

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS

**BIOFERTILIZANTE DEL CONSORCIO CIANOBACTERIAS (*Trichormus* sp.) Y
MICROALGAS (*Scenedesmus* sp.) EN FORMULACIÓN LIOFILIZADA O BIOMASA
HÚMEDA, COMO SUSTITUTO PARCIAL O TOTAL A LA FERTILIZACIÓN
CON NITRÓGENO EN PLÁNTULAS DE TOMATE**

Tesis de graduación para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Estudiante

Bach. Irene Cortés González

Tutor

Licda. Nancy Villalobos Sandí

Asesores

Dr. Eduardo Salas Alvarado

M.Sc. Esteban Arboleda Julio

Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica, 2021

**BIOFERTILIZANTE DEL CONSORCIO CIANOBACTERIAS (*Trichormus* sp.) Y
MICROALGAS (*Scenedesmus* sp.) EN FORMULACIÓN LIOFILIZADA O BIOMASA
HÚMEDA, COMO SUSTITUTO PARCIAL O TOTAL A LA FERTILIZACIÓN
CON NITRÓGENO EN PLÁNTULAS DE TOMATE**

Estudiante
Bach. Irene Cortés González

**Trabajo final de graduación de tesis sometida a consideración del tribunal
examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias, para optar por el grado de
Licenciatura en Ingeniería Agronómica.**

**Trabajo Final de Graduación presentado como requisito parcial para optar por el
grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica.**

Tribunal Examinador

M.Sc. José Alonso Calvo Araya
Representante del Decano FCTM

Dr. Rafael Evelio Granados Carvajal
Director Escuela de Ciencias Agrarias.

Licda. Nancy Villalobos Sandi.
Directora de Tesis

Dr. Eduardo Salas Alvarado
Asesor

M.Sc. Esteban Arboleda
Asesor

Bach. Irene Cortés González
Estudiante

ÍNDICE

1	DEDICATORIA	9
2	AGRADECIMIENTO	10
3	RESUMEN	11
4	SUMMARY	12
5	INTRODUCCIÓN	13
6	OBJETIVOS	17
	6.1 OBJETIVO GENERAL	17
	6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
7	MARCO TEORICO	18
	7.1 Plántulas de tomate y el aporte de nitrógeno	18
	7.2 Alternativas al nitrógeno mineral en la agricultura	19
	7.3 Biología de las cianobacterias y microalgas.....	20
	7.4 Compuestos de las cianobacterias y microalgas útiles para la agricultura.....	22
	7.5 Cianobacterias y microalgas como biofertilizantes	24
8	METODOLOGIA	27
	8.1 Localización de la investigación	27
	8.2 Establecimiento del experimento	27
	8.3 Tratamientos	28
	8.4 Inoculación del consorcio microalga y cianobacterias.	29
	8.5 Condiciones de crecimiento del consorcio	31
	8.6 Diseño experimental	34
	8.7 Variables para evaluar	35
	8.7.1 Altura de la planta y diámetro del tallo	35
	8.7.2 Medición fotosintética	36
	8.7.3 Biomasa total de la plántula.....	37
	8.7.4 Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC) de cianobacterias y microalgas en el sustrato al final del experimento.	38
	8.8 Análisis estadístico	39
9	RESULTADOS Y DISCUSION	40
	9.1 Variables de crecimiento de las plántulas de tomate	40
	9.2 Absorción total de nutrientes	47

9.3 Unidades formadoras de colonias (UFC) de cianobacterias y microalgas en el sustrato al final del experimento.	55
10 CONCLUSIÓN	56
11 RECOMENDACIÓN	58
12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los tratamientos producto de la combinación de factores.....	28
Tabla 2. Composición química de los medios de cultivo BBM y BG11.....	32
Tabla 3. Promedio de UFC/mL del consorcio de cianobacterias y microalgas contenidos en los sustratos suelo al final del desarrollo de la plántula de tomate en cada uno de los tratamientos.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diseño estructural y funcional de la mesa Invernadero; a). Mesa Invernadero cubierta maya antiafida, apertura lateral, b) capota plástica para evitar exposición a la lluvia. 28
- Figura 2.** Implementación de la metodología. cámara de germinación y traslado mesa invernadero; a) temperatura y humedad adecuada, b) distribución espacial de las bandejas según el diseño. 29
- Figura 3.** Metodología empleada en la medición de conductividad y pH de la solución nutritiva; a) Tester a utilizarse. 31
- Figura 4.** Metodología empleada en la inoculación del sustrato con el consorcio de microalgas y cianobacterias, a) llenado de celdas con sustrato inoculado 33
- Figura 5.** Esquema del diseño experimental (completamente al azar) con tres repeticiones por tratamiento. 34
- Figura 6.** Descripción de las bandejas utilizadas diámetros y dimensiones y distancias de distribución; a) Dimensiones de las bandejas comerciales, b) bandeja comerciales recortadas para obtener la bandeja de unidad experimental, c) distancia entre distribución de las bandejas. 35
- Figura 7.** Metodología empleada en variables a medir, a). altura de la planta, diámetro del tallo y medición fotosintética. 36
- Figura 8.** Metodología empleada en la preparación de las muestras para análisis de Biomasa total de la plántula; a) muestras limpias y seleccionadas por unidad experimental, b) muestras preparadas para entrega al laboratorio del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA)..... 37
- Figura 9.** Metodología empleada en la preparación de muestras para cuantificación de UFC de microalgas y cianobacterias en el sustrato final; a.) Extracción del sustrato por celda según unidad experimental, b) muestras identificadas para envío al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad Nacional (UNA). 38
- Figura 10.** Medias (n=9) de (A) altura, (B) peso fresco y (C) peso seco de plántulas de tomate a los 22 días de la siembra, según la condición de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.) liofilizadas y en biomasa húmeda o sin aplicación (testigo). Barras verticales angostas son errores estándar. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias en las medias de los tratamientos ($P \leq 0.05$)..... 42
- Figura 11.** Efecto de la concentración de nitrógeno contenido en la solución nutricional sobre los valores medios (n=9) de la Altura, peso fresco y peso seco de plántulas de tomate a los 22 días de la siembra. Barras verticales angostas son errores estándar. . 44
- Figura 12.** Efecto de la concentración de nitrógeno contenido en la solución nutricional, bajo tres condiciones de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.): liofilizado, biomasa

húmeda o sin aplicación (Testigo), sobre el nivel medio de clorofila de las hojas (n=3), a los 22 días de la siembra de las plantas..... 45

Figura13. Efecto de la concentración de nitrógeno contenido en el sustrato nutricional, bajo tres condiciones de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.): liofilizado, biomasa húmeda o sin aplicación (Testigo), sobre la absorción total de (A) nitrógeno, (B) fósforo, (C) calcio, (D) magnesio, (E) potasio y (F) azúfre, a los 22 días de la siembra de las plantas de tomate. No hubo datos para el tratamiento sin liofilizar y el testigo a nivel cero de nitrógeno, excepto para absorción total de nitrógeno. 49

Figura14. Efecto de la concentración de nitrógeno contenido en el sustrato nutricional, bajo tres condiciones de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.): liofilizado, biomasa húmeda o sin aplicación (Testigo), sobre la absorción total de (A) Hierro, (B) Cobre, (C) Zinc, (D) Manganeso y (E) Boro, de plantas de tomate a los 22 días de la siembra. No hubo datos para el tratamiento biomasa húmeda y el testigo a nivel cero de nitrógeno 52

Figura15. Medias de absorción neta (mg/g) de (A) Nitrógeno, (B) Fósforo, (C) Calcio, (D) Magnesio, (E) Potasio y (F) Azúfre de plantas de tomate a los 22 días de la siembra, según la condición de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.) liofilizadas (n=9) y biomasa húmeda (n=6) o sin aplicación (testigo, n=6). Barras verticales angostas son errores estándar. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias en las medias de los tratamientos ($P \leq 0.05$)..... 53

Figura16. Medias de absorción neta de (A) Hierro, (B) Cobre, (C) Zinc, (D) Manganeso y (E) Boro, de plantas de tomate a los 22 días de la siembra, según la condición de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.) liofilizadas (n=9) y biomasa húmeda (n=6) o sin aplicación (testigo, n=6). Barras verticales angostas son errores estándar. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias en las medias de los tratamientos ($P \leq 0.05$)..... 54

1 DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico, con un profundo sentimiento a Dios, creador y mentor de mi existencia. La fuente de sabiduría y entendimiento.

GRACIAS MI DIOS.

A mis padres por todo el esfuerzo y trabajo incondicional en beneficio de mi formación como ser humano y profesional. Esa lucha incansable, cuyo apoyo absoluto me ha permitido lograr mis más anhelados sueños. Gracias

A mi esposo por ser fuente de motivación y con ello, conocer la capacidad, la fortaleza y el coraje que he desarrollado. Gracias

A mis hijas queridas: Nazaret y Mariangel, a quienes me escogieron como madre y me enseñaron a descubrir el arte de ser mamá. Donde la inspiración, las aventuras, los desafíos, los sueños y anhelos han sido y serán siempre compartidos. Gracias

A mis Hermanos: Verny, Warner y Jessica, quienes siempre han sido una columna inquebrantable en mi vida. Gracias

A mis sobrinos consentidos: Gabriel, Roberto, Alejandro y Felipe. Quienes siempre me llenan de sonrisas.

A mis sobrinas: María José, Camila, Amanda y Ana Belén. Cómplices de aventuras, secretos y abrazos.

A mi cuñado Cristian y mis cuñadas: Marcela e Ileana por el apoyo y la comprensión en este sueño hecho realidad.

2 AGRADECIMIENTO

Un Agradecimiento incondicional a la directora de tesis Licenciada Nancy Villalobos Sandí. Por su dedicación, apoyo y respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas.

Agradezco profundamente al Dr. Eduardo Salas Alvarado, por su extraordinaria ayuda, paciencia y ante todo el compartir su vasta experiencia en trabajos de investigación.

Agradezco al M.sc. Esteban Arboleda Julio. Por su orientación y atención a mis consultas durante el proceso que con llevo esta tesis.

También quiero agradecer al programa FOCAES de la Universidad Nacional, por brindarme parte de los recursos y herramientas necesarias para llevar a cabo el proceso de investigación.

Agradezco a Tahiris Calderón Peralta, estudiante de biología de la Universidad Nacional, por la ayuda ofrecida durante todo el desarrollo de esta tesis, su atención y amabilidad.

Agradezco a Ericka Rodríguez, Secretaria de la Escuela de Ciencia Agrarias-UNA, por facilitarme siempre el apoyo en la parte administrativa, la paciencia y las respuestas inmediatas a las ayudas solicitadas.

Agradezco al personal del CIA de la Universidad de Costa Rica: A la secretaria Patricia Gutiérrez, al Ing. Agr. Michael González, a las asistentes de laboratorio Nancy Peña, y Yesenia Rivas, quienes siempre mostraron mucho interés, esmero y me brindaron sugerencias para la mejor administración de las muestras, necesarias para el análisis de biomasa requerido en la investigación.

3 RESUMEN

Algunas cianobacterias y microalgas han sido estudiadas como una fuente de nitrógeno, nutriente primordial en la agricultura. En esta investigación se evaluó el aporte de nitrógeno de la cianobacterias (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.) en consorcio, como biofertilizante en el cultivo de tomate a nivel almácigo, buscando una alternativa total o parcial de las aplicaciones minerales de nitrógeno. El consorcio de microorganismos fue donado por el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad Nacional (UNA). En el experimento se estableció un diseño bifactorial 3x3, el primer factor correspondió a la condición del consorcio de microorganismos: liofilizado, biomasa húmeda y testigo (sin consorcio). El segundo factor fue la concentración de nitrógeno: 0, 50 y 100 %. Las Variables evaluadas fueron: altura de plántula, diámetro de tallo, medición de clorofila, biomasa total de la plántula y unidades formadoras de colonias (UFC) del consorcio en el sustrato finalizado el experimento. Las variables de altura, peso fresco y seco de las plántulas, mostraron diferencias estadísticas ($P \leq 0.0001$), según la formulación aplicada del consorcio. La formulación liofilizada incrementó ($P \leq 0.0001$) la altura 177%, peso fresco 284% y peso seco 369% respecto al testigo y con biomasa húmeda incremento ($P \leq 0.0001$) 181% altura, 306% peso fresco y 284% peso seco. El análisis del segundo factor (% de N fertilizado), indicó un efecto cuadrático ($P \leq 0.0023$) para altura, peso fresco y seco de las plántulas. Hubo efecto de fertilizar con nitrógeno al 50% y 100%, respecto a no fertilizar ($P \leq 0.0001$). Las diferencias entre las dosis de fertilizante del 50% y 100% de nitrógeno no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En el diámetro surgió interacción entre factores. La clorofila a 0 % N, mostró diferencia de 0.03 mg/cm² ($P \leq 0.0001$). Mientras que entre el tratamiento liofilizado respecto al testigo y a la biomasa húmeda, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis de 50 y 100% de N ($P \geq 0.1390$). Con relación a la absorción total del nitrógeno de la formulación liofilizado y la biomasa húmeda no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.0133$). Por otra parte, entre el testigo y la biomasa húmeda no mostraron diferencias significativas ($P \geq 0.5692$). El tratamiento liofilizado a 0, 50 y 100% nitrógeno, presentó las mayores absorciones totales de nitrógeno con diferencias altamente significativas ($P \leq 0.0001$) respecto a biomasa húmeda y testigo. La relación de los porcentajes crecientes de nitrógeno, para cada formulación: liofilizado, biomasa húmeda y testigo, arrojó un efecto cuadrático ($P \leq 0.0132$) en la absorción total de N. En absorción total de N hubo diferencias entre fertilizar al 50 y 100% N respecto a no fertilizar ($P \leq 0.0006$). En los niveles de 50 y 100 % N, las absorciones de macro y microelementos fueron mayores ($P \leq 0.0001$) para la formulación liofilizada, respecto a biomasa húmeda y testigo. La comparación liofilizada 0% nitrógeno, fue significativa ($P \leq 0.0193$) respecto a biomasa húmeda y testigo al 50 y 100% de nitrógeno. Los niveles crecientes de nitrógeno del consorcio liofilizado dieron efecto cuadrático ($P \leq 0.0397$) para Ca, Mg, Fe y S. Mientras que no hubo tendencia ni lineal ni cuadrática para P, K, Cu, Bo, Zn y Mn. Para liofilizado, el análisis de contraste entre fertilizar 50 y 100% de N respecto a no fertilizar, reveló un efecto de fertilizar en la absorción total de Ca, Mg, K, Zn y Mn ($P \leq 0.0450$). El consorcio liofilizado al 50% de concentración de nitrógeno, resultó ser el mejor tratamiento. Por tanto, el aporte de nitrógeno que ofrece como biofertilizante el consorcio de cianobacterias y microalgas, en el cultivo de tomate a nivel de plántula, es una alternativa parcial al fertilizante mineral.

