginato con película de quitosano. a = película de quitosano, b = microcápsula de alginato.....	63
Figura 20. Peso (g) de microcápsulas a temperatura ambiente durante 2100 min para: T1 = ○ FIS encapsulado en ALG, T2 = ● FIS en ALG con película CHI, T3 = □ FIS en una matriz con ALG y ACR con película CHI y T4 = ■ FIS en una matriz con los 3 polímeros.....	65
Figura 21. Fuerza de compresión (N) de T1 = ○ FIS encapsulado en ALG, T2 = ● FIS en ALG con película CHI, T3 = □ FIS en una matriz con ALG y ACR con película CHI y T4 = ■ FIS en una matriz con los 3 polímeros.....	65
Figura 22. Producción de biomasa de Fischerella TB22 en forma libre y encapsulada utilizando diferentes polímeros combinados durante 40 días a 25 °C. T1 = ▲ FIS en forma libre, T2 = ○ FIS encapsulado en ALG, T3 = ● FIS en ALG con película CHI, T4 = □ FIS en un u una matriz con ALG y ACR con película CHI y T5 = ■ FIS en una matriz con los 3 polímeros.....	68
Figura 23. Producción de amonio de Fischerella TB22 en forma libre y encapsulada usando formulaciones diferentes de polímeros durante un período de 40 días a 25 ° C. T1 = ▲ FIS en forma libre, T2 = ○ FIS encapsulado en ALG, T3 = ● FIS en ALG con película CHI, T4 = □ FIS en un u una matriz con ALG y ACR con película CHI y T5 = ■ FIS en una matriz con los 3 polímeros.....	68
Figura 24. Tamaño de planta de los tratamientos después de un período de crecimiento de 7 semanas usando como fertilizante Fischerella TB22 en forma libre, encapsulada y urea. T1 = FIS en forma libre, T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4 Urea y un control con solo agua.	69
Figura 25. Tamaño de la raíz (a), tamaño del tallo (b) y peso de hojas (c)de espinaca después de un período de crecimiento de 7 semanas utilizando como fertilizante Fischerella TB22 en forma libre, encapsulada y urea. T1 = FIS en forma libre, T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4 Urea y un control sin tratamiento. B=Estadísticamente iguales (P<0.05).	70
Figura 26. Tamaño de planta. ■ Criollo e ■ Híbrido (Saladet). T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3. A=Estadísticamente iguales. T5 (fertilización combinada) fue 10 % mejor que el control (fertilización química).....	71
Figura 27. Tamaño de fruto de tomate híbrido. T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3.	73

Figura 28 a). Peso de fruto de tomate híbrido. T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3. T5 (fertilización combinada) fue 50 % mejor que el control (fertilización química). b). Volumen de frutos de tomate híbrido. T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3. T5 (fertilización combinada) fue 55 % mejor que el control (fertilización química). En los sólidos solubles (°Brix) el mejor tratamiento (T5) reportó 50% más que el control. c). Algunos trabajos, la mayoría en condiciones de invernadero reportan diferentes valores de °Brix como se muestra en la tabla 8, en este trabajo se obtuvo de 3.4 a 5.4 en condiciones de malla sombra. d) Amonio residual en suelo. T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3..... 74

Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades Físicas, Químicas y Biológicas del Suelo. (Modificado de Havlin et al., 2016).	15
Tabla 2. Algunos microorganismos utilizados en la agricultura.	19
Tabla 3. Principales componentes utilizados como material pared en la encapsulación.	22
Tabla 4. ANOVA de diferencia entre tratamientos.	37
Tabla 5. Comparación de resultados de trabajos donde utilizaron cianobacterias.	41
Tabla 6. Resultados obtenidos entre los orbitales frontera HOMO-LUMO de los monómeros y polímeros en Spartan. *Moléculas estables.	47
Tabla 7. Componentes del medio de cultivo BG110 (Rippka et al., 1979).	56
Tabla 8. Tabla comparativa de ° Brix en tomate híbrido.	75

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad del Mar (UMAR).

En especial a mi asesor de tesis el Dr. Eustacio Ramírez Fuentes, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en el proyecto.

A la Dra. Ma. Nieves Trujillo Tapia, ella ha inculcado en mí un sentido de serenidad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa.

A la Dra. Carmen L. Gomes, por sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación que han sido fundamentales para mi formación.

A la Dra. Ofelia Adriana Hernández Rodríguez por sus consejos, su amistad y su apoyo incondicional.

A todo el comité de tesis que me enseñaron tanto de la profesionalización como de la vida, impulsándome a siempre seguir adelante.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud al personal del Laboratorio de Ambiental de la UMAR, a su manera todos han sido capaces de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con todos por el apoyo recibido. A Victor, Bere, Karina, Esme, Perla, Nati, Cinthia, Lenni, Coral, Karla.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia, compañeros y amigos, fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida y más aún en mis duros años de estudio.

Al Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos (LIIA) del Instituto Tecnológico de Tepic por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo y al Departamento de Ingeniería Biológica y Agrícola (BAEN) de la Texas A&M University (TAMU) por todo su apoyo para la realización de este capítulo del trabajo.

A todos ellos, muchas gracias.

Dedicatoria

A ti mi esposa, que has estado a mi lado desde hace tiempo, me acompañas y siempre me levantas de mis continuos tropiezos. El tiempo sigue pasando, y ahí estas, cerca de mi ofreciendo lo mejor que tienes, gracias por tu apoyo, por tus esfuerzos para mantener siempre vivo este amor.

A mis padres, que han sido la base de mi formación, cada uno de ustedes ha aportado grandes cosas a mi vida, y me han ayudado a enfrentar la gran tarea de encarar a la sociedad. Les agradezco por todo.

A mis hermanos, aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla, hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos. Gracias por no solo ayudarme en gran manera a concluir el desarrollo de mis estudios, sino por todos los bonitos momentos que pasamos en el proceso.

A Andrea y Anet, cada vez que las veo, me doy cuenta que estoy frente a mi retrato, y al mismo tiempo siento más ganas de trabajar fuertemente y seguir con el objetivo de alcanzar mis metas. Regina y Andrés, posiblemente en este momento no sepan leer estas palabras (Regina sí), pero para cuando sean capaces, quiero que se den cuenta de lo que significan para mí, son muy importantes en mi vida. Todos mis hijos, ustedes son la razón de que me levante cada día esforzándome por el presente y el mañana, mi principal motivación, sin ustedes mi vida sería un desastre.

Siempre me he sentido maravillado por la linda familia que tengo, se han preocupado de mí desde el momento en que llegué a este mundo, me han formado para saber cómo luchar y salir victorioso ante las diversas adversidades de la vida. Muchos años después, sus enseñanzas no cesan, y aquí estoy, con un nuevo logro exitosamente conseguido, mi doctorado, nuestro doctorado.

Quiero agradecerles por todo, no me alcanzan las palabras para expresar el orgullo y lo bien que me siento por tener una familia tan asombrosa.

1 Introducción

Uno de los importantes desafíos del siglo XXI es conseguir el desarrollo sostenible en las grandes ciudades. No obstante, la relación entre el desarrollo económico y la sostenibilidad ambiental es compleja (Lamelas, 2009). Actualmente, los cultivos hortofrutícolas también se enfrentan a muchos problemas, entre ellos está el continuo deterioro del suelo (Calvo *et al.*, 2008), que impacta en la estabilidad y sustentabilidad de la producción de alimentos, generando hambre y pobreza (Altieri y Nicholls, 2010). La disminución de suelos productivos, y la pérdida de la fertilidad ponen en peligro la seguridad alimentaria y nutricional (Martínez *et al.*, 2009). Diversos estudios han demostrado la factibilidad en el uso de microorganismos como mejoradores de suelo. Las cianobacterias (CBS) son un grupo de microorganismos eucarióticos de gran importancia biotecnológica en este sentido. Las CBS han sido utilizadas como biofertilizante y acondicionadores de suelo (Garbisu y Alkorta, 1999; Hernández-Reyes *et al.*, 2019). Entre los beneficios del uso de microorganismos por ejemplo, las CBS en la agricultura están: su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, el control de plagas y enfermedades, el aporte de nutrientes, vitaminas, hormonas y varios compuestos bioactivos que estimulan y promueven el crecimiento de las plantas (Almeida, 2014); en algunos países la utilización de microorganismos se han convertido en fuente de vitaminas, proteínas y carbohidratos, data de tiempos muy antiguos (Harrigan *et al.*, 1999; Rosales-Loaiza *et al.*, 2017). Las CBS pueden trabajar solas o en combinación con otros organismos, de ambas formas presentan una alta capacidad acondicionadora de suelos degradados, son eficaces en el tratamiento de suelos contaminados o suelos muy pobres (Mandal *et al.*, 1998; García *et al.*, 2020). La aplicación de los consorcios microbianos con CBS como biofertilizante, es importante en el área agrícola, debido a su capacidad de fijar nitrógeno, además de potenciar la producción de metabolitos secundarios y promover la captación de nutrientes en las plantas (Luna *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, se plantea como objetivo de este estudio, encapsular a *Fischerella TB22* con polímeros biodegradables para mejorar su aplicación como biofertilizante además de mejorar las condiciones del suelo.

2 Marco teórico

2.1 Generalidades del suelo

El suelo es un cuerpo natural heterogéneo, complejo y abierto, en constante evolución, en donde los factores formadores (clima, topografía, litología, seres vivos y tiempo) están actuando de forma continua generando nuevo suelo (Chiesa y Grazia, 2014). En un suelo, los procesos físicos, químicos y biológicos presentan multitud de interrelaciones, lo que hace que sea muy complejo su estudio. El suelo es la base sobre la que se desarrolla toda la vida terrestre del planeta y por tanto, el recurso natural más importante de que disponemos. Continuamente se está formando suelo nuevo, sin embargo, esta formación es muy lenta y necesita de un período de tiempo muy grande para ello (Thompson y Troeh, 1988; López-Ulloa, 2016). La formación de 1 cm de suelo puede exigir, en ocasiones, de miles de años, aunque con frecuencia se adopta la cifra media de 500 años. Sin embargo, su destrucción puede ser muy rápida, de apenas unos pocos años. Esta lentitud en su formación, comparada con la velocidad de destrucción, hace que se le considere como un recurso no renovable y, en consecuencia, es vital librarlo de su degradación. Cuando un suelo se utiliza de modo irracional, adquieren preponderancia una serie de procesos físicos, químicos y biológicos que conducen a su degradación (Hernández-Morales *et al.*, 2015). Las consecuencias ambientales, económicas y sociales de la degradación del suelo son muy graves, especialmente en aquellas zonas donde las condiciones ambientales condicionan una capacidad de regeneración de los ecosistemas baja y, por tanto, en los que la intervención del hombre será imprescindible para conseguir su regeneración (Gómez y Gómez, 2013).

El suelo está formado por los siguientes componentes: un 50% de materiales sólidos, divididos en 45% de partículas minerales y 5% de materias orgánicas conforman la capa cultivable del suelo. El otro 50% se constituye de agua y aire en un 25% cada uno. Los componentes antes mencionados se subdividen y se mezclan de tal manera que el agua y el aire ocupa poros que quedan entre las partículas sólidas. Si comparamos la capa cultivable del suelo con el subsuelo, podremos darnos cuenta de que éste contiene mayores cantidades de sustancias minerales, pero la materia orgánica se encuentra en cantidades menores. El material parental o los fragmentos depositados son los encargados de derivar la parte mineral de los suelos.

Esta es la fuente principal de los nutrientes propios del suelo tales como fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). El suministro potencial de estos elementos nutritivos varía de acuerdo con el origen, la clase y el tamaño de las partículas minerales (Tisdale y Nelson, 1987; Chilón, 2018).

La materia orgánica que se encuentra presente en el suelo es la representación de la acumulación de plantas frescas, de vegetales parcial o completamente descompuestos, y de residuos animales. Los microorganismos del suelo hacen que su contenido sea inestable y es importante tener en cuenta que el contenido de materia orgánica debe mantenerse constante.

El contenido del agua presente en el suelo puede variar de manera considerable, siendo la lluvia y la irrigación factores importantes en tal aspecto. El agua en el suelo es importante ya que satisface los requerimientos de humedad de las plantas, se encarga de disolver los nutrientes dando origen a una solución que es absorbida por las raíces de las plantas (Fig. 1), también se encarga de controlar el volumen de aire en el suelo y controla la fluctuación de la temperatura en el suelo. El rendimiento y desarrollo de los cultivos se ve grandemente afectado por la cantidad de agua que encuentran disponible en los suelos.

La mezcla de gases que constituyen el aire se encarga de llenar parte de los poros del suelo. Una parte de estos gases puede ser absorbida por las raíces de las plantas y por los microorganismos presentes en el suelo, también puede ser disuelta en la solución del suelo. Para que las raíces de las plantas se desarrollen de manera adecuada, los componentes gaseosos del aire y el agua deben estar presentes en cantidades proporcionales (Ford, 1984; Barbaro y Karlanián, 2020).

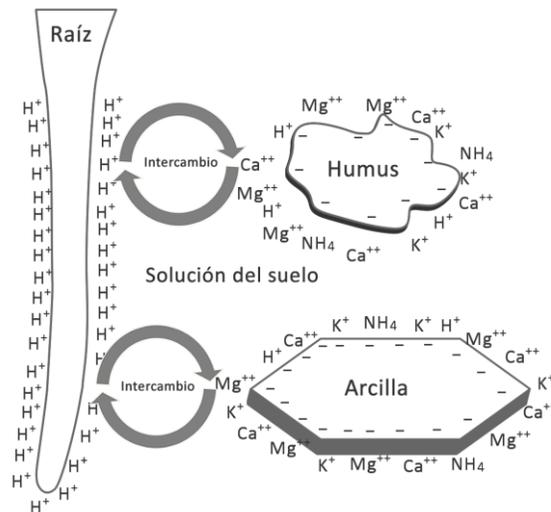


Figura 1. Raíz de la planta en contacto con la solución del suelo, el humus y la arcilla. (Modificado de Havlin *et al.*, 2016).

2.2 Fertilidad del suelo

Es la capacidad de éste para mantener una cubierta vegetal. En la fertilidad intervienen todas las características del suelo, sean físicas, físico-químicas o químicas (Tabla 1), se ha relacionado con la capacidad de suministro de nutrimentos esenciales para los cultivos y niveles no tóxicos de ciertos elementos, así como con otras propiedades (potencial de hidrógeno, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico) que restringen la expresión del rendimiento máximo posible del agrosistema agro sistema (Eckert, 1987; Orozco *et al.*, 2016). Hay conceptos más amplios de la fertilidad de un suelo (Sims, 2000), que la consideran un atributo de la tierra, resultado de múltiples propiedades del suelo que interaccionan constantemente con las plantas y el ambiente.

Son numerosos los factores inherentes al medio (suelo y clima) que influyen sobre el mayor o menor grado de absorción de los nutrientes, algunos nutrientes químicos en el suelo son estables (fósforo) mientras que otros se pierden o se consumen muy fácilmente (nitrógeno) de ahí su importancia.

Tabla 1. Propiedades Físicas, Químicas y Biológicas del Suelo. (Modificado de Havlin *et al.*, 2016).

Físicas	Químicas	Biológicas
Estabilidad estructural	pH	Biomasa microbiana C
Porosidad	CIC	Biomasa microbiana N
Capacidad de campo	Materia Orgánica	Respiración
Textura	Nitrógeno mineralizado	Actividad enzimática
Velocidad de infiltración	Estado RedOX	Organismos indicadores (Colémbolos, lombrices, protozoarios, rhyzobium)
Densidad	Conductividad eléctrica	Diversidad: composición y número de especies.

2.3 Nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente mineral más demandado por microorganismos y plantas (Verhulst *et al.*, 2014). Este elemento conforma aproximadamente el 12 % del peso seco total de la célula, y su ciclo biogeoquímico incluye varios procesos catalizados por microorganismos, como la fijación de nitrógeno, que es un proceso llevado a cabo sólo por un selecto grupo de bacterias y cianobacterias. Se encuentra en distintas formas en el suelo, es absorbido por las plantas y microorganismos como nitrato (NO_3) o amonio (NH_4^+), puede encontrarse en 3 estados de oxidación principales (-3, +3 y +5) aunque también se presentan otros estados de oxidación y reducción. El nitrógeno inorgánico está disponible para ser tomado por las plantas, mientras que el orgánico debe ser primero mineralizado (convertido a N inorgánico) antes de que las plantas lo puedan utilizar.

Las formas inorgánicas de nitrógeno son producidas a partir de la descomposición de la materia orgánica del suelo o de la adición de fertilizantes nitrogenados. Los que se encuentran presentes en el suelo incluyen amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO) y nitrógeno elemental (N_2), el cuál es inerte excepto para aquellos microorganismos fijadores de nitrógeno (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016). Desde el punto de vista de fertilidad del suelo, NH_4^+ , NO_2^- , y NO_3^- estas tres formas representan entre 2 y 5 % del nitrógeno total del suelo (Luna *et al.*, 2016).

2.4 Materia Orgánica

La materia orgánica (MO) configura la principal reserva edáfica de carbono. Su participación en moléculas que poseen composición y propiedades físicas, químicas, enzimáticas, estructurales y biológicas diferenciadas, le hacen responsable de actividades fundamentales del suelo que son distintas a las de los constituyentes inorgánicos minerales (Verhulst *et al.*, 2014). Aunado a lo anterior, con la participación de seres vivos, la MO se convierte en un conjunto de nivel superior (con capacidades distintas a sus componentes), que genera estabilidad, coopera a la conservación y promueve la fertilidad, productividad y la biodiversidad de los suelos. Contiene aproximadamente un 5 % de nitrógeno (Julca-Otiniano *et al.*, 2006), pero también contiene otros elementos esenciales para las plantas, tales como fósforo, magnesio, calcio, azufre y micronutrientes (Villarreal-Romero *et al.*, 2010). La materia orgánica es aquella que se encuentra conformada por moléculas orgánicas resultantes de los seres vivos y la podemos hallar en las raíces, en los animales, en los organismos muertos y en los restos de alimentos. Por otra parte, la molécula orgánica, es un compuesto químico que contiene carbono y forma enlaces carbono-carbono y carbono-hidrógeno y en algunos casos también pueden contener nitrógeno, azufre, fósforo, oxígeno, entre otros.

2.5 Potencial de Hidrógeno

El potencial de hidrógeno (pH) determina el grado de adsorción de iones (H^+) por las partículas del suelo e indica si un suelo está ácido o alcalino. Es el indicador principal en la disponibilidad de nutrientes para las plantas, influyendo en la solubilidad, movilidad, disponibilidad y de otros constituyentes y contaminantes inorgánicos presentes en el suelo. El valor del pH en el suelo oscila entre 3,5 (muy ácido) a 9,5 (muy alcalino). Los suelos muy ácidos ($< 5,5$) tienden a presentar cantidades elevadas y tóxicas de aluminio y manganeso. Los suelos muy alcalinos ($> 8,5$) tienden a dispersarse. La actividad de los organismos del suelo es inhibida en suelos muy ácidos y para los cultivos agrícolas el valor del pH ideal se encuentra en 6,5 (Zhalnina *et al.*, 2015). De acuerdo con Castellanos (2014) y Venegas-González *et al.*, (2016), la importancia del pH en el suelo es debido a que tiene una influencia decisiva en la disponibilidad de nutrientes

para las plantas (Fig. 2). En los diferentes niveles de pH la planta aprovecha los nutrientes del suelo en diversos grados (Fig. 3).

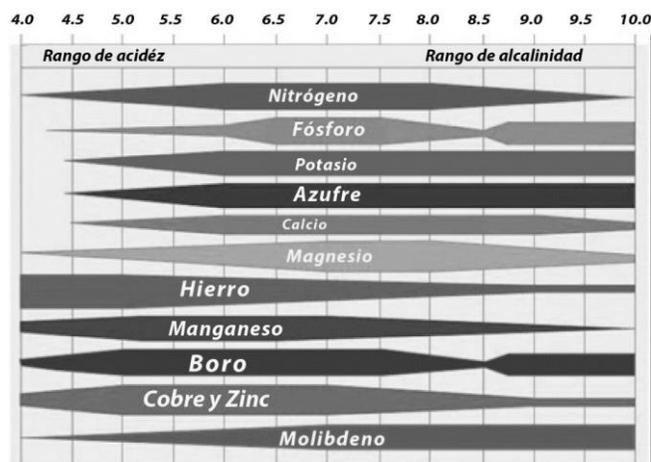


Figura 2. Valor de pH y su relación con la disponibilidad de los nutrientes en el suelo. (Castellanos, 2014)

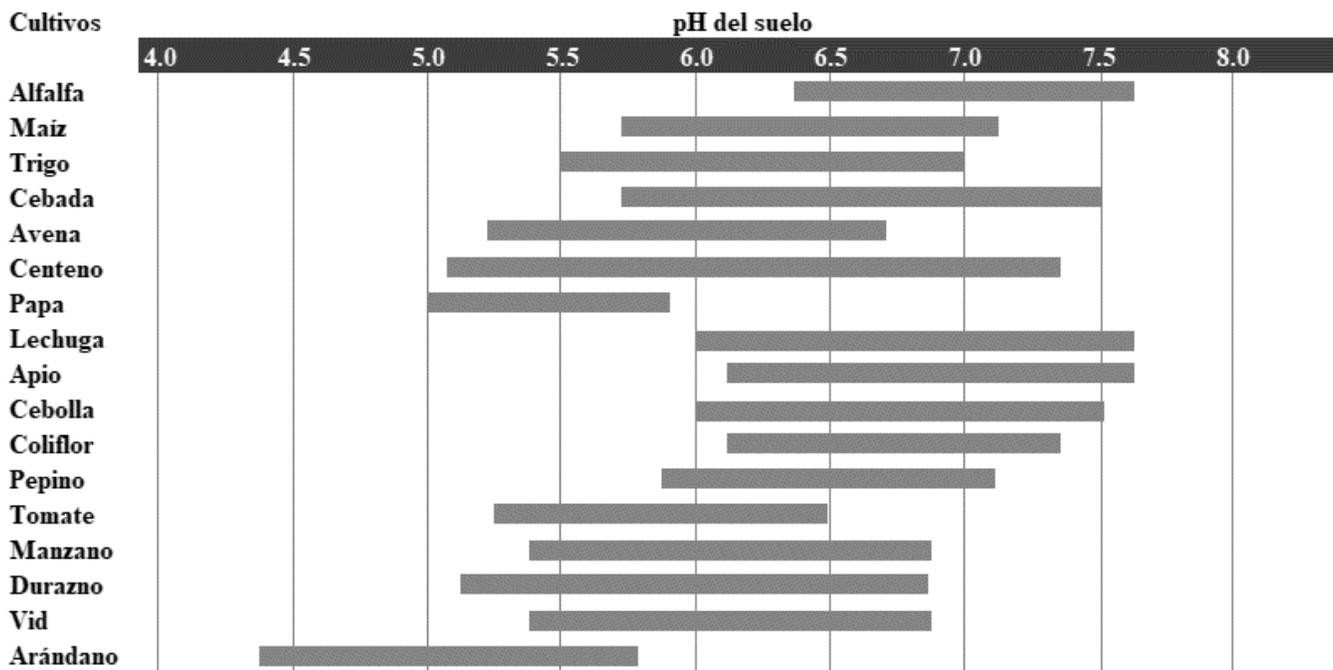


Figura 3. Valor de pH para el crecimiento de diferentes plantas cultivadas. (Modificado Venegas, 1993)

2.6 Conductividad Eléctrica

Todos los suelos fértiles contienen por lo menos pequeñas cantidades de sales solubles (Flores *et al.*, 2014). La acumulación de sales solubles en el suelo se atribuye principalmente a problemas de drenaje y a la acción de riegos continuados, seguidos de evaporación y sequía.

Cuando un suelo tiene un exceso de sales solubles se le denomina suelo salino. La medida de la conductividad eléctrica (CE) del suelo y de las aguas de riego permite estimar en forma casi cuantitativa la cantidad de sales que contiene (Coitiño-López *et al.*, 2015). El análisis de la CE en suelos se hace para establecer si las sales solubles se encuentran en cantidades suficientes como para afectar la germinación normal de las semillas, el crecimiento de las plantas o la absorción de agua por parte de estas (Terrón *et al.*, 2011). El uso de la CE como indicador de la fertilidad potencial de un terreno es especialmente eficaz en la determinación de las áreas menos productivas y, por consiguiente, en la determinación de las zonas menos rentables de la parcela (Moral *et al.*, 2010).

Las sales solubles que se encuentran en los suelos en cantidades superiores al 0.1 % están formadas principalmente por los cationes Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} asociados con los aniones Cl^- , SO_4^- , NO_3^- y HCO_3^- . La CE se informa siempre a 25 °C porque varía con la temperatura. La variación es del orden de un 2 % por cada °C (USDA, 1996; Saavedra-Romero *et al.*, 2020).

2.7 Generalidades de los biofertilizantes

Un biofertilizante es un fertilizante orgánico natural que ayuda a proporcionar a las plantas todos los nutrientes que necesitan y a mejorar la calidad del suelo creando un entorno microbiológico natural (Martínez-Cordeiro *et al.*, 2014). Los materiales vivos aumentan la fertilidad de los suelos (Tabla 2); algunas bacterias de vida libre o simbiótica y algas verdeazuladas (cianobacterias) fijan el nitrógeno gaseoso, produciendo amoníaco, que liberan, lo que aumenta la fertilidad del suelo y el agua (Carvajal y Mera, 2010).

Tabla 2. Algunos microorganismos utilizados en la agricultura.

Microorganismo	Tipo	Acción	Aplicación	Referencia
Trichoderma	Hongo	Fungicida	Aspersión	Castro <i>et al.</i> , 2020
Bauveria bassiana	Hongo	Insecticida	Aspersión	Góngora <i>et al.</i> , 2020
Trichoderma	Hongo	Fungicida	Aspersión	Castro <i>et al.</i> , 2020
Azotobacter	Bacteria	Bioremediador	Inoculación	Huete <i>et al.</i> , 2019
Rhizobium	Bacteria	Fija nitrógeno	Inoculación	Ruiz <i>et al.</i> , 2020
Cianobacterias Diazotróficas	Cianobacteria	Fijación N, Aporte de compues- tos nitrogenados	Riego	Sánchez <i>et al.</i> , 2019

Uno de los elementos más valiosos para la agricultura ecológica es el uso de microorganismos propios del suelo como biofertilizantes, lo cual en los sistemas productivos es una alternativa viable e importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Alfonso *et al.*, 2005). Entre los beneficios del uso de microorganismos, por ejemplo, las cianobacterias en la agricultura están: su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, el control de plagas y enfermedades, el aporte de nutrientes, vitaminas, hormonas y varios compuestos bioactivos que estimulan y promueven el crecimiento de las plantas (Rueda *et al.*, 2015). Las cianobacterias pueden ser empleadas como biofertilizantes puesto que se ha demostrado que actúan como estructuradores del suelo permitiendo así la captación de nutrientes, específicamente del nitrógeno; en muchos países ya se han realizados estudios e inclusive se está comenzando a producir a escala industrial, de ahí la importancia de evaluar el efecto fertilizante de las cianobacterias en nuestro medio (Vidal *et al.*, 2018). El uso de estos microorganismos podría servir como alternativa para resolver el uso de nitrógeno químico, ya que estas bacterias fotosintéticas son inocuas para la salud de los humanos y además no contaminan el ambiente, al ser utilizadas para la agricultura (Ghosh, 2004; Sharma *et al.*, 2019).

