



**FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN MEDIO AMBIENTE
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Desarrollo de un biofertilizante en base a la cianobacteria
*“Anabaena cylindrica”***

TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL

Preparado por: Benjamín Espinoza Tobar

Profesor guía: Dr. Daniel Undurraga Peralta

Profesores Informantes: Dr. Ociel Cofré Carvajal

Mag. Javier Arancibia Fortes

DICIEMBRE 2024

RESUMEN

La degradación del suelo en Chile representa un problema crítico que compromete la sostenibilidad de las prácticas agrícolas y la capacidad del suelo para soportar cultivos de forma eficiente. Este fenómeno se debe a factores como la deforestación, incendios forestales, y el uso excesivo de agroquímicos, los cuales afectan la retención de nutrientes, el equilibrio ecológico y la biodiversidad del suelo. Como respuesta a esta problemática, el presente estudio se enfoca en el desarrollo de un biofertilizante basado en la cianobacteria *Anabaena cylindrica*, seleccionada por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y promover el crecimiento vegetal, contribuyendo a la recuperación de suelos degradados de manera sostenible.

Con el objetivo de mejorar la estabilidad y viabilidad de las cianobacterias en condiciones de aplicación, se evaluaron dos técnicas de estabilización: la microencapsulación en esferas de alginato y la formación de acinetos mediante estrés lumínico y limitación de nutrientes. Para inducir la formación de acinetos, se implementaron dos métodos en cultivos de *Anabaena cylindrica*: uno mediante la exposición a luz roja de baja irradiancia ($1,9 \text{ W/m}^2$) en un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y otro mediante la limitación de hierro en el medio de cultivo, utilizando concentraciones de Fe-EDTA de 0%, 25%, 50% y 75% respecto del medio original. Las muestras fueron evaluadas semanalmente mediante microscopía para observar la formación de estructuras diferenciadas.

La segunda estrategia de estabilización consistió en la microencapsulación realizada en 4 lotes, en la cual se utilizaron cultivos de diferentes edades (joven y envejecido) y dos concentraciones de biomasa en una solución de alginato al 1,5% (0,468 g/L y 1,499 g/L). La mezcla fue introducida en una solución de cloruro de calcio al 1% mediante una bomba peristáltica, formando esferas de aproximadamente 1 mm de diámetro. Las esferas se almacenaron en dos condiciones: a temperatura ambiente bajo luz blanca y a 4°C en oscuridad, lo cual permitió evaluar la viabilidad y estabilidad del biofertilizante en condiciones de almacenamiento contrastantes.

Los resultados de las estrategias de estabilización mostraron que la formación de acinetos no fue exitosa, ya que ni el estrés por calidad lumínica (luz roja de $1,9 \text{ W/m}^2$) ni la limitación de hierro (0-75% Fe-EDTA) lograron inducir su diferenciación; sólo se observaron estructuras como heterocistos y filamentos típicos. En cambio, la microencapsulación en alginato resultó efectiva, especialmente cuando las esferas fueron almacenadas a 4°C en oscuridad. En estas condiciones, las esferas conservaron mejor su integridad y coloración, además de presentar densidades celulares estables, evaluadas mediante mediciones de absorbancia y un rendimiento cuántico (QY) entre 0,3 y 0,45, lo que refleja una alta viabilidad y estabilidad de las cianobacterias encapsuladas durante las pruebas de viabilidad y periodo de monitoreo.