4 SUMMARY

Some cyanobacteria and microalgae have been studied as a source of nitrogen, an essential nutrient in agriculture. In this research, the contribution of nitrogen from cyanobacteria (*Trichormus* sp.) and microalgae (*Scenedesmus* sp.) in consortium was evaluated as a biofertilizer in tomato crops at seedling level, looking for a total or partial alternative to mineral applications of nitrogen. The consortium of microorganisms was donated by the Microalgae Biotechnology Laboratory of the National University (UNA). The first factor corresponded to the condition of the consortium of microorganisms: freeze-dried, wet biomass and control (without consortium). The second factor was the nitrogen concentration: 0, 50 and 100 %. The variables evaluated were: seedling height, stem diameter, chlorophyll measurement, total seedling biomass and colony forming units (CFU) of the consortium in the substrate at the end of the experiment. Statistical analysis showed that the height, fresh and dry weight of tomato seedlings were different ($P \leq 0.0001$), according to the applied formulation of the consortium. The lyophilized formulation increased ($P \leq 0.0001$) height 177%, fresh weight 284% and dry weight 369% with respect to the control and with wet biomass increased ($P \leq 0.0001$) 181% height, 306% fresh weight and 284% dry weight. The analysis of the second factor (% N fertilized), indicated a quadratic effect ($P \leq 0.0023$) for height, fresh and dry weight of seedlings. There was an effect of fertilizing with nitrogen at 50% and 100%, with respect to not fertilizing ($P \leq 0.0001$). The differences between fertilizer doses of 50% and 100% nitrogen did not show statistically significant differences. In diameter, there was an interaction between factors. Chlorophyll at 0 % N showed a difference of 0.03 mg/cm² ($P \leq 0.0001$). While between the freeze-dried treatment and the control and the wet biomass, there were no statistically significant differences between the doses of 50 and 100% N ($P \geq 0.1390$), the total nitrogen absorption of the freeze-dried formulation and the wet biomass showed no significant differences ($P \geq 0.0133$), while between the control and the wet biomass there were no significant differences ($P \geq 0.5692$). The freeze-dried treatment at 0, 50 and 100% nitrogen, presented the highest total nitrogen uptakes with highly significant differences ($P \leq 0.0001$) with respect to wet biomass and control. The relationship of increasing percentages of nitrogen, for each formulation: freeze-dried, wet biomass and control, showed a quadratic effect ($P \leq 0.0132$) on total N uptake. In total N uptake there were differences between fertilizing at 50 and 100% N with respect to not fertilizing ($P \leq 0.0006$). At 50 and 100% N levels, macro and microelement uptakes were higher ($P \leq 0.0001$) for the freeze-dried formulation, with respect to wet biomass and control. The freeze-dried 0% nitrogen comparison was significant ($P \leq 0.0193$) with respect to wet biomass and control at 50 and 100% nitrogen. Increasing levels of nitrogen in the freeze-dried consortium gave a quadratic effect ($P \leq 0.0397$) for Ca, Mg, Fe and S. While there was no linear or quadratic trend for P, K, Cu, Bo, Zn and Mn. For freeze-dried, the contrast analysis between fertilizing 50 and 100% N with respect to not fertilizing revealed an effect of fertilizing on the total uptake of Ca, Mg, K, Zn and Mn ($P \leq 0.0450$). The freeze-dried consortium at 50% nitrogen concentration proved to be the best treatment. Therefore, the nitrogen supply offered as a biofertilizer by the cyanobacteria and microalgae consortium in tomato crops at the seedling level is a partial alternative to mineral fertilizer.

5 INTRODUCCIÓN

La agricultura convencional, llamada también "proceso de modernización de la agricultura", inició en la década del cincuenta con el uso de semillas híbridas, fertilizantes minerales, agroquímicos y maquinaria de alta capacidad operativa (Cáceres, 2009). Esto dio como resultado un movimiento fuerte en la historia agrícola a nivel mundial, conocido como la "Revolución Verde", esta significaba que, al utilizar las mismas cantidades de área agrícola, se podían alcanzar mayores rendimientos por superficie de área cultivada (Nikos, 2010). Lo anterior representó un modelo exitoso en el Primer Mundo, implantado por un conjunto de prácticas agrícolas de tipo intensivo (Bernal, 2010).

Las investigaciones mencionan que, en los países de América Latina, la agricultura convencional, ha causado un desgaste y deterioro de suelos agrícolas, lo cual se reconoce como "suelos erosionados que son simples sustratos de sustentación, estos requieren de técnicas artificiales cada vez más caras, por causa de un manejo inadecuado" (Primavesi, 2008). Debido a lo anterior, se genera una pérdida de fauna útil, problemas de contaminación ambiental y un impacto negativo sobre la salud humana (Castillo, 2004). Por otro lado, los gases con efecto invernadero (N_2 , O_2 y NH_4) que emiten los cultivos con índices de nitrógeno muy elevados, favorecen al calentamiento global en el planeta y provocan problemas respiratorios (Larios, 2009).

En consecuencia, a los cuestionamientos de la agricultura convencional y su impacto negativo, ha motivado a desarrollar un tipo de agricultura de cero o casi nada de impacto al cultivo, al ambiente y a los seres vivos, es decir; agricultura bajo principios más naturales y seguros para el ambiente y la sociedad. Siendo, un enfoque alternativo conocido como

“agricultura ecológica”, que permite una mejor reducción en la compactación del suelo, favorece la sostenibilidad de las producciones, recupera el intercambio iónico y estimula el crecimiento y nutrición de las plantas (Rodríguez-Salgado et al., 2019). El mismo trata de un enfoque holístico de la agricultura que considera la profunda interrelación existente entre la producción y el ambiente.

La agricultura ecológica o alternativa promueve la protección de los suelos y cultivos a través de prácticas agrícolas tales como el reciclado de nutrientes y de materia orgánica (usando compost y coberturas de suelo), las rotaciones de cultivo y el no uso de plaguicidas y fertilizantes sintéticos. (Cáceres, 2009). 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 y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Leyva et al., 2005).

Las cianobacterias son consideradas un beneficio para la agricultura por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Este proceso es considerado clave en la biosfera y constituye la base fundamental de la agricultura sostenible, ya que permite la conversión de nitrógeno gaseoso a una especie química mayormente disponible, como, nitritos, nitratos y amonio, para el desarrollo de procesos metabólicos de las plantas (Urzúla, 2005). Sumado a esto, las cianobacterias benefician al control de plagas y enfermedades por medio del antagonismo patogénico, al aporte de nutrientes, vitaminas, hormonas y varios compuestos bioactivos que estimulan y promueven el crecimiento de las plantas (Ahmed et al., 2010). Junto a estos microorganismos encontramos a las microalgas, algunas con la capacidad de fijar nitrógeno, absorber, metales pesados y fósforo (Dermibas, 2011; Converte et al., 2009; Scragg et al., 2002).

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes en el crecimiento de las plantas y se encuentra en un 78,0% a nivel atmosférico. Las bacterias nitrificantes, y otros microorganismos como cianobacterias son los responsables de la fijación y la disponibilidad de este elemento en la biosfera terrestre. (Ursula, 2009).

La fuente de nitrógeno a partir de organismos como cianobacterias y microalgas podría generar un aporte significativo para el crecimiento de las plántulas de diversos cultivos, entre ellos el cultivo de tomate (*Solanun lycopersicum*) a nivel de almacigo. La utilización de estos microorganismos a nivel agrícola puede sustituir parcial o total el nitrógeno mineral.

El cultivo de tomate es importante para la economía de Costa Rica. El área cultivada en el país, supera las 1.000 hectáreas. Es una hortaliza muy consumida a nivel nacional, se caracteriza por ser un cultivo intensivo, cultivado durante todo el año por pequeños y medianos productores y cuya producción se concentra en el Valle Central, en la provincia de Cartago, cantones como Paraiso, Orosi y en la provincia de Heredia y Alajuela se cultiva en la mayoría de sus cantones (López, 2016). Es primordial cualquier esfuerzo, en mejorar la calidad de los suelos, reducir el impacto negativo sobre el ambiente y la salud humana, provocado por manejos inadecuados de plaguicidas y fertilizantes. Así, como mantener la productividad y rentabilidad del cultivo. Por tanto, se debe fomentar un grado de responsabilidad en el sector agrícola, directamente en la búsqueda de alternativas, con temas de gran importancia para el avance en la agricultura.

Debido a lo antes expuesto sobre áreas, requerimientos nutricionales y manejos agrícolas implementados en cultivos de tomate, se consideró idóneo como planta indicadora para llevar a cabo esta investigación, cuyo propósito fue evaluar el aporte de nitrógeno que ofrece como biofertilizante un consorcio de cianobacterias y microalgas a nivel de almácigo, como alternativa total o parcial de las aplicaciones minerales. en el cual, combinando el requerimiento de elementos, las aplicaciones de bioproductos de bajo o cero impactos sobre el ambiente y la disponibilidad de información existente sobre la contribución de nitrógeno por parte de las microalgas y cianobacterias.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el aporte de nitrógeno que ofrece el biofertilizante del consorcio de cianobacterias y microalgas en plántulas de tomate, como alternativa total o parcial al fertilizante mineral.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Comparar el aporte de nitrógeno con y sin aplicación de consorcio de cianobacterias y microalgas, mediante el crecimiento y nutrición de plántulas de tomate.
- 2- Evaluar la formulación (liofilización y biomasa húmeda) del consorcio de cianobacterias y microalgas en la contribución de nitrógeno, mediante el crecimiento y nutrición de plántulas de tomate.
- 3- Valorar la aplicación del consorcio bajo tres dosis de fertilización nitrogenada mineral en la plántula de tomate para una posible sustitución parcial o total del elemento.

7 MARCO TEORICO

7.1 Plántulas de tomate y el aporte de nitrógeno.

El desarrollo de una planta inicia con el proceso de embriogénesis, en el cual se establece la forma básica de la planta y se forman los meristemas, tejidos que generan los órganos de la planta adulta y que se distribuyen en los ápices de los tallos y raíces y en el tejido cambial (Quintero y Correa, 2011). El proceso continuo de división celular, expansión y diferenciación origina la forma general de la planta, asimismo su tamaño y su estructura. Por lo que el crecimiento total de una planta puede ser definido como la suma de patrones locales de la expansión celular (Quintero y Correa, 2011).

Ahora bien, en todas las etapas del desarrollo es necesario la asimilación de elementos, algunos de ellos indispensables para la formación y la maduración de los órganos. En este sentido, uno de los elementos más requerido para el crecimiento es el nitrógeno, base de aminoácidos y proteínas. Este elemento es incorporado en forma directa o indirecta siendo absorbido por la raíz, una vez ahí son transformados en compuestos orgánicos y asimilables. (Abarca, et al., 2017).

Sumado a lo anterior, una planta con deficiencia de nitrógeno puede presentar un proceso llamado clorosis, manifestando una coloración amarillenta de tallos y de hojas, además de falta de desarrollo y debilidad en todo el cuerpo vegetal (González, 2004). Aunque este fenómeno es multifactorial, la deficiencia de nutrientes como el nitrógeno puede contribuir a que la clorofila presente en la planta sea degradada y, por ende, la planta se debilita. El tomate, en particular, es un vegetal que requiere de cantidades importantes de

nitrógeno para el desarrollo adecuado del mismo. (Abarca et al., 2017). Este requerimiento oscila entre 300-400 kg N. ha⁻¹. (López, 2016).

7.2 Alternativas al nitrógeno mineral en la agricultura.

El nitrógeno es un elemento esencial para los cultivos, este nutriente se absorbe en altas cantidades, ya que cumple funciones vitales como crecimiento del vegetal, desarrollo y producción. La importancia de mantener y mejorar las cantidades de nitrógeno en suelos, es una práctica importante ya que la mayoría de suelos son deficientes. La incorporación de nitrógeno no mineral es una estrategia de gran valor agrícola, ya que el nitrógeno mineral se pierde por desnitrificación, volatilización del amonio (NH₄) o lixiviación. La desnitrificación y volatilización de NH₄ causan polución por producción de gases con efecto invernadero (N₂ O₂ y NH₄), mientras que la lixiviación puede causar contaminación de aguas superficiales, de manera que cualquier forma de aumentar su aporte al sistema o de disminuir sus pérdidas, es importante desde el punto de vista ecológico y económico. Dentro de alternativas que se mencionan se encuentran como, por ejemplo: el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno y los abonos verdes.

El nitrógeno fijado por las cianobacterias puede ser liberado al medio y quedar disponible para la planta a partir de la autólisis y la descomposición de las células y en algunas especies, liberado en forma de amonio o pequeños polipéptidos en la etapa vegetativa. (Harun et al., 2010). Por otro lado, las microalgas producen lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades, compuestos que al degradarse liberan elementos esenciales importantes al suelo (Demirbas, 2011).

Es importante considerar que la fertilización mineral tiene una disponibilidad inmediata en su respuesta mientras que la fertilización haciendo uso de microorganismos como las microalgas y las cianobacterias necesita de más tiempo para estar disponible debido al periodo de descomposición (Tello, 2018).

7.3 Biología de las cianobacterias y microalgas.

Las cianobacterias y microalgas son organismos microscópicos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, capturando el dióxido de carbono (CO₂) atmosférico, a partir de la luz absorbida y se genera la síntesis de compuestos orgánicos. La clorofila es el principal pigmento en la fotosíntesis, por medio de esta molécula se captura la luz solar y esta energía es empleada para romper las moléculas de agua que a su vez donan los electrones necesarios para reestablecer de nuevo la molécula de clorofila, tal y como ocurre en las plantas (Kim, 2015).

Otros pigmentos presentes en estos organismos son los carotenoides, los cuales también son muy numerosos y tienen una función muy particular relacionada con evitar la fotooxidación de la clorofila (Rowan, 1989). Por otro lado, específicamente las cianobacterias contienen otro tipo de pigmento denominado ficobiliproteínas, que incluye la ficocianina, la ficoeritrina y la aloficocianina, moléculas encargadas de reflejar los colores azules, rojo y verdeazulado respectivamente, cuya función se relaciona del mismo modo con la protección de la clorofila de la luz (Richmond & Hu, 2014).

Debido a su antigüedad, estos microorganismos, se han adaptado para sobrevivir en diversos ambientes extremos tales como sequías, salinidad, temperatura, pH entre otros (Zulpa et al., 2003). Además, se les puede encontrar en ecosistemas acuáticos (marinos y dulceacuícolas) y terrestres o formando relaciones simbióticas con otros organismos como es el caso de los líquenes (asociación cianobacteria-hongo) o con plantas vasculares y no vasculares, relación que aporta grandes beneficios a los suelos (Rueda, 2020).