2.8 Generalidades de los bioencapsulados

Los procesos de encapsulación fueron desarrollados para su aplicación comercial entre 1930 y 1940, por la National Cash Register (NCR) para la encapsulación de un tinte empleando gelatina como agente encapsulante, mediante un proceso conocido como coacervación (Pedroza-Islas *et al.*, 2002). La encapsulación hoy en día se aplica para preservar y/o proteger numerosos ingredientes comerciales (Gibbs *et al.*, 1999; De Oliveira *et al.*, 2018), ya que ésta envasa, separa y almacena materiales a escala microscópica para su posterior liberación, considerándola de esta manera, una forma especial de empaquetar, debido a que un material en particular puede ser recubierto de manera individual, para protegerlo del ambiente y agentes extraños (Loksuwan, 2007). La encapsulación se ha convertido en un proceso muy atractivo en las últimas décadas, tanto para productos alimentarios como para compuestos químicos, fármacos o cosméticos, manteniendo el propósito de incrementar la estabilidad y la vida media o de anaquel de éstos (Arteaga y Arteaga, 2016).

2.8.1 Tipos de encapsulamiento

Una microesfera o microcápsula se compone de una sola o de la combinación de varios ingredientes tales como: azúcares, gomas, proteínas, polisacáridos, lípidos o de polímeros sintéticos modificados, que se encuentran revistiendo el núcleo, éstas se producen en forma de geles o en forma de polvo seco. Lupo (2012) clasifica los encapsulados y dice que pueden estar constituidos por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios (Fig. 4).

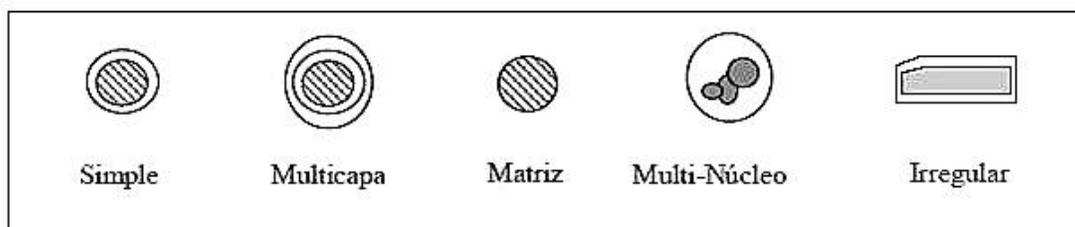


Figura 4. Clasificación de encapsulados. (Lupo, 2012)

Muchos de los principios activos que se manejan en la industria, y no sólo de alimentos, son susceptibles a las condiciones que prevalecen en el ambiente, como son la exposición a la luz, el oxígeno, la humedad y las altas temperaturas, con lo cual se alteran sus propiedades (Popplewell *et al.*, 1995; Castromonte *et al.*, 2020). De esta manera, la protección que ofrece la encapsulación puede ayudar a minimizar el daño ocasionado por dichos factores, permitiendo mantener su estabilidad, viabilidad y una máxima absorción de los compuestos, con un mínimo de reacciones adversas como las reacciones de oxidación (Desai y Park, 2005).

Entre algunos de los compuestos activos que se pueden mencionar, y en los que se ha utilizado el proceso de microencapsulación se encuentran: sabores, agentes antimicrobianos, activos nutraceúticos y terapéuticos, vitaminas, minerales, antioxidantes, colores, ácidos, bases, reguladores, edulcorantes, nutrientes, enzimas, levaduras, agentes químicos para fermentación, grasas, aceites, oleorresinas y microorganismos probióticos, entre otros (Pérez-Leonard *et al.*, 2013). El inmovilizado de microorganismos ha sido empleado con fines agrícolas y ambientales (Bashan 1998; Pacheco-Aguirre *et al.*, 2017). En el Tabla 3 se muestran los principales componentes utilizados como material pared en la encapsulación.

Tabla 3. Principales componentes utilizados como material pared en la encapsulación.

Compuesto a encapsular	Material utilizado	Uso general	Referencia
Aceites esenciales, aromas, microorganismos , vitaminas, agentes de fermentación, enzimas.	Goma arábiga, goma xantana, goma guar, alginato , carragenina.	Alimentos Farmacéutica	Castañeda-Ovando <i>et al.</i> , 2020
Sabores, vitaminas, aceites esenciales, carotenos.	Almidón modificado, jarabe de maíz, dextrinas, maltodextrinas, pectinas, quitosano , sacarosa, inulina.	Alimentos Farmacéutica	Sandoval-Peraza <i>et al.</i> , 2017
Antígenos, antibióticos, fungicidas, enzimas	Ceras, parafinas, triestearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas.	Alimentos Farmacéutica	Castañeta <i>et al.</i> , 2011
Antibióticos, enzimas.	Gluten, caseína, gretina, gelatina , albúmina, colágeno.	Alimentos Farmacéutica Agricultura	Castañeta <i>et al.</i> , 2011

A pesar de los trabajos realizados para la inmovilización de microorganismos con perlas elaboradas a base de Alginato de Sodio, son muy pocos los realizados con cianobacterias.

2.8.2 Alginato de Sodio

Los alginatos se utilizan ampliamente en la industria alimenticia como mejorador de consistencia, textura y para retener la humedad en productos lácteos, enlatados y de pastelería. En los alimentos congelados, las propiedades de los alginatos aseguran la textura suave y el descongelamiento uniforme. La estabilización de la espuma de la cerveza es una de las funciones más usuales de los alginatos, en la fabricación del papel, produce una película suave, continua y una superficie con menos pelusa. En la medicina, el Alginato se utiliza como agente desintegrador de tabletas y en la elaboración de vendas para heridas que son absorbidas por el cuerpo y que no tienen que ser removidas (Hernández-Carmona *et al.*, 2012). También se usan en la elaboración de material de impresión dental (Reyes-Tisnado *et al.* 2004) y la inmovilización de organismos benéficos para el tratamiento de aguas residuales, así como promotores del crecimiento de plantas (Yabur

et al. 2007). Actualmente, el estudio de los alginatos se ha enfocado en el transporte de proteínas (Coopi *et al.* 2001); intercambiadores de metales; inmovilización de levaduras; microencapsulados, absorción de radiación ultravioleta, y como promotor del crecimiento en las raíces de plantas terrestres (Iwasaki y Matsu- bara 2000).

2.8.3 Quitosano

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtuvo un producto soluble en ácidos orgánicos; esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler, quién la denominó “quitosano” (De la Paz *et al.*, 2012). El quitosano también ha mostrado actividad fungistática inhibiendo el crecimiento de hongos como: *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Piricularia orizae*, *Rhizoctonia solana*, *Trichophyton equinum* (Fei *et al.*, 2001). En la agricultura el quitosano es utilizado como agente de biocontrol contra hongos, (Freepons, 1997; Domini, 2018). El grupo amino en el quitosano posee una ligera carga positiva, lo que le permite ser soluble en medios ácidos o en soluciones neutras; es un bioadhesivo que puede ligarse a las superficies cargadas negativamente tales como las membranas mucosas; debido a esta propiedad física el quitosano permite el transporte de principios activos polares a través de las superficies epiteliales, siendo además biocompatible y biodegradable (Durán *et al.*, 2016). Se ha utilizado recientemente como un fertilizante que puede ayudar a las plantas como un buen inductor para sus mecanismos de defensa (Lárez, 2008), desarrollar reacciones inmunitarias saludables, otorgando un mayor rendimiento y esperanza de vida (Lárez-Velásquez, 2006).

2.9 Cianobacterias

2.9.1 Cianobacterias fijadoras de nitrógeno

Las cianobacterias, también conocidas como algas verde azules, son un grupo diverso de procariotas gram negativos fotoautotróficos (Fay, 1992; Sotelo *et al.*, 2016). Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno en especial contribuyen en gran medida a la presencia de nitrógeno en hábitats terrestres y acuáticos (Freire *et al.*, 2016). También muestran una amplia diversidad morfológica, ya que pueden ser unicelulares (*Chroococcus*) o filamentosas, éstas últimas, en ocasiones presentan ramificaciones (Por ejemplo: *Fischerella sp.*). Muchas cianobacterias, producen células diferenciadas que sirven para protección, esporulación y reproducción o bien, para realizar funciones vegetativas específicas (Martínez, 2010). Bajo condiciones de limitación de nitrógeno, muchas especies filamentosas poseen células diferenciadas, llamadas heterocitos, las cuales tienen como única función la fijación de nitrógeno (Morales *et al.*, 2014). Las cianobacterias en particular pueden tomar el nitrógeno de diferentes formas combinadas, tales como: nitrato, amonio, nitrógeno orgánico (aminoácidos), urea o principalmente como nitrógeno molecular (N₂) (Arias *et al.*, 2007).

2.9.2 Fijación de nitrógeno

Los microorganismos fijadores de nitrógeno en general producen enzimas que toman el nitrógeno en su forma gaseosa de la atmósfera y con los azúcares que obtienen de la planta, fijan el nitrógeno dentro de la biomasa bacteriana, si las bacterias satisfacen sus necesidades de nitrógeno pasan a la planta y pueden absorber niveles elevados de proteína en las plantas. Sin embargo, en la mayoría de los ambientes, estas formas se encuentran en bajas concentraciones (Santana-Aragone *et al.*, 2017). El N-orgánico está sujeto a diversas transformaciones microbiológicas, desaminación, nitrificación y desnitrificación, estas; son el resultado eventual en la conversión de alguna forma combinada de nitrógeno a nitrógeno molecular. Este último elemento, al encontrarse en grandes cantidades en la tierra, es el que todos los microorganismos fijadores de nitrógeno obtienen fácilmente y sin competencia. Lo anterior, es gracias a que cuentan con un complejo enzimático denominado nitrogenasa, que les permite fijar dicho elemento (Mayz-Figueroa, 2004). Las enzimas inmiscuidas en el proceso de fijación de N son las Nase: nitrogenasa y CytOx: citocromo

oxidasa; además de $[H^+]$: equivalentes reductores (NAD (P) H, FdH) derivados del metabolismo de la sacarosa.

3 Antecedentes

El empleo de los biofertilizantes, constituye una alternativa tecnológica de probada efectividad para el incremento de los rendimientos en la mayoría de los cultivos y tiene la capacidad de producir una simbiosis con algunas especies de plantas y una alta tasa de fijación de Nitrógeno, incrementando el rendimiento (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012). En términos generales, se puede decir que los biofertilizantes tienen un costo para el productor de sólo 10% del costo de la fertilización química, y en la mayoría de los casos no debe representar más del 2 a 3% del costo de producción del cultivo (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012). El desarrollo de la biotecnología microalgal (incluidas las cianobacterias) ha permitido, no sólo el desarrollo a escala comercial de cultivos de nuevas especies, sino la ampliación de la lista de aplicaciones de estos microorganismos y las sustancias de interés químico, farmacéutico e industrial que de ellas se extraen (Gómez, 2007). Hernández y Araujo (2017) en su estudio evaluaron en un consorcio de cianobacterias (*Oscillatoria sp.*, *Anabaena sp.* y *Gloeocapsa sp.*), concluyen que con el uso de las cianobacterias aumentó un 10% el tamaño de plantas de arroz, 40 % en plantas de maíz y un 33% más en peso húmedo en arroz, e infieren que el uso del biofertilizante incrementan la fertilidad del suelo, debido a que son organismos fijadores de Nitrógeno capaces de generar su propio fotosintato el cual las hace especialmente atractiva para ser usadas como biofertilizante. Salazar *et al.*, en 2020 evaluaron el efecto de un consorcio de cianobacterias sobre la obtención de biomasa vegetal de gulupa (*Passiflora edulis f. edulis Sims.*) bajo condiciones de campo e indican que existe una respuesta favorable en las variables de respuesta (Longitud de planta, longitud de raíz, peso fresco planta y peso fresco raíz) contra el control en el crecimiento vegetal por parte de la planta al aplicar la inoculación con la cianobacteria *Passiflora edulis*. Vidal *et al.*, en 2018 postulan que el potencial de las cianobacterias como abono orgánico no ha sido explotado a pesar de sus extraordinarias cualidades nutricionales en arroz y su fácil crecimiento, por ejemplo, cianobacterias del género *Spirulina* pueden contener el 70% de peso seco en proteínas, del 70 al 80% del total de lípidos son ácidos grasos libres, el 15 al 20% del peso seco representado en compuesto de glucosa y el glucógeno según las condi-

ciones de crecimiento, además de que utilizar cianobacterias podrían tener un efecto benéfico en las cualidades del suelo a largo plazo. Arenas-Julio et al. (2021) determinaron la influencia del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante sobre la fenología, biomasa total, rendimiento de grano y sus componentes en el cultivo de girasol. Para los suelos encontró que la fertilización nitrogenada y el biofertilizante no modificaron el tiempo a ocurrencia de las etapas fenológicas, pero sí se observó un cambio en la biomasa total y rendimiento de grano en 10 % respecto a la nula biofertilización. Trujillo-Tapia y Ramírez Fuentes (2015) afirman que el uso de fertilizantes químicos se puede reducir hasta en un 50% sin afectar las necesidades de nitrógeno de una planta aplicando biofertilizantes y que esto dependerá del número de aplicaciones de fertilizantes para obtener un mejor rendimiento en otros cultivos. Lara y Negrete (2015) señalaron que la aplicación de un biofertilizante con un consorcio microbiano fotosintético fijador de nitrógeno en plántulas de arroz en condiciones de invernadero, favoreció su crecimiento sin dañarlas o intoxicarlas como sucedió con la urea y coincide con Cruz *et al.* (2017) que además dice que la fertilización utilizando un consorcio microbiano fotosintético sería más económica que la aplicación de Urea. Hernández-Reyes *et al.* (2019) demostraron que positivamente, las cianobacterias empleadas como biofertilizantes incrementaron el contenido de materia orgánica y disminuyeron la acidez de los suelos. La permanencia de las cianobacterias después de la cosecha incrementó la biodiversidad de microorganismos fotosintéticos que tienen un papel fundamental como acondicionadores de suelos.

Ramírez-López (2009) realizó una metodología para poner en crecimiento y determinar cinéticas de *Fischerella sp.* y su contribución de NH_4^+ en el medio de cultivo para su uso para fertilización alternativa. La encapsulación con polímeros biodegradables, cuando se explotan adecuadamente, tiende a ser un producto ecológico y prometedor cuando se busca su aplicación en la agricultura, por lo tanto, una tendencia creciente como lo afirman Yonezawa *et al.*, en su trabajo del 2017. Brandelero *et al.*, (2021) utilizando urea en capsulas de quitosano y almidón, el encapsulado proporcionó una mayor estabilidad al fertilizante de urea ya que redujo la solubilidad y la disponibilidad para la reacción con las enzimas del suelo. Solis *et al.*, (2017) menciona que el uso de biofertilizante repercute favorablemente en la economía a nivel del agricultor, junto

con una evaluación ambiental. Además, hay una ligera reducción de la huella de carbono de la producción agraria. Alonso-Santos et al, demostraron que el bioencapsulado de *Fischerella sp.*, en perlas de alginato de calcio es una alternativa viable para su crecimiento, demostrando que la mayor producción de NH_4^+ fue 4 veces más en promedio a las 2 semana en el bioencapsulado y que en el cultivo en las células libres.

Neira-Carrillo et al. (2013) en su estudio en el área biomédica de encapsulación de biomoléculas utilizando polímeros naturales, afirman que un polímero es apto para cumplir estas funciones cuando reúne ciertas características tales como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia mecánica, estabilidad química, baja toxicidad, etc. Sus aplicaciones dependen de la naturaleza de los polímeros, sus funcionalidades químicas reactivas, su nano-estructura, morfología, técnica utilizada y propiedades físico-químicas. Pérez-Leonard et al. (2013) utilizaron la encapsulación para microorganismos probióticos usando κ -carragenano, alginato, almidón y sus derivados, goma arábiga, gelano, xantano, quitosano y gelatina, para encapsular utilizaron las técnicas de secado por aspersion, enfriamiento por aspersion, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, co-extrusión, extrusión-fusión, co-cristalización. En la industria alimentaria Cho y Park (2002) realizaron una doble encapsulación de polvo con compuestos aromatizantes utilizando alginato y película de quitosano, la doble encapsulación exhibió una estabilidad a la oxidación, también observaron una liberación controlada del sabor con un aumento hasta del 95%. Castromonte et al. (2020) encapsularon orujo de uva con alginato y una mezcla de alginato y quitosano, el mejor sistema fue alginato:quitosano (1:3% p/v).

4 Justificación

El impacto de las actividades humanas en el medio ambiente puede significar la destrucción de este. La agricultura ecológica u orgánica se basa en el cultivo que aprovecha los recursos naturales para combatir plagas, mantener o aumentar la fertilidad del suelo, entre otros, sin recurrir a productos químicos sintetizados como fertilizantes, plaguicidas, antibióticos, y similares. Actualmente el deterioro de los suelos y la calidad del producto, están ligados al uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas. La importancia de los resultados de los estudios actuales con biofertilizantes, infieren que permiten mejorar las condiciones de fertilidad de un suelo en cultivos hortofrutícolas. El presente trabajo propone la encapsulación de *Fischerella TB22* (cianobacteria fijadora de nitrógeno atmosférico) encapsulada con biopolímeros biodegradables para mejorar la producción de amonio para las plantas, aportar materia orgánica y nitrógeno al suelo, disminuyendo el impacto ambiental provocado por el uso de fertilizantes químicos.

5 Hipótesis general

Con la aplicación de un biofertilizante encapsulado basado en cianobacterias en el suelo, con las posibles combinaciones estables de alginato-acrilato-quitosano, se obtendrán mejores resultados en su aplicación; debido a la porosidad del alginato, la capacidad de retención de humedad del acrilato y la protección del quitosano, esto mejorará la liberación de amonio que será aprovechado por las plantas.

6 Objetivo general

Desarrollar un bioencapsulado para cianobacterias utilizando polímeros biodegradables que favorezca la liberación de amonio para su aplicación como biofertilizante en suelo.

7.1 Introducción

Las cianobacterias son microorganismos procariotas conocidos como algas verde-azules o cianofitas (Lee, 1999). Por muchos años las cianobacterias fueron consideradas algas verde azuladas debido a su fototrofia oxigénica. La estructura fina de las cianobacterias es bien conocida Son organismos fotoautótrofos, que realizan la fotosíntesis con liberación de oxígeno, presentan clorofila a como pigmento fotosintético primario y ficobiliproteínas como pigmentos auxiliares (Campos *et al.*, 2005). Algunos microorganismos en especial las cianobacterias se reproducen por división celular, por lo cual presentan un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones adecuadas. Las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo, por lo cual, se modifica también la velocidad de crecimiento poblacional (Arredondo y Voltolina, 2007). El crecimiento de un cultivo se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células (cél/mL), en peso seco (total y/o orgánico), cantidad de proteína, de pigmentos, medidos directamente o en unidades arbitrarias de fluorescencia, volumen de las células o carbono celular total, calculado para un período de tiempo o una fase de crecimiento específica (Arredondo *et al.*, 1997). Esto permite reconocer diferentes fases de crecimiento (Fig. 5), las cuales sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o biomasa.

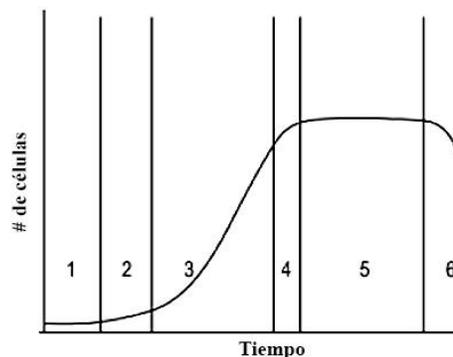


Figura 5. Curva típica de crecimiento microbiano. 1.- Fase lag, 2.- Fase de aceleramiento, 3.- Fase exponencial, 4.- Fase de desaceleración, 5.- Fase estacionaria, 6.- Fase de muerte (Modificado de Lazcano, 2016)

Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre, abarcan una gama morfológica que va desde los organismos unicelulares como las bacterias y algunas cianobacterias, hasta multicelulares, filamentosas (Mayz-Figueroa, 2004) como *Fischerella TB22*, que presentan ramificaciones, son capaces de generar fotosíntesis oxigénica, sintetizar clorofila a, poseen al menos una ficobiliproteína, sintetizan glucógeno como producto de almacenamiento, presentan paredes celulares provistas de azúcares, aminos y aminoácidos (Carr y Whitton, 1982). Son organismos fijadores de nitrógeno donde la enzima que utilizan es la nitrogenasa (Stainer *et al.*, 2005). Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno contribuyen en gran medida a la presencia de nitrógeno en hábitats terrestres y acuáticos (Freire *et al.*, 2016). El género *Fischerella* en particular, que tienen a la nitrogenasa confinada en los heterocitos, los cuales son células especializadas, distribuidas a lo largo o al final del filamento. Los heterocitos están rodeados de una pared glucolipídica gruesa que reduce la difusión del oxígeno hacia las células, cualquier oxígeno que se difunda hacia los heterocistos es reducido rápidamente por hidrógeno; así, la fijación de nitrógeno está espacial y metabólicamente separada del proceso fotosintético. Los heterocistos tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas adyacentes (Todar, 2015). El modelo de Stal (2017) de un heterocisto de *Fischerella sp.* con uniones a una célula vegetativa a cada lado (Fig. 6), enfatiza la situación para el N₂. El heterocisto se caracteriza por una envoltura que comprende una capa de glicolípidos, que forma la barrera principal para la difusión del gas (flechas delgadas) y una capa de polisacárido. La envoltura rodea una pared celular con una membrana externa, una capa de peptidoglicano y una membrana plasmática. Si el aire ingresa o no a los heterocistos a través de las células vegetativas puede regularse mediante un mecanismo de apertura / cierre (representado conceptualmente por flechas naranjas). El O₂ se respira, produciendo ATP. El N₂ y O₂ compiten por los electrones que se importan como sacarosa de las células vegetativas. Los poros en los extremos de los heterocistos a veces pueden contener cianofina (polímero de poliaspartato-multiarginina). Las enzimas involucradas en el proceso de fijación de N son las Nase: nitrogenasa y CytOx: citocromo oxidasa; además de [H⁺]: equivalentes reductores (NAD (P) H, FdH) derivados del metabolismo de la sacarosa. Martínez (2010)

afirma que *Fischerella sp.* mostró capacidad para crecer en un medio de cultivo selectivo (sin nitrógeno), y así comprobar que el amonio medido en el medio es por fijación de N_2 .

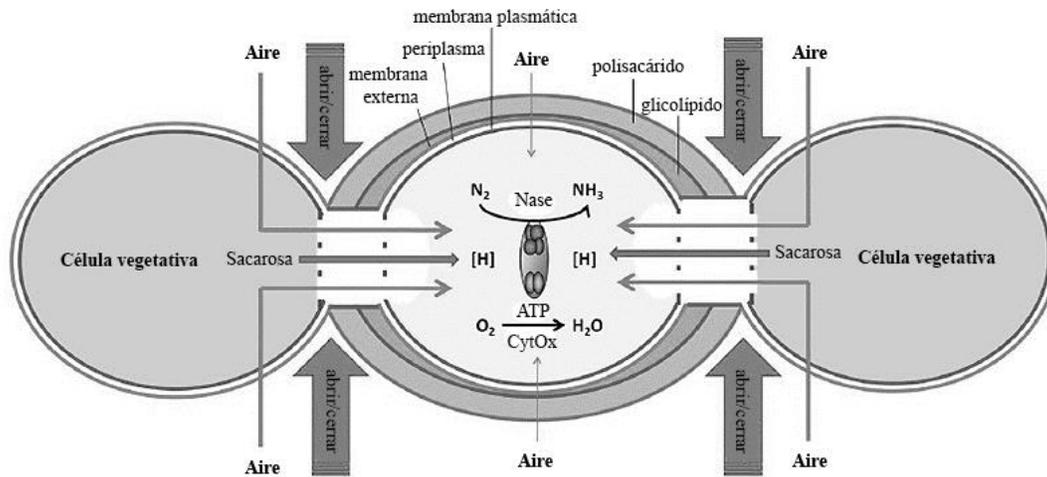


Figura 6. Modelo de un heterocisto con uniones a una célula vegetativa a cada lado. (Traducido de Stal, 2017)

7.2 Hipótesis

Se sabe que las cianobacterias son capaces de sobrevivir o crecer en ambientes extremos debido a que son organismos extremófilos, (escasa agua, salinos, alcalinos, termales etc.) por lo que la variación del volumen del medio de cultivo y control del pH en el crecimiento de *Fischerella TB22* no afecta su desarrollo celular y metabólico.

7.3 Objetivo

Evaluar el crecimiento y metabolismo de *Fischerella TB22* utilizando cultivos in vitro en condiciones controladas de laboratorio

7.4 Materiales y métodos

7.4.1 Condiciones experimentales del cultivo

Se prepararon 4 fotobioreactores de columna burbujeada (Reichert *et al.*, 2006) con 500 ml de medio de cultivo BG11⁰ sin nitrógeno (Rippka *et al.*, 1979) con un inóculo de *Fischerella TB22* (Fig. 7) al 1 % (p/v), se colocaron en aireación constante de 1 Lmin⁻¹ con 12 horas luz con una irradiación de 6200 Lux y 12 horas oscuridad durante 12 días (Ramírez-López, 2009) a 35° C, el inóculo en fase estacionaria para evaluar su crecimiento fue obtenido de la cepa del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Mar. Se prepararon 4 tratamientos por triplicado: el T1 donde se ajustó el pH del medio al pH inicial (6.8) cada 3 días, el T2 donde se recuperó el volumen (vol) al vol inicial, esto debido a la evaporación del medio de cultivo, el T3 donde se ajustó el pH y el vol cada 3 días y el T4 donde no hubo ningún ajuste, esto para determinar el mejor tratamiento para el crecimiento de *Fischerella TB22*. Se tomaron 5 muestras de cada tratamiento para su análisis el día 0, 3, 6, 9, 12.

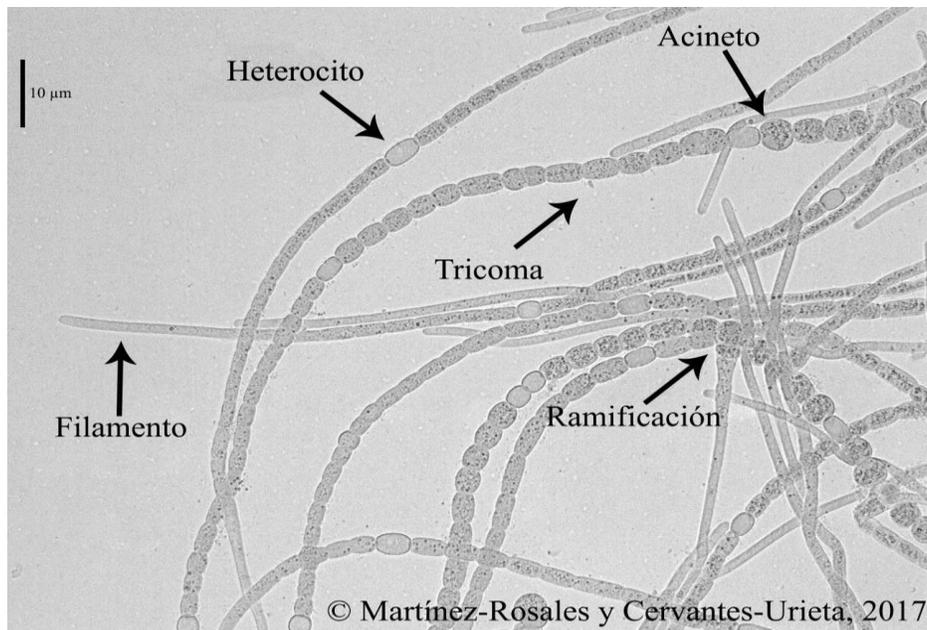


Figura 7. Identificación de células especializadas de *Fischerella TB22* con fotografía en microscopio a 40X.