En conclusión, la microencapsulación en esferas de alginato es una técnica prometedora para la formulación de biofertilizantes en base a cianobacterias de la cepa *Anabaena cylindrica*, permitiendo conservar la funcionalidad de las cianobacterias en condiciones de almacenamiento y aplicación. Este desarrollo ofrece una alternativa sostenible a los fertilizantes sintéticos y contribuye a la recuperación de suelos degradados en Chile.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Degradación de suelos en Chile	1
1.1.1. Principios de la degradación de suelos	1
1.2. Biofertilizantes	3
1.2.1. Tipos de Biofertilizantes.	3
1.3. Cianobacterias.	3
1.3.1. Potencial de las cianobacterias como biofertilizante.	4
1.3.2. Estructuras clave de las cianobacterias para su uso como biofertilizantes.	5
1.3.3. <i>Anabaena cylindrica</i> .	6
1.4. Importancia de los soportes en la formulación de biofertilizantes	7
2. PROBLEMA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo general	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. METODOLOGÍA	11
4.1. Objetivo 1 - Etapa 1: Evaluar las estrategias de estabilización de las cianobacterias a través de microencapsulación y formación de acinetos	11
4.1.1. Cultivo de cianobacterias en medio líquido para evaluar estrategias de estabilización.	11
4.1.1.1. Preparación del medio de cultivo.	11
4.1.1.2. Cultivos en placa petri.	12
4.1.1.3. Cultivos en matraz Erlenmeyer	12
4.1.1.4. Cultivos en botellas 1L y fotobiorreactor 7 litros	13
4.1.1.5. Cuantificación de biomasa producida.	13
4.1.2. Estrategias de formación de acinetos	14
4.1.2.1. Método de cambio de calidad lumínica	14
Se removieron alícuotas una vez por semana durante el período de 1 mes para seguir la formación de acinetos, la cual fue evaluada mediante inspección microscópica directa.	15
4.1.2.2. Método de limitación de hierro como nutriente.	15
4.1.3. Microencapsulación de Cianobacterias en esferas de alginato.	15
4.2. Objetivo 2 - Etapa 2: Evaluar parámetros de formulación del biofertilizante con la estrategia de estabilización seleccionada.	17
4.2.1. Condiciones de formulación del biofertilizante a través de microencapsulación.	17
4.3. Objetivo 3 - Etapa 3: Evaluar la viabilidad del formulado en base a cianobacterias <i>Anabaena cylindrica</i>.	18
4.3.1. Pruebas de viabilidad, monitoreo y seguimiento del formulado.	18
4.3.1.2. Medición de absorbancia.	19
4.3.1.3. Medición de rendimiento cuántico (QY) de fluorescencia de la clorofila A.	19
5. RESULTADOS	20
5.1. Objetivo 1 - Etapa 1: Evaluar las estrategias de estabilización de las cianobacterias a través de microencapsulación y formación de acinetos.	20

5.1.1. Cultivo de cianobacterias en medio líquido para evaluar estrategias de estabilización.	20
5.1.2. Estrategia de formación de acinetos a través de método de calidad lumínica	21
5.1.3. Estrategia de formación de acinetos a través de método de limitación de hierro como nutriente.	23
5.2. Objetivo 2 - Etapa 2: Evaluar parámetros de formulación del biofertilizante con la estrategia de estabilización seleccionada.	25
5.2.1. Condiciones de formulación del biofertilizante a través de microencapsulación.	25
5.2.2. Cianobacterias microencapsuladas en esferas de alginato de sodio.	26
5.3. Objetivo 3 - Etapa 3: Evaluar la viabilidad del formulado en base a cianobacterias <i>Anabaena cylindrica</i>.	30
5.3.1. Medición de rendimiento cuántico (QY) sobre cianobacterias microencapsuladas en alginato.	30
5.3.2. Medición de absorbancia en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.	32
5.3.3. Medición de rendimiento cuántico (QY) en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.	33
6. DISCUSIÓN	34
7. CONCLUSIONES	37
8. REFERENCIAS	38
9. ANEXOS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Representación esquemática del ciclo de vida de las cianobacterias del orden Nostocales	6
Figura 5.1: Cultivos en botellas 1L de CB <i>Anabaena cylindrica</i> .	20
Figura 5.2: Botella B1 dispuesta a irradiancia 1,9 W/m ² bajo luz roja	21
Figura 5.3: Muestras extraídas de la botella B1 incubada en condiciones de formación de acinetos con luz roja	22
Figura 5.4: Muestras extraídas de matraces Erlenmeyer bajo condiciones de formación de acinetos 2 semanas posterior a inoculación con método de la limitación de hierro como nutriente.	23
Figura 5.5: Muestras extraídas de matraces Erlenmeyer bajo condiciones de formación de acinetos 4 semanas posterior a inoculación con método de la limitación de hierro como nutriente.	24
Figura 5.6: Muestras de cianobacterias microencapsuladas en alginato de sodio a una concentración de 0,468 g/L, elaboradas a partir de cultivo joven	27
Figura 5.7: Muestras de cianobacterias microencapsuladas en alginato de sodio a una concentración de 0,468 g/L, elaboradas a partir de cultivo envejecido	27
Figura 5.8: Muestras de cianobacterias microencapsuladas en alginato de sodio a una concentración de 1,499 g/L, elaboradas a partir de cultivo joven	28
Figura 5.9: Muestras de cianobacterias microencapsuladas en alginato de sodio a una concentración de 0,468 g/L, elaboradas a partir de cultivo envejecido	29
Figura 5.10: Gráfico comparativo de absorbancia acordes a los datos de la tabla 5.11	32
Figura 5.11: Gráfico comparativo de QY acordes a los datos de la tabla 5.12	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Composición elemental de <i>Anabaena cylindrica</i> .	7
Tabla 4.1: Composición del medio de cultivo Allen-Arnold modificado	11
Tabla 4.2: Descripción del cultivo de cianobacterias para crecimiento en botellas y fotobiorreactor	13
Tabla 4.3: Tabla a utilizar para la cuantificación de la biomasa y seguimiento de los cultivos	14
Tabla 4.4: Descripción del cultivo de cianobacterias en condiciones de estrés con luz roja	15
Tabla 4.5: Resumen de microencapsulación de CB en esferas de alginato	18
Tabla 5.1 Cuantificación de biomasa botella B1	20
Tabla 5.2: Cuantificación de biomasa fotobiorreactor	21
Tabla 5.3: Cuantificación de biomasa botella B3	25
Tabla 5.4 Cuantificación de biomasa fotobiorreactor	25
Tabla 5.5: Cuantificación de biomasa fotobiorreactor nuevo	26
Tabla 5.6: Cuantificación de biomasa fotobiorreactor viejo	26
Tabla 5.7 Resultados QY sobre CB microencapsuladas en esferas de alginato con 1 semana de conservación.	30
Tabla 5.8 Resultados QY sobre CB microencapsuladas en esferas de alginato con 1 mes de conservación.	30
Tabla 5.9 Resultados QY sobre CB microencapsuladas concentradas en esferas de alginato con 1 semana de conservación	31