En cuanto a su forma, tanto las microalgas como las cianobacterias tienen representantes unicelulares, coloniales y filamentosas, así como también, específicamente las microalgas, presentan una gran diversidad en cuanto a la forma de sus células y a la estructura de como los cloroplastos (Úrsula, 2009). Pese a esto y a que ambos microorganismos son autótrofos, presentan varias características diferenciales que las alejan evolutivamente. Por ejemplo, las cianobacterias son procariotas, por lo que tienen semejanzas con las bacterias como por ejemplo presentan un solo cromosoma circular situado en el citoplasma, no tienen organelas complejas y su pared celular está compuesta por peptidoglucano, carbohidrato típico de las paredes celulares bacterianas. Las microalgas en cambio cuentan con un núcleo bien establecido, presentan cloroplastos y mitocondrias bien definidas y su pared celular está compuesta por celulosa, igual que las plantas superiores (Bellinger & Sigeo, 2015).

Por otro lado es importante definir que la producción de proteína microalgal es una nueva opción biotecnológica de discutida viabilidad en el manejo y aprovechamiento de desechos orgánicos de origen agrícola, constituyendo una alternativa recurrente de convertir estas fuentes de contaminación en materiales útiles desde un punto de vista económico, nutricional e industrial. (Castrillón, 2013).

7.4 Compuestos de las cianobacterias y microalgas útiles para la agricultura.

Se reporta en la literatura la producción de fitohormonas por parte de las cianobacterias y las microalgas. Por ejemplo, se ha encontrado que las auxinas pueden ser producidas por algunos géneros de cianobacterias como *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Calothrix*, *Chlorogloeopsis*, *Cylindrospermum*, *Gloeotheca*, *Nostoc*, *Plectonema*, *Synechocystis*. (Prasanna, et al., 2010). También, las giberelinas pueden ser producidas por los géneros de cianobacterias como *Anabaenopsis* y *Cylindrospermum*, mientras que las citoquininas se han encontrado en *Anabaena*, *Chlorogloeopsis* y *Calothrix*.

Otros compuestos como el ácido indol-3-acético (IAA), la auxina biológicamente más activa, se ha encontrado en colonias de bacterias de suelo y epífitas (Hussain, 2015). Sin embargo, también se ha reportado la presencia de este compuesto en cianobacterias tales como *Nostoc*, *Chlorogloeopsis*, *Calothrix*, *Plectonema*, *Gloeotheca*, *Anabaena*, *Cylindrospermum* y *Anabaenopsis*. (Prasanna et al., 2010) y en microalgas como *Scenedesmus armatus* y *Chlorella pyrenoidosa* (Stirk et al., 2013). La síntesis de IAA se puede presentar también en bacterias y puede tener una localización plasmática o cromosómica, sin embargo, en *Nostoc*, se encontraron genes homólogos de las enzimas de IAA (Hussain, 2015), lo cual reafirma la producción de este compuesto en cianobacterias. (Stirk et al., 2013).

Se ha reportado el efecto de fitohormonas producidas por los géneros de cianobacterias *Cylindrospermum* y *Anabaenopsis*, sobre la germinación de las semillas, las cuales sintetizan giberelinas, acelerando la germinación de semillas, además promover el crecimiento de las plántulas (Hegazi, 2010).

Por otro lado, las cianobacterias y microalgas producen una serie de metabolitos que son considerados como sustancias extracelulares que además son promotores de crecimiento (Gacheva & Gigova, 2014). También su metabolismo les permite sintetizar una reconocida composición de polisacáridos, lípidos, proteínas, vitaminas, esteroides y enzimas (Prasanna, et al., 2010) Es por esto que representan una continua fuente de biomasa renovable, que libera al ambiente sustancias orgánicas solubles con productos extracelulares conocidos como metabolitos secundarios, que pueden ser mineralizados por la microflora y por lo tanto ser beneficiosos para el suelo y por ende para los cultivos agrícolas (Vargas, 2014).

Las cianobacterias son una alternativa para disminuir la fertilización química y aumentar la producción en cultivos de interés comercial. Tienen la capacidad de fijar nitrógeno, producir reguladores de crecimiento, vitaminas y aminoácidos con la capacidad de estimular el crecimiento vegetal (Vidal, 2018).

En los últimos años, se menciona que las cianobacterias desempeñan un papel significativo en los ecosistemas áridos y semiáridos a través de las entradas de carbono (C) y nitrógeno (N) junto con varios micronutrientes para mejorar la estabilidad del suelo (Orlovsky et al., 2004). De acuerdo con lo anterior, las cepas nativas de cianobacterias en suelos semiáridos mostraron un notable potencial para mejorar la estabilidad estructural, el estatus de nutrientes y la productividad del suelo, debido a su inherente capacidad de tolerancia en condiciones de limitada humedad del suelo.

7.5 Cianobacterias y microalgas como biofertilizantes.

Los biofertilizantes, son productos que utilizan organismos beneficiosos que aportan nutrientes al suelo o al agua por medio de su actividad biológica (Tiwari, 2014). Estos son recomendados para aumentar la fertilidad de los suelos incrementando la materia orgánica presente. Por ende, las cianobacterias y las microalgas son organismos que tienen una función específica en los suelos, su descomposición permite la mineralización de los nutrientes necesarios (nitrogenados y fosfatados) para el crecimiento de las plantas (Hussain *et al.* 2011), (Prasanna, Sood, Ratha & Singh 2014).

Específicamente algunas cianobacterias filamentosas tienen la capacidad de transformar el nitrógeno atmosférico en compuestos nitrogenados por medio de células especializadas denominadas heterocistos (Ursula, 2009). Sin embargo, otras unicelulares no heterocísticas, también son capaces de realizar esta función (Prasanna *et al.*, 2014). El nitrógeno fijado, es reducido a iones amoniacos (NH_4^+) o nitritos (NO^{-3}) y el proceso es llevado a cabo mediante el complejo enzimático de la nitrogenasa, que cataliza la conversión del N_2 a NH_4^+ . La reacción general del proceso se representa mediante la siguiente ecuación:



El nitrógeno es absorbido por las plantas que forman diversas moléculas orgánicas indispensables en sus procesos metabólicos (Úrsula, 2009). Además de la fijación de N_2 , estos microorganismos realizan la fotosíntesis de manera simultánea mediante la especialización celular, presencia y cantidad de catalizadores (Roset, 2011) Por ejemplo, los heterocistos son células que contienen la enzima nitrogenasa en donde se concentra el proceso de fijación del nitrógeno. Mientras tanto en las células vegetativas se lleva a cabo la

fotosíntesis y formación de moléculas necesarias para el metabolismo de los carbohidratos, proceso que es incompatible con la fijación de nitrógeno (Úrsula, 2009).

Las cianobacterias y microalgas pueden ser incorporadas al suelo como materia orgánica y representan una fuente de enzimas como la fosfatasa, ácidos extracelulares y alcalinos que están activados en espacios periplasmáticos de la pared celular. Este material agregado al suelo induce a un incremento de otros mecanismos y aumentan la actividad enzimática del suelo, que participa en la liberación de nutrientes requeridos por la planta (Prasanna et al., 2014). Los biofertilizantes a base de cianobacterias y microalgas movilizan elementos nutricionalmente importantes como el fósforo desde una forma no utilizable (inorgánico) a través de procesos biológicos (Tello, 2018). Razón por lo que hace algunos años se están utilizando consorcios de cianobacterias como biofertilizantes en donde en los cultivos de arroz se han visto favorecido en el incrementar de la producción entre un 26.6% a un 30% (Nisha et al., 2007).

El consorcio con microalgas a nivel agrícola favorece a una mayor producción en los cultivos y mejora la eficiencia en la nutrición, la resistencia a cambios de temperatura, la resistencia a enfermedades fungosas, el ataque de insectos además de que prolonga la vida de frutos almacenados y mejora la germinación de la semilla (Purba, 2002). De acuerdo con Singh et al. (2010), las sustancias poliméricas extracelulares (ESP) que producen las cianobacterias mejoran las condiciones de estrés hídrico y permiten la unión de las partículas del suelo. El consorcio de cianobacterias utilizado como biofertilizante también producen abundante EPS aproximadamente un 25% de su biomasa total (Nisha et al. 2007).

Los EPS producidos por las cianobacterias también parece promover la actividad de la microflora del suelo, como lo indican las altas actividades enzimáticas del suelo, a la vez

que dicha flora microbiana, puede producir más EPS, amplificando aún más el efecto (Nisha et al. 2007). Debido a esto, las cianobacterias juegan un papel muy importante en la fijación de C y N en el suelo y se han considerado muy importantes para el ecosistema del desierto. Por otro, la notable tolerancia de las cepas de cianobacterias al estrés osmótico puede hacer que tengan éxito en la agricultura de suelo árido y semiárido donde la escasez de agua es inminente. Además, las cepas de cianobacterias, adaptadas a condiciones de alto estrés osmótico, pueden ser la estrategia más provechosa para mejorar la productividad de los cultivos y la recuperación tierras en descanso para la agricultura sostenible (Singh *et al.*, 2010).

Las cianobacterias poseen la capacidad de fijar nitrógeno, producir vitaminas y aminoácidos que estimulan el crecimiento vegetal, particularmente forman asociaciones con plantas vasculares y no vasculares, actuando como biofertilizantes, y convirtiéndose en una alternativa para disminuir la aplicación de agroquímicos que afectan la calidad de los suelos y la salud humana (Cindy A. García Salazar, 2020).

El beneficio de las microalgas como biofertilizantes es considerado, como una posible solución, siendo un recurso ecológico, rentable y sostenible a los fertilizantes sintéticos, ya que mejoran la producción agrícola y disminuyen la contaminación ambiental (Kawalekar, 2013). Esto indica que las cianobacterias y las microalgas pueden ser utilizadas como biofertilizantes en cultivos anegados como el arroz, así como en una opción en diversidad de condiciones y diversidad de cultivos agrícolas.

8 METODOLOGIA

8.1 Localización de la investigación.

La investigación se llevó en San Bosco de Santa Bárbara de Heredia, coordenadas 10.63293 latitud norte, y -84.159363 longitud oeste. El clima en esta región presenta precipitaciones significativas la mayoría de los meses del año, con estación seca corta. La temperatura promedio anual es de 19.6 °C y precipitaciones medias de 2785 mm. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica, (2020).

8.2 Establecimiento del experimento.

Para la realización del experimento, se construyó una mesa metálica tipo invernadero con un área de 2,88m² (1,20m de ancho x 2,40m de largo x 1,80m de alto), protegida en su totalidad con malla antiáfida. Diseñada con puerta en los laterales de cierre con velcro adhesivo 3m. A la estructura se le confecciono una capota plástica para la protección de la lluvia con facilidad de manipulación, además se instaló una malla de sarán negro del 80,0% de sombra en la base de la estructura para controlar el ingreso de insectos. La mesa del invernadero se ubicó en un terreno plano y libre de sombra en orientación de este a oeste. La duración de la fase experimental fue de 30 días (Figura 1).



Figura 1. Diseño estructural y funcional de la mesa Invernadero; a). Mesa invernadero cubierta maya antiafida, apertura lateral, b) capota plástica para evitar exposición a la lluvia.

8.3 Tratamientos.

Se realizó un experimento bifactorial 3x3, donde el primer factor fue la condición de la aplicación de un consorcio entre una cianobacteria fijadora de nitrógeno (*Trichormus sp.*) y una microalga (*Scenedesmus sp.*), a tres niveles: a) liofilizadas, b) biomasa húmeda (condición de sin liofilizar) y testigo (sin aplicación del consorcio). El segundo factor consistió en la concentración de nitrógeno contenido en el fertilizante que se utilizó como solución nutricional a tres niveles: 0, 50 y 100 % de nitrógeno. En total se evaluaron 9 tratamientos producto de la combinación de los niveles de los factores (3 x 3).

En la Tabla 1 se muestra la descripción de los 9 tratamientos, producto de la combinación de factores (3x3).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos producto de la combinación de factores.

Código	Tratamiento
T1	Testigo + 0 % de nitrógeno
T2	Testigo + 50 % de nitrógeno
T3	Testigo + 100 % de nitrógeno
T4	Consortio cianobacteria y microalga liofilizadas + 0 % de nitrógeno
T5	Consortio cianobacteria y microalga liofilizadas + 50 % de nitrógeno
T6	Consortio cianobacteria y microalga liofilizadas + 100 % de nitrógeno
T7	Consortio cianobacteria y microalga en biomasa húmeda + 0 % de nitrógeno
T8	Consortio cianobacteria y microalga en biomasa húmeda + 50 % de nitrógeno
T9	Consortio cianobacteria y microalga en biomasa húmeda + 100 % de nitrógeno

Fuente: Elaboración Propia, 2020

8.4 Inoculación del consorcio microalga y cianobacterias.

Las microalgas (*Scenedesmus* sp.) y cianobacterias (*trichormus* sp.), fueron donadas por el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad Nacional (UNA). Estas cepas fueron aisladas de ecosistemas de agua dulce de Heredia. Así mismo el sustrato de siembra utilizado fue Tuba Berger BM2, turba canadiense combinada con perlita y vermiculita fina para brindar el entorno radicular ideal. Se elaboró una cámara de germinación, cubriendo las bandejas inoculadas y sembradas con plástico negro a una temperatura promedio de 30°C durante cinco días (Figura 2). Posteriormente se trasladaron a la mesa invernadero de acuerdo con la distribución espacial de las bandejas según el diseño y el manejo agronómico específico.



Figura 2. Implementación de la metodología. cámara de germinación y traslado mesa invernadero; a) cámara húmeda, b) distribución espacial de las bandejas según el diseño.

Los riegos se realizaron con una frecuencia de dos o tres veces al día, dependiendo de las condiciones climáticas. La estructura y la granulometría de la turba permitió a las raíces una excelente porosidad de aireación y capacidad de flujo de agua. Se realizó el riego con una bomba manual de aspersión con capacidad de 2 litros. Se aplicó *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* a los 15 días después de germinado, la aplicación fue en forma foliar para el control de insectos como *Bemisia tabaci* y patógenos como *Fusarium sp.*

El programa de fertilización se llevó a cabo mediante, la aplicación de la solución nutritiva que alimentó a los microorganismos inoculados, solución que a la vez fertilizó indirectamente a las plántulas. La solución nutritiva se preparó mediante la formulación descrita en la tabla 2. Respetando las concentraciones de nitrógeno de acuerdo con los tratamientos 100%, 50% y 0% de nitrógeno. La conductividad eléctrica de la solución se fijó de 0.4 a 0,8 dS-m⁻¹, incrementándose gradualmente según la edad de la planta. El pH de la solución se mantuvo de 6,5 a 7,0. Ambas unidades de medida se regularon con un Tester (Groline) marca Hanna instruments, las mediciones se realizaron cada vez que se aplicó la solución nutritiva, correspondiente para los días: lunes, miércoles y viernes. La dosis aplicada fue de 120 ml de solución nutritiva por unidad experimental (Figura 3). La fertilización se realizó directamente al sustrato turba de forma manual, utilizando una botella de aforo. La variedad de tomate a utilizar fue variedad Rambo. Sus frutos se caracterizan por un rojo redondo tipo “Beef”, de buena calidad, buen color y sabor. Son de calibre GG y G con cuello verde ligero, con muy buen color en pintón y en su madurez. La planta es de vigor medio y de entrenudos cortos adaptada a los trasplantes. Presentan una alta resistencia a algunos hongos fitopatógenos como *Verticillium alboatrum* Reinke & Berthold, *Fusarium*

oxysporum Schltdl. y *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamam. y al virus Tomato mosaic virus (ToMV). Variedad de crecimiento indeterminado.