7.4.2 Evaluación metabólica de *Fischerella TB22*

7.4.2.1 Cuantificación de biomasa por peso seco

La evaluación del crecimiento se realizó de dos formas, cuantificando la biomasa por peso seco (BPS) y densidad óptica (DO); para la BPS se utilizaron filtros cualitativos de 40 mm de diámetro y con una abertura de poro de 5-8 μm , se enjuagaron con agua acidificada a pH 4 (Vonshak 1997), y se colocaron en una estufa marca Felisa a 70 °C por 24 horas y posteriormente en un desecador durante 24 horas. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada tratamiento por triplicado las cuales se filtraron utilizando una bomba de vacío, después de colocaron los filtros en la estufa a una temperatura de 70 °C durante 24 horas. Se tomó el peso final del papel y el peso seco de biomasa se obtuvo por diferencia de peso (Arredondo-Vega *et al.*, 2007).

7.4.2.2 Determinación espectrofotométrica del crecimiento

Para la densidad óptica (DO), previamente en un limpiador ultrasónico Marca Branson modelo 5510, se sonicaron las muestras durante 5 minutos a una frecuencia de 42 ± 6 khz. Se tomó una alícuota de 1 ml de muestra de cada tratamiento por triplicado, se adicionó 1ml de BG11⁰, se midieron en un espectrofotómetro 365UV/Vis marca Perkin Elmer modelo Lambda 365, a 550 nm. Para la medición de amonio en el medio de cultivo (NH_4^+) se utilizó el método colorimétrico de Nessler (APHA, 1992). Se tomó una alícuota de 5 ml de muestra de cada tratamiento por triplicado y se centrifugaron en tubos Falcon a 3500 rpm por 10 min, el sobrenadante se separó en otro tubo y se agregaron: 50 μL de Sulfato de manganeso (MnSO_4) 0.003M., 0.5 mL de hipoclorito de sodio (NaClO) y 0.6 mL de Fenato inmediatamente después de la solución de NaClO . Para la Solución de sulfato de manganeso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$) 0.003M, se disolvieron 50 mg de $\text{MnSO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua desionizada, el hipoclorito de sodio se preparó de la siguiente manera: a 40 mL de agua desionizada se agregaron 10 mL de un blanqueador comercial (Clorox) al 5% (v/v), ajustando el pH a 6.5-7.0 con HCl 0.1M. Esta solución fue preparada semanalmente. Para preparar el fenato, se disolvieron 4.0 g de fenol (ácido fénico) y 1.0 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 40 mL de agua

desionizada. Dicha solución se mantuvo en la oscuridad y fue preparada cada semana. Se agitó vigorosamente tras cada adicción. Se dejaron reposar 10 min y se midieron a una absorbancia de 630 nm en un espectrofotómetro UV/Vis marca Perkin Elmer modelo Lambda 365. La lectura del pH se tomó con un potenciómetro marca Hanna modelo HI5221 directamente en el medio de cultivo de cada tratamiento.

7.5 Análisis estadístico

Todos los análisis experimentales se llevaron a cabo por triplicado como experimentos independientes. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis de medidas repetidas (ANOVA), cuando se encontró diferencias entre los diferentes tratamientos se realizaron pruebas de comparación *Pos-Hoc* de Tukey a un nivel de significancia de 0.05%. Todos los datos obtenidos fueron analizados con el software Estadística versión 7 (StatSoft).

7.6 Resultados y Discusión

Los resultados demostraron diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, entre días y la relación tratamiento-días. Para la diferencia entre tratamiento se hizo una comparación de medias de cada tratamiento, se encontraron de 3 grupos diferentes encontrando que T3 (grupo 3) es diferente de T1, T4 y T2 (grupo 2); T1 Y T4 (grupo 1) son iguales entre sí, pero diferentes a T3 y T2; T2 es diferente a los tres tratamientos.

Tabla 4. ANOVA de diferencia entre tratamientos.

	Tratamientos	Promedio	1	2	3
2	T2	23.59909		C	
4	T4	25.13569	B		
1	T1	25.27378	B		
3	T3	28.14606			A

El mayor crecimiento en biomasa ocurrió en el día 9 y 12 (Fig. 8a) se obtuvieron en promedio 6.8 ± 0.12 mg de NH_4^+ y 7 ± 0.18 μg el día 12. Rajabnasab et al., (2017) quienes documentan en un experimento similar con *Fischerella sp.* en condiciones de aireación la producción de amonio de 0.44 ± 0.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ a los

5 días, en este trabajo la producción de amonio de *Fischerella TB22* (Fig. 8b) a los 5 días fue superior ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), esto se atribuye a que estudiaron una especie diferente a este trabajo. Rajabnasab et al., (2017) reportaron también con una cepa de *Fischerella sp.* $8.34 \pm 0.72 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila, en este trabajo, la cepa de *Fischerella TB22* alcanzó en el T4 $8.03 \pm 0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 8c) siendo T4 el mejor tratamiento en esta variable. El ajuste de pH y volumen en el T3 (Fig. 8d) mostró mejor producción de amonio en el día 9. Los resultados de biomasa (Fig. 8a) y pH (Fig. 8d) confirman lo dicho por Morales et al., (2002) que algunas cepas de cianobacterias son capaces de mantener un crecimiento sostenido entre un pH de 6,0 y 10,0 con un óptimo a pH 8,0, en este trabajo el pH de los medios de cultivo oscilaron entre 6.8 y 8.2. Brito et al., (2016) afirman que la variación del pH está directamente relacionada con el incremento celular debido al aumento en el consumo de CO_2 , trayendo como consecuencia la alcalinización del medio. Así mismo el pH se puede incrementar por el consumo de fosfatos por las cianobacterias, esto debido a que el medio de cultivo perdió su capacidad de amortiguamiento como reportan Beltrán-Rocha et al., (2017) en su trabajo con microalgas, para evitar pérdidas de biodisponibilidad de fósforo, sin embargo, en este trabajo no afectó en el rango de crecimiento.

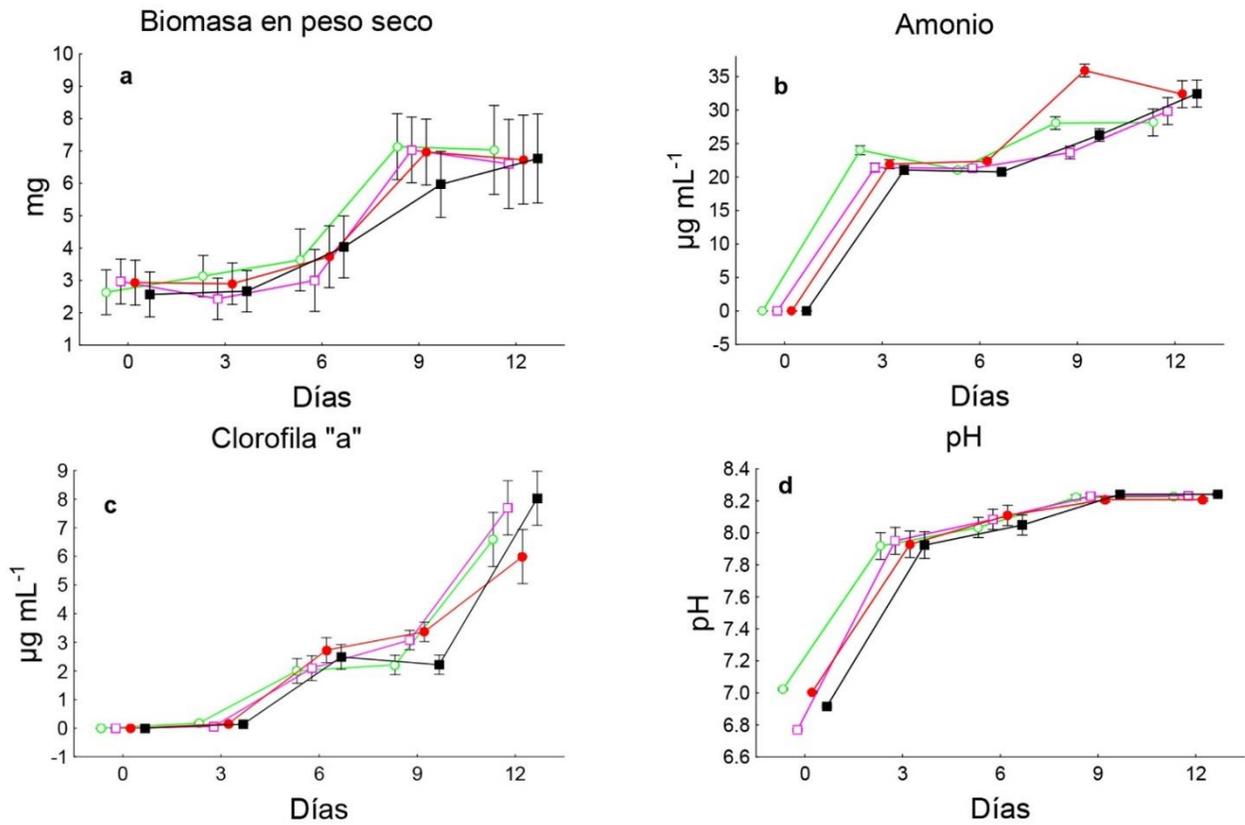


Figura 8. a) Biomasa en peso seco. b) Concentración de amonio. c) Clorofila "a". d) Medición de pH de Fischerella TB22. T1= (○) Ajuste de pH, T2= (□) Ajuste de volumen de medio BG11⁰, T3= (●) Ajuste de pH y volumen de medio BG11⁰, T4= (■) control sin ajustes.

Los resultados de DO (Fig. 9) demostraron una tendencia muy similar a la biomasa en peso seco. La sonicación ayudó a homogenizar el inóculo además de separar algunas células encadenadas, facilitó las mediciones por espectrofotometría como lo afirman Siller-Ruiz *et al.*, (2017). Se encontró una relación positiva entre la medición de absorbancia y el peso seco según se muestra en la Fig. 10 ($y = 0.022 e^{0.048x}$, $R^2 = 0.948$). Lo que indica que se puede relacionar el peso seco con la DO.

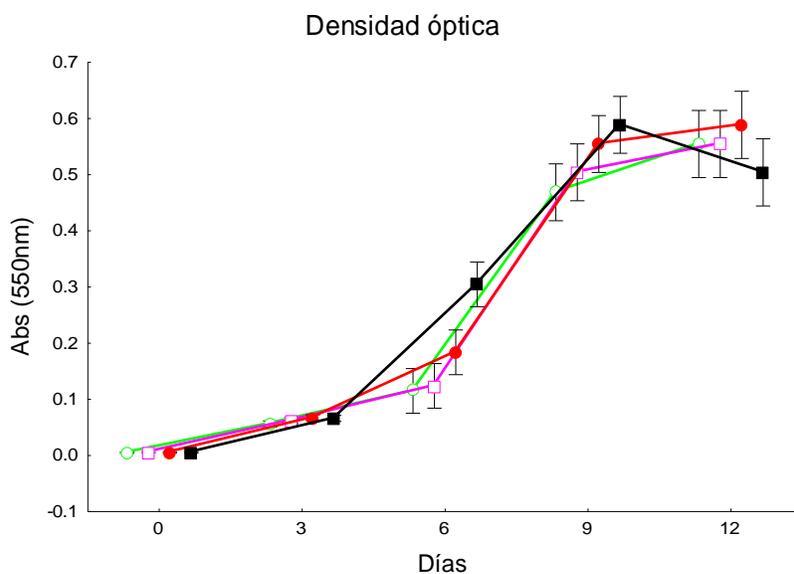


Figura 9. Densidad óptica de *Fischerella TB22*. T1= (○) Ajuste de pH, T2= (□) Ajuste de volumen de medio BG11⁰, T3= (●) Ajuste de pH y volumen de medio BG11⁰, T4= (■) control sin ajustes.

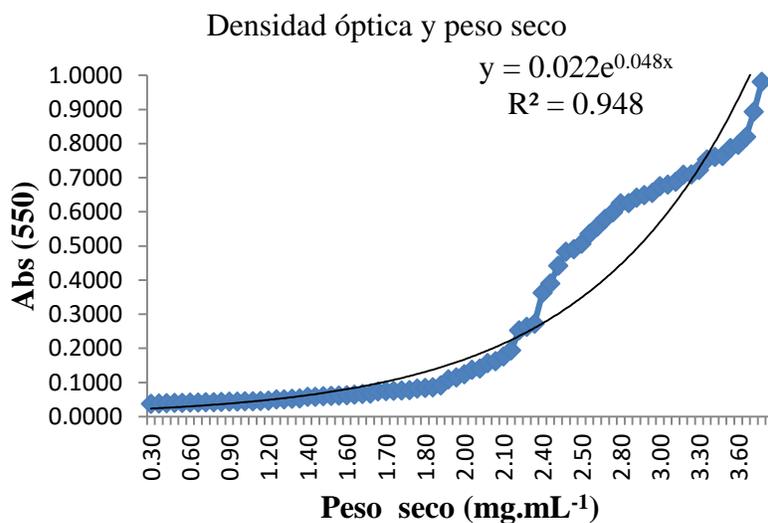


Figura 10. Relación entre la DO y BPS de *Fischerella TB22*.

En un periodo similar de 12 a 15 días de cinética con consorcios de cianobacterias, Ramírez-López (2009) y Alonso-Santos *et al.* (2015), obtuvieron resultados similares (Tabla 5), las diferencias en las variables evaluadas se atribuyen a que hubo diferentes géneros en las cepas evaluadas, en este trabajo se utilizó únicamente a *Fischerella TB22* aislada.

Tabla 5. Comparación de resultados de trabajos donde utilizaron cianobacterias.

	pH	Biomasa (mg)	DO (abs)	CLa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	NH₄⁺ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ramírez-López, 2009 *	6.8 \pm 0.10	8.12 \pm 0.05	0.4 \pm 0.01	10.42 \pm 0.63	34.5 \pm 4.6
Alonso-Santos <i>et al.</i> , 2015 *	N/A	5.8 \pm 0.1	N/A	4.12 \pm 0.95	12.70 \pm 3.8
En este trabajo	8.22 \pm 0.01	6.95 \pm 0.61	0.4 \pm 0.09	7.7 \pm 0.94	30.7 \pm 2.08

*Utilizaron consorcios de cianobacterias

7.7 Conclusiones

El crecimiento de *Fischerella* TB22 mostró un patrón típico de crecimiento bacteriano. El noveno día de crecimiento de *Fischerella* TB22 en fase exponencial es el mejor para la aplicación como biofertilizante ya que tiene su máxima producción de amonio. Recuperar el volumen y mantener el pH como al inicio no afectó su desarrollo durante el cultivo. Las cianobacterias mantuvieron su crecimiento óptimo en el rango del pH de 6.8 y 8.2. La sonicación ayudó a homogenizar el inóculo y facilitó las mediciones por espectrofotometría.

8 Capítulo 2. Modelo molecular de biocompositos (alginato, acrilato y quitosano) para su uso en la encapsulación de cianobacterias

8.1 Introducción

El uso de microorganismos en el área ambiental (bioremediación) y agrícola (biofertilizantes), promotores de crecimiento, solubilizadores, etc. se basa principalmente en incorporar a los microorganismos libres a la matriz (suelo, agua y aire) para que lleven a cabo su actividad; sin embargo, los microorganismos están expuestos a factores ambientales y biológicos (predación, competencia), que afectan su supervivencia (Schoebitz *et al.*, 2013), lo cual representa la principal limitante en el éxito de esta tecnología (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012). La inmovilización y encapsulamiento de células microbianas les proporcionan un microambiente, las protege de factores de estrés biótico y abiótico, permitiendo una vida útil más prolongada y el mantenimiento de la actividad metabólica durante largos períodos de tiempo, no solo durante el almacenamiento sino también después de la aplicación (Vemmer y Patel, 2013). Estudios han demostrado que el material adecuado para la elaboración de cápsulas son polímeros de fuentes naturales, debido a su característica de ser biodegradables, biocompatibles y no tóxicos (Jun-Yee *et al.*, 2016). El alginato de calcio es el polímero más usado, contiene bloques de residuos de (1,4) β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G), es de fácil preparación, bajo costo y no tóxico, además, tiene nanoporos de entre 5 a 200 nm y son hidrofílicos, lo que los hace adecuados para encapsular moléculas grandes o materiales hidrófobos con altas eficiencias, generalmente superiores al 90 % (Jun-Yee *et al.*, 2016). Diversas investigaciones se han centrado en la elaboración de capsulas utilizando un solo polímero (e.j. alginato, agar, quitosano, etc.), aunque en años recientes se han fabricado capsulas multicapa basados en biopolímeros, como el quitosano y el alginato, que podrían usarse como portadores de cultivos celulares y como matriz para el control de la liberación de moléculas debido a las distintas barreras físicas (He *et al.*, 2017). El acrilato es otro polímero, contiene grupos hidrofílicos como $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ (Glowinska *et al.*, 2019), por lo cual presenta una alta capacidad de absorción de agua de varios cientos de veces de su propio peso (Chen *et al.*, 2016).

Como se mencionó, el alginato es el biopolímero más utilizado, sin embargo, presenta la desventaja de tener una baja resistencia mecánica y ser susceptible a la biodegradación (de-Bashan y Basahn, 2010), por lo tanto, su uso y aplicación en pruebas de campo (biofertilización) no es adecuado. La combinación de varios polímeros es una opción que ayude a mejorar las propiedades físicas del encapsulado y poder aplicarlos al suelo, donde se espera mejore la capacidad de retención de humedad en el suelo, promuevan un crecimiento óptimo de las plantas y mejoren la actividad biológica del suelo. La modelación molecular a nivel estructural puede predecir el comportamiento y estabilidad de moléculas y compuestos, proporcionar información que pueda ser utilizada para tomar decisiones antes de hacer las pruebas en laboratorio.

8.2 Hipótesis

La estabilidad de las combinaciones entre polímeros no afectará la interacción y encapsulación de la cianobacteria.

8.3 Objetivo

Analizar la estabilidad molecular de la combinación de los polímeros alginato de sodio (ALG), acrilato de potasio (ACR) y quitosano (CHI) y su interacción con la cianobacteria *Fischerella sp.*

8.4 Materiales y métodos

8.4.1 Obtención de estructuras para modelado molecular

Las estructuras moleculares de los polímeros encapsulantes fueron obtenidas de la base de datos PubChem (Kim, 2019) de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) ALG, ACR y CHI, por la disponibilidad de datos que permite una comparación completa de modelos (Butkiewicz *et al.*, 2013). La unidad repetida del alginato (Fig. 11) es un polímero natural que consiste en unidades de copolímeros lineales de β -(1-4) enlazado D-ácido manurónico (M) y β -(1-4)-enlazado L-ácido galurónico. A continuación la estructura de la unidad repetida

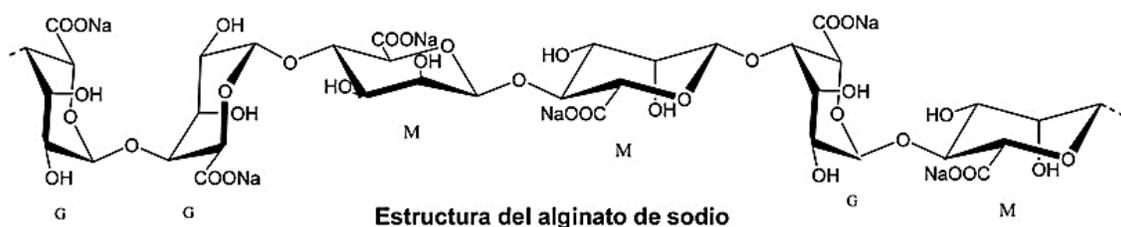


Figura 11. Estructura química del Alginato de sodio. (Mares, 2017)

Mientras que el poliacrilato de potasio es una sal del ácido poliacrílico (Fig. 12), que es un polímero vinílico soluble en agua y tiene la siguiente fórmula de la unidad repetida.

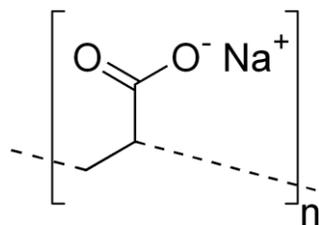


Figura 12. Estructura química del Acrilato de potasio (Valderrama, 2016).

En el caso del quitosano (Fig. 13), su unidad repetida es la que se muestra a continuación:

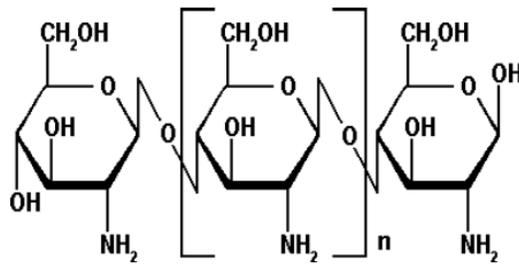


Figura 13. Estructura química del Quitosano (Mármol *et al.*, 2011).

Aunque realmente es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β-(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). En realidad también es un co-polímero como el alginato. La fórmula para representar este polímero incluye la consideración del grado de desacetilación, y se puede considerar quitosano cuando el grado de desacetilación (DD) es mayor a 50 %, aunque en la práctica los DD suelen ser mayores a 70 % (cuando el biopolímero puede disolverse en una solución acuosa ácida). También se obtuvo un fragmento de estructura de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de proteína de *Fischerella sp.* para obtener las interacciones con los polímeros (Fig. 14) elaborada por Kim *et al.* (2013).

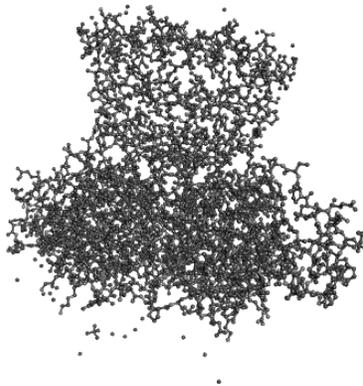


Figura 14. Estructura molecular de un fragmento de estructura de DNA de la proteína de *Fischerella sp.* (Kim *et al.*, 2013)

Para realizar el modelado de la estabilidad de las moléculas, peso, área polar, volumen y orbitales frontera HOMO y LUMO, se utilizó el software Spartan'16 (Spartan@, 2016). Los puentes de hidrógeno se obtuvieron con el software Biovia Discovery Studio 4.5 (BIOVIA, 2015). Debido a que el ALG ya ha sido utilizado como inmovilizador de microorganismos (Yabur *et al.*, 2007; Villena *et al.*, 2009; López *et al.*, 2012; Sosa-del Castillo *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018), se manejaron combinaciones de polímeros utilizando su peso molecular y el ALG como matriz: ALG-ACR (1:1, 1:2, 1:4, 1:6), ALG-CHI (1:1, 2:1, 4:1), ALG-ACR-CHI (1:1:1, 1:4:1, 2:8:1), cada polímero por separado y el fragmento de DNA de la proteína de *Fischerella sp.*

8.5 Resultados y discusión

Los valores obtenidos (Tabla 6) de los orbitales frontera HOMO y LUMO del CHI coinciden con los datos reportados por Upma y Mohan (2015) y Medhat *et al.* (2010), también Flores-Belmont y Jimenez-Munguia (2013) han demostrado la biocompatibilidad del CHI con distintos compuestos bioactivos y también como agente estabilizador según Collado-González *et al.* (2017) ya que este polímero evita la agregación que tiene lugar cuando aumenta la fuerza iónica del medio.

Tabla 6. Resultados obtenidos entre los orbitales frontera HOMO-LUMO de los monómeros y polímeros en Spartan. *Moléculas estables.

	Peso (g/mol)	Área polar (Å)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Hueco HOMO-LUMO
ALG*	216.121	169.93*	-10.1	0.16	10.26*
ACR*	110.153	95.76*	-8.73	-0.36	8.37*
CHI	1526.4.64	1232.88	2.8	3.8	1
ALG+ACR*	326.274	256.24*	-9.9	0.37	10.27*
ALG+ACR+CHI	1852.738	1580.28	2.2	2.5	0.3

Los valores obtenidos del hueco HOMO-LUMO de los polímeros de ALG (10.26), ACR (8.37) y ALG + ACR (10.27), coinciden con Angulo-Cornejo y Tovar (2014). Streitwieser, (2013) afirma que cuando el

resultado obtenido es mayor que cero, es decir, cuanto más grande es la diferencia entre el valor de HOMO y LUMO, las moléculas presentan una mayor estabilidad estructural y cinética. Por otro lado, a medida que el resultado del espacio HOMO-LUMO es cercana a cero, el sistema es poco estable y altamente reactivo (Whangbo *et al.*, 2015), lo anterior está relacionado con los datos obtenidos del área polar de los polímeros y la formación de los biocompositos, ya que a menor área polar mejor estabilidad molecular.

Los monómeros y polímeros estables de las combinaciones de ALG y ACR, demostraron capacidad de aceptar electrones en un 75% (Fig. 15) según se obtuvo en el BIOVIA Discovery Studio, esta propiedad deriva directamente de las características estructurales de la conformación abierta o cerrada que adquiere la estructura durante la interacción entre polímeros, dependiendo de la polaridad del medio (González-Albaldalejo *et al.*, 2015).

Los enlaces de los puentes de hidrógeno son mucho más fuertes que los de Van der Waals y, aunque son más débiles que los covalentes, al tomar en consideración un elevado número de ellos entre las cadenas poliméricas, resultan en mayor fuerza de atracción en los polímeros que los presentan (Coreño-Alonso y Méndez-Bautista, 2010). Por consiguiente, los enlaces de hidrógeno que formaron estructuras con las proteínas de *Fischerella sp.*, (Fig. 16) a través de la interacción con los grupos amino de la cianobacteria (Markovitch y Agmon, 2008); por lo tanto, ALG y ALG + ACR podrían ser utilizados como encapsulantes de cianobacterias, además promoverá que las moléculas de agua se atraigan entre sí con gran facilidad, debido a que la estructura del agua favorece las interacciones para formar puentes de hidrógeno y así mantener la hidratación de los polímeros.

Los polímeros de ALG y ACR mostraron estabilidad al reportar 10.26 y 8.37 respectivamente en el hueco HOMO-LUMO y puentes de hidrógeno disponibles en un 90 y 80%, según se obtuvo en el BIOVIA Discovery Studio, para interactuar con los grupos amino de la proteína de la cianobacteria.