Tabla 5.10 Resultados QY sobre CB microencapsuladas en esferas de alginato con 2 semanas de conservación	31
Tabla 5.11 Resultados de absorbancia en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.	32
Tabla 5.12 Resultados de QY en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.	33
Tabla 9.1: Resumen de cálculo de concentración de CB en solución de alginato para lote 1	41
Tabla 9.2: Resumen de cálculo de concentración de CB en solución de alginato para lote 2	41
Tabla 9.3: Resumen de cálculo de concentración de CB en solución de alginato para lote 3	42
Tabla 9.4: Resumen de cálculo de concentración de CB en solución de alginato para lote 4	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Degradación de suelos en Chile

1.1.1. Principios de la degradación de suelos

La degradación del suelo es un problema crítico que afecta la capacidad del país para mantener una productividad sostenible en diversas áreas, incluyendo la agricultura, la ganadería, la silvicultura, y otros usos del suelo. La degradación del suelo se puede entender como la pérdida de equilibrio de sus propiedades, lo que limita su productividad. Esta tiene expresión en aspectos físicos (erosión), químicos (déficit de nutrientes, acidez, salinidad, otros) y biológicos del suelo (deficiencia de materia orgánica).

La degradación del suelo abarca varios aspectos que afectan su capacidad productiva:

La degradación física corresponde al proceso de desgaste de la superficie terrestre, provocada por la acción de las fuerzas de la naturaleza, contribuyendo a la transformación del suelo. Por otra parte, se denomina erosión acelerada al proceso de degradación que se induce por acciones antrópicas en los suelos, a través de prácticas incorrectas de uso y manejo como como la deforestación, el sobrepastoreo, entre otras.

La degradación química se refiere a la pérdida de nutrientes esenciales, acumulación excesiva de ciertos elementos, aumento de la salinidad y/o acidez del suelo. Estos cambios químicos pueden resultar de la aplicación desmedida de fertilizantes y pesticidas, así como de la irrigación con agua de mala calidad, afectando tanto a la agricultura como a otros usos del suelo.