Figura 3. Metodología empleada en la medición de conductividad y pH de la solución nutritiva; a) Tester a utilizarse.

8.5 Condiciones de crecimiento del consorcio.

El consorcio de cianobacterias y microalgas fue realizado en un biorreactor bajo condiciones controladas de luz ($70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y temperatura ($28,0 \text{ }^\circ\text{C}$) en un medio de cultivo específico (sustrato) para cada una de ellas. La microalga se cultivó en medio Bold's (BBM) (Bold 1949) (Bischoff & Bold 1963) y la cianobacterias en medio BG-11 modificado (Allen and Stanier 1968) (Rippka et al. 1979), con las concentraciones de nutrientes que se presentan en la tabla 2. La preparación de los medios de cultivo se llevó a cabo según Richmond & Hu (2013).

Tabla 2. Composición química de los medios de cultivo BBM y BG11.

Bold's Basal Medium (BBM) (Bold 1949, Bischoff & Bold 1963).

Componente	Solución Stock (g L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración final en medio (M)	Cantidad Usada
Macronutrientes			
1. NaNO ₃	25.0g	2.94 x 10 ⁻³	10 ml
2. CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5g	1.70 x 10 ⁻⁴	10 ml
3. MgSO ₄ .7H ₂ O	7.5g	3.04 x 10 ⁻⁴	10 ml
4. K ₂ HPO ₄	7.5g	4.31 x 10 ⁻⁴	10 ml
5. KH ₂ PO ₄	17.5g	1.29 x 10 ⁻³	10 ml
6. NaCl	2.5g	4.28 x 10 ⁻⁴	10 ml
Solución EDTA alcalino			
7. EDTA	50.0g	1.71 x 10 ⁻⁴	1 ml
KOH	31.0g	5.53 x 10 ⁻⁴	
Solución Hierro acidificada			
8. FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98g	1.79 x 10 ⁻⁵	1 ml
H ₂ SO ₄	1.0mL		
Solución de Boro			
9. H ₃ BO ₃	11.42g	1.85 x 10 ⁻⁴	1 ml
1. Micronutrientes			
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82	3.07 x 10 ⁻⁵	1 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44	7.28 x 10 ⁻⁶	
MoO ₃	0.71	4.93 x 10 ⁻⁶	
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57	6.29 x 10 ⁻⁶	
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.49	1.68 x 10 ⁻⁶	

Notas: Ajuste pH a 6.6 con NaOH 1M o HCl, Autoclave a 121 C por 15 minutos a 15psi.

BG-11 Medium, Modified (Allen 1968, Allen & Stanier 1968, Rippka *et al.* 1979)

Componente	Solución Stock (g L ⁻¹ H ₂ O)	Concentración en el medio(M)	Cantidad utilizada
Macronutrientes			
1. NaNO ₃	150.0 g	1.76 x 10 ⁻⁵	10mL
2. K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	4.0 g	1.75 x 10 ⁻⁴	10mL
3. MgSO ₄ .7H ₂ O	7.5 g	3.04 x 10 ⁻⁴	10mL
4. CaCl ₂ .2H ₂ O	3.6 g	2.45 x 10 ⁻⁴	10mL
5. Ácido Cítrico	0.6 g	3.12 x 10 ⁻⁵	10mL
6. Citrato Férrico de Amonio	0.6 g (autoclave para	disolver)	10mL
7. EDTA	0.1 g	2.79 x 10 ⁻⁶	10mL
8. Na ₂ CO ₃	2.0 g	1.89 x 10 ⁻⁴	10mL
9. Metales traza			
H ₃ BO ₃	2.86g	4.63 x 10 ⁻⁵	1mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81g	9.15 x 10 ⁻⁶	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222g	7.65 x 10 ⁻⁷	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.39 g	1.61 x 10 ⁻⁶	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079 g	3.16 x 10 ⁻⁷	
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.0494 g	1.70 x 10 ⁻⁷	

Notas: Ajuste el pH a 7,4 con NaOH 1M o HCl, Autoclave a 121 C por 15 minutos a 15psi. Fuente: Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad Nacional. Richmond & Hu (2013).

La concentración final del consorcio para aplicar la inoculación al sustrato (medio de siembra) correspondió a la mezcla de las cepas de biomasa húmeda de 7g en el caso de las microalgas (*Scenedesmus* sp.) y 32g de biomasa en el caso de las cianobacterias (*Trichormus* sp.). Para la obtención de estas cantidades, los cultivos se cosecharon mediante centrifugación en una centrifuga marca Hermle Z206A para eliminar el exceso de agua. Una parte de está biomasa húmeda se utilizó en el experimento (condición de biomasa húmeda) y la otra parte fue deshidratada por medio de liofilización en un liofilizador marca Labconco. Ambas biomasas se colocaron en frascos estériles debidamente rotulados y se transportaron para la inoculación de la turba donde se realizaría la siembra de la semilla de tomate.

El consorcio se inoculó y aplicó al momento de la siembra de la siguiente forma: el sustrato (turba) se colocó en una bolsa plástica con capacidad para 3 kg, se mezcló con el consorcio microbiano mediante la agitación de al menos 20 veces con la bolsa cerrada. La dosis se estableció aplicando 3gramos de consorcio liofilizado por litro de agua para el tratamiento liofilizado y 13 gramos por litro de agua para el tratamiento de biomasa húmeda. De cada mezcla liofilizada o biomasa húmeda se tomó 7 gramos de turba inoculada para el llenado de la celda y posterior siembra (Figura 4).



Figura 4. Inoculación del sustrato con el consorcio de microalgas y cianobacterias.

La dosis de la fertilización mineral se estableció de la siguiente manera: 100% correspondió a la formulación completa, y las dosis de 50% y 0% se le restó únicamente el elemento nitrógeno a la mitad o por completo.

8.6 Diseño experimental.

El diseño experimental correspondió a un diseño completamente al azar (DCA), con tres repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por 24 celdas (6x4 celdas) de una bandeja de siembra de 72 celdas (6x12 celdas) con una dimensión de 540x280x46 mm en total (Figura 5). Cada bandeja se recortó en dos partes, obteniéndose tres bandejas de 24 celdas correspondiendo a la unidad experimental como se observa en la (Figura 6). La distancia entre bandejas en la mesa invernadero fue de 10cm, para evitar la proximidad de los tratamientos y la alteración de los resultados.

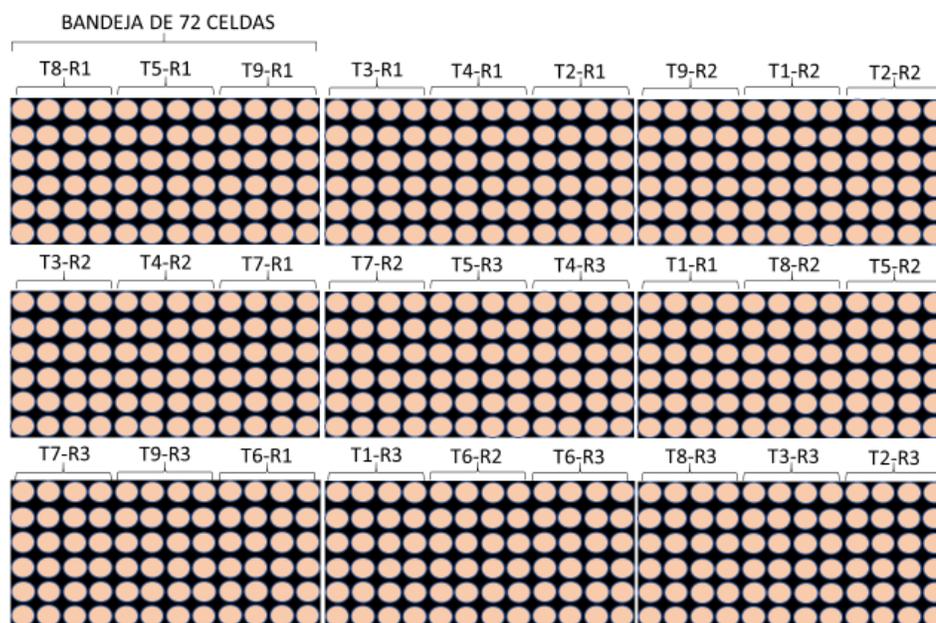


Figura.5. Esquema del diseño experimental (completamente al azar) con tres repeticiones por tratamiento. En cada bandeja de 72 celdas se establecerán tres tratamientos, cada tratamiento con 24 celdas donde se sembrarán plantas de tomate. Ver códigos de los tratamientos en la tabla 1 de descripción de tratamientos.

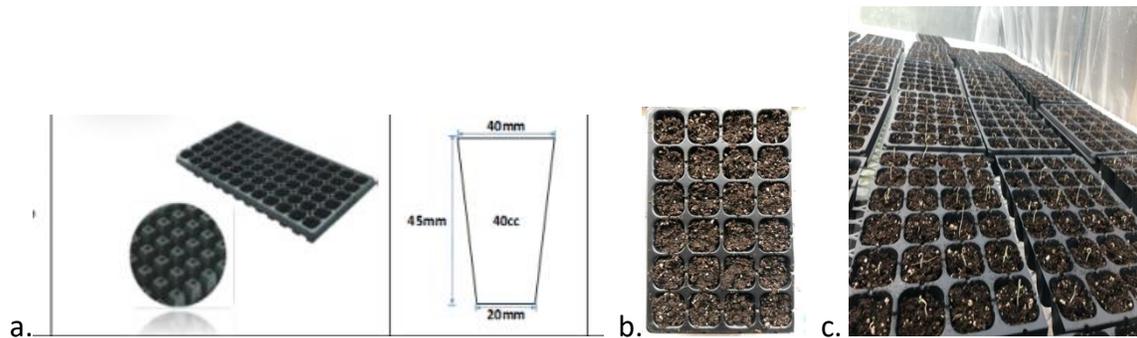


Figura 6. Descripción de las bandejas utilizadas diámetros y dimensiones y distancias de distribución; a) Dimensiones de las bandejas comerciales, b) bandeja comerciales recortadas para obtener la bandeja de unidad experimental, c) distancia entre distribución de las bandejas.

En cada celda de la bandeja se colocó una semilla de tomate variedad Rambo. La semilla se depositó en el centro y a la profundidad del tamaño de la semilla sobre de la superficie del sustrato, para lograr un crecimiento recto, homogéneo de las plántulas y evitar posteriormente competencia por luz y contaminación entre tratamientos. Las 27 unidades experimentales fueron ubicadas en el centro de la mesa invernadero.

8.7 Variables evaluadas.

8.7.1 Altura de la planta y diámetro del tallo.

La medición del crecimiento de la plántula de tomate fue el tamaño de plántula y el diámetro del tallo. Se midió el crecimiento de 15 plántulas de tomate de cada unidad experimental y se les realizaron mediciones de tamaño y diámetro del tallo a los 15 y 22 días después de germinación (ddg). Se midió la longitud del tallo desde la base hasta el meristemo apical de la plántula, utilizando una regla graduada en centímetros. Para la

medición del diámetro del tallo se utilizó un calibrador gradual (vernier manual o pie de rey), la medición se realizó a 0.5 cm de la base del tallo (Figura 7).

8.7.2 Medición fotosintética.

Para determinar la eficiencia fotosintética se midió la clorofila. lo cual es un fenómeno físico de las moléculas de clorofila que permite medir la funcionalidad del fotosistema II (PSII) durante el transporte de electrones. Esta además es considerada una medición no intrusiva y se realiza directamente sobre las hojas de las plantas. Para lo anterior, se utilizó un medidor de clorofila marca atLEAF CHL PLUS, es un dispositivo potente, portátil y fácil de usar para medir de forma no invasiva el contenido relativo de clorofila de las plantas de hoja verde. Esta medición se realizó a los 22 días después de germinada la semilla. (Figura7).



Figura 7. Metodología empleada en variables a medir, a). altura de la planta, diámetro del tallo y medición fotosintética.

8.7.3 Biomasa total de la plántula.

Se extrajeron 20 plántulas por unidad experimental, a estas se les realizó el lavado de raíces y se colocaron en bolsas de papel debidamente identificadas (Figura 8), las cuales se llevaron al laboratorio del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica (UCR). De la biomasa se obtuvo el dato de peso húmeda y peso seco mediante el método de diferencia de masa realizado por el mismo laboratorio. Además, se realizaron los análisis de concentración de nutrientes de la biomasa total de la planta. El procedimiento del N fue por combustión seca en auto analizador de acuerdo con el M-N; P, Ca, Mg, K, S, Na, Fe, Cu, Zn, B y Al. Por digestión de humedad con HNO_3 y determinación por espectrometría de emisión atómica con plasma (ICP) de acuerdo con el M-ICP.

La edad de muestreo para la biomasa seca fue al finalizar el periodo experimental 22 días después de la germinación.



Figura 8. Preparación de las muestras para análisis de Biomasa total de la plántula; a) muestras limpias y seleccionadas por unidad experimental, b) muestras preparadas para entrega al laboratorio del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA).

8.7.4 Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC) de cianobacterias y microalgas en el sustrato al final del experimento.

La cuantificación de microorganismos es un parámetro muy importante en los estudios de ecología microbiana para poder establecer si éstos son capaces de desarrollar una función benéfica o perjudicial (Morales-García et al., 2012). En este caso, se realizó la cuantificación a los 22 días después de germinadas las plántulas por el método de recuento en placa, el cual consistió en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 0,1 mL de cada dilución en una placa; las placas se incubaron hasta que las colonias se pudieran observar para su recuento (Ortega, 2014).

Las muestras para determinar las UFC de cianobacterias y microalgas en el sustrato turba, se realizaron extrayendo todo el sustrato de cada celda al final del experimento para cada unidad experimental, posteriormente se identificaron las muestras para ser enviadas al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la UNA (Figura 9).



Figura 9. Metodología empleada en la preparación de muestras para cuantificación de UFC de microondas y cianobacterias en el sustrato final; a.) Extracción del sustrato por celda según unidad experimental, b) muestras identificadas para envío al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la UNA.

8.8 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza considerando la estructura factorial de tratamientos. Cuando hubo interacción significativa entre factores se realizó un gráfico, lo anterior con el fin de visualizar los cambios que experimenta los niveles de un factor dado el cambio en los niveles del otro factor. Cuando la interacción no fue significativa, se analizó las diferencias de los niveles dentro de cada factor. Para separar las medias del factor condición de la aplicación del consorcio, se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa (LSA) al 5% de significancia. Los niveles crecientes del factor fertilización de nitrógeno se analizó mediante contrastes para observar si hubo efecto lineal o cuadrático. Los análisis estadísticos se realizaron en SAS® 9,4.

El modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + N_j + CN_k + E_{ijkl}$$

Donde:

μ : promedio general

C_i : condición de los microorganismos

N_j : concentración de nitrógeno

CN_k : interacción de la condición de los microorganismos por la concentración de nitrógeno

E_{ijkl} : término del error aleatorio.

9 RESULTADOS Y DISCUSION

9.1 Variables de crecimiento de las plántulas de tomate.

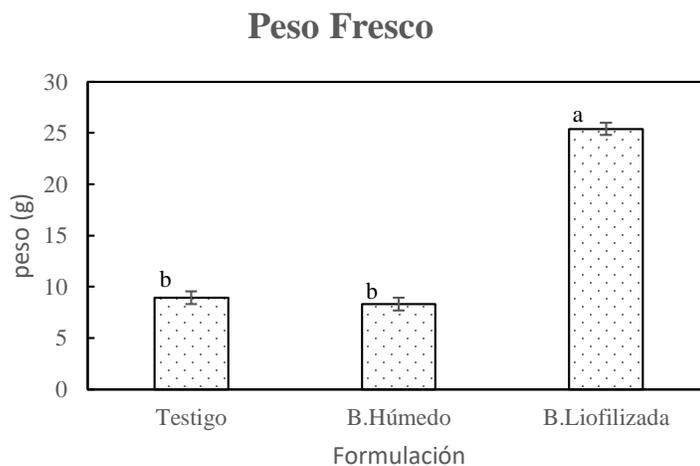
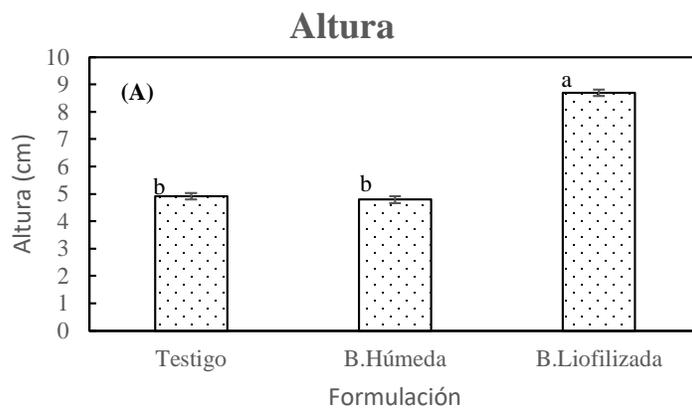
Las variables altura, peso fresco y seco de las plántulas de tomate no presentaron diferencias estadísticamente significativas con relación a la formulación liofilizada y biomasa húmeda del consorcio de cianobacterias - microalgas con respecto la concentración de nitrógeno contenido en la solución nutricional. El análisis de varianza reveló que no existió interacción ($P \geq 0.2758$) a los 22 días de la siembra, es decir; la formulación liofilizada y biomasa húmeda mantuvo la respuesta de estas variables de forma proporcional según la concentración de nitrógeno. Estudios demuestran que cepas de cianobacterias mejoraron parámetros de crecimiento de las plantas como altura de la planta, peso seco, rendimiento de grano (Prasanna et al.2009).

Por el contrario, existió interacción entre los parámetros de diámetro y el contenido de clorofila de las plántulas de tomate con relación a la formulación liofilizada y biomasa húmeda. Esto podría estar influenciado por una mayor disponibilidad de nitrógeno en el consorcio liofilizado, ya que algunas investigaciones indican que la participación del nitrógeno en la síntesis de la clorofila es primordial como fuentes de aminoácidos y proteínas. (Tjalling, 2006).

Por otra parte, estudios en el cultivo del pompón (*Dendranthema grandiflora* T), la deficiencia de nitrógeno presenta tallos con flores de diámetro pequeño, follaje clorótico y hojas de menor tamaño (Ángel y Campos. 1989). Por otro lado, ensayos señalan que el nitrógeno al encontrarse en cantidades deficientes, afectan la acumulación de clorofila

presentando mediciones bajas. (Boussadia *et al.*, 2010). Investigaciones mencionan que la liofilización permite la estabilidad del producto, disminuye la pérdida de sustancias volátiles, no existe oxidación y la solubilidad es más rápida. (Barragán & Lesmes, 2009).

El análisis estadístico mostró además que la altura, peso fresco y seco de las plántulas de tomate fue diferente ($P \leq 0.0001$), según la formulación aplicada del consorcio. La aplicación del consorcio en formulación liofilizada incrementó ($P \leq 0.0001$) la altura en un 177%, el peso fresco en 284% y el peso seco en 369% respecto al testigo (Figura10).



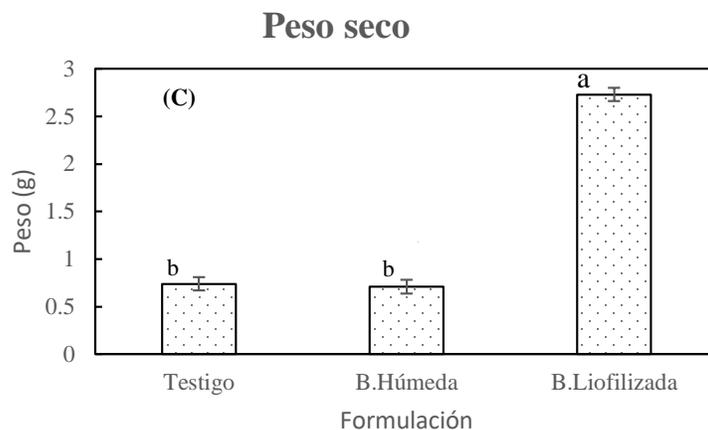


Figura10 Medias (n=9) de (A) altura, (B) peso fresco y (C) peso seco de plántulas de tomate a los 22 días de la siembra, según la condición de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.) biomasa liofilizada y en biomasa húmeda o sin aplicación (testigo). Barras verticales angostas son errores estándar. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias en las medias de los tratamientos ($P \leq 0.05$).

Investigaciones muestran que las cianobacterias benefician el aporte de nutrientes, vitaminas, hormonas y varios compuestos bioactivos tipo giberelinas, auxinas y al ácido indol acético, que estimulan y promueven el crecimiento de las plantas (Ahmed et al., 2010; Zaccaro, 2000). También se presentó incremento ($P \leq 0.0001$) de 181% en altura, 306% en peso fresco y 284% en peso seco entre el consorcio liofilizado respecto al consorcio en biomasa húmeda.

Según estudios, algunas tecnologías de conversión de biomasa de las algas, especialmente la pirolisis, origina un residuo carbonoso que contienen aplicaciones potenciales en agricultura como los biofertilizantes (Santos, 2014). Por el contrario, las variables altura, peso fresco y seco no presentaron diferencia ($P \geq 0.0508$) en forma de

biomasa húmeda respecto al testigo. Algunos ensayos han evidenciado que la inoculación de cianobacterias no produjo un aumento en el rendimiento en el cultivo del arroz, ni disminuyó el nitrógeno absorbido por la planta, derivado del fertilizante aplicado, lo que indica que la fijación biológica del nitrógeno inoculante no realizó un aporte significativo a la nutrición de la planta (Irisarri, Gonnet y Monza, 2008).

El análisis de los niveles cuantitativos del segundo factor (concentración de nitrógeno contenido en la solución nutricional), indicó un efecto cuadrático ($P \leq 0.0023$) para las variables altura, peso fresco y seco de las plántulas de tomate (Grafico 2). El efecto de fertilizar con nitrógeno al 50% y 100%, con respecto a no fertilizar con nitrógeno (0%) fue significativo ($P \leq 0.0001$), donde las diferencias fueron de 2.0 mm (± 0.147) en altura; 7.99 mg (± 0.748) de peso fresco y 0.70 mg (± 0.086) de peso seco (la diferencia media \pm error estándar de la diferencia). Este resultado es característico para una planta con deficiencia de nitrógeno ya que puede presentar falta de desarrollo y debilidad en todo el cuerpo vegetal (González, 2004).

Al contrario, las diferencias entre la fertilización en las dosis de 50% y 100% de nitrógeno no fueron significativas. En este sentido, algunos artículos respaldan que, al utilizar dosis de nitrógeno superiores a los requerimientos del cultivo de tomate, incide en un aumento en la contaminación del suelo y de mantos acuíferos además de los altos costos por fertilización que se generan. (Villarreal et al., 2002), (Eugercios, Álvarez y Montero, 2017).

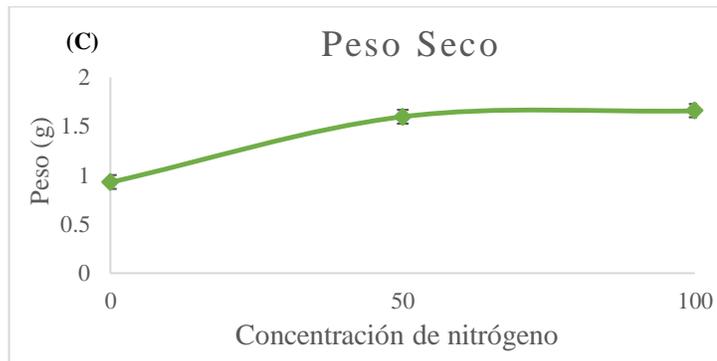
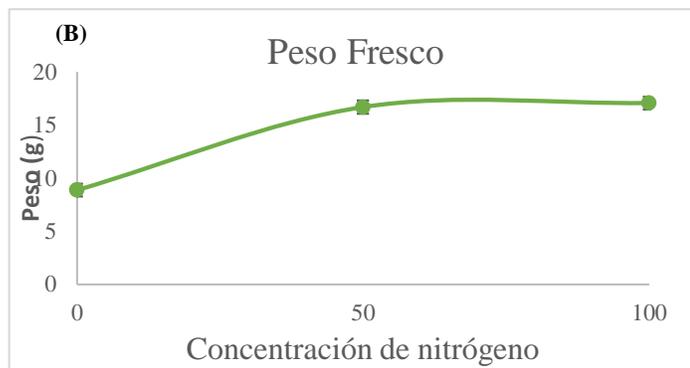
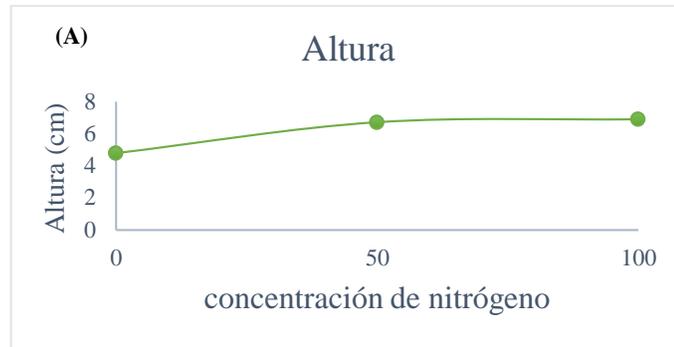


Figura 11. Efecto de la concentración de nitrógeno contenido en la solución nutricional sobre los valores medios (n=9) de la Altura, peso fresco y peso seco de plántulas de tomate a los 22 días de la siembra. Barras verticales angostas son errores estándar.

Los resultados del diámetro y el contenido de clorofila de las plántulas con respecto a los niveles de nitrógeno según el tratamiento, la condición liofilizada el diámetro de la plántula fue mayor con respecto a la condición de biomasa húmeda y el testigo, además se mantuvo constante en todos los niveles de nitrógeno probados (Figura 11).

También, se registró un comportamiento similar con respecto al contenido de clorofila. Esto refuerza la idea de que probablemente el aporte del nitrógeno sobre el crecimiento de la plántula fue adecuado, el diámetro del tallo es un indicador del vigor de las plantas, porque refleja la acumulación de fotosintatos, los cuales posteriormente pueden translocarse a los sitios de demanda en el cuerpo vegetal (Preciado *et al.*, 2002).

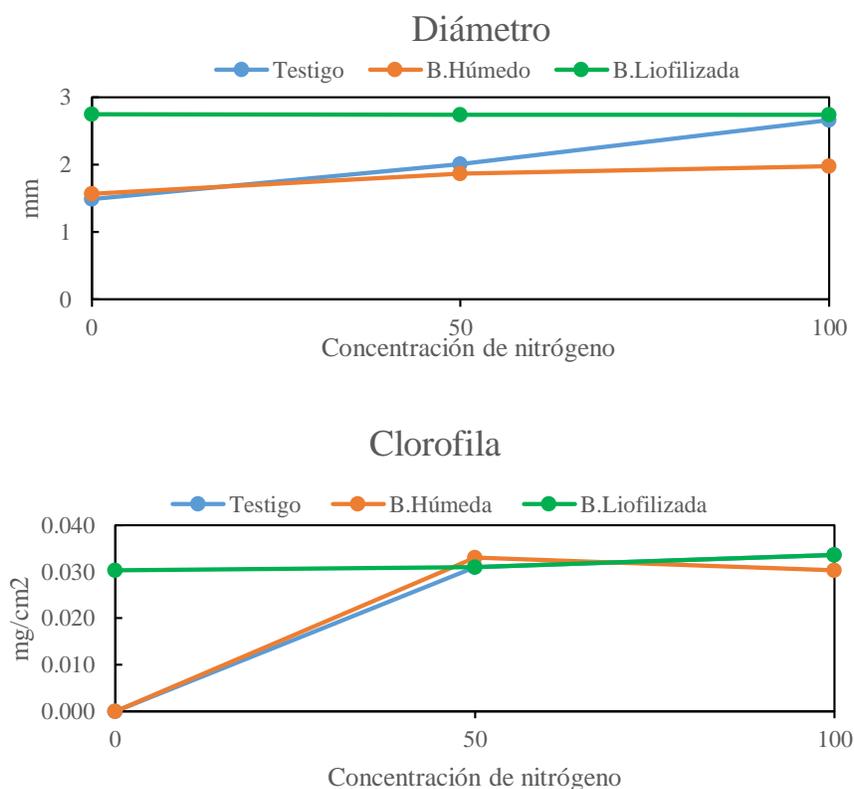


Figura 12. Efecto de la concentración de nitrógeno contenido en la solución nutricional, bajo tres condiciones de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.) : biomasa liofilizada, biomasa húmeda o sin aplicación (Testigo), sobre el nivel medio de clorofila de las hojas (n=3), a los 22 días de la siembra de las plantas.