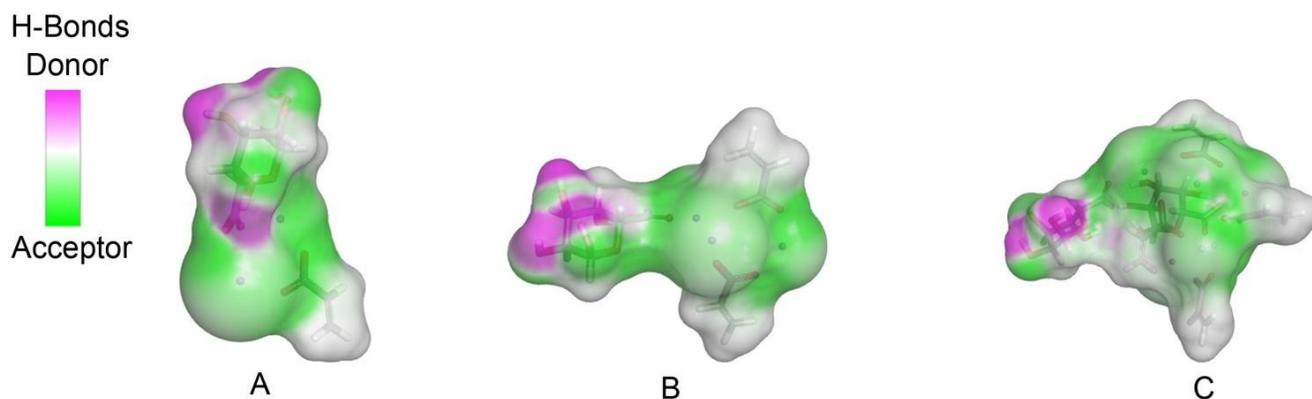


Figura 15. Estructuras estables obtenidas del modelado estructural de ALG y ACR: A (1:1), B (1:2) y C (1:4).

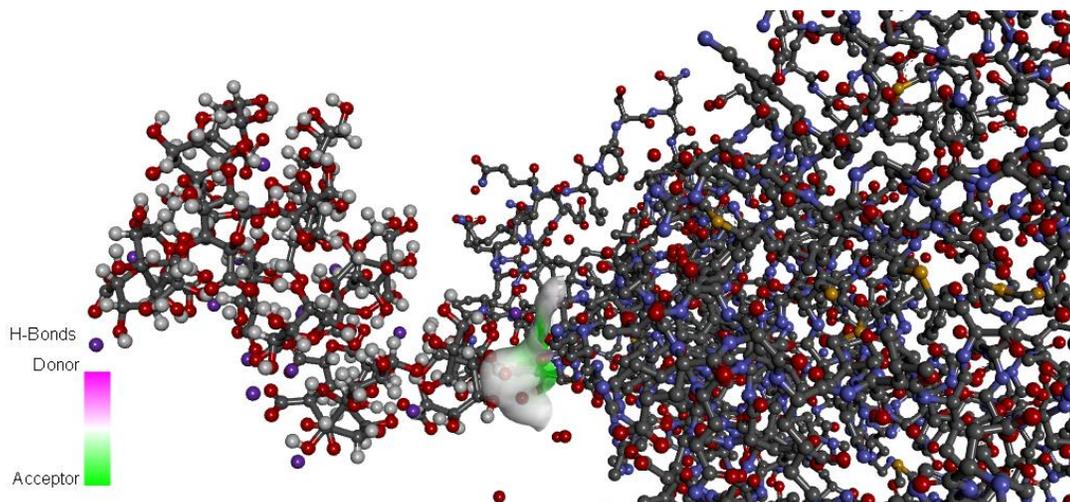


Figura 16. Zona de interacción entre polímero de ALG (Izq.) y el fragmento de proteína de *Fischerella sp* (Der.) por medio de puentes de hidrógeno entre el polímero y los grupos amino de la proteína de las cianobacterias.

Estudios actuales confirman la utilización del ALG como buen encapsulante en la industria alimenticia y de sustancias activas para diversos usos (Cavalheiro *et al.*, 2015; Cortez *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2016). En la interacción ALG-ACR-CHI (2:0.5:1), la diferencia entre HOMO y LUMO es 0.3, por lo tanto, esa formulación es inestable, al igual que utilizar solo CHI, por ello algunos investigadores proponen utilizar estructuras de CHI modificado con ALG aprovechando la estabilidad en la molécula (Herrera *et al.*, 2016). Las formulaciones propuestas de ALG, ACR y ALG + ACR (1:4) fueron las que obtuvieron mejores resultados en la modelación estructural.

8.6 Conclusiones

Las propuestas de los polímeros ALG, ACR y ALG+ACR (1:4), pueden ser considerados un buen medio para la supervivencia de cianobacterias y otros microorganismos debido a la estabilidad de la estructura y la interacción en los puentes de hidrógeno de los polímeros con los grupos amino de *Fischerella sp.*, estos enlaces intermoleculares podrían promover que las moléculas de agua se atraigan entre sí con gran facilidad y así mantener hidratados los encapsulados.

9 Capítulo 3. Microencapsulación de *Fischerella TB22* con polímeros biodegradables para mejorar su aplicación como biofertilizante

9.1 Introducción

El nitrógeno (N) es el elemento más importante en los fertilizantes, en función de la energía requerida para su síntesis, el tonelaje utilizado y el valor monetario (DeRosa *et al.*, 2010). La importancia del N para la agricultura está asociada, a la función clave como un nutriente para la producción de alimentos, biomasa y fibra. Sin embargo, actualmente más de la mitad del N agregado a las tierras de cultivo, como fertilizantes químicos, se pierde en el medio ambiente, desperdiciando el recurso, produciendo amenazas para el aire, el agua, el suelo y la biodiversidad, lo que lleva a la degradación del suelo, las emisiones de gases de efecto invernadero, la contaminación por nutrientes, y eutrofización (Lassalleta *et al.*, 2014; Zhang, 2017). Una alternativa potencial y amigable con el medio ambiente a los fertilizantes químicos sintéticos son los fertilizantes de origen orgánico, como el estiércol y los residuos de cultivos (Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, dado que algunos de los macro y micronutrientes esenciales pueden no estar disponibles en las cantidades requeridas para este tipo de fertilizantes, su aplicación en cultivos de alto rendimiento es limitada (Wuang *et al.*, 2016). En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar estrategias de gestión de nitrógeno más sostenibles desde el punto de vista ambiental que mejoren la eficiencia de uso de la planta sin comprometer los rendimientos de los cultivos y reducir el impacto ambiental de la aplicación de fertilizantes.

Los biofertilizantes son una alternativa para reducir la aplicación de fertilizantes químicos y estas conformados en su mayoría por microorganismos como las microalgas, bacterias y hongos que colonizan la rizosfera o el interior de las plantas promoviendo la germinación y el crecimiento de las plantas, lo que aumenta la productividad (Vessey, 2003; Raposo y Morais, 2011; Mahanty *et al.*, 2017). En los cultivos, los biofertilizantes tienen el potencial de aumentar el rendimiento al aumentar la disponibilidad de nutrientes a través de la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato y la eliminación de hierro, lo que induce la producción de sustancias promotoras del crecimiento que tienen un efecto directo sobre el tamaño de la planta, el peso y la longitud de las raíces y hojas (Gupta *et al.*, 2013; Mahanty *et al.*, 2017). Las cianobacterias (algas

verde-azules) no solo se han utilizado como biofertilizantes, sino también en otras aplicaciones en la agricultura, como agentes de control biológico y suplementos nutricionales utilizando la biomasa de cianobacterias (Gupta *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el uso de cianobacterias estimula y promueve el crecimiento de las plantas, ya que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y liberarlo como amonio (Gupta *et al.*, 2013; Prasanna *et al.*, 2013). Tripathi *et al.* (2008) encontraron una mejora significativa en el crecimiento de las plantas de arroz que crecen en suelos modificados y mejorados utilizando cianobacterias como biofertilizante. Del mismo modo, Saadatnia y Riahi (2009) informaron una germinación más rápida de semillas de arroz tratadas con cianobacterias.

Fischerella sp. se ha utilizado particularmente en sembradíos de arroz (Venkatachalam *et al.*, 2016) y cultivos de maíz (Trujillo-Tapia y Ramírez-Fuentes, 2010), estos estudios han demostrado reducir hasta un 50% el uso de fertilizantes químicos sin cambiar los requisitos de nitrógeno de los cultivos. Sin embargo, cuando *Fischerella sp.* están expuestos al medio ambiente, sus acciones están limitadas por las condiciones ambientales y del suelo, incluida la temperatura, el pH, la radiación solar y la disponibilidad de agua, lo que también limita sus amplias aplicaciones en cultivos agrícolas (Trujillo-Tapia y Ramírez-Fuentes, 2015). La encapsulación surge como un método para superar estos obstáculos. Se han estudiado diferentes tipos de polímeros sintéticos y naturales para producir microcápsulas para una liberación controlada y una vida útil prolongada de su contenido (Rojan *et al.*, 2011). Se han utilizado múltiples polímeros para encapsular microorganismos vivos, incluidos alginato, agarosa, poliacrilatos, alcohol polivinílico, quitosano, entre otros, en función de su capacidad para contribuir a la función del microorganismo, el transporte de nutrientes y la tasa de supervivencia general (Schoebitz *et al.*, 2013; Koziel *et al.*, 2019). Además, las partículas poliméricas deben tener una estabilidad mecánica adecuada para el almacenamiento y la actuación a largo plazo en el campo durante el cultivo. Entre varios polímeros naturales aplicados en la producción de microcápsulas semipermeables, el alginato (ALG) que es uno de los polímeros naturales más ampliamente estudiados y aplicados con éxito para la encapsulación de microorganismos (Rojan *et al.*, 2011; Trejo *et al.*, 2012; Koziel *et al.*, 2019). El ALG es una matriz altamente versátil utilizada para proteger y mejorar el suministro

y la absorción de componentes activos, células y microorganismos sensibles al calor, pH y oxígeno (Goh *et al.*, 2012), incluidos los usos en la inmovilización de organismos benéficos para el tratamiento de aguas residuales, así como promotores del crecimiento de las plantas (López *et al.*, 2017). El ALG es un copolímero lineal extraído de diferentes tipos de algas que consisten en residuos de β -D-manuronato y α -L-guluronato, (Martín *et al.*, 2015). Los cationes divalentes, especialmente el calcio (Ca_2^+), están involucrados en la formación de enlaces iónicos entre los residuos de α -L-guluronato, promoviendo la reticulación del polímero y originando la estructura semipermeable (Goh *et al.*, 2012; Schoebitz *et al.*, 2013).

El quitosano (CHI) es otro polímero natural muy aplicado para la encapsulación de componentes activos. El CHI se obtiene por la desacetilación de la quitina, que es un polisacárido que se encuentra en las conchas de crustáceos, insectos y hongos (Zou *et al.*, 2016). El CHI es conocido por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y efecto antimicrobiano. Además, su característica catiónica en medios ácidos y neutros a partir de la protonación de sus grupos amino que proporciona al CHI propiedades únicas, como efecto antimicrobiano, bioadhesivo, bioestimulante y propiedades sensibles al pH (Pola *et al.*, 2019). En agricultura, el CHI se ha utilizado como agente de biocontrol contra hongos (Ziani, 2010), bioestimulante para estimular el crecimiento de las plantas (Burrows *et al.*, 2007) y para obtener respuestas de defensa en las plantas (Chamnanmonoontham *et al.*, 2015), lo que resulta en mayores rendimientos y mayor esperanza de vida de los cultivos (Kashyap *et al.*, 2015). Los polímeros superabsorbentes (SAP) son polímeros hidrófilos con la capacidad de absorber y retener grandes cantidades de agua. Debido a sus excelentes propiedades, los SAP ya están bien establecidos en diversas aplicaciones, como pañales desechables, servilletas higiénicas, cemento, sistemas de suministro de medicamentos y agricultura (es decir, acondicionamiento de la humedad del suelo, retención de agua en el suelo, liberación controlada de agroquímicos) (Kabiri *et al.*, 2011). Los SAP sintéticos son favorables debido a su rendimiento superior, como la alta resistencia del gel, la capacidad de hinchamiento y la tasa de hinchamiento adecuadas, la resellable durabilidad, así como su bajo precio con los SAP basados en ácido acrílico y acrilamida como los más comunes (Zohuriaan-Mehr y

Kabiri, 2008; Kabiri *et al.*, 2011). Los SAP biodegradables, como el poliacrilato de potasio (ACR) aumentan la capacidad de retención de agua del suelo y disminuyen el estrés por sequía para las plantas, mejorando en consecuencia la tasa de supervivencia de los árboles jóvenes, acelerando el crecimiento de las plantas y aumentando el rendimiento (Wilske *et al.*, 2014). Por lo tanto, la combinación de polielectrolitos, como el CHI, y superabsorbentes como el ACR con la porosidad y estabilidad del ALG, podría mejorar la estabilidad de ALG, la liberación de componentes activos, la capacidad de retención de agua y el mantenimiento del crecimiento de cianobacterias y la tasa de supervivencia general a través de la respuesta sensible al pH de CHI y la retención de agua por las propiedades del ACR. Pocos estudios han informado sobre el uso de partículas de ALG por ejemplo para encapsular microalgas *Chlorella vulgaris* para la enmienda del suelo (Raposo y Morais, 2011; Koziel *et al.*, 2019); sin embargo, no hay informes sobre la encapsulación de Fischerella TB22 y su aplicación como biofertilizante. Además, según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que utiliza partículas de ALG con CHI y ACR para encapsular microalgas para la liberación controlada de fertilizante.

9.2 Hipótesis

Los diferentes encapsulados ayudan al crecimiento de las cianobacterias y a la liberación de amonio, la aplicación de estos estimula un mejor crecimiento en plantas de espinaca y tomate.

9.3 Objetivo

Evaluar diferentes encapsulaciones para *Fischerella TB22* utilizando ALG en combinación con ACR y CHI, para mejorar la producción de amonio y su uso como biofertilizante en cultivo de espinaca y tomate.

9.4 Materiales y métodos

9.4.1 Cultivo de *Fischerella* TB22

La cepa *Fischerella* TB22 (FIS) se obtuvo de la colección de microalgas del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Mar. Se preparó el medio de cultivo BG11⁰ (Tabla 7.) (Rippka *et al.*, 1979). Las cianobacterias se suspendieron en medio de cultivo BG11⁰ y se mantuvieron en aireación constante con un flujo de 4 L.min⁻¹, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 40 días a 28 °C. La irradiación aplicada fue de 5000 ±100 lux con 2 lámparas de luz blanca de 35 voltios.

Tabla 7. Componentes del medio de cultivo BG11⁰ (Rippka *et al.*, 1979).

Componente	g L ⁻¹ (H ₂ O)
NaCl ₂	23
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	40
MgSO ₄ • 7H ₂ O	75
CaCl ₂ • 2H ₂ O	36
Ácido Cítrico	6
Citrato férrico de amonio	6
MgNa ₂ EDTA • H ₂ O	1
Na ₂ CO ₃	20
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ • 4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.22
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.08
CoCl ₂	0.05

9.4.2 Síntesis de microcápsulas de *Fischerella TB22*.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 5 tratamientos y 3 repeticiones en medio de cultivo BG11⁰, que consistió en cultivo de FIS en forma libre (T1, control), FIS en matriz con ALG (T2), FIS ALG con película de CHI (T3), FIS en matriz con ALG y ACR con película CHI (T4) y FIS en matriz con los 3 polímeros (T5). Las microcápsulas se sintetizaron utilizando el procedimiento descrito por Bashan (1998) (Figura. 17). Se preparó una solución de alginato de sodio de calidad alimentaria (Sigma-Aldrich) al 2% de concentración en agua destilada esterilizada manteniéndola en constante agitación hasta que se formó una solución uniforme. Posteriormente, se añadió el cultivo de *Fischerella TB22* al 1% (p/v) en todos los tratamientos. La solución de alginato se colocó en un embudo de separación y se vertió en una solución de cloruro de calcio (CaCl₂) al 5% (p/v) bajo agitación constante. Una vez que se formaron las microcápsulas, se dejaron en la solución de CaCl₂ durante 1 minuto, se extrajeron de la solución y se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de CaCl₂. Para el recubrimiento de la cápsula de ALG con CHI (T3), se preparó inicialmente una solución de quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich) al 0,4% (p/v). El pH se ajustó a $6 \pm 0,5$ con NaOH 1M. Se filtró en papel filtro Whatman # 4 y se esterilizó en una autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Posteriormente, se sumergieron 15 g de microcápsulas de alginato para recubrir en 100 ml de quitosano, se mantuvo durante 40 min en un agitador orbital a 100 rpm (Krasaekoopt y Watcharapoka, 2014). Para la encapsulación de ALG y ACR con película de CHI (T4), la solución de alginato se preparó al 2% (p/v), a la que se añadió 0,2% de ACR (p/v), siguiendo la técnica de revestimiento antes mencionada (T3). Para la matriz encapsulada de ALG, ACR y CHI (T5), se preparó la solución de alginato al 2% (p/v), luego se añadió acrilato de potasio al 0,2% (p/v) y quitosano al 0,4% (p/v).

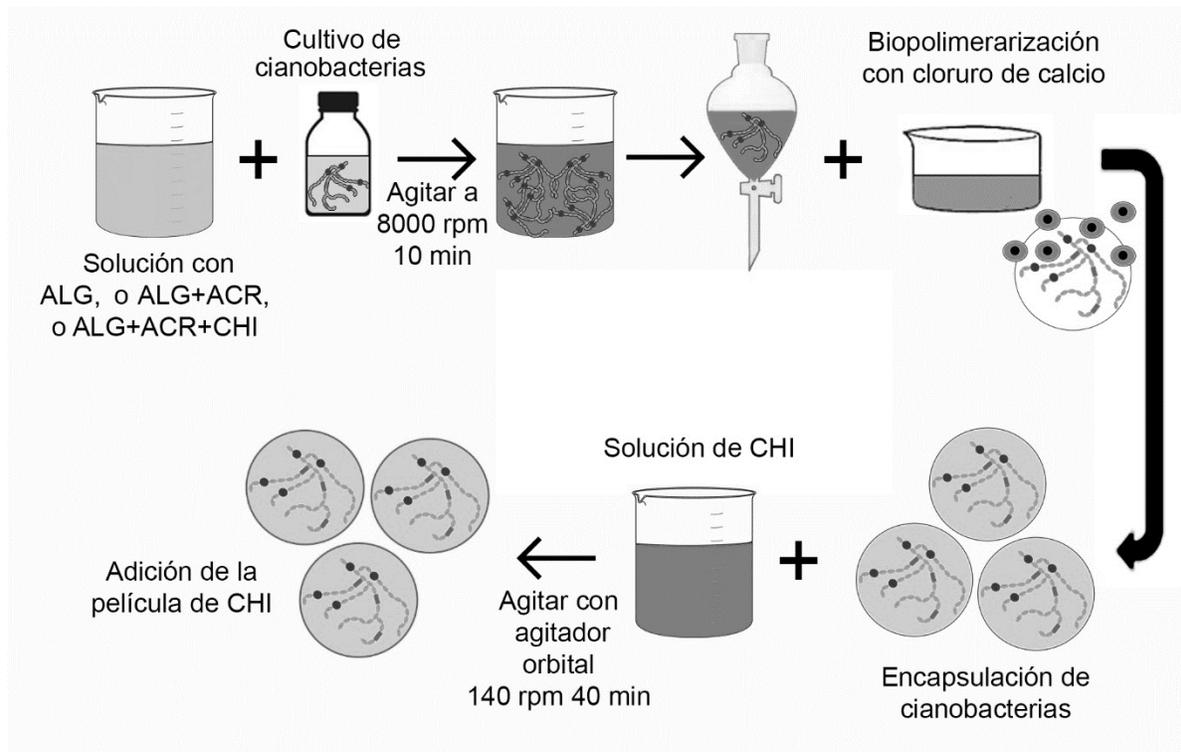


Figura 17. Proceso para la microencapsulación de *Fischerella TB22* (Elaboración propia).

9.4.3 Caracterización de microcápsulas

Para medir el tamaño de microcápsula y el peso seco, se tomaron 15 g de microcápsulas de cada tratamiento, el tamaño de la microcápsula se midió con un vernier Mitutoyo 530 y se pesó en una balanza analítica de precisión Velab (modelo VE-303), se pesaron al minuto 0, 30, 60, 120 y 2100 a 25 °C. Para la fuerza de compresión, se tomaron 5 microcápsulas de cada tratamiento los días 0, 10, 20, 30 y 40, la fuerza de compresión se midió en un analizador de textura Stable Micro Systems (modelo TA-XT2i) y una sonda plana de 3 cm de diámetro, se aplicó una fuerza de deformación de 0.981 N a una velocidad de desplazamiento de 1 mm.s⁻¹ a una compresión del 20%.

9.4.4 Crecimiento de *Fischerella TB22* encapsulada

El crecimiento de la cianobacteria se determinó por su peso seco (biomasa) siguiendo el procedimiento descrito por Shabana et al. (2017). Se analizaron 15g de microcápsulas de cada tratamiento el día 0, 10, 20, 30 y 40; las muestras se disolvieron en una solución de 10 ml de bicarbonato de sodio al 4% (p/v) durante 24 horas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y las muestras se diluyeron a 10 ml con agua destilada, este procedimiento se repitió 3 veces. A continuación, las muestras se colocaron en filtros de 40 mm de diámetro (Whatman) con una abertura de poros de 5-8 μm , que se enjuagaron con agua acidificada a pH de 4 antes de colocarse en un horno a 70 °C durante 24 horas. Se registró el peso inicial y final del filtro; el peso seco de la biomasa se obtuvo por diferencia de peso.

9.4.5 Cuantificación de amonio

La cuantificación de amonio se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en APHA (1992). Se evaluaron 5 ml del medio de cultivo BG11⁰ de cada tratamiento los días 0, 10, 20, 30 y 40. Las muestras se centrifugaron a 4800 g (RDF) durante 10 minutos. Luego se adicionaron, 50 μL de MnSO_4 (50% p/v), 0.5 mL de NaClO (25% p/v) y 0.6 mL de fenato (10% (p/v)), se agitó usando un vortex y se dejó reposar durante 10 minutos. A continuación, se leyeron las absorbancias de las muestras a 630 nm usando un espectrofotómetro UV-Visible (Evolution 60s, Thermo Fischer Scientific). Se preparó una curva de calibración de amonio utilizando 0,389% (p/v) de NH_4Cl anhidro (J. T. Baker) con un rango de 10 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_3 ($R^2 = 0.99$), esta prueba tiene una sensibilidad de 10 a 500 $\mu\text{g NH}_3\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$.

9.5 Aplicación de microcápsulas durante el crecimiento de la plantas de espinaca y tomate.

9.5.1 Experimento con plantas de espinaca (*Spinacia oleracea*)

Se germinaron 36 plantulas de *Spinacia oleracea* (variedad Viroflay), se trasplantaron en macetas de 1 kg en sustrato vegetal comercial (Miracle Gro). El riego fue constante de 100 ml por planta cada 3 días. Para los tratamientos con microcápsulas, se usaron 10 g del biofertilizante (*Fischerella TB22* encapsulada), y para el tratamiento con urea (46% N) se utilizaron 10 ml, esto por triplicado. Los tratamientos fueron: control sin aplicación de fertilización, FIS en forma libre (T1), FIS encapsulado con ALG (T2), FIS encapsulado en ALG con película de CHI (T3), y urea (T4). Estos tratamientos se aplicaron encima del sustrato. Después de 7 semanas, se midió tamaño de la raíz, tamaño del tallo con hojas y peso seco por planta de cada tratamiento.

9.5.2 Experimento con plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum*)

Se germinaron 25 plántulas de tomate híbrido marca SAKATA (*Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum*) y 25 de tomate criollo (Tomate riñón), posteriormente se trasplantaron en macetas de 2 kg con suelo de Santo Domingo de Morelos, Oaxaca. Se preparó cada maceta con 25 g de biofertilizante combinado (T1 y T2), 50 % de cada tratamiento en la zona radicular excepto al control. Como fertilizante químico se utilizó el Triple 18, contiene 18% de N, P y K. Se utilizaron 5 tratamientos con 5 repeticiones: T1: 100% (25ml) triple 18 (Control), T2: 100% (25g) de biofertilizante (*Fischerella TB22* encapsulada en alginato de sodio), T3: 100% (25g) de biofertilizante (*Fischerella TB22* encapsulada en alginato de sodio con película de quitosano), T4: 50% T2 (*Fischerella TB22* encapsulada en alginato de sodio) + 50% triple 18 y T5: 50% T3 (*Fischerella TB22* encapsulada en alginato de sodio con película de quitosano) + 50% triple 18, estos tratamientos se aplicaron en el sustrato, además, se adicionaron 10 ml de medio de cultivo filtrado donde crecieron las cianobacterias ($0.44 \pm 0.13 \text{ mg.L}^{-1}$ de NH_4^+) en aplicación foliar a partir de la 2da fertilización a todos los tratamientos excepto al control. Se realizaron las labores culturales del cultivo de tomate propuestas por SAGARPA (2014). Se evaluó altura de planta por semana, se midió desde la base del tallo hasta el ápice de la planta con un flexómetro. En fruto se evaluó, peso, volumen y °Brix. Para la determinación

de NH_4^+ (Arango y Pérez, 2005) se tomaron 10 g de suelo, se adicionaron 100 ml de solución de KCl 1,0 N, luego se agitó constantemente durante 10 minutos y se filtró. Después del filtrado se tomaron dos alícuotas, una de 50 ml para la determinación por electrodo de ion selectivo marca Intellical ISENH4181 y otra de 2 ml para la determinación por el método colorimétrico (azul de indofenol, Kempers, 1974).

9.6 Análisis estadístico

Todos los análisis experimentales se llevaron a cabo por triplicado como experimentos independientes. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis de medidas repetidas (ANOVA), cuando se encontró diferencias entre los diferentes tratamientos se realizaron pruebas de comparación *Pos-Hoc* de Tukey a un nivel de significancia de 0.05%. Todos los datos obtenidos fueron analizados con el software Statistica versión 7 (StatSoft).

9.7 Resultados y discusión

9.7.1 Microcápsulas

La figura 18 muestra imágenes de microcápsulas inoculadas en alginato (T2) a lo largo del tiempo, se observaron morfologías de microcápsulas similares y crecimiento de cianobacterias para los otros tratamientos. Similar a estudios anteriores, este estudio muestra que el alginato actúa como un agente adherente y protector que ayuda al crecimiento de las cianobacterias (Lee, 2013). Además de que *Fischerella TB22* pudo crecer dentro de las microcápsulas para todos los tratamientos.

Para demostrar que la película de quitosano se formó como la capa más externa de las microcápsulas, se preparó una suspensión de quitosano agregando un tinte rojo (colorante alimentario variado McCormick ©) y microcápsulas que contienen la película de quitosano (T3 y T4) se observaron bajo un microscopio óptico, que mostró que la película de quitosano midió un promedio de 0.30 ± 0.06 mm (Fig. 19).

El tamaño de las microcápsulas fue de $4 \pm 0,45$ mm para todos los tratamientos, lo que indica que la película de CHI añadida a T3, T4 y T5 no afectó significativamente el tamaño de las microcápsulas.