Mientras que la degradación biológica está caracterizada por la reducción de la materia orgánica y la biodiversidad del suelo. La pérdida de materia orgánica afecta la estructura del suelo y su capacidad para retener agua y nutrientes, mientras que la disminución de la biodiversidad puede afectar los procesos ecológicos y la resiliencia del suelo en diversos ecosistemas.

1.1.2. Situación en Chile.

En Chile, la degradación del suelo es una preocupación significativa. Según el Centro de Información de Recursos Naturales (Cirén, 2010), 36,5 millones de hectáreas presentan algún grado de erosión, lo que representa el 48,7% del territorio nacional. De estas, 18,1 millones de hectáreas se encuentran en las categorías de erosión severa o muy severa.

La degradación de los suelos en Chile tiene múltiples causas y orígenes. El uso agrícola de la tierra por el hombre altera el equilibrio natural, modifica la velocidad de los procesos de deterioro y provoca cambios en la naturaleza de los mismos. Por consiguiente, la degradación del suelo es un proceso dinámico y no el resultado estático de ciertas acciones degradantes de un sector determinado (Ministerio de Agricultura, 1995).

Las causas principales de la degradación del suelo en Chile incluyen:

Deforestación: La tala indiscriminada de bosques reduce la cobertura vegetal, aumentando la vulnerabilidad del suelo a la degradación.

Sobrepastoreo: La presión excesiva del ganado sobre la tierra puede llevar a la compactación del suelo y la pérdida de vegetación, exacerbando su degradación.

Incendios forestales: Los incendios forestales, que pueden ser causados tanto por factores naturales como antrópicos, destruyen la cubierta vegetal, dejando el suelo expuesto a la degradación y reduciendo su capacidad para retener agua y nutrientes.

Cambio climático: Eventos extremos como sequías e inundaciones, que se están volviendo más frecuentes debido al cambio climático, también contribuyen a la degradación del suelo.

En Chile, la Constitución Política, en el Artículo 19 N° 18 del Capítulo III, asegura el derecho a vivir en un ambiente libre de contaminación. Por otra parte, en el Artículo 39 de la Ley 19.300 sobre Bases del Medio Ambiente, se estipula que “la ley velará porque el uso del suelo se haga en forma racional, a fin de evitar su pérdida y degradación”. Por tal motivo, parece lógico demandar la implementación de las medidas necesarias, así como el cumplimiento de los cuerpos legales existentes, para que la degradación del suelo sea prevenida o debidamente penada en caso de producirse por un agente antrópico (Francke, 1999).

1.1.3. Desafíos y medidas de mitigación

La degradación del suelo genera impactos significativos tanto en el medio ambiente como en la economía. Reduce la productividad agrícola, compromete la calidad del agua y contribuye a la pérdida de biodiversidad. Para enfrentar estos desafíos, es fundamental implementar prácticas de manejo sostenible del suelo, como la agroecología, la reforestación y el uso de biofertilizantes.

En Chile, se están adoptando diversas medidas para combatir la degradación del suelo:

Conservación de suelos: Se han implementado programas que promueven prácticas sostenibles en diferentes sectores, enfocados en la rehabilitación de áreas degradadas y la conservación de la fertilidad del suelo.

Educación y concienciación: Se llevan a cabo campañas educativas dirigidas a comunidades y agricultores para destacar la importancia de la gestión sostenible del suelo. Estas campañas también educan sobre técnicas específicas para conservar y mejorar la salud del suelo, fortaleciendo así la resiliencia de los ecosistemas locales.

Investigación y desarrollo: Existen iniciativas de investigación destinadas a desarrollar nuevas tecnologías y prácticas agrícolas que promuevan la salud del suelo. Esto incluye el estudio y la aplicación de biofertilizantes, así como el desarrollo de técnicas de manejo regenerativo que restauran la estructura y la función del suelo.

Estas acciones no solo buscan mitigar los efectos adversos de la degradación del suelo, sino también promover un uso más eficiente y sostenible de los recursos naturales, asegurando así la disponibilidad de alimentos y la preservación de los ecosistemas para las generaciones futuras.