En el caso del testigo se observó un aumento lineal creciente del diámetro a mayor porcentaje de nitrógeno, de tal forma que las diferencias entre la condición liofilizada y el testigo se acortaron los diámetros a medida que incrementó la concentración de nitrógeno en 1.27, 0.74 y 0.08 mm respectivamente. Por el contrario, las plántulas del testigo con respecto al consorcio de biomasa húmeda presentaron diferencias en diámetro que se fueron incrementando a mayor fertilización con nitrógeno en 0.08, 0.14 y 0.69 mm respectivamente. Por lo tanto, hubo mayor efecto del nitrógeno a 100% de su aplicación en el testigo que en el consorcio de biomasa húmeda (0.69 mm de diferencia), mientras que a 50% de aplicación de nitrógeno esa diferencia fue solo de 0.14 mm y a 0% de nitrógeno prácticamente no hubo diferencia. Estos resultados demuestran que, al haber una deficiencia de nitrógeno en el suelo, las consecuencias en la planta pueden presentarse por una falta de desarrollo y debilidad de esta (González, 2004).

De acuerdo con los datos de clorofila (figura 12), se presentó una diferencia con respecto al 0% de nitrógeno. Las diferencias entre el tratamiento liofilizado respecto a los tratamientos testigo y la biomasa húmeda fueron de 0.03 mg/cm² de clorofila ($P \leq 0.0001$) en ambos casos. En relación con esto, la clorofila en la hoja está estrechamente ligada con la concentración de nitrógeno, a su vez este elemento es necesario para la síntesis de esta molécula que inicia el proceso de la fotosíntesis (Rincón A & Ligarreto G. (2010). No obstante, las diferencias en los resultados de clorofila entre los tratamientos para los niveles de 50% y 100% de nitrógeno fueron muy pequeñas o nulas ($P \geq 0.1390$). Algunos estudios reportan que situaciones donde la disponibilidad de nitrógeno es grande, las lecturas del contenido de clorofila y el nitrógeno foliar no necesariamente presentan una correlación positiva. Lo anterior debido a que el potencial del sistema fotosintético podría estar

convirtiendo la energía lumínica en energía química y el excedente de nitrógeno puede formar parte de otros compuestos de reserva (Argenta et al., 2001, Bullock y Anderson, 1998, Zotarelli et al., 2003).

9.2 Absorción total de nutrientes.

En cuanto al contenido total de nitrógeno, este dio diferencia significativa en la formulación liofilizada con respecto a la biomasa húmeda según su concentración, con una probabilidad de ($P \leq 0.0133$) (Gráfico 4A). La liofilización es un proceso de transferencia de calor en donde ocurre una deshidratación forzada que puede alterar las propiedades físico-químicas y nutricionales del material (Villota y Hawkes, 2006). En este sentido, la descomposición de los microorganismos puede ser la razón del aporte de nitrógeno al sustrato para ser aprovechado por las plántulas en pocos días. Este efecto aumenta en el caso de las cianobacterias por su capacidad para fijar el nitrógeno gaseoso y liberar sus metabolitos al medio, los cuales quedan disponibles para la planta a partir de la autólisis y descomposición de las células e incluso en algunas especies, se produce amonio o pequeños polipéptidos (Almeida, 2014).

En cuanto al testigo y al tratamiento con biomasa húmeda los porcentajes de nitrógeno contenidos en las plántulas no mostraron diferencias significativas ($P \geq 0.5692$). Irisarri, Gonnet y Monza, (2008) determinaron que la fertilización con biomasa húmeda de cianobacterias generaba una descomposición del nitrógeno en forma gradual a partir de los 25 días después de aplicado y absorbido por las plantas. Lo anterior demuestra el comportamiento de la asimilación del N_2 a partir de la fertilización con cianobacterias a largo plazo en el suelo. Por el contrario, en plántulas tratadas con el consorcio liofilizado en cada uno de los niveles de nitrógeno, presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) con

las mayores absorciones totales, respecto al tratamiento con la biomasa húmeda y el testigo. Dichas diferencias entre el tratamiento liofilizado, respecto al promedio del testigo y el tratamiento con biomasa húmeda fueron de 21.5, 35.9 y 32.8 mg de nitrógeno en cada uno de los niveles de nitrógeno, respectivamente (gráfico 4A). De acuerdo con esto, la biomasa liofilizada puede estar brindando al sustrato los nutrientes de una forma más rápida para ser absorbidos por las plántulas.

Cuando se analizó la relación de los porcentajes crecientes de nitrógeno, dentro de cada una de las formulaciones del consorcio (liofilizado y biomasa húmeda) y el testigo, se encontró un efecto cuadrático ($P \leq 0.0132$) para la absorción total de nitrógeno (gráfico 4 A). Pero el análisis de contraste o comparación entre la fertilización a niveles 50 y 100% de N, respecto al 0% de N para cada nivel de consorcio liofilizado, la biomasa húmeda y el testigo, reveló que existió un efecto en la absorción total de nitrógeno ($P \leq 0.0006$) cuando se hace una fertilización. En este sentido el nitrógeno es uno de los elementos más requeridos para el crecimiento de las plantas y es incorporado en forma directa o indirecta por la raíz y transformado en compuestos orgánicos y asimilables (Abarca, et al., 2017).

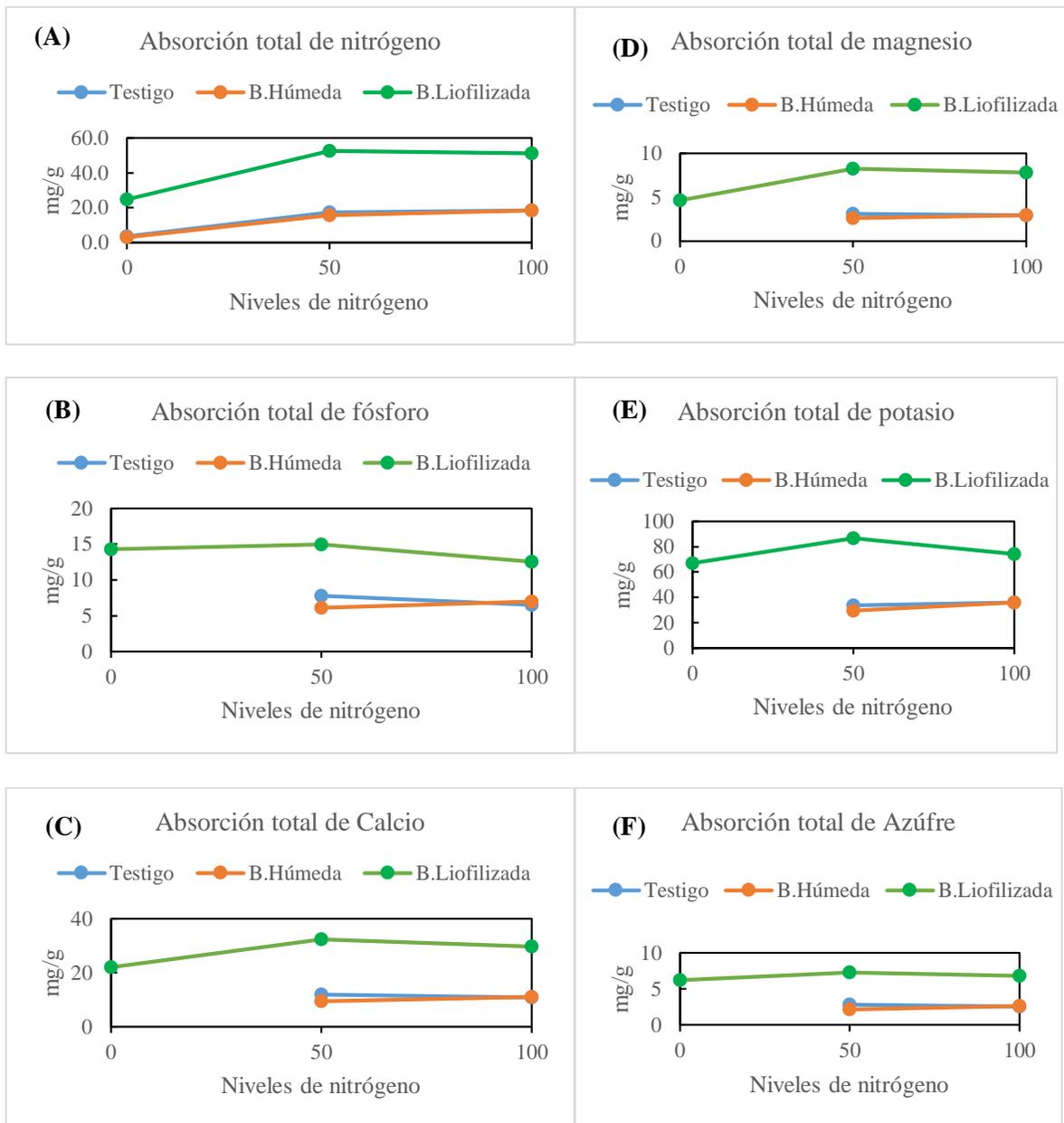


Figura13. Efecto de la concentración de nitrógeno contenido en el sustrato nutricional, bajo tres condiciones de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.): biomasa liofilizada, biomasa húmeda o sin aplicación (Testigo), sobre la absorción total de (A) nitrógeno, (B) fósforo, (C) calcio, (D) magnesio, (E) potasio y (F) azúfre, a los 22 días de la siembra de las plantas de tomate. No hubo datos para el tratamiento biomasa Húmeda y el testigo a nivel cero de nitrógeno, excepto para absorción total de nitrógeno.

Al comparar la biomasa liofilizada, húmeda y el testigo en todos los niveles evaluados de nitrógeno al 0, 50 y 100%, la condición liofilizada fue significativa ($P \leq 0.0193$). Algunas investigaciones indican que el aporte de nitrógeno por fijación biológica en cultivos de arroz se estima entre 8 y 30 kg de N/ ha por ciclo de cultivo (Méndez, 2015). Por otro lado, la técnica de liofilización quizás favorece la desintegración de algunas células siendo posteriormente asimilables en menor tiempo respecto a la biomasa húmeda, esto considerando que las operaciones de transferencia de calor en la deshidratación forzada pueden alterar las propiedades físico-químicas y nutricionales, sobre todo presentando cambios significativos por el proceso de oxidación catalizado por el calor (Villota y Hawkes, 2006). Al comparar la formulación de biomasa húmeda y el testigo, esta relación no presentó diferencias significativas en los diferentes niveles de nitrógeno.

En cuanto a las cantidades absorbidas de los otros elementos, no se pudo obtener datos para el tratamiento de biomasa húmeda y el testigo a nivel de 0% de nitrógeno, debido a que las plántulas no se desarrollaron lo suficiente, por ende, no se contó con la cantidad de material vegetal necesaria para el análisis de laboratorio (gráfico 4 y 5). Esta condición del desarrollo de la plántula puede estar relacionada con la deficiencia del nitrógeno, ya que una de las funciones más importantes de este elemento es contribuir con el crecimiento vegetativo, porque favorece el desarrollo del tallo, el crecimiento del follaje, así como la formación de frutos y granos (Hernández, 2018).

Por el contrario, en los niveles de 50 y 100 % de nitrógeno las absorciones de estos elementos fueron significativas ($P \leq 0.0001$) en la condición de biomasa liofilizada, respecto a la húmeda y el testigo (Gráfica 4 y 5). Se puede decir que, la implementación del biofertilizante en forma liofilizada favorece el metabolismo de la planta ya que el suministro

de nitrógeno aumenta la tasa fotosintética a la vez que favorece su crecimiento (Peil y Galvez, 2012).

Cuando se analizaron los niveles de nitrógeno en el consorcio liofilizado, se encontró un efecto cuadrático ($P \leq 0.0397$) en los elementos calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe) y azufre (S). Por otra parte, el fósforo (P), potasio K, cobre (Cu), boro (Bo), zinc (Zn) y manganeso (Mn) no presentaron ninguna relación. La comparación entre los niveles de 50 y 100% de N respecto al 0% de N, evidenció que hubo una absorción de Ca, Mg, K, Zn y Mn ($P \leq 0.0450$) específicamente para el consorcio liofilizado. El resto de los elementos se mantuvieron constantes. De acuerdo con lo anterior, las cianobacterias y microalgas permiten la mineralización de los nutrientes necesarios en el suelo (nitrogenados y fosfatados) para el crecimiento de las plantas (Tiwari, 2014) en este sentido, el aporte de nitrógeno en el suelo pudo haber favorecido la absorción de estos elementos.

Cuando se comparó la condición del consorcio húmedo y testigo (Gráfico 6 y 7), se manifestó que no existió diferencias entre el testigo y la biomasa húmeda. Por el contrario, ambos difirieron significativamente del consorcio liofilizado, donde este último presentó los valores más altos de las absorciones de los elementos. Los incrementos porcentuales de las absorciones de los elementos cuando se aplicó el consorcio liofilizado, respecto al promedio del testigo y el tratamiento biomasa húmeda, fueron 336% N, 204% P, 259 %Ca, 238 %Mg, 225%K, 265 %S, 282 %Fe, 304% Cu, 288 % Zn, 334 %Mn, 320 B %.