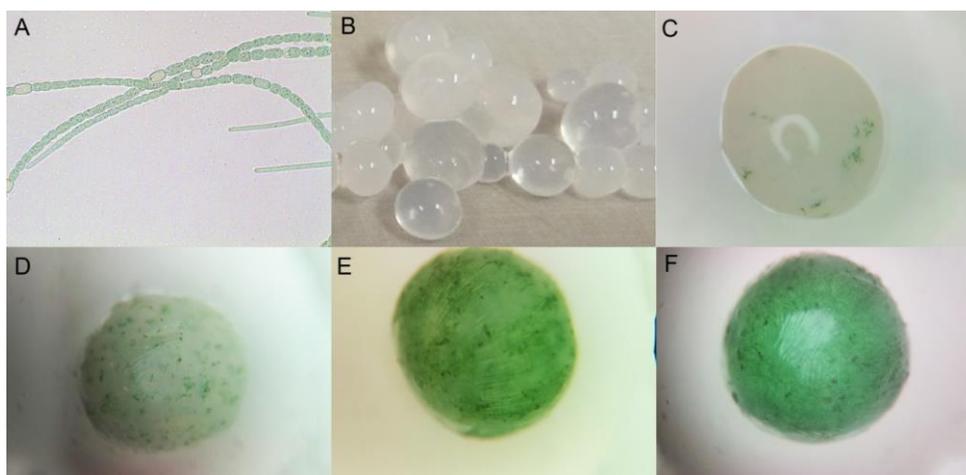


Figura 18. (A) *Fischerella TB22* antes de la inoculación, (B) Microcápsulas de alginato inoculadas con *Fischerella TB22* el día 0, (C) día 10, (D) día 20, (E) día 30 y (F) día 40.

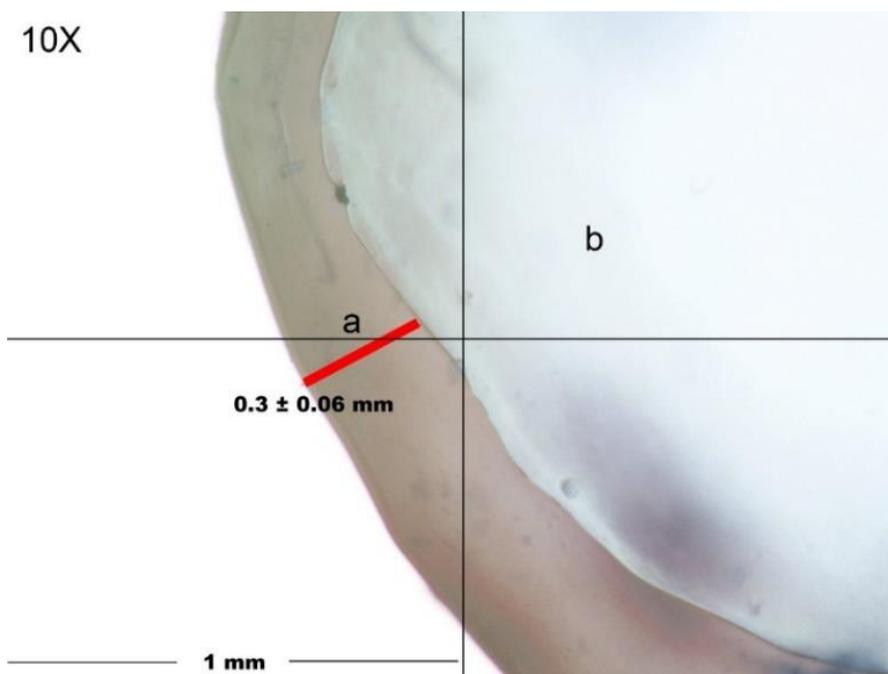


Figura 19. Microcápsulas de alginato con película de quitosano. a = película de quitosano, b = microcápsula de alginato.

Para el porcentaje de retención de agua ($96.7 \pm 0.55 \%$), no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{12, 64} = 0.28933$, $P = 0.98910$), pero si durante el tiempo inicial y final ($F_{9, 24} = 18.650$, $P = 0.00000$), los resultados obtenidos en peso después de 2100 min (0.5 ± 0.15 g). Los tratamientos que incluyeron ACR en su formulación demostraron una mejora significativa en la retención de agua en el momento de la preparación de la microcápsula, hasta 2 veces más que los tratamientos sin ACR (Fig. 20), esto se le atribuye a las propiedades físico-químicas del ACR, Brucker-Kelling (2017) afirma que el ACR en contacto con el suelo y la raíz de la planta reduce el consumo de agua en el riego y disminuye el estrés por sequía en las plantas. Sin embargo, no hubo diferencias entre los tratamientos después de 2100 min (Fig. 20), lo que mostró que todas las microcápsulas se secaron a la misma velocidad en condiciones ambientales (23 ± 2 °C y $55 \pm 4\%$ de humedad relativa). Los resultados de la fuerza de compresión de las microcápsulas húmedas no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos pero si durante el tiempo en minutos, alcanzando un promedio de 0.061 ± 0.004 N después de 20 días (Fig. 21), que es el resultado de las cianobacterias que han alcanzado la fase estacionaria. En consecuencia, esto no produjo más cambios en las propiedades mecánicas de las microcápsulas (solubilidad, extensibilidad y ruptura) esto se le atribuye a la estabilidad molecular mencionada por Rosales-Oballos (2012), que están relacionadas con la producción de biomasa de cianobacterias durante la fase de crecimiento. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a otros estudios que informaron microcápsulas a base de alginato. (Rodríguez-Huezo *et al.*, 2011) mostraron valores similares a los de este estudio con cápsulas de alginato gelificado (1% de ALG) y con un centro líquido obteniendo una fuerza de compresión de 0.49 ± 0.04 N y 0.21 ± 0.00 N. Sandoval-Castilla *et al.*, (2010) con mezclas de alginato (0.5 - 2% de ALG) y cápsulas de pectina obtuvieron resultados de 0.45 ± 0.0 N hasta 2.08 ± 0.20 N, en este trabajo, la dureza permaneció muy similar en todos los tratamientos de las cápsulas hidratadas después de 10 días y hasta 40 días con una fuerza de compresión de 0.6 ± 0.002 N, estos resultados con el uso de ALG, coinciden con lo dicho por Villada *et al.*, 2007, que la diferencia de dureza se ve afectada por la concentración total y la relación utilizada entre ambos biopolímeros.

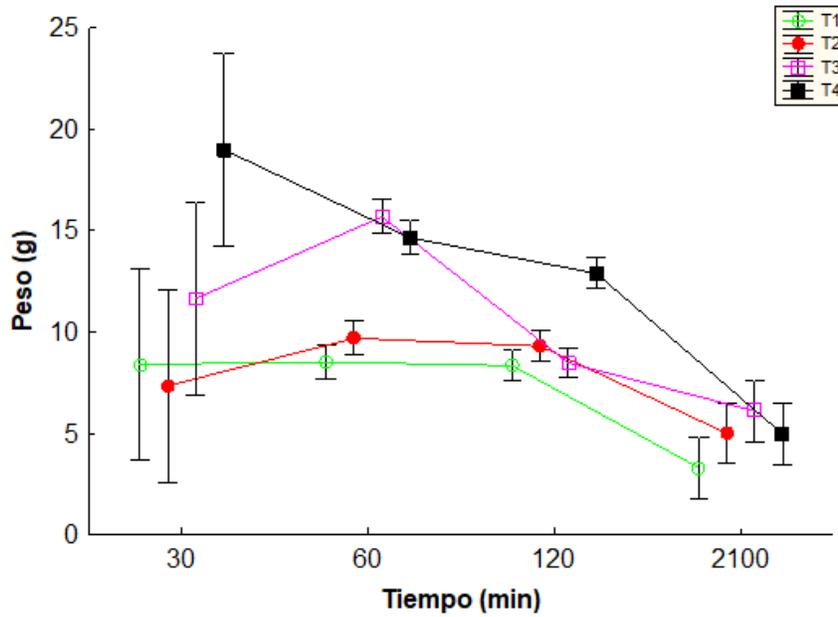


Figura 20. Peso (g) de microcápsulas a temperatura ambiente durante 2100 min para: T1 = ○ FIS encapsulado en ALG, T2 = ● FIS en ALG con película CHI, T3 = □ FIS en una matriz con ALG y ACR con película CHI y T4 = ■ FIS en una matriz con los 3 polímeros.

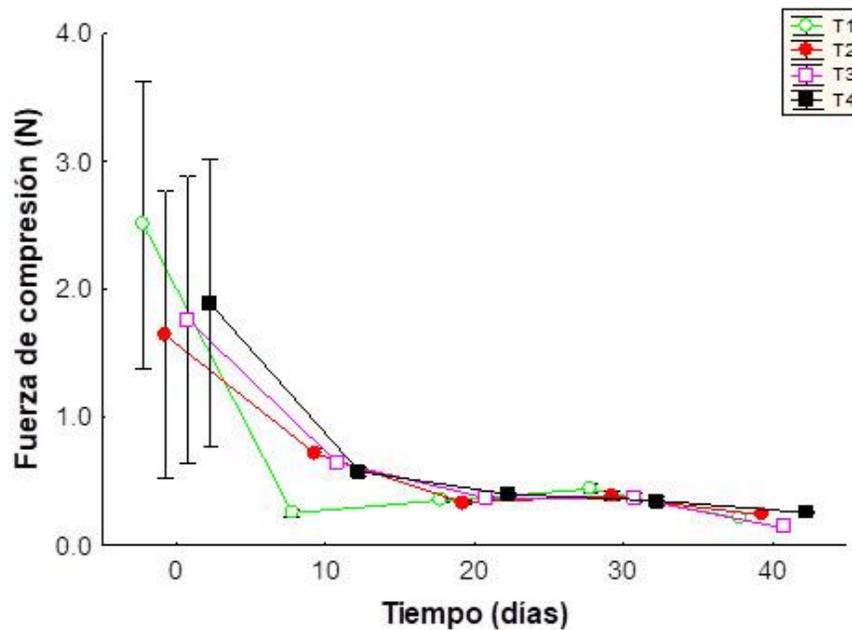


Figura 21. Fuerza de compresión (N) de T1 = ○ FIS encapsulado en ALG, T2 = ● FIS en ALG con película CHI, T3 = □ FIS en una matriz con ALG y ACR con película CHI y T4 = ■ FIS en una matriz con los 3 polímeros.

En el tiempo cero del experimento, el T1 tuvo la mayor fuerza con 2.6 N, a los 10 días las formulaciones con ACR y T2 con película de quitosano, la fuerza de compresión aumentó en un 115% en comparación con el T1, pero en los siguientes días de medición, se mantuvieron con la misma fuerza.

El calcio tiene la propiedad de reticularse con el ALG a través de enlaces de hidrógeno, lo que en consecuencia da lugar a películas con propiedades mecánicas mejoradas (Solano-Doblado *et al.*, 2018). Estudios previos mostraron que el uso de ALG a una concentración del 2% (p/v) favorece la microcápsula polimérica y proporcionaría efectos positivos significativos al encapsular un consorcio de bacterias (*Trichoderma harzianum*, *Rhodanobacter* sp. y *Arthrobacter* sp., entre otros) y hongos (*Azospirillum brasilense*, *Triticum* sp., *Vigna radiata*, *Gossypium* sp., entre otros), debido a las propiedades fisicoquímicas de los polímeros (Pacheco-Aguirre *et al.*, 2017).

Estos estudios previos confirman que el uso de ALG como matriz encapsulante mejora las propiedades de compresión mecánica de las microcápsulas, según lo observado por (Ponce *et al.*, 2006).

9.7.2 Cultivo de las cianobacterias

El crecimiento de *Fischerella TB22*, expresado en peso seco de biomasa mostró diferencia entre tratamientos ($F_{4,10} = 195.03$, $P = 0.0000$), fue mayor para T5 ($19.9 \pm 0.6 \text{ mg mL}^{-1}$), los demás tratamientos mostraron un comportamiento similar ($8.5 \pm 1.5 \text{ mg mL}^{-1}$), que fueron mayores que el valor informado por Alonso-Santos et al. (2015) de $5.8 \pm 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$, demostrando que la combinación de polímeros en este trabajo promovió el crecimiento de *Fischerella TB22*, especialmente por el CHI, el grupo amino que está presente en el CHI permite generar una atmósfera interna, se puede inferir que debido a la película añadida de CHI y a su característica estructural de polielectrolito catiónico, es capaz de interactuar con los polímeros y las cianobacterias a través de interacciones electrostáticas formando complejos iónicos estables con la consiguiente mejora en las propiedades mecánicas, esto reduce la deshidratación de las microcápsulas como lo afirman Bautista-Baños et al., (2018), mientras que los otros tratamientos no muestran diferencias significativas (Fig. 22).

9.7.3 Producción de amonio

Montenegro y Barrera (2014) hablan de la importancia del aporte de N en el medio de cultivo por microorganismo diazotróficos, en este trabajo, la producción de NH_4^+ por las cianobacterias (Fig. 23), mostró que los mejores tratamientos fueron los encapsulados T2 ($347.1 \pm 13 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) y T3 ($529.1 \pm 45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), con T4 y T5 mostrando $104.9 \pm 8.3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y $102.6 \pm 6.6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Además, la microencapsulación proporcionó las condiciones necesarias para aumentar la producción de NH_4^+ 10 veces en comparación con *Fischerella TB22* en su forma libre, T1 ($50 \pm 2.7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). El aumento en la producción de amonio para los tratamientos T2 y T3 después de 25 días podría ser debido a que estas matrices promovieron el crecimiento exponencial de las cianobacterias. En un trabajo con un consorcio de cianobacterias que contenía *Fischerella* sp. en forma libre reportó $12.70 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de producción de NH_4^+ (Alonso-Santos et al., 2015), lo que demuestra que *Fischerella TB22* puede producir niveles más altos de NH_4^+ que el consorcio.

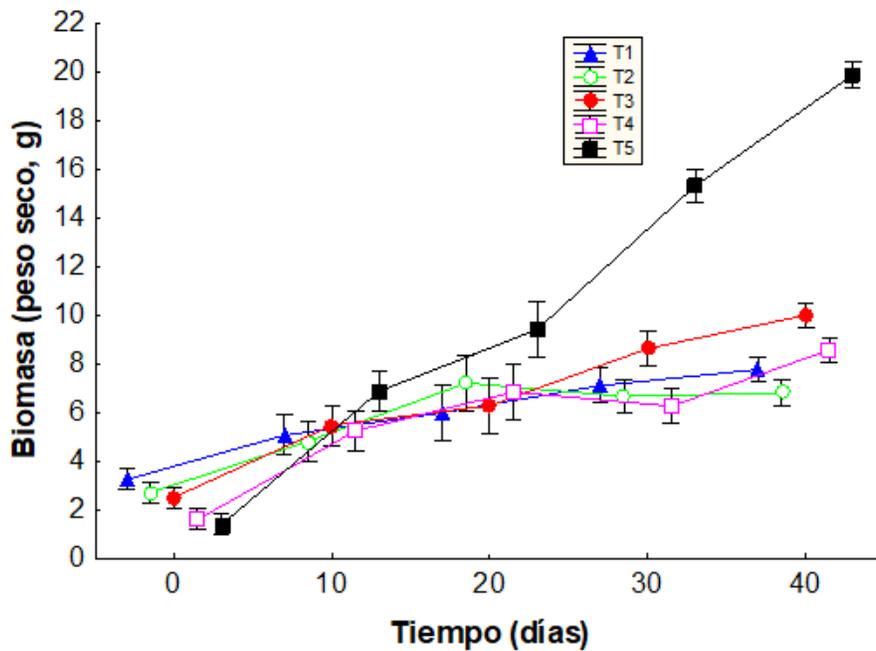


Figura 22. Producción de biomasa de Fischerella TB22 en forma libre y encapsulada utilizando diferentes polímeros combinados durante 40 días a 25 °C. T1 = ▲ FIS en forma libre, T2 = ○ FIS encapsulado en ALG, T3 = ● FIS en ALG con película CHI, T4 = □ FIS en un u una matriz con ALG y ACR con película CHI y T5 = ■ FIS en una matriz con los 3 polímeros.

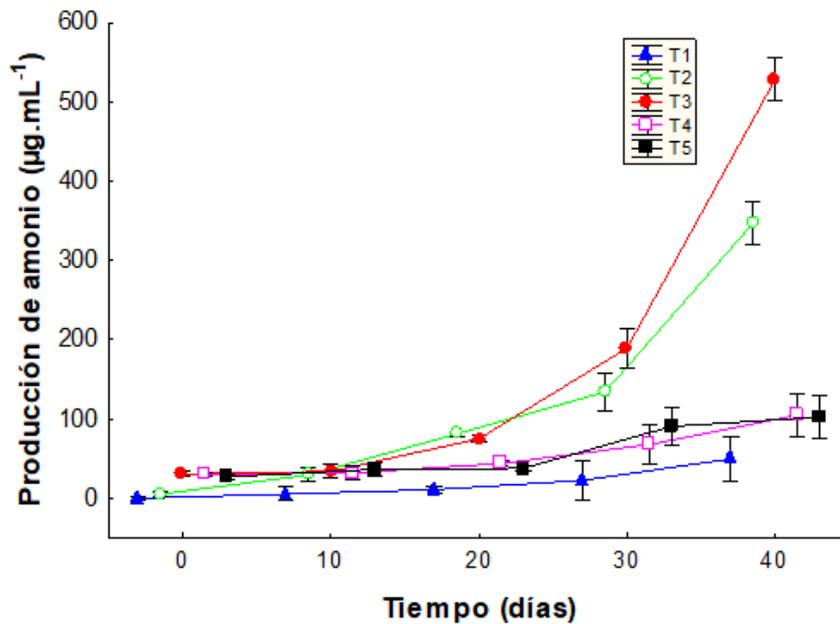


Figura 23. Producción de amonio de Fischerella TB22 en forma libre y encapsulada usando formulaciones diferentes de polímeros durante un período de 40 días a 25 °C. T1 = ▲ FIS en forma libre, T2 = ○ FIS encapsulado en ALG, T3 = ● FIS en ALG con película CHI, T4 = □ FIS en un u una matriz con ALG y ACR con película CHI y T5 = ■ FIS en una matriz con los 3 polímeros.

La misma prueba de amonio se realizó en los encapsulados con ALG y CHI sin cianobacterias, para conocer si estaban contribuyendo en el resultado final en la producción de NH_4^+ , los resultados obtenidos fueron $1.99 \pm 0.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solo ALG) y $61.62 \pm 10.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (con película de CHI), por lo tanto su contribución a la medición de amonio comparado con los tratamientos encapsulados fue pequeña.

9.7.4 Efecto de la aplicación de los microencapsulados en *Spinacia oleracea*.

Para los resultados del crecimiento de la planta de espinaca (Fig. 25), todos los tratamientos mostraron mejores resultados ($P < 0.05$) que el control (solo agua) en todas las variables medidas. Para el tamaño de la raíz (Fig. 26a), el tamaño del tallo (Fig. 26b) y el peso seco (Fig. 26c) los tratamientos T1, T3 y T4 no fueron significativamente diferentes, pero superiores al control hasta 160%, el mejor resultado se demostró con T2 hasta 200% de mejora, demostrando que *Fischerella TB22* en forma encapsulada proporciona amonio por más tiempo para el uso de plantas.

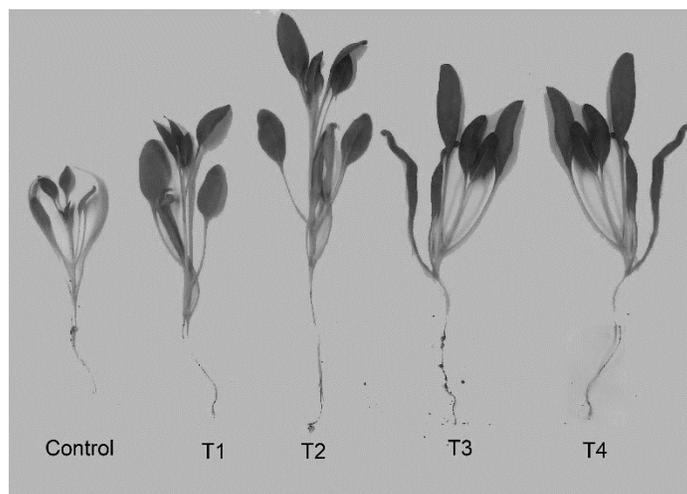


Figura 24. Tamaño de planta de los tratamientos después de un período de crecimiento de 7 semanas usando como fertilizante *Fischerella TB22* en forma libre, encapsulada y urea. T1 = FIS en forma libre, T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4 Urea y un control con solo agua.

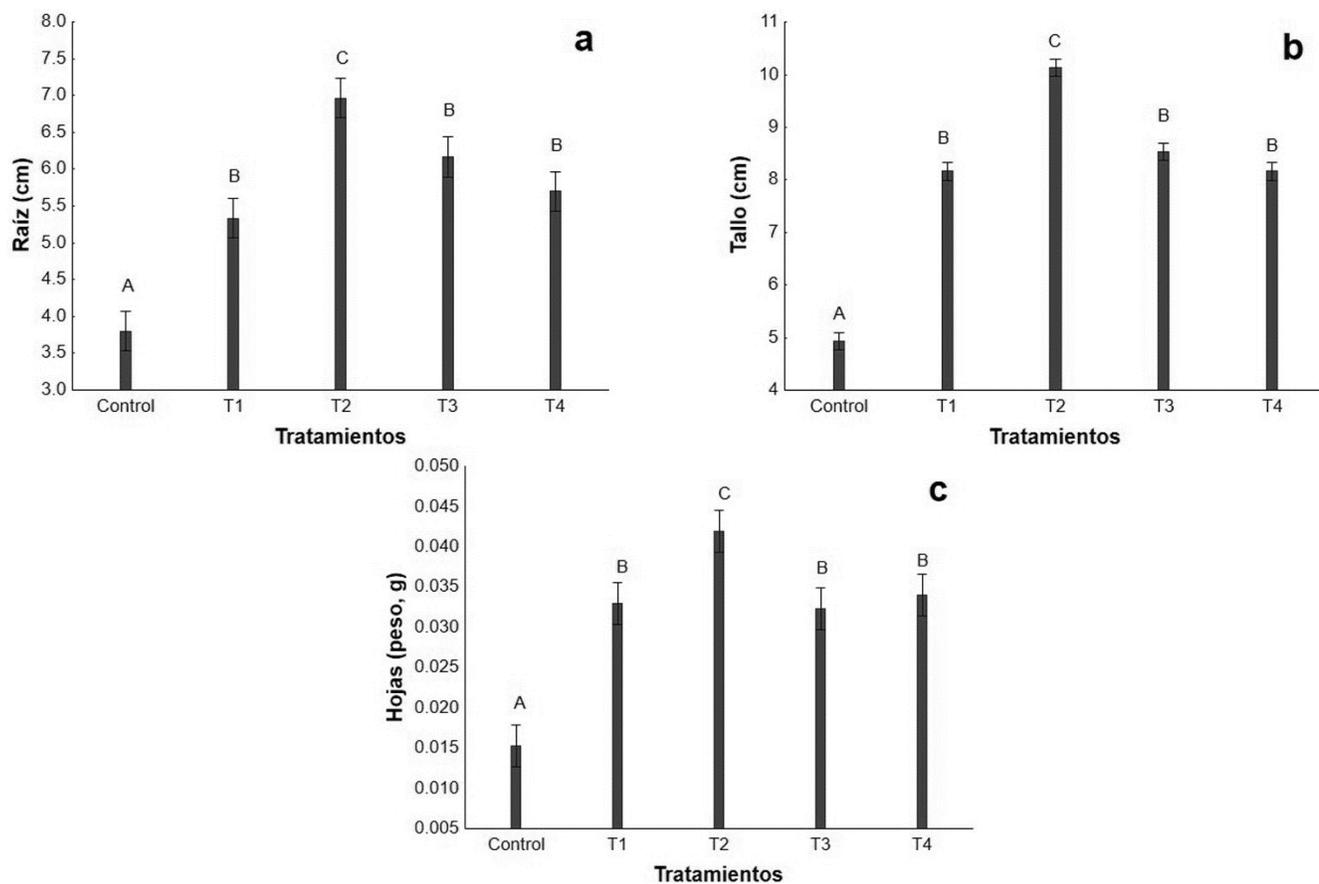


Figura 25. Tamaño de la raíz (a), tamaño del tallo (b) y peso de hojas (c) de espinaca después de un período de crecimiento de 7 semanas utilizando como fertilizante Fischerella TB22 en forma libre, encapsulada y urea. T1 = FIS en forma libre, T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4 Urea y un control sin tratamiento. B=Estadísticamente iguales ($P < 0.05$).

9.7.5 Efecto de la aplicación de los microencapsulados en *Solanum lycopersicum* var. *Lycopersi-cum*.

En el cultivo de tomate, el tamaño de planta no muestra diferencia significativas entre tipo de cultivares pero si entre tratamientos. En el experimento con tomate criollo, las plantas alcanzaron 150.7 ± 7.2 cm y el híbrido (Saladet) 151.3 ± 13.2 cm en 140 días (Fig. 26); Medina et al. (2016) aplicando diferentes concentraciones de calcio, reportaron en el tamaño 74.5 cm en tomate Saladet, este trabajo el T4 (160 ± 1 cm) y T5 (165 ± 1.5 cm) tienen un mejor crecimiento que los reportados por los trabajos anteriores, debido a la fertilización combinada. El T4 y T5 (fertilización combinada) tuvieron mejores resultados en altura de planta, un 6% y 10% respectivamente contra el control (fertilización química).

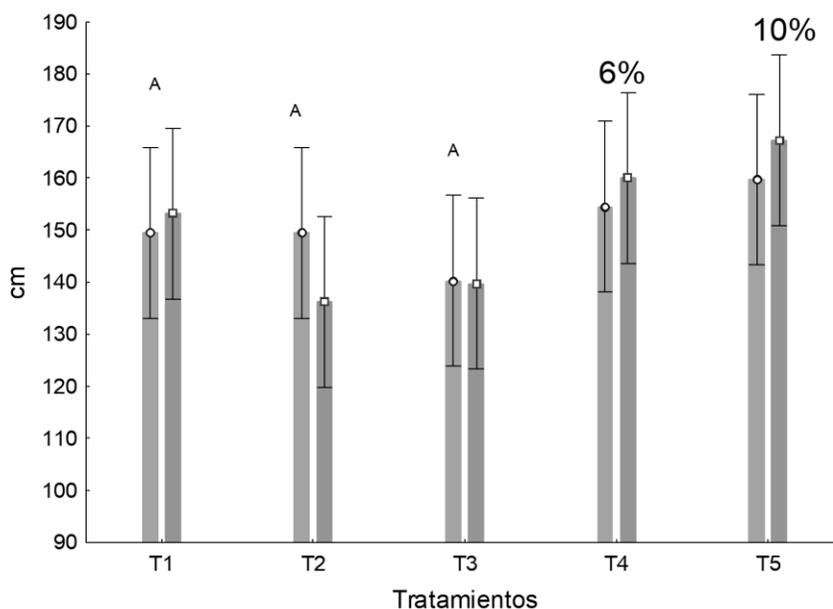


Figura 26. Tamaño de planta. ■ Criollo e ■ Híbrido (Saladet). T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3. A=Estadísticamente iguales. T5 (fertilización combinada) fue 10 % mejor que el control (fertilización química).