1.2. Biofertilizantes

La interpretación del término biofertilizante es muy amplia, pueden representar desde microorganismos, abonos verdes y estiércoles, hasta extractos de plantas. De manera sintetizada, se puede decir que son productos que contienen microorganismos, que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas y le ayudan a su nutrición y protección (Vessey, 2003). Además contribuyen con sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética, así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos y mejorar la calidad de los suelos degradados (Armenta et al., 2010).

1.2.1. Tipos de Biofertilizantes.

En base a las diferentes funciones que desempeñan los microorganismos en los biofertilizantes estos pueden ser clasificados dentro de dos grupos: El primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al estrés por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta. El segundo grupo incluye microorganismos los cuales son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos (Lucy et al., 2004).

Puede haber microorganismos que puedan estar en los dos grupos, que además de promover el crecimiento de la planta, inhiba los efectos de microorganismos patógenos (Kloepper et al., 1980).

Dentro del tipo de biofertilizantes de interés para efectos de esta investigación son aquellos que tienen como función principal participar en el crecimiento de las plantas posterior a su inoculación o sea aquellos que pertenecen al primer grupo anteriormente definidos, entre ellos podemos encontrar biofertilizantes en base a bacterias heterotróficas, destacando géneros como: *Azospirillum*, *Rhizobium*, (capaces de fijar nitrógeno atmosférico) *Pseudomonas*, entre otros. Otro grupo que cae dentro de esta categoría son los hongos micorrízicos que presentan asociación simbiótica con las plantas las cuales estas se benefician incrementando la captación de nutrientes minerales del suelo principalmente fósforo (Alloush et al., 2000). Por último encontramos al grupo de las cianobacterias (también mencionadas como "CB" en este informe) en las que se destacan géneros como *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaena*, etc capaces de fijar nitrógeno atmosférico y asociaciones simbióticas con plantas terrestres y hongos (Mayz-Figueroa, 2004)..

1.3. Cianobacterias.

Son un filo de organismos procariontes fotoautótrofos que pueden ser unicelulares, coloniales o filamentosas, a diferencia de otras bacterias, presentan membranas internas que alojan ciertas estructuras como tilacoides que le permiten captar la luz solar y carboxisomas que le permiten fijar el dióxido de carbono de la atmósfera como fuente de carbono. Marcaron un antes y un después en la

evolución de la vida transformando una atmósfera ausente de oxígeno en una atmósfera con oxígeno, siendo responsables actualmente junto a las microalgas de más del 50% del oxígeno liberado a la atmósfera (Rodríguez, 2023).

1.3.1. Potencial de las cianobacterias como biofertilizante.

Estos microorganismos son capaces de establecerse en casi todo tipo de ecosistemas dado que sus necesidades metabólicas son sencillas, es decir, solo necesitan de cinco componentes para desarrollarse: Luz solar, agua, dióxido de carbono, nitrógeno atmosférico y algunos micronutrientes como el magnesio y fósforo, Por lo tanto son bastante abundantes formando tapetes microbianos en suelos y/o cuerpos de agua lacustres. Lo que les confiere una gran plasticidad fisiológica para proliferar bajo condiciones agrícolas y ecológicas muy variadas (Pham et al., 2017).

Una de las características más destacadas de las cianobacterias es su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (N₂) a través de células especializadas llamadas heterocistos. Esta habilidad las convierte en uno de los organismos con mayor independencia trófica, lo que las hace especialmente atractivas para su uso como biofertilizantes (Irisarri et al., 1999). La fijación biológica de nitrógeno es un proceso crucial para las plantas, ya que el nitrógeno es un componente esencial de moléculas vitales como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila. Al convertir el nitrógeno atmosférico en formas asimilables, las cianobacterias permiten a las plantas sintetizar las biomoléculas necesarias para su crecimiento, desarrollo y fotosíntesis.

Además de la fijación de nitrógeno, las cianobacterias son capaces de ofrecer múltiples beneficios al suelo y a las plantas tales como:

Promoción del crecimiento vegetal: Géneros como *Anabaena*, *Anabaenopsis* y *Calothrix* producen hormonas vegetales (fitohormonas) como auxinas, citoquininas y giberelinas, que estimulan activamente la germinación, el crecimiento y desarrollo de las plantas (Manjunath et al., 2010; Joshi et al., 2020). Estos reguladores del crecimiento pueden influir en diversos aspectos del desarrollo vegetal, incluyendo la división celular, la elongación de tallos y raíces, y la formación de flores y frutos.