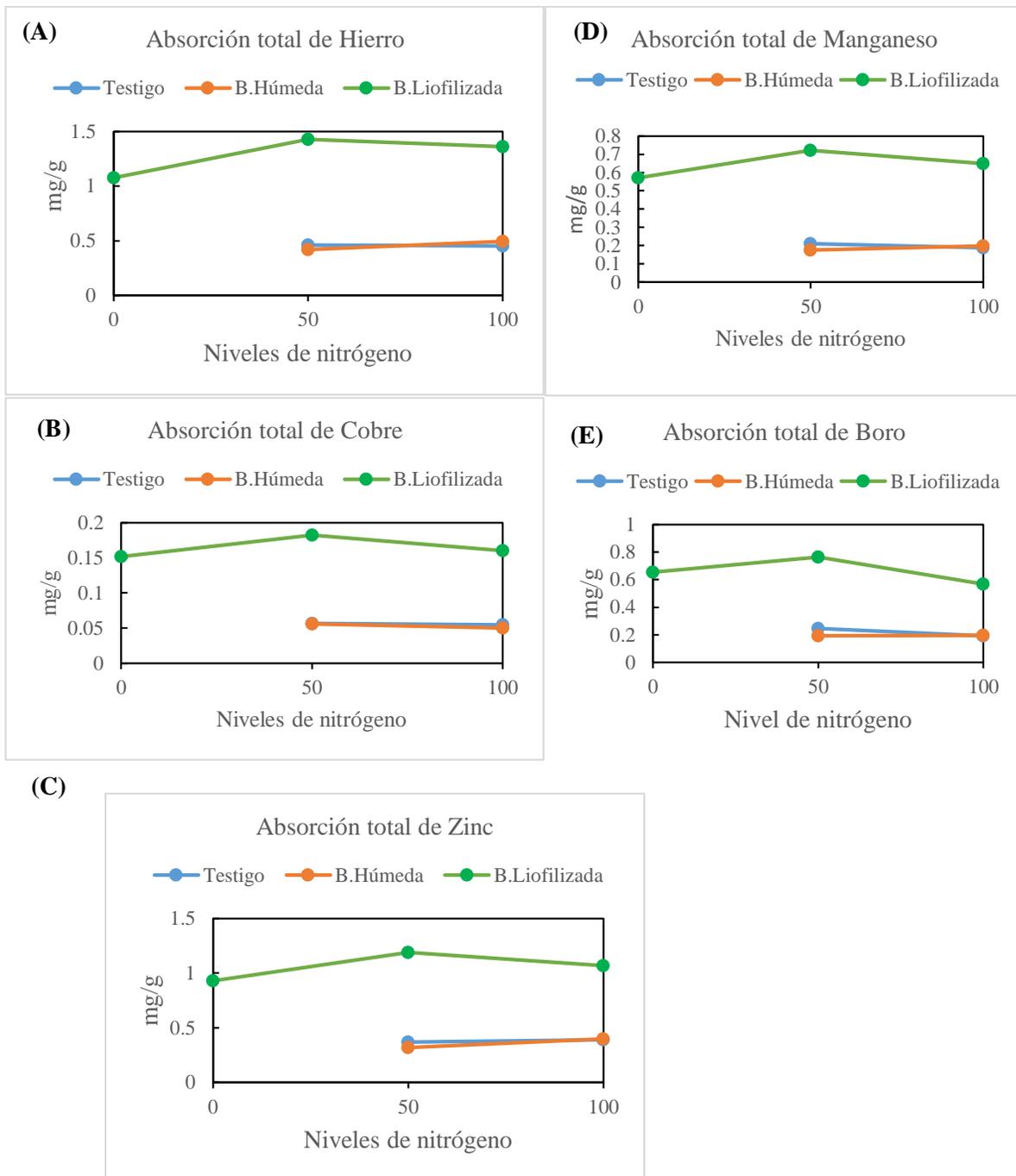


Figura 14. Efecto de la concentración de nitrógeno contenido en el sustrato nutricional, bajo tres condiciones de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.): biomasa liofilizada, biomasa húmeda o sin aplicación (Testigo), sobre la absorción total de (A) Hierro, (B) Cobre, (C) Zinc, (D)

Manganeso y (E) Boro, de plantas de tomate a los 22 días de la siembra. No hubo datos para el tratamiento biomasa húmeda y el testigo a nivel cero de nitrógeno.

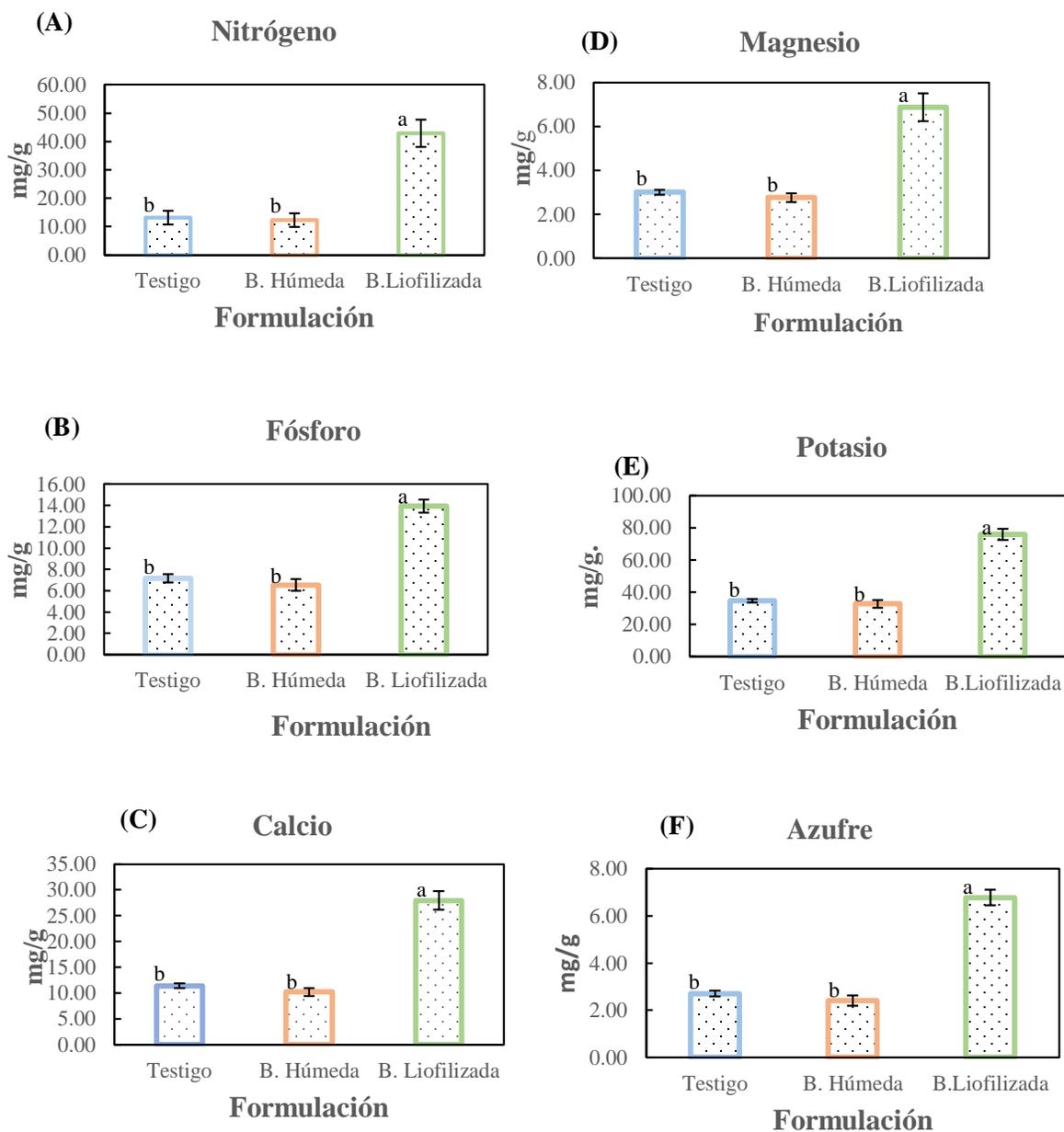


Figura 15. Medias de absorción neta (mg/g) de (A) Nitrógeno, (B) Fósforo, (C) Calcio, (D) Magnesio, (E) Potasio y (F) Azufre de plantas de tomate a los 22 días de la siembra, según la condición de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.) biomasa liofilizada (n=9) y biomasa húmeda (n=6) o sin aplicación (testigo, n=6). Barras verticales angostas son errores estándar. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias en las medias de los tratamientos ($P \leq 0.05$).

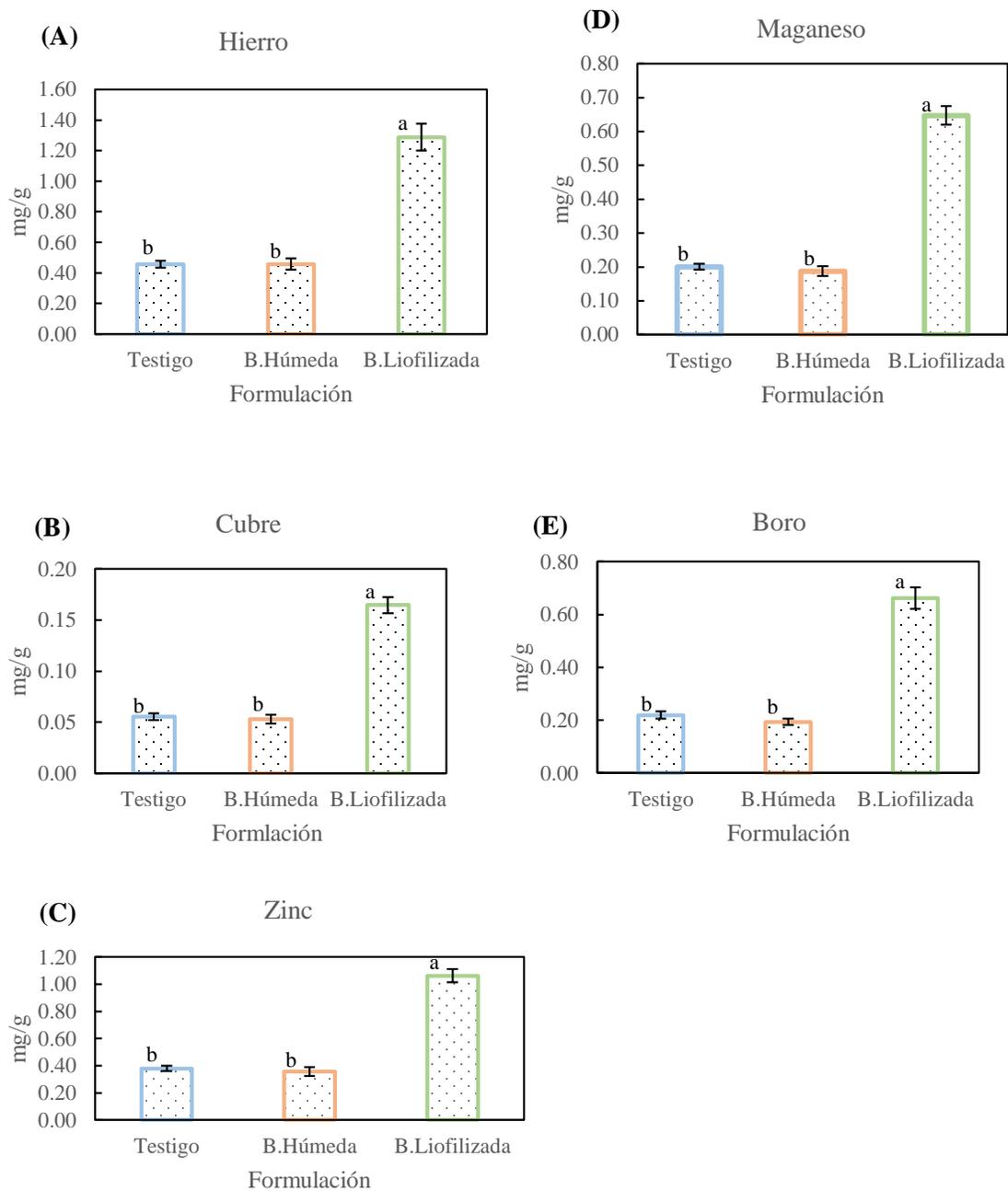


Figura 16. Medias de absorción neta de (A) Hierro, (B) Cobre, (C) Zinc, (D) Manganeso y (E) Boro, de plantas de tomate a los 22 días de la siembra, según la condición de la aplicación del consorcio de cianobacterias fijadora de nitrógeno (*Trichormus* sp.) y microalgas (*Scenedesmus* sp.) biomasa liofilizada (n=9) y biomasa húmeda (n=6) o sin aplicación (testigo, n=6). Barras verticales angostas son errores estándar. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias en las medias de los tratamientos ($P \leq 0.05$).

9.3 Unidades formadoras de colonias (UFC) de cianobacterias y microalgas en el sustrato.

Los resultados del análisis UFC·ml⁻¹ del consorcio de cianobacterias y microalgas contenidas al final del experimento en el sustrato suelo, indican que el testigo sin inoculación y a diferentes niveles de nitrógeno (0-50 y 100%) reportó 0 UFC/mL. Los sustratos inoculados con el consorcio, tanto en condición liofilizada como húmeda, las UFC/mL, reportaron poblaciones elevadas en los tres niveles de nitrógeno. (Tabla 3). Por otro lado, se puede observar que los resultados de UFC·ml⁻¹ siempre se mantuvieron más elevados en la condición de biomasa húmeda con respecto a la liofilizada. Sosteniendo valores superiores en las condiciones de 50 y 100%. La aplicación del consorcio en las formulaciones liofilizada y húmeda podría generar un aprovechamiento diferente del nitrógeno a corto o a mediano plazo. Algunos ensayos indican que una alta productividad de biomasa algal demandaría cantidades insostenibles de fertilizantes (N, P y CO₂) (Brennan & Owende, 2010; Laurens et al., 2017). Por el contrario, la población del consorcio liofilizado se mantuvo con poblaciones muy inferiores desde el inicio del estudio.

Tabla 3. Unidades formadoras de colonias (UFC·ml⁻¹) del consorcio de cianobacterias y microalgas presente en el sustrato suelo al final del experimento en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	UFC·ml ⁻¹		
	0% N ₂	50% N ₂	100% N ₂
Testigo	0	0	0
Biomasa liofilizada	6,3 x 10 ⁴	2,1 x 10 ²	2,6 x 10 ⁵
Biomasa húmeda	5,3 x 10 ⁵	> 7,0 x 10 ⁵	> 7,0 x 10 ⁵

Fuente: Elaboración Propia, 2021

10 CONCLUSIONES

La inoculación del consorcio liofilizado reflejó diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) en altura, peso fresco y seco de las plántulas de tomate, respecto al consorcio biomasa húmeda en los niveles de nitrógeno 0-50 y 100%.

Los diámetros de las plántulas de tomate inoculadas con el consorcio liofilizado fueron mayores con respecto a los diámetros de las plántulas del consorcio de biomasa húmeda y del testigo.

Los datos de clorofila a nivel cero nitrógenos comparados entre el tratamiento liofilizado respecto a biomasa húmeda y testigo fue significativo ($P \leq 0.0001$). Mientras que a 50 y 100 % de nitrógeno la significancia fue muy pequeña o nula ($P \geq 0.1390$).

El aporte de nitrógeno que ofrece como biofertilizante el consorcio de las cianobacterias y microalgas en el cultivo de tomate a nivel de plántula es una alternativa parcial al fertilizante mineral. La absorción total de nitrógeno en las plántulas tratadas con la formulación liofilizada de cianobacterias y microalgas, presentó diferencias altamente significativas ($P \leq 0.0001$) con respecto a biomasa húmeda y el testigo, tanto en los niveles de 0, 50 y 100% de aplicación de nitrógeno.

Al fertilizar a 50 y 100% de N, respecto a no fertilizar (0% de N) para el consorcio liofilizado, biomasa húmeda y testigo, resultó significativo la absorción total de N ($P \leq 0.0006$) al fertilizar.

Las absorciones de macro y micro elementos del consorcio de cianobacterias y microalgas bajo condición liofilizada fue significativa ($P \leq 0.0193$), respecto a biomasa húmeda y el testigo. De igual forma los niveles de nitrógeno a 0, 50 y 100 % presentaron

significancia ($P \leq 0.0001$) para la condición liofilizada con referencia a la biomasa húmeda y testigo.

El consorcio liofilizado presentó un efecto cuadrático ($P \leq 0.0397$), conforme aumentaban los niveles de nitrógeno para los elementos Ca, Mg, Fe y S. Mientras que para los elementos P, K, Cu, B, Zn y Mn, no mostraron tendencias ni lineales ni cuadráticas.

Al fertilizar las plántulas a nivel de 50 y 100% de nitrógeno, produjo un efecto en la absorción total de Ca, Mg, K, Zn y Mn ($P \leq 0.0450$), respecto a no fertilizar (0% de N).