En la calidad del fruto, únicamente se midió la variedad comercial de tomate híbrido por presentar menos variabilidad en el tamaño. (Saladet) (Fig. 27).

Martínez et al. (2013) y Márquez-Quiroz *et al.*, (2014) reportan de 80 a 110 g de peso por fruto en condiciones de invernadero con fertilización química a base de N y Ca⁺, De la Rosa-Rodríguez *et al.* (2016) con un sistema hidropónico obtuvieron entre 94.18 y 92.48 g. En sistemas de invernadero se obtienen mejores resultados, debido a que internamente hay condiciones artificiales, estas, resguardan a las plantas o cultivos de daños ambientales como heladas, fuertes vientos, granizo, plagas, etc., esto genera una mayor productividad.

En este trabajo a pesar de estar en malla sombra a la intemperie, con la fertilización combinada se obtuvo 58 ± 3 g en T5 (Fig. 28 a), hasta un 50% más peso que el control con fertilización química (32 ± 2.6 g). Espinoza et al. (2017) en condiciones de invernadero con solo fertilización química reportó 30 cm^3 de volumen por fruto, en condiciones de malla sombra se incrementó el volumen hasta en un 55% más que el control (Fig. 28 b), esto puede ser debido al aporte de N de la fertilización combinada de un biofertilizante y un microorganismo diazotrófico, como lo demuestran Obando et al., (2013); Repke et al. (2013) y Huete et al., (2019).

En los sólidos solubles (°Brix) el mejor tratamiento (T5) reportó 50% más que el control (Fig 28 c). Algunos trabajos, la mayoría en condiciones de invernadero reportan diferentes valores de °Brix como se muestra en la tabla 8, en este trabajo se obtuvo de 3.4 a 5.4 en condiciones de malla sombra

Arango y Pérez (2005) determinaron el NH_4^+ en muestras de suelo cultivado con banano, reportando un rango de 5-19 ppm. En este trabajo (Fig. 28 d) el NH_4^+ residual en el suelo demuestra que los tratamientos encapsulados tienen una concentración más alta que el control, esto se puede atribuir a que las cianobacterias continúan aportando amonio al suelo después de la cosecha. Según Boccolini et al., 2013, el aporte de N y el potencial de nitrificación, desde los residuos afecta la actividad enzimática de los microorganismos que intervienen en el proceso de mineralización de la materia orgánica del suelo. En consecuencia, la recuperación de nitrógeno en el suelo podría disminuir el costo de la fertilización para la próxima siembra y evitar la contaminación por nitratos según lo observado por González (a) (2016). Esta reserva temporal de nitrógeno debe tenerse en cuenta al fertilizar los cultivos de acuerdo con los resultados de los análisis del suelo, reducir los costos de producción y minimizar la pérdida de nutrientes, que al no ser utilizados por el cultivo, constituyen una fuente potencial de contaminación ambiental como lo menciona Salomó et al. (2016).



Figura 27. Tamaño de fruto de tomate híbrido. T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3.

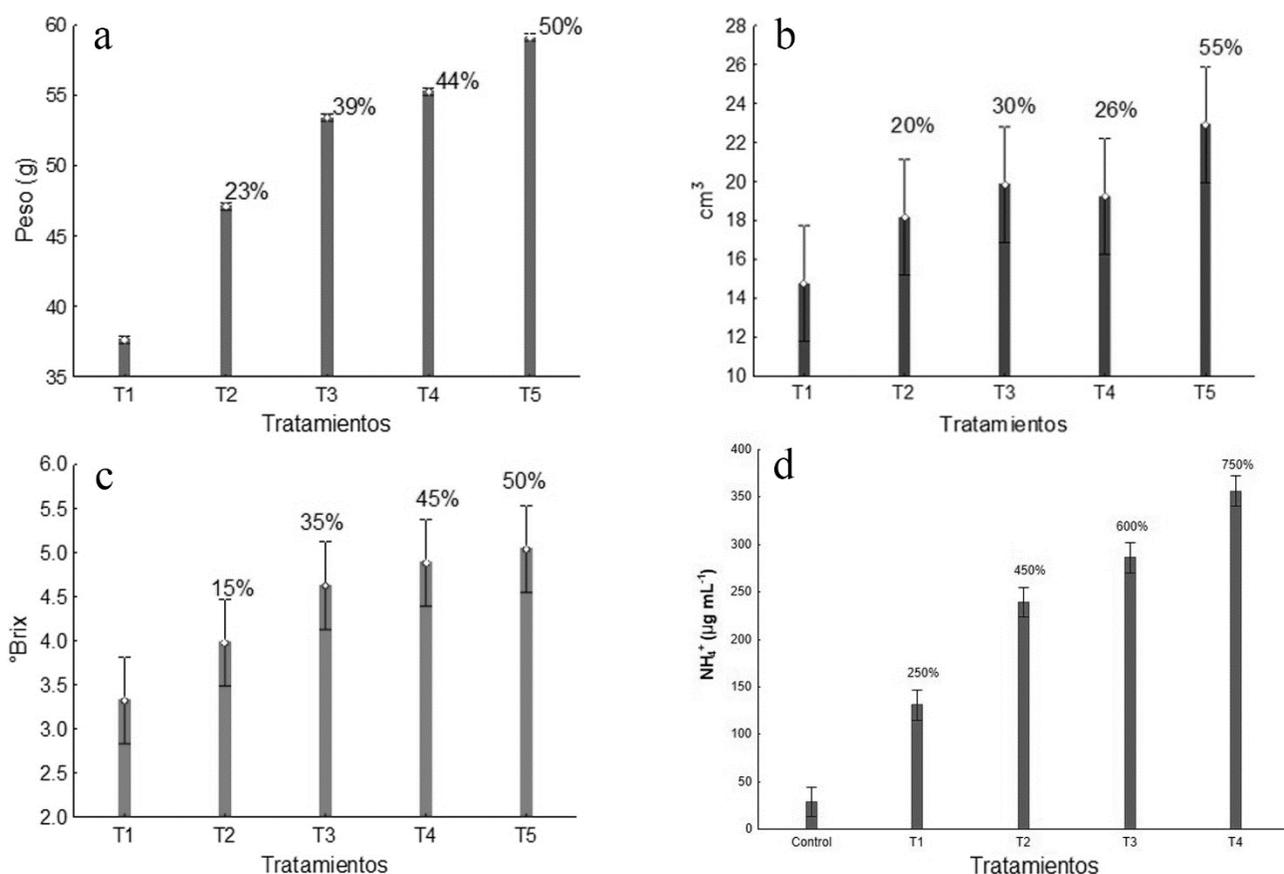


Figura 28 a). Peso de fruto de tomate híbrido. T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3. T5 (fertilización combinada) fue 50 % mejor que el control (fertilización química). **b).** Volumen de frutos de tomate híbrido. T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3. T5 (fertilización combinada) fue 55 % mejor que el control (fertilización química). En los sólidos solubles (°Brix) el mejor tratamiento (T5) reportó 50% más que el control. **c).** Algunos trabajos, la mayoría en condiciones de invernadero reportan diferentes valores de °Brix como se muestra en la tabla 8, en este trabajo se obtuvo de 3.4 a 5.4 en condiciones de malla sombra. **d).** Amonio residual en suelo. T1 = Control (Triple 18), T2 = FIS encapsulado en ALG, T3 = FIS en ALG con película CHI, T4=50% T1 y 50% T2, T5=50% T1 y 50% T3.

Tabla 8. Tabla comparativa de ° Brix en tomate híbrido.

Referencia	Tipo de fertilización	Condiciones	°Brix
Rodríguez <i>et al.</i> , 2004	Nutribora y compost		4.5 a 5
Márquez <i>et al.</i> , 2013	Compost		4 a 4.6
Márquez-Quiroz <i>et al.</i> , 2014	Lombri y Vermicompost		4.2 a 4.7
Vázquez <i>et al.</i> , 2015	Té de Compost	Invernadero	4.2 a 4.5
González (b) <i>et al.</i> , 2016	Arena y compost		4.4 a 4.5
Salas-Pérez <i>et al.</i> , 2016	Sustratos orgánicos		4 a 4.5
Espinoza <i>et al.</i> , 2017	K Foliar		4.8 a 5.5
Hernández <i>et al.</i> , 2014	Fertiriego	Hidroponia	3.9 a 5.2
En este trabajo	Biofertilizante y Triple 18	Malla-sombra	3.4 a 5.4
Mercado Comercial	Química	Invernadero	4.6 a 5

9.8 Conclusiones

Los tratamientos con *Fischerella* TB22 encapsulados en matriz de alginato de sodio y con película de quitosano mostraron los mejores resultados en la producción de NH_4^+ . En general, los tratamientos que incluyen acrilato de potasio no mostraron un efecto significativo en la mayoría de los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, el tratamiento de *Fischerella* TB22 encapsulado en una matriz de alginato de sodio, acrilato de potasio y quitosano podría usarse para la producción de biomasa u otras aplicaciones biotecnológicas.

El uso de alginato de sodio como encapsulante proporciono a las cianobacterias mejores condiciones de crecimiento y producción de amonio en comparación a las que se encuentran en forma libre. El quitosano y el aporte de amonio proporcionado por las cianobacterias mejoraron el crecimiento de las plantas de espinaca y tomate. En los cultivos tomate, se demostró que una fertilización combinada con *Fischerella* TB22 encapsulada como biofertilizante y fertilizante químico (triple 18), mejoró significativamente el crecimiento de la plantas, por lo cual podría usarse potencialmente en otros cultivos.

Este estudio demuestra que el encapsulado de *Fischerella* TB22 con biopolímeros como el alginato y quitosano, ambos abundantes y de bajo costo, son una opción factible para aplicaciones en cultivos de interés comercial, además, indican el potencial para reducir el uso de fertilizantes químicos, al utilizar biofertilizantes microencapsulados se mejora el rendimiento y una calidad del fruto, y al mismo tiempo reducir el impacto del exceso uso de fertilización química en el suelo.

10 Conclusiones generales

El uso de la sonicación de cianobacterias filamentosas ayudó a homogenizar el inóculo y facilitó las mediciones por espectrofotometría. Recuperar el volumen y mantener el pH como al inicio no es relevante para su desarrollo, además mantienen su crecimiento en el rango del pH entre 6 y 9. El noveno día de crecimiento de *Fischerella TB22* es el mejor para la aplicación como biofertilizante ya que tiene su máxima producción de amonio.

La modelación molecular a nivel estructural puede predecir el comportamiento y estabilidad de moléculas y compuestos, proporciona información que puede ser utilizada para tomar decisiones antes de hacer las pruebas in vivo.

La utilización de cianobacterias como bioestimulantes o biofertilizantes, sin el aporte de fertilizante químico, puede contribuir a mejorar la agricultura orgánica, el encapsulado con biopolímeros mejoró su potencial del aporte de NH_4^+ . Se recomienda realizar otros bioensayos con diferentes tipos de suelo y cultivos, estos proporcionarán información para disminuir el impacto al suelo, además del uso adecuado de la fertilización combinada sin alterar la producción del cultivo.

11 Recomendaciones generales

Es importante realizar más experimentos con la encapsulación de la cianobacteria *Fischerella TB22* aplicando a otros cultivos hortofrutícolas de interés comercial.

Combinar los encapsulados de *Fischerella TB22* con algún sustrato orgánico y/o compostas, para evaluar el comportamiento con cultivos de interés comercial.

12 Bibliografía

Aguilar, C. (2021). Rentabilidad y rendimiento de girasol en función del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante. *Biocencia*, 23(1), 45-51.

Alfonso, E., Leyva, Á., y Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista colombiana de Biotecnología*, 7(2), 47-54.

Almeida, M. (2014). Evaluación como acondicionador de suelo y a nivel de laboratorio, de un consorcio previamente seleccionado de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix sp.* Trabajo final para obtener el grado de Ingeniero en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). 196 pp.

Alonso-Santos E., Trujillo-Tapia Ma. y Ramírez-Fuentes E. (2015). Crecimiento de *Fischerella sp.* (Stigonematales: Cyanobacteria) en ausencia de nitrógeno y carbonatos. *Tendencias de Investigación en Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*. Pag. 8-17.

Alonso-Santos, E., Trujillo-Tapia, M. N., Cervantes-Hernández, P., y Ramírez-Fuentes, E. (2021). Bioencapsulado de *Fischerella sp.*: crecimiento, metabolismo y concentración del inóculo. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24, 1-9.

Altieri, M., y Nicholls, C. (2010). Agroecología: potenciando la agricultura campesina para revertir el hambre y la inseguridad alimentaria en el mundo. *Revista de Economía Crítica*, 10(2), 62-74.

Angulo-Cornejo, J., y Tovar, C. (2014). Utilización de la química computacional: Método semiempírico PM3, para elucidar la estructura del complejo bis (1, 5-difenil-1, 2, 4-triazol-3-tionato) plomo (II) (Pb (DTT) 2). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(2) 136-143.

APHA. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th edition. American Public Health Association. Washington. D. C., U. S. A.

Arango, G. y Pérez, J. (2005). Determinación de Nitratos y amonio en muestras de suelo mediante el uso de electrodos selectivos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1), 2733-2740.

Arias, F., López, V. y Guerrero, P. (2007). “Tratamiento de cultivos sin suelo”. *Horticultura Ecológica*. Ed mundipresa. vol 5, num. 2, p. 13-15.

Arredondo B. y Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, 1, 17-25.

Arredondo, V., Cordero, E., Herrero, C., y Abalde, J. (1997). Manual de técnicas bioquímicas aplicadas en ficología. *Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y Universidad de Coruña*. La Paz, Baja California Sur, México, 1-70.

Arredondo-Vega, B., Cordero-Esquivel, B., y Voltolina, D. (2007). Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Capítulo 4. 31- 34 pp.

Arteaga, A., y Arteaga, H. (2016). Optimización de la capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y capacidad de rehidratación en polvo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) microencapsulado con mezclas de hidrocoloides. *Scientia Agropecuaria*, 7, 191-200.

Barbaro, L., y Karlanián, M. (2020). Efecto de las propiedades físicas del sustrato sobre el desarrollo de plantines florales en maceta. *Ciencia del suelo*, 38(1), 1-11.

Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16(4), 729-770.

- Bautista-Baños, S., González-Soto, R., y Ramos-García, M. (2018). Propiedades físicas de películas de quitosano adicionadas con aceite esencial de limón y su impacto en la vida de anaquel del jitomate (*Lycopersicon esculentum L.*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 1-11.
- Beltrán-Rocha, J., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I., y López-Chuken, U. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), 417-427.
- BIOVIA, D. S. (2015). Discovery studio modeling environment. Dassault Systems: San Diego, CA, USA.
- Boccolini, M., Aimetta, B., Cazorla, C., y Conde, B. (2013). Efecto del residuo de vicia (*Vicia sativa L.*) sobre el potencial de nitrificación del suelo. *Cultivos de cobertura*, 83.
- Brandelero, R., Brandelero, E., y Santos, G. (2021). Cápsulas de almidón/quitosano e quitosano aplicadas no controle da volatilização de nitrogênio/Starch/chitosan capsules and chitosan applied to control nitrogen volatilization. *Brazilian Journal of Development*, 7(4), 35602-35611.
- Brito, D., Caña, E., Guevara, M., Subero, J., Colivet, J., y Colorado, C. (2016). Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias*, 4(1), 15-26.
- Brucker-Kelling, M. (2017). Irrigation regime and water retaining polymer doses in morphological and physiological characteristics of *Cordia trichotoma* seedlings. *Forest (Valdivia)*, 38(1), 123-131.
- Bryant, D. (1986). The cyanobacterial photosynthetic apparatus: comparison to those of higher plants and photosynthetic bacteria. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci*, 214, 423-500.

Burrows, F., Louime, C., Abazinge, M., y Onokpise, O. (2007). Extraction and evaluation of chitosan from crab exoskeleton as a seed fungicide and plant growth enhancer. *American-Eurasian J. Agric. y environ. Sci.*, 2(2), 103-111.

Butkiewicz, M., Lowe, E., Mueller, R., Mendenhall, J., Teixeira, P., Weaver, D., y Meiler, J. (2013). Benchmarking ligand-based virtual High-Throughput Screening with the PubChem database. *Molecules*, 18(1) 735-756.

Calvo, P., Reymundo, L., y Zúñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1-2), 141-148.

Campos, V., Lisperguer, S., Weckesser, J., Vera, A., y Muñoz, D. (2005). Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile. *Boletín Micológico*, 20.

Carr, N., y Whitton, B. (1982). The Biology of Cyanobacteria (2nd Edition). *California: University of California at Berkeley Press*.

Carvajal, J. y Mera, A. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción+ limpia*, 5(2), 77-96.

Castañeda-Ovando, A., González-Aguilar, L. A., Granados-Delgadillo, M. A., y Chávez-Gómez, U. J. (2020). Goma guar: un aliado en la industria alimentaria. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 7(14), 107-111.

Castañeta, H., Gemio, R., Yapu, W., y Nogales, J. (2011). Microencapsulación, un método para la conservación de propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustancias químicas. *Revista Boliviana de Química*, 28(2), 135-140.

Castellanos, J. (2014). Acidez del suelo y su corrección. *Hojas Técnicas de Fertilab, México*. 4p.

- Castro, E., Sánchez, A., Galindo, M. y Vázquez, M. (2020). Control biológico de la pudrición de mazorca en genotipos de maíz con especies de *Trichoderma*. *Revista Bio Ciencias*, 7, 14.
- Castromonte, M., Wacyk, J., y Valenzuela, C. (2020). Encapsulación de extractos antioxidantes desde sub-productos agroindustriales: una revisión. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(5), 836-847.
- Cavalheiro, C., de Araújo, M., da Silveira M., de Menezes, C., y Martins L. (2015). Encapsulation: an alternative for application of probiotic microorganisms in thermally processed foods. *Ciência e Natura*, 37, 65-74.
- Chamnanmonoontham, N., Pongprayoon, W., Pichayangkura, R., Roytrakul, S., y Chadchawan, S. (2015). Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. *Plant Growth Regul.*, 75, 101-114.
- Chen X., Mao X., Lu Q., Liao Z. y He Z. (2016). Characteristics and mechanism of acrylate polymer damage to maize seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 129: 228-234.
- Chiesa, A., y Grazia, J. (2014). Los factores formadores y los procesos pedogenéticos. El suelo como cuerpo natural. Nomenclatura de horizontes. Taxonomía de suelos. Mapas de suelos de la Argentina Taxonomía-Esquema. Series de suelo.
- Chilón, E. (2018). El Paradigma Suelo Vivo. *Apthapi*, 4(2), 1188-1211.
- Cho, Y., y Park, J. (2002). Characteristics of Double-Encapsulated Flavor Powder Prepared by Secondary Fat Coating Process. *Journal of food science*, 67(3), 968-972.
- Coitiño-López, J., Barbazán, M., y Ernst, O. (2015). Conductividad eléctrica aparente para delimitar zonas de manejo en un suelo agrícola con reducida variabilidad en propiedades físico-químicas. *Agrociencia Uruguay*, 19(1), 102-111.

Collado-González, M., Montalbán, M., Peña-García, J., Pérez-Sánchez, H., Vllora, G., y Díaz, G. (2017). Chitosan as stabilizing agent for negatively charged nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 161, 63-70.

Coopi G., Lannuccelli, V., Leo, E., Bernabei, T. y Cameroni, R. (2001). Chitosan-alginate microparticles as a protein Carrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(5): 393-400.

Coreño-Alonso, J., y Méndez-Bautista, M. (2010). Relación estructura-propiedades de polímeros. *Educación Química*, 21(4), 291-299.

Cortez, M., Ardilas, A., Salgado, J., Soto, R. y Hernández, J. (2016). Actividad enzimática de xilanasas inmovilizadas en perlas de alginato de sodio en la hidrogenación de citral en medio líquido. *Acta Universitaria*, 26(1), 48-55.

Cruz, C., Gómez, L. y Uribe-Vélez. (2017). Manejo biológico del tamo de arroz bajo diferentes relaciones C: N empleando consorcios microbianos y promotores de crecimiento vegetal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 47-62.

De la Paz, N., Fernández, M., López, O., Nogueira, A., García, C., Pérez, D. y Díaz, D. (2012). Optimización del proceso de obtención de quitosano derivado de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(3), 103-116.

De la Rosa-Rodríguez, R., Lara-Herrera, A., Lozano-Gutiérrez, J., Padilla-Bernal, L., Avelar-Mejía, J. y Castañeda-Miranda, R. (2016). Rendimiento y calidad de tomate en sistemas hidropónicos abierto y cerrado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (17), 3439-3452.

De Oliveira, J., Ramos, E., Pereira, A., Nunes, L., Da Silva, C., Lima, R., Smaniotto, G., Polanczyk, R. y Fraceto L. (2018). Geraniol encapsulated in chitosan/gum arabic nanoparticles: A promising system

for pest management in sustainable agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(21), 5325-5334.

de-Bashan L. y Bashan Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresorce Technology*. 101: 1611-1627.

DeRosa, M., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R., y Sultan, Y. (2010). Nanotechnology in fertilizers. *Nature Nanotechnology*, 5, 91.

Desai, K., y Jin, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.

Domini, A. (2018). Potencialidades del quitosano para la fresa. Usos en la mejora y conservación de los frutos. *Cultivos Tropicales*, 39(1), 134-142.

Durán, J., Magaña, G., Ayala, R., García, R., Amábilis, L., Durán, M. y Solís, J. (2016). Uso de quitina y quitosana procedentes de residuos de camarón en la purificación de jugos de caña (*saccharum officinarum*). *Química Central*, 5(1), 27-40.

Eckert, D. (1987). Soil test interpretations: Basic cation saturation ratios and sufficiency levels. *Soil testing: Sampling, correlation, calibration, and interpretation*, 21, 53-64.

Espinoza, P., Adulfo, H., Chávez, J., Carrillo, G., Mendoza, R., de las Nieves, M., y Ascencio, R. (2017). Fertilización foliar en el rendimiento y calidad de tomate en hidroponía bajo invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(2), 333-343.

Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol.* 56: 340-373.

Fei Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z., y De Yao, K. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(7), 1324-1335.

Flores, E., Flores, J., y Tórrez, J. (2014). Recuperación de suelos salinos con la incorporación de sulfato de calcio hemidrato ($\text{Ca}(\text{SO}_4) \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) en la comunidad de Yotala. In *Ciencias Tecnológicas y Agrarias TI: Handbook* (pp. 221-246). ECORFAN.

Flores–Belmont, I., y Jiménez–Munguía, M. (2013). Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1) 48-56.

Ford, I. (1984). Dinámica mineral en el suelo, algunos puntos de referencia para su estudio, Ibraim N. Ford (No. S592. 367. N67 1984.). *Universidad Autónoma Chapingo*. Chapingo. MX.

Freepons, D. (1997). Enhancing food production with chitosan seed-coating technology. In: *Applications of Chitin and Chitosan*, Goosen MFA, ed. *Lancaster, PA: Technomic Publishing*. pp 129–139.

Freire, E., Koch, A., y Salvador, L. (2016). Evaluación del potencial biofertilizante de consorcios de Cianobacterias en pasto Raygrass (*Lolium multiflorum*). *Ecuador es Calidad. Revista Científica Ecuatoriana*, 4(1).

Garbisu, C., y Alkorta, I. (1999). Utilization of genetically engineered microorganisms (GEMs) for bioremediation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(7), 599-606.

García, L., Carpera, A., Melendez, J. y Mayorquín, N. (2020). Alternativas microbiológicas para la remediación de suelos y aguas contaminados con fertilizantes nitrogenados. *Scientia et Technica*, 25(1), 172-183.

Ghosh, N. (2004). Promoting Biofertilisers in Indian Agriculture. *Economic and Political Weekly*, 39(52), 5617-5625.

Gibbs, F., Kermasha, S., Ali, I. y Mulligan, C.H. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal Food Science Nutrition*. 50: 213-224.

- Glowinska A., Trochimczuk A. y Marcinkowska A. (2019). Novel acrylate/organophosphorus-based hydrogels for agricultural applications. New outlook and innovative concept for use of 2-(methacryloyloxy) ethyl phosphate as a multi-purpose monomer. *European Polymer Journal*. 110: 202-210.
- Goh, C., Heng, P., y Chan, L. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr. Polymers.*, 88(1), 1-12.
- Gómez, D., y Gómez, M. (2013). Evaluación de impacto ambiental. *Mundi-Prensa Libros*.
- Gómez, L. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19(2), 3-20.
- Góngora, C., Laiton, L., Gil, Z., y Benavides, P. (2020). Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control de *Monalonion velezangeli* (Hemiptera: Miridae) en el cultivo del café. *Revista Colombiana de Entomología*, 46(1).
- González (a), A., Figueroa, U., Preciado, P., Núñez, G., Luna, J., y Antuna, O. (2016). Uso eficiente y recuperación aparente de nitrógeno en maíz forrajero en suelos diferentes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 301-309.
- González (b), B., Fortis, H., Preciado, R., Segura, C., Salazar Sosa, E., García, H., y Esparza, R. (2016). Calidad fitoquímica de tomate Saladette producido con sustratos orgánicos bajo condiciones de invernadero. *Phyton* (Buenos Aires), 85(1), 71-78.
- González-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R., Lavandera, J., Alkorta, I., y Elguero, J. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 81, 278-310.
- Grageda-Cabrera, O., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J., y Vera-Núñez, J. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261-1274.

Gupta, V., Ratha, S., Sood, A., Chaudhary, V., y Prasanna, R. (2013). New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae): prospects and challenges. *Algal Research*, 2, 79-97.

Harrigan, G., Luesch, H., Yoshida, W, Moore, R., Nagle, D. y Paul, V. (1999). Symplostatin 2: a dolastatin 13 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydnooides*. *Journal of Natural Products*, 62(4), 655-658.

Havlin, J., Tisdale, L., Nelson, W. y Beaton, J. (2016). "Soil Fertility and Fertilizers. Pearson Education" 8a edición, Inc., Upper Saddle River, New Jersey. 528 p.

He M., Zhang X., Yao W., Wang Ch., Shi L. y Zhou P. (2017). Construction of alternate layered chitosan/alginate composite hydrogels and their properties. *Materials Letters*. 200: 43-46.

Hernández R. y Araujo D. (2017). Cianobacterias: una alternativa para aumentar la competitividad agrícola y seguridad alimentaria de la guajira colombiana. *Ciencia e Ingeniería*, 3(2), 14-14.

Hernández, M., Chailloux, M., Moreno, V., Mojena, M., y Salgado, J. (2014). Relaciones nitrógeno-potasio en fertirriego para el cultivo protegido del tomate (*Solanum lycopersicum L.*) en la época de primavera-verano. *Cultivos Tropicales*, 35(4), 106-115.

Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Y., Arvizu-Higuera, D., Reyes-Tisnado, R., Murillo-Álvarez, J. y Muñoz-Ochoa, M. (2012). Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 13(2), 155-168.

Hernández-Morales, J., Sandoval-Islas, J., Ayala-Escobar, V., Soto-Rojas, L., y Alejo-Jaimes, A. (2015). Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad "Pata Prieta" de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(2), 173-194.