Solubilización de fósforo: Las cianobacterias, mediante enzimas fosfatasas, pueden solubilizar y movilizar fosfatos orgánicos insolubles presentes en el suelo, mejorando su biodisponibilidad para las plantas (Singh et al., 2016; Joshi et al., 2020). Este proceso es particularmente importante, ya que el fósforo es el segundo nutriente más crucial para las plantas después del nitrógeno, y su disponibilidad en el suelo suele ser limitada.

Mejora de la estructura del suelo: La secreción de polisacáridos por parte de las cianobacterias forma biopelículas que afectan la infiltración, retención y evaporación del agua a través de la agregación de partículas de suelo (Rossi et al., 2017). Esta mejora en la estructura del suelo puede incrementar su capacidad de retención de agua y nutrientes, lo que es especialmente beneficioso en suelos degradados o en regiones propensas a la sequía.

Aporte de materia orgánica: Las cianobacterias incrementan la materia orgánica del suelo, contribuyendo a la regulación de las funciones biológicas de otros microorganismos beneficiosos (Ördög et al., 2021). Este aumento de la materia orgánica no solo mejora la fertilidad del suelo, sino

que también contribuye a la retención de carbono, lo que puede tener implicaciones positivas en la mitigación del cambio climático.

Producción de metabolitos bioactivos: Estos microorganismos secretan compuestos fenólicos, flavonoides y otros metabolitos que actúan como precursores de fitohormonas y compuestos aromáticos secundarios, desempeñando un papel esencial en la embriogénesis, la organogénesis y la protección contra el estrés osmótico (Chiaiese et al., 2018). Estos compuestos bioactivos pueden mejorar la resistencia de las plantas a diversos tipos de estrés abiótico, como la salinidad o la sequía.

Efecto en la calidad de los cultivos: Algunos estudios sugieren que los extractos de cianobacterias pueden desencadenar procesos bioquímicos que van más allá del mero crecimiento de la planta. Por ejemplo, pueden inducir la acumulación de metabolitos lipofílicos relacionados con la tolerancia al estrés abiótico y la defensa de las plantas, así como la acumulación de compuestos como la piridina-3-carboxamida, que podrían mejorar la calidad de los cultivos más que su productividad (Rossi et al., 2017).

Interacciones con otros microorganismos del suelo: Las cianobacterias pueden formar asociaciones simbióticas con plantas y otros microorganismos (Rana et al., 2012; Swarnalakshmi et al., 2013), lo que puede potenciar aún más sus efectos beneficiosos en el ecosistema del suelo.

1.3.2. Estructuras clave de las cianobacterias para su uso como biofertilizantes.

Las cianobacterias filamentosas del orden Nostocales, como *Anabaena variabilis* o *Anabaena cylindrica*, poseen una notable capacidad de diferenciación celular que les permite adaptarse y persistir frente a diversas condiciones ambientales (Maldener et al., 2014)

Una de las estructuras clave que permiten a estas cianobacterias prosperar en condiciones adversas son los heterocistos, estas son células semi-aleatoriamente espaciadas que se diferencian de las células vegetativas tras la falta de nitrógeno, alrededor del 10% de las células espaciadas semialeatoriamente pueden diferenciarse en heterocistos fijadores de nitrógeno, que sostienen los filamentos con nitrógeno, presumiblemente a través de las uniones septales (Meeks et al., 2002)

Otra estructura fundamental son los acinetos, definidos como "células de reposo similares a esporas resistentes a diversas fluctuaciones ambientales desfavorables" (Maldener et al., 2014) los acinetos difieren de las células vegetativas por su composición celular y ultraestructura, y suelen ser más grandes, a veces hasta 10 veces, que las células vegetativas" estos están rodeados por una pared celular engrosada y una envoltura extracelular de múltiples capas que incluye una capa externa de polisacáridos, una capa mucilaginoso y una capa de glicolípidos". Esta envoltura protectora es esencial para la supervivencia de los acinetos en condiciones adversas (Garg y Maldener, 2021).