El consorcio liofilizado presentó los valores más altos de las absorciones de los elementos macro y micro elementos con respecto al testigo y al consorcio biomasa húmeda.

Las UFC·ml⁻¹ del consorcio de cianobacterias y microalgas contenidas en el sustrato suelo al final de la investigación, presentaron poblaciones importantes en el sustrato inoculado con biomasa húmeda en todos los niveles de nitrógeno. Generando un incremento de la UFC·ml⁻¹ de forma incontable.

La inoculación liofilizada, evidenció una disminución de UFC·ml⁻¹ a 50% de nitrógeno con respecto al nivel 0% de nitrógeno y un aumento de la población a 100% de nitrógeno.

11 RECOMENDACIÓN

Se recomienda realizar una evaluación en el manejo de la biofertilidad con aplicaciones del consorcio de microalgas y cianobacteria, en el cultivo de tomate desde trasplante hasta cosecha .

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca P, Allende M, Antúnez A, Corradini F, Felmer S, Guzmán A, Martínez J, Olivares N, Riquelme J, Salinas L, Sepúlveda P. (2017). Manual de cultivo de tomate. *Boletín INIA N° 03*. Santiago, Chile.
- Ángel, M. y. Campos R. 1988. Estudio del efecto de las deficiencias de nutrientes minerales en el cultivo del pompón (*Chrysanthemum morifolium*) en la sabana de Bogotá. En: IX Congreso colombiano de la ciencia del suelo (memorias). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia - Facultad de ciencias Agrarias, Tunja.
- Ahmed M, Hasnain S, Stal L.. (2010). Association of non-heterocystous cyanobacteria with crop plants. *Plant and Soil*, 336(1), 363-375.
- Allem Mm and Stanier RY. (1968). Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *J Gen Microbiol*.
- Almeida, Mónica 2014 Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida.
- Argenta G, Ferreira P, Bortolini C, Forsthofer EL, Strieder ML. (2001). Relação da leitura do colorofilometro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal* 13(2):134-139.
- Araujo, D., Hernández, R. y Vanegas, J. (2008). Efecto de la Inoculación de Cianobacterias en Cultivos de Interés Comercial en Zonas Semiáridas de La Guajira. Recibo: 09.08.2017 Aceptado: 27.02.2018
- Barragán, D S. & Lesmes, A. (2009) Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y micro secado sobre tres especies bacterianas. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Departamento De Microbiología Bogota D.C. obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8468/tesis432.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bellinger E, & Sigeo D. (2015). *Freshwater algae: identification and use as bioindicators*. UK: Willey-Blackwell. Obtenido de <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=rhMmBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=Identification+and+use+as+Bioindicators&ots=0hpaXRFk7f&sig=YkY2mOd9D4vIbiXIRLl1aa1vb0T0#v=onepage&q=Identification%20and%20use%20as%20Bioindicators&f=false>
- Bernal G. (2010). Prácticas agrícolas desde el punto de vista de la microbiología.

- Bischoff H.W. & Bold, H.C. (1963). Some soil algae from Enchanted. University of Texas Publications. Texas.
- Bold, H. (1949). The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. B Torrey Bot Club.
- Bergman W., (1993). Ernährungs-störungen bei kultur-pflanzen. Gustav Fischer Verlag SenaStuttgart.
- Brennan L & Owende P. (2010). Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. 14(2):557-57 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032109002408#!>
- Bullock DG, Anderson DS. (1998). Evaluation of the Minolta SPAD 502 chlorophyll meter for nitrogen management in corn. *Journal of Plant Nutrition* 21:741-755
- Burguet, N. & Sierra, N. (2012). Evaluación de una estrategia de conservación para *Brevundimonas diminuta*. Departamento de investigación y desarrollo. Laboratorio Liorad. La Habana, Cuba. *VacciMonitor* 21(1):10-13.
- Cáceres, D. (2009). Tecnologías modernas: la perspectiva de los pequeños productores (Argentina). *Scielo, Cuad. Desarro. Rural* vol.6 no.62. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-14502009000100007
- Caseres, D. (2003). Agricultura Orgánica vs Agricultura Industrial. Su Relación con la Diversificación Productiva y la Seguridad Alimentaria. *Agroalimentaria*, 8(16), 29-39. Obtenido de World Wide web: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542003000100002&Ing=es&nrm=iso
- Castillo, R. M. (2004). <http://agroecologiautn.blogspot.com/p/agroecologia-fundamentos-culturales.html>. Obtenido de <http://agroecologiautn.blogspot.com/p/agroecologia-fundamentos-culturales.html>
- Cecoon, E. (2008). La Revolución Verde: Trajedia en dos actis . *Ciencias*, 20-29.
- Cindy A. García Salazar (2020). Hechos microbiológicos, Bogotá. Universidad de Antioquia.
- Converti, A., Casazza A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing* 48, 1146-1151.
- Demirbas, F.M., (2011). Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*. Article in press.
- Eugercios, A. Álvarez, M. y Montero, E. (2016). Impacto del nitrógeno agrícola en los ecosistemas acuáticos. *Revista científica de Ecología y medio ambiente*. 26, 37-44 Doi.:10.7818/ECOS.2017.26-1.06

Eliana Soto Rueda Micrografía de una cianobacteria.

<https://revistas.unc.edu.ar/index.php/cicterranea/article/view/30456>.

Gacheva,G & Gigova,L. (2014). Biological activity of microalgae can be enhance by manipulating the cultivation temperature and irradiance. *Cent. Eur. J.Biol.*, 1168-1181. DOI: 10.2478/s11535-014-0350-x

Garcia,R & Martel,A. (2007). Usos y aplicaciones de macroalgas, microalgas y cianobacterias en agricultura ecológica. *The Plant Pathology Journal*. Obtenido de https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Usos+y+aplicaciones+d+e+macroalgas%2C+microalgas+y+cianobacterias+en+agricultura+ecol%C3%B3gica&btnG=

González, M. (2004). *Gran Enciclopedia Universal*. Madrid.

HerreraC & Sánchez A. (2001). Geographical Variation in autonomous self_ pollination levels unrelated to pollinator Service in *Helleborus foetidus* (*Ranunculaceae*). *American Journal Bot*, 1025-1032.

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 1037-1047.

Hussain J, Ullah F, Ullan R, Muhammad Z, Rehman N, Shinwari K. Zohaib M, Imad-Ud-Din & Hussain S. (2011). Nutrient evaluation and elemental analysis of four selected medicinal plants of khyber Pakhtoon Khwa. *Pak.J.Bot.*, 43(1), 427-434. Obtenido de [http://pakbs.org/pjbot/PDFs/43\(1\)/PJB43\(1\)427.pdf](http://pakbs.org/pjbot/PDFs/43(1)/PJB43(1)427.pdf)

Hussain A,Sted T, Rahman H, Isrland M & Iqbal A. (2015). Efectos de la IAA sobre el crecimiento in vitro y la colonización de *Nostoc* en raíces y plantas. *Front Plant Sci.*, 6(45). Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318279/>.

Kawalekar SJ. (2013). Role of biofertilizers and biopesticides for sustainable agriculture. *J Biol Innov* 2:73–78.

Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica,(2020) . Obtenido de <https://www.imn.ac.cr>

Larios, L. (Junio-mayo de 2009). Metahemoglobinemia in areas with high nitrate:Current Situation. *Scielo*, 13(13). Obtenido de http://Scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552009000300023

Laurens L, Markham D, Wychen E, Glasser C, DongT, Ryan Davis R, Pienkos P (2017). Development of algae biorefinery concepts for biofuels and bioproducts; a

perspective on process-compatible products and their impact on cost-reduction.
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ee/c7ee01306j#!divAbstract>

- Kim, S. (2015). Handbook of Marine Microalgae Biotechnology Advances. Elsevier Inc.
- Irisarri, P., Gonnet, S., Monza, J.(2008) Fijación de nitrógeno por cianobacterias y fertilización en arroz.
<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429130709161940.pdf>
- Larios, L. (Junio-mayo de 2009). Metahemoglobinemia in areas with high nitrate:Current Situation. *Scielo*, 13(13). Obtenido de http://Scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552009000300023
- Leyva, A., Herdández, A., Elein, T. (Diciembre de 2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate. *Colomb.Biotecnol*, VII(2), 47-54. Obtenido de <http://www.inta.gov.ar/valleinferior/info/documentos/>
- López, L. (2016). Manual Técnico del Cultivo de Tomate(*Solanum lycopersicum*). Alcances
- McDonald, J., T. Ericsson and C.-M. Larsson. 1996. Plant nutrition, dry mater gain and partitioning at the whole-plant level. *Journal of Experimental Botany*. 47:1245-53Tecnológicos, 130.
- Morales-García Y, Corral-Lugo, A, Pazos-Rojas L, Martínez-Contreras R, Muñoz-Rojas J y Ramírez-Valverde A. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de Goteo en Placa por Sellado (o estampado). *Revista Colombiana de Biotecnología* , 14(2), 147-156.
- Nikos, A. (2010). Hacia el año 2010. Estudio de la FAO. *Agricultura Mundial*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/003/v4200s/V4200S00.htm>
- Nisha R, Kaushik A, Kauskik C. (2007). Effect of indigenous cyanobacterial application on structural stability and productivity of an organically poor semi-arid soil. *Geoderma*, 138, 49-56.
- Orlovsky, L., Dourikov, M., Babaev, A. (2004). Temporal dynamics and productivity of biogenic soil crusts in the central Karakum desert, Turkmenistan. *J. Arid Environ.* , 579-601.
- Ortega Olguín, I. (2014). Comparación de métodos de cuantificación de bacterias lácticas expuestas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Quétaro.
- Peil. R. Galvez. J. (2012). Reparto de materia seca como factor determinante de la producción de las hortalizas de fruto cultivadas en invernadero. *R. bras. Agrociência*, 11(1), 5-11
- Prasanna R, Sood A, Ratha S & Singh P. (2014). Cyanobacteria as a "Green" option for sustainable agricultura. *Cyanobacteria: an economic perspective*.

- Prasanna R, Soodb A, Jaiswala P, Nayaka S, Gupta V, Chaudharya V, Josh & Natarajana C. (2010). Rediscovering Cyanobacteria as Valuable Sources. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(2), 133-147. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1134/S0003683810020018>
- Pretty, J. (2001). The real costs of modern agriculture. *Resurgence*, 205, 7-9.
- Preciado R P, G A B Castillo, J L T Torres, J K Shibata, L T Chávez, A M Garza (2002) Nitrógeno y potasio en la producción de plántulas de melón. *Terra* 20:67-76.
- Purba Rao. (2002). Greening the supply chain: a new initiative in South East Asia. *International Journal of Operations & Production Management.*, 632-655.
- Quesada, A.; Leganés, F. y Fernández-Valiente, E. 1997. Environmental factors controlling N₂ fixation in mediterranean rice fields. *Microb. Ecol.* 34:39-48.
- Quintero N & Correa C. (2011). Comparación de técnicas experimentales para la medición. *memorias*, 9(15), 81-94.
- Richmond A, Hu Q. (2013). *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Arizona: Wiley-Blackwell.
- Rincón A, Ligarreto G. (2010). Relación entre nitrógeno foliar y el contenido de clorofila, en maíz asociado con pastos en el Piedemonte Llanero colombiano. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11 (2), 122 128.
<https://core.ac.uk/download/pdf/230352822.pdf>
- Rippka R et al. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 1-61.
- Rodríguez-Salgado, A; Saavedra-Montañez, G; Fonseca D, Borrás, L. (2019). Algunos Preparados Microbianos Sobre el Desarrollo Biotecnológico en el sector Agropecuario. *Revista Informetric@ - Serie Ingeniería , Basica y Agrícola*, 1(1), 39-50. <http://ienciometrica.com/informetrica/index.php/syh/article/view/65/64>
- Stirk W, Ördög V, Novák O, Rolčík J, Strnad M, Bálint P & Staden J. (2013). Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *Journal of Phycology*, 459-467. doi: <https://doi.org/10.1111/jpy.12061>
- Rendón Castrillón, Leidy Johanna; Ramírez Carmona, Margarita Enid; Vélez Salazar, Yesid (2015).
- Rowan, K. (1989). *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press.
- Santos. A. (2014) Usos y Aplicaciones potenciales de las microalgas. <https://www.iit.comillas.edu/docs/IIT-14-027A.pdf>
- Scragg, A.H., Illman, A.M., Carden, A., Shales, S.W., (2002). Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy* 23, 67-73

- Sinha, R.P. & Häder, D-P. (1996). Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.*, 887-896. Stirk W, Ördög V, Novák O, Rolčik J, Strnad M, Bálint P & Staden J. (2013). Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *Journal of Phycology*, 459-467. doi: <https://doi.org/10.1111/jpy.12061>
- Singh, J., Pandey, V., Singh, D. & Singh, R. (2010). Influence of pyrite and farmyard manure on population dynamics of soil methanotroph and rice yield in saline rain-fed paddy field. *Agriculture, Ecosystems and Environment.*, 74-79.
- Tello, E. (2018). Respuesta agronómica del fréjol (*Phaseolus vulgaris*) a un biofertilizante con base en microalgas *Chorella* y *Senedesmus*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR. Ecuador. obtenido de <http://cienciametrica.com/index.php/syh/article/view/65/64>
- Taiz, L & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc, 339-374.
- Tiwari, A. (2014). *Cyanobacteria: Nature, potenciales and aplicaciones*. India: Daya Publishing house.
- Úrsula, W. (2009) *Botánica General*. EUNA
- Urzúla, H. (2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno. *Ciencias e Investigación Agraria.*, 32(2), 133-150. Obtenido de <///C:/Users/Cortes/Downloads/313-619-1-SM.pdf>
- Villota, R. y J. Hawkes. (2006). Reaction kinetics in food systems. *Handbook of Food Engineering. Food Science and Technology*, 2: 125-286.
- Villarreal. García, R ; Osuna. Armenta, A. (2002). Efecto de dosis y fuente de nitrógeno en rendimiento y calidad pos cosecha de tomate en fertirriego. *Terra Latinoamericana* 20, 311-320. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. obtenido de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57320310>
- Zaccaro, M. (2000). Plant growth-promoting cyanobacteria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Recuperado de https://www.soiltechcorp.com/images/uploads/product_PDFs/Plant_Growth_Promotion_Study.pdf
- Zotarelli L, Garcia C, Piccinin JL, Urquiaga S, Boddey RM, Torres E, Rodrigues BJ. (2003). Calibração do medidor de clorofila minolta SPAD 502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(9):1117-1122
- Zulpa, Zaccaro, Boccazzi, Parada, Storn. (2003). Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on “wood blue stain” fungi. *Biological control* - Elsevier. https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2c5&q=bioactivity+of+intra+and+extracellular+substances+from+cyanobacteria+and+biol.+zulpa++2003&btnq=