Hernández-Reyes, B., Rodríguez-Palacio, M., Castilla-Hernández, P., Sánchez-Robles, J., Vela-Correa, G., y Schettino-Bermúdez, B. (2019). Uso potencial de cianobacterias como biofertilizante para el cultivo de maíz azul en la Ciudad de México. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 10(1), 13-27.

Hernández-Rodríguez, A., Rives-Rodríguez, N., Díaz-de la Osa, A., de la Fe-Pérez, Y., Pijeira-Fernández, G., y Divan-Baldani, V. (2016). Caracterización de bacterias diazotróficas asociativas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Oryza sativa L.*/Characterization of associative diazotrophic bacteria with plant growth promoting activity in *Oryza sativa L.* *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 5(2), 9.

Herrera, A., Acevedo, M., Castro, M., y Marrugo L. (2016). Preparación de nanopartículas de quitosano modificadas con alginato con potencial para la liberación controlada de medicamentos. *Revista EIA*, 12(2) 75-83.

Huete, Y., Torres, J., y Domínguez D. (2019). Comportamiento morfológico del Maíz inoculado con *Azotobacter chroococcum* a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Avances*, 21(2), 166-178.

Iwasaki K. y Matsubara Y. (2000). Purification of alginate oligosaccharides with root growth promoting activity toward lettuce. *Bioscience Biotechnology Biochemical*. 64: 1067-1070.

Julca-Otiniano, A., Meneses-Florián, L., Blas-Sevillano, R., y Bello-Amez, S. (2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia* (Arica), 24(1), 49-61.

Jun-Yee Leong, Weng-Hoong Lam, Kiang-Wei Ho, Wan-Ping Voo, Micky Fu-Xiang Lee, Hui-Peng Lim, Swee-Lu Lim, Beng-Ti Tey, Denis Poncelet y Eng-Seng Chan. (2016). Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology*. 24: 44–60

Kabiri, K., Omidian, H., Zohuriaan-Mehr, M., y Doroudiani, S. (2011). Superabsorbent hydrogel composites and nanocomposites: a review. *Polymer Composites*, 32(2), 277-289.

Kashyap, P., Xiang, X., y Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle-based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36-51.

Kempers, A. (1974). Determination of submicroquantities of ammonium and nitrates in soils with fenol, sodium nitroprusside and hypochlorite. *Geoderma*. Vol. 12; p. 201-206.

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., y Bolton, E. E. (2019). PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res.*, 49(D1), D1388–D1395.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>

Kim, Y., Ye, Z., Joachimiak, G., Videau, P., Young, J., Hurd, K., y Joachimiak, A. (2013). Structures of complexes comprised of Fischerella transcription factor HetR with Anabaena DNA targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19), 1716-1723.

Koziel, W., Jaromin-Glen, K., Polakowski, C., Walkiewicz, A., y Bulak, P. (2019). Effect of encapsulated and free-living cells of *Chlorella vulgaris* L. on nitrogen retention in soils. *Int. Agrophys.*, 33, 127-136.

Krasaekoopt, W., y Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, and fruit juice. *Food Science and Technology*, 57(2), 761-766.

Lamelas, M. (2009). Esquema metodológico para la toma de decisiones sobre el uso sostenible del suelo: Aplicación a la localización de suelo industrial, *GeoFocus*. 9, p. 28-66. ISSN: 1578-5157.

- Lara, C. y Negrete J. (2015). Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichantium aristatum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 122-130.
- Lárez C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15-21.
- Lárez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1), 1-22.
- Lassalleta, L., Billen, G., Grizzetti, B., Anglade, J., y Garnier, J. (2014). 50-year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental Research Letters*, 9, 105011.
- Lazcano, C. (2016). Biotecnología ambiental de aguas y aguas residuales. *Ecoe Ediciones Ltda.*
- Lee, D. (2013). In situ analysis of heterogeneity in the lipid content of single green microalgae in alginate hydrogel microcapsules. *Analytical Chemistry*, 85(18), 8749-8756.
- Lee, E. (1999). *Phycology* (3rd Edition). Estados Unidos: Cambridge University Press.
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*. 21: 928-935.
- López, A., Deladino, L., Navarro, S. y Martino, N. (2012). Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 10(1), 18-27.
- López, B., Hernández, J., Bashan, Y. y de-Bashan, L. (2017). Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. *Journal of Microbiological Methods*, 135, 96-104.

López-Ulloa, R. (2016). Servicios ecosistémicos del suelo. *Ecuador es calidad: Revista Científica Ecuatoriana*, 4(1).

Luna, R., Reyes, J., Espinosa, K., Luna, M., Luna, F., Celi, M., Espinoza, A., Rivero, M., Cabrera, D., Alvarado, A. y González J. (2016). Efecto de diferentes abonos orgánicos en la producción de tomate (*Solanum lycopersicum*, L). *Biotecnia*, 18(3), 33-36.

Lupo, B., González, C. y Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151.

Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., y Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4), 3315-3335.

Mandal, B., Vlek P. y Mandal L. (1998). Beneficial effect of blue-green algae and Azolla excluding supplying nitrogen, on wetland rice fields: a review. *Biology & Fertility of Soils*, 329- 342.

Mares, X. (2017). Síntesis y caracterización de esferas poliméricas para la liberación de fármacos. *Jóvenes en la Ciencia*, 3(2), 2696-2700.

Markovitch, O., y Agmon, N. (2008). The distribution of acceptor and donor hydrogen-bonds in bulk liquid water. *Molecular Physics*, 106(2-4) 485-495.

Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., y Gutiérrez, E. (2011). Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 1, 53-58.

Márquez-Quiroz, C., Cano-Ríos, P., Moreno-Reséndez, A., Figueroa-Viramontes, U., Sánchez-Chávez, E., De la Cruz-Lázaro, E., y Robledo-Torres, V. (2014). Efecto de la fertilización orgánica sobre el rendimiento y contenido nutricional de tomate saladette en invernadero. *ITEA*, 110, 3-17.

Martín, M., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M., y Morales, M. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 27, 15-25.

Martínez, K. (2010). Establecimiento de las condiciones de cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, aisladas de suelos cultivados de papaya. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca.

Martínez, L., Velasco, V., Ruiz, J., Enríquez-del Valle, J., Campos G. y Montaña, M. (2013). Efecto del nitrato de calcio y sustratos en el rendimiento del tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1175-1184.

Martínez, R., Palma, A., Atalah, E., y Pinheiro, A. 2009. Inseguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe. *Documento de proyecto LC/W274 CEPAL*.

Martínez-Cordeiro, H., Varela, M., García-Jares, C., Lores, M., y Domínguez, J. (2014). Conversión acelerada de retama negra (*Cytisus scoparius*) en un biofertilizante de calidad mediante vermicompostaje. *Recursos Rurais*, 25.

Martínez-Trujillo M., García-Rivero M. (2012). Revisión: aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 11(1): 55-73.

Mayz-Figueroa, J. (2004). Biological Nitrogen Fixation. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.

Medhat, I., Mahmouda, A., Osmana, O., Refaat A. y El-Sayed M. (2010). Molecular and Biomolecular Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 77, 802–806.

Medina, H., Álvarez V., Partida L., Martínez, J. y León, J. (2016). Response of the Saladette Tomato of Growth Determinate to Different Sources and Doses of Calcium in Greenhouse. *Open Access Library Journal*, 3(03), 1.

Montenegro, S., y Barrera, S. (2014). Biofertilización nitrogenada como aporte a la sustentabilidad de la agricultura colombiana. *RIAA*, 5(2), 135-144.

Mora-Aguirre, E., Robles-Bermúdez, A., Domínguez-Monge, S., y Isiordia-Aquino, N. (2019). Compatibility of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with Natural Parasitism by *Anagyrus kamali* 1 in Nayarit, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 44(1).

Moral, F., Terrón, J., y Da Silva, J. (2010). Delineation of management zones using mobile measurements of soil apparent electrical conductivity and multivariate geostatistical techniques. *Soil and Tillage Research*, 106(2), 335-343.

Morales, E., Martínez, R. y Suárez G. (2014). Aislamiento, cultivo, viabilidad y evaluación de un consorcio cianobacteria-microalga como acondicionador de suelos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 35(1-2), 51-71.

Morales, E., Rodríguez, M., García, D., Loreto, C., y Marco, E. (2002). Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia*, 27(7), 373-378.

Neira-Carrillo, A., Yañez D., Zazzali, P., Marini, Y., Vilches, S., y Palma, R. (2013). Encapsulación de biomoléculas usando polímeros naturales: “un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en medicina”. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2), 31-40.

Obando, M., Rivera, D., y Bonilla, R. (2013). Respuesta fisiológica a la fertilización por *Azotobacter chroococcum* AC1 y fertilización nitrogenada de síntesis sobre el maíz (*Zea mays* L.) en invernadero. *Bioteología*, 17, 11-22.

Orozco, A., Valverde, M., Martínez, R., Chávez, C. y Benavides, R. (2016). Propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo con biofertilización cultivado con manzano. *Terra Latinoamericana*, 34(4), 441-456.

Pacheco-Aguirre, J., Ruíz-Sánchez, E., Ballina-Gómez, H., y Alvarado-López, C. (2017). ¿Mejora el encapsulamiento basado en polímeros el desempeño de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal? Una visión de metaanálisis. *Agrociencia*, 51(2), 173-187.

Pedroza-Islas, R., Cruz, L., Ricque-Marie, D., Tapia, M., Gaxiola, M., y Simoes, N. (2002). Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. Avances en Nutrición Acuícola VI. *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3.

Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., y Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 14-25.

Pola, C., Moraes, A., Medeiros, E., Teófilo, R., Soares, N., y Gomes, C. (2019). Development and optimization of pH-responsive PLGA-chitosan nanoparticles for triggered release of antimicrobials. *Food Chemistry*, 295, 671-679.

Ponce, S., Orive, G., Hernández, R., Gascón, A. R., Pedraz, J. L., de Haan, B. J. y de Vos, P. (2006). Chemistry and the biological response against immunoisolating alginate-polycation capsules of different composition. *Biomaterials*, 27(28), 4831-4839.

Popplewell, L., Black, J., Norris, L. y Porzio, M. (1995). Encapsulation system for flavors and colors. *Food Technology*. 49: 76-82.

- Prasanna, R., Babu, S., Rana, A., Kabi, S., Chaudhary, V., Gupta, V. y Pal, R. (2013). Evaluating the establishment and agronomic proficiency of cyanobacterial consortia as organic options in wheat–rice cropping sequence. *Experimental Agriculture*, 49(3), 416-434
- Rajabnasab, M., Khavari-nejad, R., Shokravi, S., y Nejadstari, T. (2017). Adaptation of the Cyanobacterium *fischerella* sp. ISC 107 to the combined effects of pH and carbon dioxide concentration. *Plant Physiology*, 7(4), 2163-2171.
- Ramírez-López C. (2009). Efecto de la aireación y la irradiación sobre un consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Tesis de licenciatura. Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel. 84 pp.
- Raposo, M., y Morais, M. (2011). *Chlorella vulgaris* as soil amendment: influence of encapsulation and enrichment with rhizobacteria. *International Journal of Agriculture y Biology*, 13, 719-724.
- Reichert, C., Reinehr, C. y Costa, J. (2006). Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 23(1), 23-28.
- Ren, H., Gao, Z., Wu, D., Jiang, J., Sun, Y., y Luo, C. (2016). Efficient Pb (II) removal using sodium alginate–carboxymethyl cellulose gel beads: Preparation, characterization, and adsorption mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 137, 402-409.
- Repke, R., Cruz, J., da Silva, J., Figueiredo, P., y Bicudo, S. (2013). Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 12 (6) p. 214-226.
- Reyes-Tisnado R., Hernández-Carmona, G., López-Gutierrez, F., Vernon-Carter, E. y Castro-Moroyqui, P. (2004). Sodium and Potassium alginates extracted from *Macrocystis pyrifera* algae for use in dental impression materials. *Ciencias Marinas*, 30(3), p. 189-199.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M. y Stanier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 111 (1), 1-61.

Rodríguez, J., Marcano, A., y Montano, N. (2004). Chemical characterization of nutrihora compost and its combined use with a commercial fertilizer in tomato production. *Interciencia*, 29(5), 267-273.

Rodríguez-Huezo, M., Lobato-Calleros, C., Reyes-Ocampo, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., y Pimentel-Gonzalez, D. (2011). Survivability of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* in liquid-and gel-core alginate beads during storage and simulated gastrointestinal conditions. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(3), 353-361.

Rojan, J., Tyagi, R., Brar, S., Surampalli, R., y Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211-226.

Rosales-Loaiza, N., Díaz, L., Aiello-Mazzarri, C., y Morales-Avenidaño, E. (2017). Cultivos a cielo abierto de las cianobacterias *Nostoc LAUN0015* y *Anabaena MOF015* para la producción de biomasa enriquecida. Pruebas piloto para cultivos masivos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 48(3), 81-86.

Rosales-Oballos, Y., Raybaudi-Massilia, R., Mosqueda-Melgar, J., de Daza, M., y Tomé-Boschian, E. (2012). Propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de películas de quitosano y películas de alginato de sodio con aceites esenciales y nisina. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 54(2), 7-17.

Rueda, E., Ortega, J., Barrón, J., López, J., Mutillo, B., Hernández, L., Alvarado, A. y Valdez, R. (2015). Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *Invurnus*, 10, 10-17.

Ruiz, R., Ballina, H., Ruiz, E. y Alejo, J. (2020). Effect of the association of *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris* L. on the plant growth and the preference of *Bemisia tabaci*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(1).

Saadatnia, H., y Riahi, H. (2009). Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. *Plant Soil Environ.*, 55, 207-212.

Saavedra-Romero, L., Alvarado-Rosales, D., Martínez-Trinidad, T., y Hernández-de la Rosa, P. (2020). Propiedades físicas y químicas del suelo urbano del Bosque San Juan de Aragón, Ciudad de México. *Revista Terra Latinoamericana*, 38(3), 529-540.

SAGARPA, S. (2014). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

Salas-Pérez, L., González Fuentes, J., García Carrillo, M., Sifuentes-Ibarra, E., Parra-Terrazas, S., y Preciado-Rangel, P. (2016). Calidad biofísica y nutracéutica de frutos de tomate producido con sustratos orgánicos. *Nova scientia*, 8(17), 310-325.

Salazar, C., Cardona, Y., Osorio, L., y Porras, L. (2020). Efecto de un Consorcio de cianobacterias sobre la obtención de biomasa vegetal de la gulupa (*Passiflora edulis f. edulis sims*) bajo condiciones de campo en el municipio de Marinilla-Antioquia. *Hechos Microbiológicos*, 11(1 y 2), 12-21.

Salomó, J., Martínez, E., Maresma, Á., y Lloveras, J. (2016). Efecto residual de la fertilización nitrogenada del maíz sobre el trigo posterior en regadío: optimización de los aportes de nitrógeno en el cultivo de trigo en riego por aspersión. *Vida Rural*. núm. 422 (1), p. 28-34. <http://hdl.handle.net/10459.1/64617>.

Sánchez, C., Benintende, M., y Benintende, S. (2019). Población de cianobacterias en suelos arroceros: efecto de las rotaciones. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(1), 71-76.

Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H., Alvarez-Ramírez, J., y Vernon-Carter, E. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111-117.

Sandoval-Peraza, V., Cu-Cañetas, T., Peraza-Mercado, G., y Acereto-Escoffíe, P. (2017). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. *Alimentos Funcionales de Hoy. Barcelona, España: OmniaScience*. 181-218.

Santana-Aragone, D., Colina-Navarrete, E., Castro-Arteaga, C., Cadena-Piedrahita, D., Sotomayor-Morán, A., Galarza-Centeno, E., y López-Villacrés, M. (2017). Microorganismos fijadores de nitrógeno y su acción complementaria a la fertilización química en el cultivos de *Coffea arabica L.* *European Scientific Journal*, 13(3), 211-222.

Schoebitz, M., Lopez, M., y Roldan, A. (2013). Bioencapsualtion of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 33(4), 751-765.

Shabana, E., Gabr, M., Moussa, H., El-Shaer, E., y Ismaiel, M. (2017). Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in response to gamma irradiation. *Food chemistry*, 214, 550-555.

Sharma, H., Sharma, K., y Koshal, A. (2019). Role of microorganism for eco-friendly agriculture. *Journal of Plant Development Sciences*. Vol, 11(8), 441-444.

Siller-Ruiz, M., Hernández-Egido, S., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J., y Muñoz-Bellido, J. (2017). Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(5), 303-313.

Sims, J. (2000). Soil fertility evaluation In: Sumner M. E. (ed) *Handbook of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 2111 p. 106-154.

Solano-Doblado, L., Alamilla-Beltrán, L., y Jiménez-Martínez, C. (2018). Functionalized edible films and coatings. *TIP Specialized Journal in Chemical-Biological Sciences*, 21, 30-42.

Solis, K., Quiroz F., Vernaza, L y Carrera F. (2017). Biofertilizantes una alternativa ecológica para la agricultura frente al cambio climático en el Ecuador. *Dominio de las Ciencias*, 3(4), 75-88.

Sosa-del Castillo, D., Álvarez-Barreto, J., y Pérez-Martínez, S. (2015). Encapsulación de Trichoderma en micropartículas de alginato para el control de patógenos de cacao. *Revista de Protección Vegetal*, 30, 80-80.

Sotelo, C., Zalocar, Y., e Iglesias, M. (2016). Biofertilización con cianobacterias (*Nostoc sp.*): efecto sobre el rendimiento del girasol (*Helianthus annuus L.*), en suelos del Chaco. *Agrotecnia*, (23), 21-21.

Spartan©, W. 16. (2016). Wavefunction Inc. Irvine CA.

Stainer, R., Ingraham, J., Wheels, M., y Painter, P. (2005). *Microbiología Segunda Edición*. Barcelona: Editorial Reverté.

Stal, L. (2017). The effect of oxygen concentration and temperature on nitrogenase activity in the heterocystous cyanobacterium *Fischerella sp.* *Scientific Reports*, 7(1), 5402.

Streitwieser, A. (2013). Molecular orbital theory for organic chemists. In *Pioneers of Quantum Chemistry*. American Chemical Society. pp. 275-300.

Terrón, J., Da Silva, J., Moral, F., y García-Ferrer, A. (2011). Soil apparent electrical conductivity and geographically weighted regression for mapping soil. *Precision Agriculture*, 12(5), 750-761.

Thompson, L., y Troeh, F. (1988). Los suelos y su fertilidad. *Revert S.A.* Barcelona. España, pp. 135-169.

Tisdale, S. y Nelson W. 1987. Fertilidad de suelos y fertilizantes. *Montaner y Simón S.A.* Barcelona. ES. 739 p.

Todar, K. (2015). Textbook of bacteriology. Important groups of prokaryotes. <http://www.textbookof-bacteriology.net>

Trejo, A., de-Bashan, L., Hartmann, A., Hernandez, J., Rothballer, M., Schmid, M., y Bashan, Y. (2012). Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 65-73.

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

Trujillo-Tapia Ma N., y Ramírez-Fuentes E. (2010). Producción de maíz en temporal con el uso de algas verde-azules en la costa de Oaxaca. *AgroProduce*. 27:21-25.

Trujillo-Tapia, Ma. N., y Ramírez-Fuentes, E. (2015). Bio-fertilizer: an alternative to reduce chemical fertilizer in agriculture. *Journal of Global Agriculture and Ecology*, 42(2), 99-103.

Upma y Mohan L. (2015). Initio studies on electronic structure and charge density of chitosan. *Advances in Applied Science Research*, 6(7) 152-158.

USDA. United States Department of Agriculture. (1996). Soil survey laboratory methods manual. Soil Survey Investigations Report No. 42. Version 3.0. Washington DC, USA, 693p.

Valderrama, J. (2016). Eficiencia del acrilato de potasio en el ahorro del recurso hídrico en la zona agrícola San Diego, Tesis de licenciatura. Repositorio Universidad César Vallejo. hdl.handle.net/20.500.12692/916.

Vázquez, P., García, M., Navarro, M. y García, D. (2015). Efecto de la composta y té de composta en el crecimiento y producción de tomate (*Lycopersicon Esculentum Mill.*) en invernadero. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 36, 1351-1356.

Vemmer M. y Patel A. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*. 67: 380-389.

Venegas-González, J., Montañez-Soto, J., Ceja-Torres, L. F., Inocencio, C., y Velázquez-Machuca, M. (2016). Liming of an Andisol of the Michoacan State Purepecha Plateau, Mexico. *Advances in Bioresearch*, 7(1), 64-69.

Venkatachalam, S., Ranjan, K., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Thapa, S., y Kanchan, A. (2016). Diversity and functional traits of culturable microbiome members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere. *Plant Biology*, 18(4), 627-637.

Verhulst, N., François, I., Grahmann, K., Cox, R., y Govaerts, B. (2014). Nitrogen use efficiency and optimization of nitrogen fertilization in conservation agriculture. *Veterinary Science, Nutrition and Natural Resource*. 8, 1-19

Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255, 571-586.

Vidal R., Benítez R., y Guerrero J. (2018). Efecto de la inoculación de cianobacterias en cultivos de interés comercial en zonas semiáridas de La Guajira-Colombia. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 5(1), 20-31.

Villada, H., Acosta, H., y Velasco, R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*, 5-19.

Villarreal-Romero, M., Parra-Terraza, S., Sánchez-Peña, P., Hernández-Verdugo, S., Osuna-Enciso, T., y Basilio Heredia, J. (2010). Cobertura vegetal, vermicompost y actividad microbiana del suelo en la producción de tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(2), 217-231.

Villena, M., Hernández, M., Lara, V., y Martínez, M. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica*, 50(1), 43-50.

Vonshak, A. (1997). Spirulina: growth, physiology and biochemistry: *Physiology cell-biology and Biotechnology*. 43 – 66.

Vonshak, A., & Maske, H. (1982). Algae: growth techniques and biomass production. In *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon Press, Oxford.

Whangbo, M., Gordon, E., Xiang, H., Koo, H., y Lee, C. (2015). Prediction of spin orientations in terms of HOMO–LUMO interactions using spin–orbit coupling as perturbation. *Accounts of Chemical Research*, 48(12) 3080-3087.

Wilske, B., Bai, M., Lindenstruth, B., Bach, M., Rezaie, Z., Frede, H. y Breuer, L. (2014). Biodegradability of a polyacrylate superabsorbent in agricultural soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 9453-9460.

Wu, T., Huang, J., Jiang, Y., Hu, Y., Ye, X., Liu, D., y Chen, J. (2018). Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity. *Food chemistry*, 240, 361-369.

Wuang, S., Khin, M., Chua, P., y Luo, Y. (2016). Use of Spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Research*, 15, 59-64.

Yabur, R., Bashan, Y., y Hernández-Carmona, G. (2007). Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Phycology*, 19(1), 43-53.

Yang, B., Xiong, Z., Wang, J., Xu, X., Huang, Q., y Shen, Q. (2015). Mitigating net global warming potential and greenhouse gas intensities by substituting chemical nitrogen fertilizers with organic fertilization strategies in rice-wheat annual rotation systems in China: a 3-year field experiment. *Ecology. Engineering.*, 81, 289-297.

Yonezawa, U., de Moura, M., y Aouada, F. (2017). Estado da arte: um estudo sobre polímeros biodegradáveis na germinação e desenvolvimento de plantas. *Caderno de Ciências Agrárias*, 9(2), 69-78.

Zhalnina, K., Dias, R., de Quadros, P., Davis-Richardson, A., Camargo, F., Clark, I. y Triplett, E. (2015). Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microbial Ecology*, 69(2), 395-406.

Zhang, X. (2017). A plan for efficient use of nitrogen fertilizers. *Nature*, 543, 322.

Ziani, K. (2010). Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection*, 29(8), 853-859.

Zohuriaan-Mehr, M. y Kabiri, K. (2008). Superabsorbent polymer materials: A review. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, 17(6), 451-477.

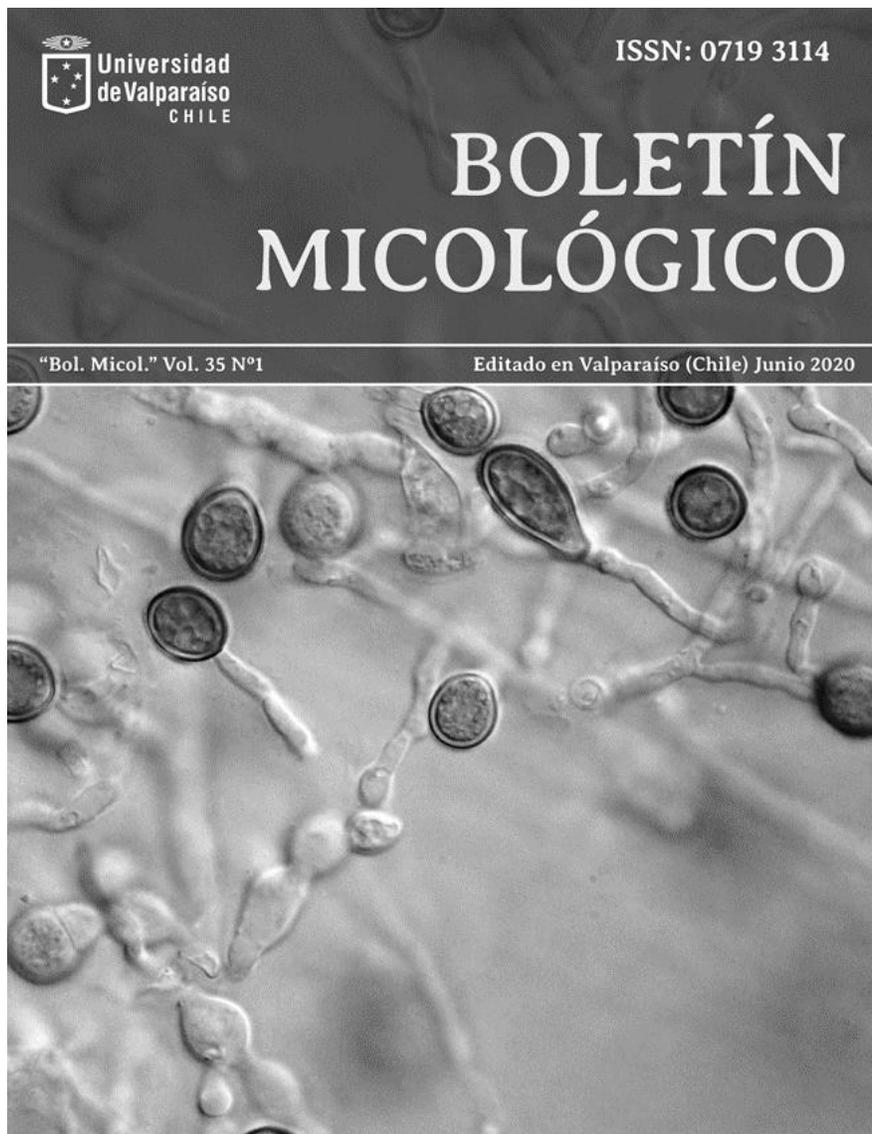
Zou, P., Yang, X., Wang, J., Li, Y., Yu, H., Zhang, Y., y Liu, G. (2016). Advances in characterization and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry*, 190 (1174-1181).