Esta capacidad de formar acinetos, extremadamente resistentes a condiciones de estrés como sequía, congelamiento y altas temperaturas (Sukeni et al., 2018), resulta clave para prolongar la viabilidad de las células en el tiempo. Estas estructuras permiten que las cianobacterias sobrevivan en estado latente hasta que las condiciones sean favorables nuevamente, asegurando así su persistencia en formulaciones de biofertilizantes y mejorando su potencial de aplicación a largo plazo.

Las cianobacterias filamentosas exhiben un ciclo de vida complejo (ver figura 1.1) que involucra la transición entre células vegetativas, heterocistos y acinetos. Bajo condiciones favorables de crecimiento, las células vegetativas pueden crecer y dividirse formando largos filamentos. En ausencia de fuentes de nitrógeno combinado, algunas células vegetativas se diferencian en heterocistos que pueden fijar nitrógeno atmosférico mientras que los acinetos se forman bajo condiciones desfavorables como privación de nutrientes, baja luz y baja temperatura.

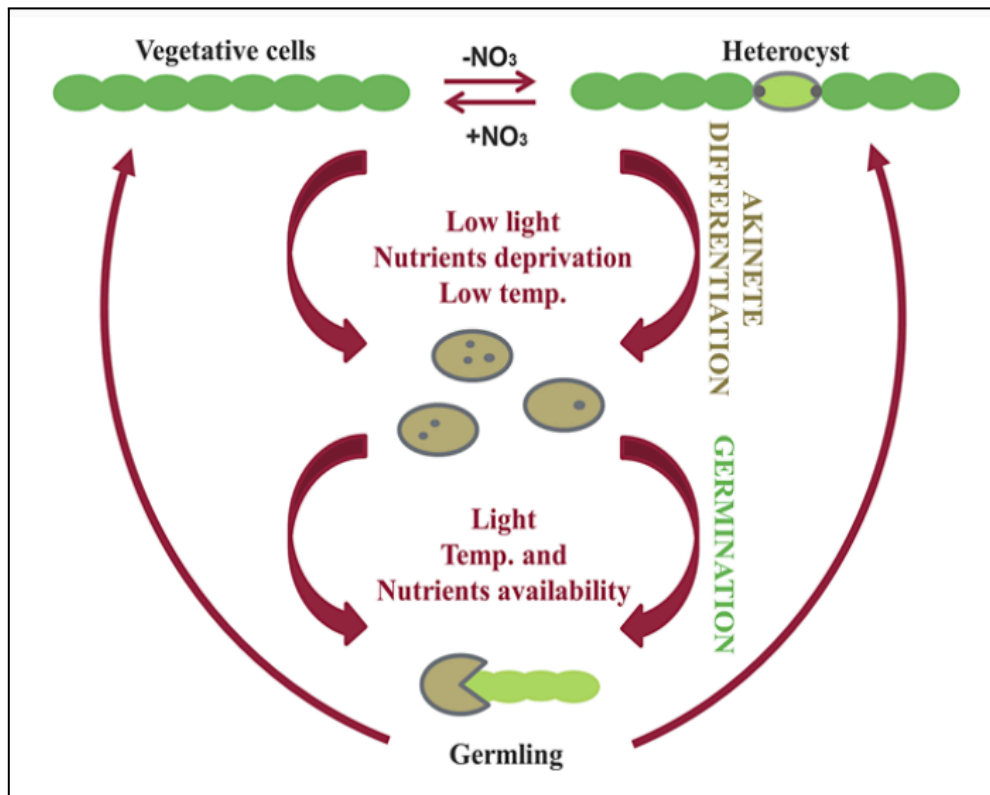


Figura 1.1: Representación esquemática del ciclo de vida de las cianobacterias del orden Nostocales (Garg y Maldener, 2021).

1.3.3. *Anabaena cylindrica*.

La *A. cylindrica* es una cianobacteria nativa muy extendida del orden Nostocales que se encuentra con frecuencia en todo el mundo y en particular, en las aguas dulces comúnmente en lagos, estanques y ríos. Esta cianobacteria filamentososa pertenece a un género conocido por su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico a través de los heterocistos y producir oxígeno mediante la enzima nitrogenasa (Sintra et al., 2022), Además poseen todas las estructuras anteriormente mencionadas que son clave para su procesamiento como biofertilizante.