13 Anexo

Artículo publicado

Martínez-Rosales, A., Trujillo-Tapia, M. N., Ramírez-Fuentes, E. (2020). Crecimiento y metabolismo de Fischerella TB22 en medio de cultivo BG110. Boletín Micológico. 35(1):26-34. ISSN: 0719 3114.

<https://doi.org/10.22370/bolmicol.2020.35.1.2425>



Crecimiento y metabolismo de *Fischerella TB22* en medio de cultivo BG11⁰

(*Growth and metabolism of Fischerella TB22 in BG110 culture medium*)

Martínez-Rosales, A.¹, Trujillo-Tapia, M. N.^{1*}, Ramírez-Fuentes, E.¹

¹ Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel. Carretera Puerto Ángel-Zipolite Km. 1.5. Cd. Universitaria S/N. C.P. 70902. San Pedro Pochutla, Oaxaca, México. Tel: (+52 958) 584 3057

*Autor para correspondencia: nieves@angel.umar.mx

RECIBIDO: 11 de agosto 2020

APROBADO: 1 de septiembre 2020

DOI: 10.22370/bolmicol.2020.35.1.2425

Palabras claves: Cianobacteria, amonio, fotobioreactores, crecimiento microbiano, sonicación, densidad óptica.

Keywords: Cyanobacteria, ammonia, photobioreactors, microbial growth, sonication, optical density.

RESUMEN

Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre, abarcan una gama morfológica que va desde los organismos unicelulares como las bacterias y algunas cianobacterias, hasta multicelulares, filamentosas, por ello es importante conocer cómo se comportan y se puede saber haciendo una curva de crecimiento microbiano. Para este estudio se prepararon 4 fotobioreactores de columna burbujeada con inoculo de *Fischerella TB22*, se pusieron en aireación constante con 12 horas luz y 12 horas oscuridad durante 40 días con diferentes tratamientos de ajuste de volumen del medio de cultivo y ajuste del pH. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento en biomasa por peso seco, densidad óptica, pH y amonio de *Fischerella sp.* en medio de cultivo BG11⁰ durante 12 días. Las variables que se midieron de la curva de crecimiento de las cianobacterias, siguieron el patrón de una curva típica de crecimiento microbiano.

ABSTRACT

Free-living nitrogen-fixing microorganisms cover a morphological range that goes from unicellular organisms such as bacteria and some cyanobacteria, to multicellular, filamentous, therefore it is important to know how they behave and can be known by making a microbial growth curve. For this study, 4 bubbled column photobioreactors with *Fischerella TB22* inoculum were prepared, they were placed in constant aeration with 12 hours of light and 12 hours of darkness for 40 days with different treatments of volume adjustment of the culture medium and pH adjustment. The objective of this work was to evaluate the biomass growth by dry weight, optical density, pH, and ammonia of *Fischerella sp.* in the BG11⁰ culture medium for 12 days. The variables that were measured from the growth curve of cyanobacteria followed the pattern of a typical microbial growth curve.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las microalgas se han convertido en una fuente prometedora y sustentable para la producción de compuestos de interés comercial, ya que al ser microorganismos autótrofos solo requieren de agua, luz (como fuente de energía) y CO₂ (como fuente de carbono)¹. Las cianobacterias son microorganismos procariotas conocidos como algas verde-azules o cianofitas². Por muchos años las cianobacterias fueron consideradas algas verdes azuladas debido a su fototrofia oxigénica. La estructura fina de las cianobacterias es bien conocida³. Son organismos fotoautótrofos, que realizan la fotosíntesis con liberación de oxígeno, presentan clorofila a como pigmento fotosintético primario y ficobiliproteínas como pigmentos auxiliares⁴. Algunos microorganismos en especial las

cianobacterias se reproducen por división celular, por lo cual presentan un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones adecuadas. Las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo, por lo cual, se modifica también la velocidad de crecimiento poblacional⁵. El crecimiento de un cultivo se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células (cél/mL), en peso seco (total y/u orgánico), cantidad de proteína, de pigmentos, medidos directamente o en unidades arbitrarias de fluorescencia, volumen de las células o carbono celular total, calculado para un período de tiempo o una fase de crecimiento específica⁶. Esto permite reconocer diferentes fases de crecimiento (figura 1), las cuales sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o biomasa.

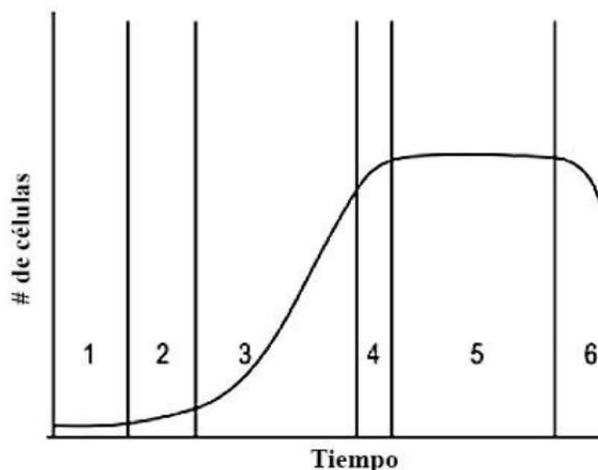


Figura 1. Curva típica de crecimiento microbiano. 1.- Fase lag, 2.- Fase de aceleramiento, 3.- Fase exponencial, 4.- Fase de desaceleración, 5.- Fase estacionaria, 6.- Fase de muerte.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre abarcan una gama morfológica que va desde los organismos unicelulares como las bacterias y algunas cianobacterias, hasta multicelulares, filamentosas⁷ como *Fischerella TB22*, que presentan ramificaciones, son capaces de generar fotosíntesis oxigénica, sintetizar

clorofila a, poseen al menos una ficobiliproteína, sintetizan glucógeno como producto de almacenamiento, presentan paredes celulares provistas de azúcares, aminos y aminoácidos⁸. Son organismos fijadores de nitrógeno donde la enzima que utilizan es la nitrogenasa⁹. Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno

contribuyen en gran medida a la presencia de nitrógeno en hábitats terrestres y acuáticos¹⁰. *Fischerella TB22* en particular, que tienen a la nitrogenasa confinada en los heterocitos, los cuales son células especializadas, distribuidas a lo largo o al final del filamento. Los heterocitos están rodeados de una pared glucolipídica gruesa que reduce la difusión del oxígeno hacia las células, cualquier oxígeno que se difunda hacia los heterocistos es reducido rápidamente por hidrógeno; así, la fijación de nitrógeno está espacial y metabólicamente separada del proceso fotosintético. Los heterocistos tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas adyacentes, de tal manera que existe un continuo movimiento de los productos de la fijación de nitrógeno desde los heterocistos hacia las células vegetativas y de los productos fotosintéticos desde las células vegetativas hacia los heterocistos¹¹. El modelo¹² de un heterocisto de *Fischerella sp.* con uniones a una célula vegetativa a cada lado (figura 2), enfatiza la situación para N. El heterocisto se caracteriza por una envoltura que comprende una capa de

glicolípidos, que forma la barrera principal para la difusión del gas (flechas delgadas) y una capa de polisacárido. La envoltura rodea una pared celular con una membrana externa, una capa de peptidoglicano y una membrana plasmática. Si el aire ingresa o no a los heterocistos a través de las células vegetativas puede regularse mediante un mecanismo de apertura / cierre (representado conceptualmente por flechas naranjas). El O₂ se respira, produciendo ATP. El N₂ y O₂ compiten por los electrones que se importan como sacarosa de las células vegetativas. Los poros en los extremos de los heterocistos a veces pueden contener cianofina (polímero de poliaspartato-multiarginina). Las enzimas involucradas en el proceso de fijación de N son la Nase: nitrogenasa y CytOx: citocromo oxidasa; además de [H]: equivalentes reductores (NAD (P) H, FdH) derivados del metabolismo de la sacarosa. ¹³afirma que *Fischerella sp.* mostró capacidad para crecer en un medio de cultivo selectivo (sin nitrógeno), y así comprobar que el amonio medido en el medio es por fijación de N₂.

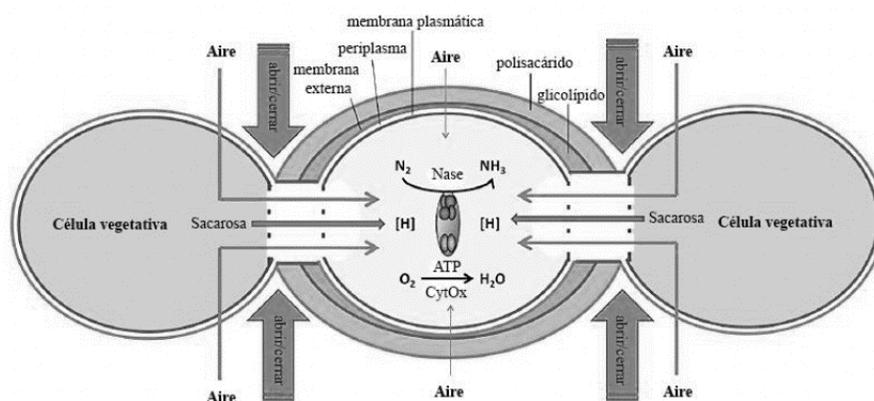


Figura 2. Modelo de un heterocisto con uniones a una célula vegetativa a cada lado¹².

METODOLOGÍA

Se prepararon 4 fotobioreactores de columna burbujeada¹⁴ con 500 ml de medio de cultivo¹⁵ BG11⁰ con inoculo de *Fischerella TB22* (figura

3) al 1% (p/v), se pusieron en aireación constante con 12 horas luz y 12 horas oscuridad durante 40 días¹⁶ a 35° C, el inoculo fue obtenido de la cepa del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Mar en fase estacionaria¹⁷. Los

tratamientos por triplicado fueron T1 donde se ajustó el pH del medio al pH inicial, T2 donde se ajustó el volumen (vol) del medio de cultivo, T3

donde se ajustó pH y vol y T4 donde habrá ningún ajuste. Se tomaron 5 muestras de cada tratamiento para su análisis el día 0, 3, 6, 9, 12.

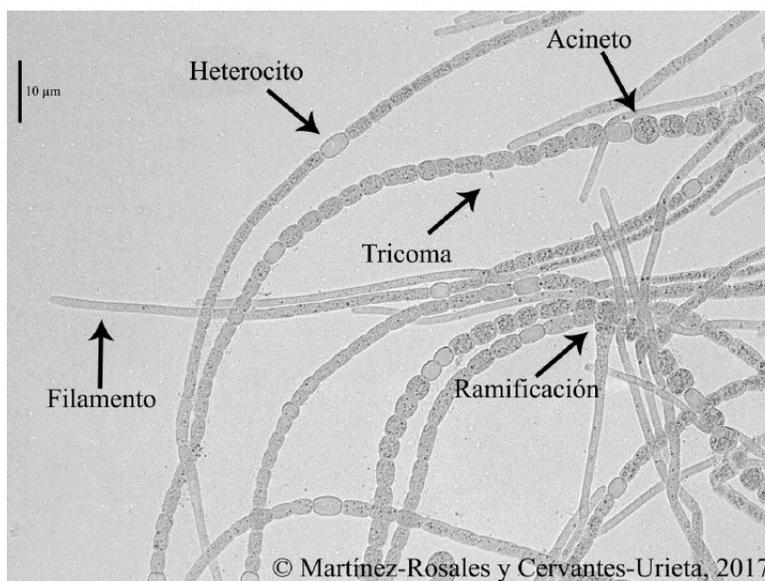


Figura 3. Identificación de células especializadas de *Fischerella TB22* con fotografía en microscopio a 40X.

Variables a evaluar

Para la biomasa por peso seco (BPS) se utilizaron filtros cualitativos de 40 mm de diámetro y con una abertura de poro de 5-8 µm, se enjuagaron con agua acidificada a pH 4¹⁸, y se colocaron en una estufa a 70°C por 24 horas y se colocaron en un desecador durante 24 horas más para obtener peso constante. Se tomaron una alícuota de 1 mL de cada tratamiento por triplicado las cuales se filtraron con la ayuda de una bomba de vacío, posteriormente los filtros se colocaron en la estufa a una temperatura de 70°C durante 24 horas. Se tomó el peso final del papel y el peso seco de biomasa se obtuvo por diferencia de peso¹⁹. Para la densidad óptica (DO) se sonicaron las muestras durante 5 minutos a una frecuencia de 42 ±6 khz. Se tomó una alícuota de 1 ml de muestra de cada tratamiento por triplicado, se adicionó 1ml de BG11⁰, se midieron en un espectrofotómetro UV/Vis a 550 nm. Para la medición de amonio

en el medio de cultivo (NH₄⁺) se usó la técnica del manual²⁰. Se tomó una alícuota de 5 ml de muestra de cada tratamiento por triplicado y se pusieron a centrifugar en tubos Falcon a 3500 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante a otro tubo y se agregó: 1 gota (0.05 ml- 50µL) de MnSO₄ 0.003M., 0.5 mL de NaClO y 0.6 mL de Fenato inmediatamente después de la solución de NaClO. Se agitó vigorosamente tras cada adición. Se dejaron reposar 10 min y se midieron a una absorbancia de 630 nm en un espectrofotómetro UV/Vis. La lectura del pH se tomó con un potenciómetro marca Hanna modelo HI5221 directamente en el medio de cultivo de cada tratamiento.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con análisis de medidas repetidas. Los datos se analizaron con el paquete estadístico Statistica versión 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No hubo diferencia en las variables evaluadas entre tratamientos, pero sí entre días. El mayor crecimiento en biomasa ocurrió en el día 9 y 12 (figura 4a) no existiendo diferencias significativas entre ellos: se obtuvieron en promedio 6.8 ± 0.12 mg de NH_4^+ y 7 ± 0.18 mg el día 12.²¹ reportaron en un experimento similar con *Fischerella sp.* en condiciones de aireación la producción de amonio de 0.44 ± 0.13 mg L^{-1} a los 5 días, en este trabajo la producción de amonio de *Fischerella TB22* (figura 4b) a los 5 días fue superior (20 mg L^{-1}), esto puede ser atribuido a que estudiaron una especie diferente a la este trabajo, reportaron también con *Fischerella sp.* 8.34 ± 0.72 mg L^{-1} de clorofila, en este trabajo *Fischerella TB22* reportó en el T4 8.03 ± 0.2 mg L^{-1} (figura 4c), siendo T4 el mejor

tratamiento en esta variable. El ajuste de pH y vol en el T3 (figura 4d) mostró mejor producción de amonio en el día 9. Los resultados de biomasa (figura 4a) y pH (figura 4d) confirman lo dicho por²² que las cianobacterias son capaces de mantener un crecimiento sostenido entre un pH de 6,0 y 10,0 con un óptimo a pH 8,0. Se coincide con²³ en que la variación del pH está directamente relacionada con el incremento celular debido al aumento en el consumo de CO_2 , trayendo como consecuencia la alcalinización del medio. El pH se incrementó debido al consumo del fósforo por las cianobacterias, esto debido a que el medio de cultivo perdió su capacidad de amortiguamiento como reportan²⁴ en su trabajo con microalgas, para evitar pérdidas de biodisponibilidad de P, sin embargo, en este trabajo no afectó en el rango de crecimiento.

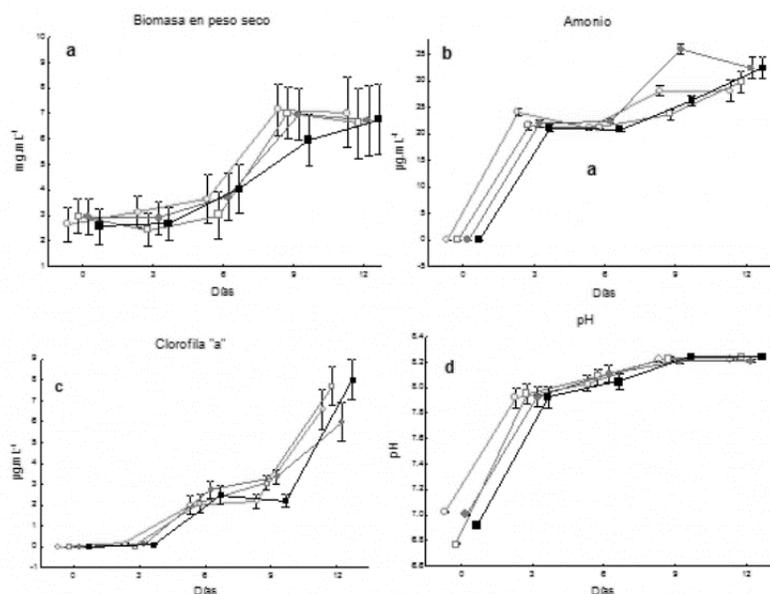


Figura 4. a) Biomasa en peso seco. b) Concentración de amonio. c) Clorofila "a". d) Medición de pH de *Fischerella TB22*

T1= (○) Ajuste de pH, T2= (□) Ajuste de volumen de medio BG11⁰, T3= (●) Ajuste de pH y volumen de medio BG11⁰, T4= (■) control sin ajustes.

Los resultados de DO (figura 5) demostraron la misma tendencia que la biomasa en peso seco.

La sonicación ayudó a homogenizar el inóculo además de separar las células encadenadas y

facilitó las mediciones por espectrofotometría. Se encontró una relación positiva (figura 6) entre

la medición de absorbancia y el peso seco según ($y = 0.022e^{0.048x}$, $R^2 = 0.948$).

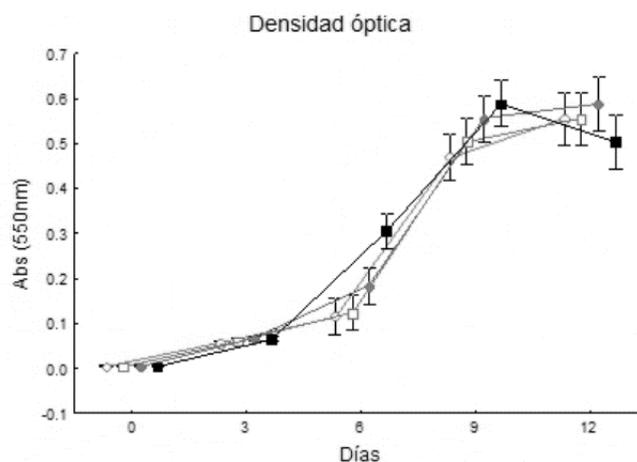


Figura 5. Densidad óptica de *Fischerella TB22*. T1= (○) Ajuste de pH, T2= (□) Ajuste de volumen de medio BG11⁰, T3= (●) Ajuste de pH y volumen de medio BG11⁰, T4= (■) control sin ajustes.

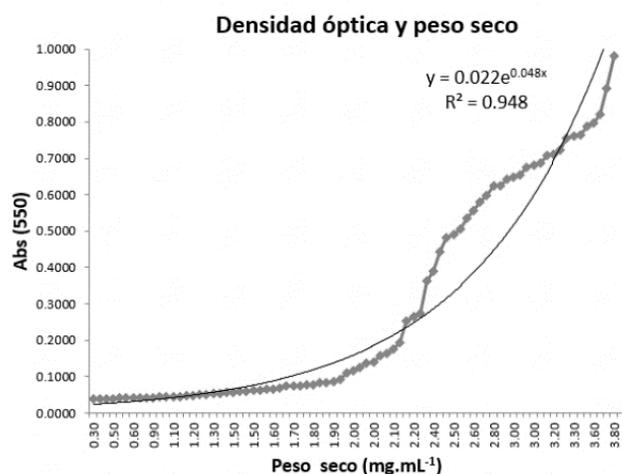


Figura 6. Relación entre la densidad óptica y peso seco de *Fischerella TB22*.

En el mismo periodo de cinética con consorcios cianobacterianos,¹⁶ y²⁵ obtuvieron resultados similares (Tabla 1), las diferencias en las variables evaluadas se atribuyen a que hubo

diferentes géneros en las cepas evaluadas, en este trabajo se utilizó únicamente a *Fischerella TB22* aislada.

Tabla 1. Comparación de resultados de trabajos con cianobacterias.

	pH	Biomasa (mg)	DO (abs)	CLa ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	NH ₄ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
16 *	6.8 \pm 0.10	8.12 \pm 0.05	0.4 \pm 0.01	10.42 \pm 0.63	34.5 \pm 4.6
25 *	N/A	5.8 \pm 0.1	N/A	4.12 \pm 0.95	12.70 \pm 3.8
Este trabajo	8.22 \pm 0.01	6.95 \pm 0.61	0.4 \pm 0.09	7.7 \pm 0.94	30.7 \pm 2.08

*Utilizaron consorcios de cianobacteria

CONCLUSIONES

Las variables que se midieron de la curva de crecimiento de las cianobacterias, siguieron el patrón de una curva típica de crecimiento microbiano. El noveno día de crecimiento de *Fischerella TB22* es el mejor para la aplicación como biofertilizante ya que tiene su máxima producción de amonio. Recuperar el volumen y mantener el pH como al inicio no fue relevante para su desarrollo. Las cianobacterias mantuvieron su crecimiento en el rango del pH de 7.3 a 8.6. La sonicación ayudó a homogenizar el inóculo y facilitó las mediciones por espectrofotometría.

REFERENCIAS

1. Benavente-Valdés, J. R., et al. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Acta Química Mexicana*, 2012, vol. 4, no 7, p. 1-12. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/262560081_Tecnologia_de_Cultivo_de_Microalgas_en_Fotobiorreactores

2. Lee, E. *Phycology* (3rd Edition). Estados Unidos: Cambridge University Press. 1999.

3. Campos, Victoriano, et al. Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile. *Boletín Micológico*, 2005, vol. 20. Disponible en:

<https://micologia.uv.cl/index.php/Bolmicol/articula/view/279>

4. Ho, Ming-Yang, et al. Extensive remodeling of the photosynthetic apparatus alters energy transfer among photosynthetic complexes when cyanobacteria acclimate to far-red light. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2020, vol. 1861, no 4, p. 148064. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272819301033>

5. Arredondo Vega, B. O., Voltolina, D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, 2007, vol. 1, p. 17-25. Disponible en:

https://www.researchgate.net/profile/Domenico_Voltolina/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO/links/00b4953c92711ed8fb000000.pdf

6. Arredondo Vega, B.O., Cordero Esquivel, B., Herrero, C. y Abalde, J. Manual de Técnicas Bioquímicas Aplicadas en Ficología. Manual de Prácticas del 1er. Curso Teórico Práctico: Aplicaciones Biotecnológicas del Cultivo de Microalgas. La Paz, Baja California Sur, México. Septiembre 1-5, 1997; 40 págs.

7. Mayz-Figueroa, J. Biological Nitrogen Fixation. *Revista Científica UDO Agrícola*, 2004; 4(1), 1-20. Disponible en:

<http://www.bioline.org.br/abstract?cg04001>

- 8. Carr, N., y Whitton, B.** The Biology of Cyanobacteria (2nd Edition). California: University of California at Berkeley Press. 1982.
- 9. Stainer, R., Ingraham, J., Wheeler, M., y Painter, P.** Microbiología Segunda Edición. Barcelona: Editorial Reverté. 2005.
- 10. Freire, Elizabeth; Koch, Alma; Salvador, Lorena.** Evaluación del potencial biofertilizante de consorcios de Cianobacterias en pasto Raygrass (*lolium multiflorum*). ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana, 2016, vol. 4, no 1. Disponible en: <https://revistaecuadorestabilidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestabilidad/index.php/revista/article/view/27>
- 11. Todar, K.** Textbook of bacteriology. Important groups of prokaryotes. 2015; <http://www.textbookofbacteriology.net>
- 12. Stal, Lucas J.** The effect of oxygen concentration and temperature on nitrogenase activity in the heterocystous *cyanobacterium Fischerella sp.* Scientific Reports, 2017, vol. 7, no 1, p. 1-10. Disponible en <https://www.nature.com/articles/s41598-017-05715-0>
- 13. Martínez A. K.** Establecimiento de las condiciones de cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, aisladas de suelos cultivados de papaya. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca. 2010.
- 14. Reichert, Carolina da Cruz; Reinehr, Christian Oliveira; Costa, Jorge Alberto Vieira.** Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2006, vol. 23, no 1, p. 23-28. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-66322006000100003&script=sci_arttext
- 15. Rippka, Rosmarie, et al.** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology, 1979, vol. 111, no 1, p. 1-61. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-111-1-1>
- 16. Ramírez-López C.** Efecto de la aireación y la irradiación sobre un consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Tesis. Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel. 2009; 84 pp.
- 17. Vonshak, A.; Maske, H.** Algae: growth techniques and biomass production. En Techniques in bioproductivity and photosynthesis. Pergamon Press, Oxford, 1982. Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/contributions/Vonshak-A/1980.-Vonshak-AL.pdf>
- 18. Vonshak, Avigad.** Spirulina: Growth, Physiology and. Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology, 1997, p. 43. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=RUIZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA43&dq=Spirulina:+growth,+physiology+and+biochemistry:+Physiology+cell-biology+and+Biotechnology.+&ots=zdOsR_Xij&sig=w7dnsDPz0V8kXIu_93hwASMZ3E8#v=onepage&q=Spirulina%3A%20growth%2C%20physiology%20and%20biochemistry%3A%20Physiology%20cell-biology%20and%20Biotechnology.&f=false
- 19. Arredondo-Vega, B., Cordero-Esquivel, B., Voltolina, D.** Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Capítulo 4. 2007; 31-34 pp.
- 20. APHA-AWA-WPCF.** Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th

edition. American Public Health Association. Washington. D. C., U. S. A. 1992.

21. Rajabnasab, Mahboobeh, et al. Adaptation of the *Cyanobacterium fischerella* sp. ISC 107 to the combined effects of pH and carbon dioxide concentration. *Plant Physiology*, 2017, vol. 7, no 4, p. 2163-2171. Disponible en: http://ijpp.iau-saveh.ac.ir/article_537981.html

22. Morales, Ever, et al. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia*, 2002, vol. 27, no 7, p. 373-378. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33907007.pdf>

23. Brito, D. J., et al. Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum* Efecto de tres fuentes de nutrientes en la producción de biomasa y pigmentos de la microalga dulce acuícola *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias*, 2016, vol. 4, no 1, p. 15-26. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Julio_Colivet/publication/303401862_Effect_of_three_sources_of_nutrients_on_biomass_and_pigment_production_of_freshwater_microalgae_Hyaloraphidium_contortum/links/5740efdb08ae9f741b34e4bf/Effect-of-three-sources-of-nutrients-on-biomass-and-pigment-production-of-freshwater-microalgae-Hyaloraphidium-contortum.pdf

24. Beltrán-Rocha, Julio C., et al. Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de biología marina y oceanografía*, 2017, vol. 52, no 3, p. 417-427. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-19572017000300001&script=sci_arttext&tlng=p

25. Alonso-Santos E., Trujillo-Tapia Ma. Y Ramírez-Fuentes E. Crecimiento de

Fischerella sp. (Stigonematales: Cyanobacteria) en ausencia de nitrógeno y carbonatos. *Tendencias de Investigación en Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*. 2015; Pag. 8-17. ISBN 978-607-9453-08-4. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Isaac_Lucas/publication/298215267_Tendencias_de_Investigacion_en_Biotecnologia_y_Ciencias_Agropecuarias/links/56e7318f08ae4c354b1a7b89/Tendencias-de-Investigacion-en-Biotecnologia-y-Ciencias-Agropecuarias.pdf