Por otro lado estas cianobacterias tienen la capacidad de adaptar su composición pigmentaria a las condiciones ambientales, produciendo abundantemente C-ficocianina y clorofilas, pigmentos de interés por la industria química y farmacéutica por dichas razones es una cepa bastante estudiada e investigada.

Tabla 1.1: Composición elemental de *Anabaena cylindrica*. (datos obtenidos del proyecto FONDEF Idea N°ID21110073 Producción in situ de bioinoculantes para suelos degradados por incendios forestales)

Elemento	% peso/peso
C	40,86
H	6,6
O	38,7602
N	8,5
K	0,72
Ca	1,3949
Mg	0,5131
Na	0,2042
P	2,4476

Para efectos de este estudio se obtuvieron cepas de *Anabaena cylindrica* extraídas de tapetes microbianos del tranque la luz, localidad de Placilla, comuna de Valparaíso, que fueron aisladas e inoculadas en el laboratorio de Biotecnología y microalgas de la Escuela de Ingeniería en Medioambiente de la Universidad de Valparaíso.

1.4. Importancia de los soportes en la formulación de biofertilizantes

La formulación de un biofertilizante eficaz no solo depende de la presencia de microorganismos beneficiosos, como las cianobacterias fijadoras de nitrógeno, sino también de la elección de un soporte adecuado que permita conservar y/o maximizar sus beneficios. Los soportes, que pueden ser materiales orgánicos, inorgánicos, arcillas o gelificantes, desempeñan un papel fundamental en la estabilidad y efectividad del biofertilizante. Estos materiales proporcionan una matriz física que protege a los microorganismos de condiciones ambientales adversas, como la desecación, la radiación ultravioleta y las fluctuaciones de temperatura, lo cual aumenta su viabilidad y longevidad en el suelo (Stephens y Rask, 2000).

Además de mejorar la resistencia ambiental, los soportes también optimizan la dispersión de los microorganismos en el suelo, asegurando una distribución uniforme y facilitando la interacción constante con las raíces de las plantas. Este contacto cercano es esencial para que las cianobacterias fijadoras de nitrógeno puedan transferir eficientemente este nutriente a las plantas, promoviendo su crecimiento y desarrollo.

La elección de un soporte adecuado puede, asimismo, influir en la capacidad del biofertilizante para retener y liberar nutrientes de manera controlada, proporcionando así un suministro sostenido de elementos esenciales para las plantas. En conjunto, estos factores convierten a los soportes en un componente clave para mejorar el rendimiento y la funcionalidad del biofertilizante en diversos tipos de suelos y condiciones ambientales.

1.4.1. Inmovilización de cianobacterias como método de soporte y estabilización

La inmovilización celular representa una técnica biotecnológica ampliamente implementada para optimizar la estabilidad y funcionalidad de células en diversas aplicaciones industriales. Esta metodología ha demostrado su efectividad en múltiples campos, destacando su uso en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes inorgánicos (Proulx & de la Noue, 1988), así como en la producción y obtención de metabolitos secundarios de interés comercial (Morales & de la Rosa, 1992). Adicionalmente, su aplicación se ha extendido al campo de la ingeniería genética, donde facilita la manipulación y preservación de organismos específicos (Barbotin, 1994).

Existen diversas formas de inmovilización, incluyendo el uso de soportes inertes como geles, resinas, fibras y polímeros que confieren protección y estabilidad a las células encapsuladas. Entre los métodos más utilizados, la inmovilización en geles naturales o sintéticos destaca por su capacidad para conservar células vivas de manera eficiente, favoreciendo su aplicación y almacenamiento (López Fouz, 2016). Dentro de estos soportes, el alginato es particularmente relevante debido a sus propiedades biocompatibles y de baja toxicidad, lo cual permite encapsular microorganismos fotosintéticos de forma eficiente .

La inmovilización en esferas de alginato también llamada "microencapsulación" ha demostrado ser especialmente útil para la conservación de microorganismos fotosintéticos como las cianobacterias. Este método permite mantener la integridad ultraestructural y la actividad fisiológica de las células por periodos prolongados, lo que lo convierte en una alternativa viable para el almacenamiento a largo plazo (Hertzberg & Jensen, 1989). Comparado con la criopreservación y otros métodos de inmovilización, el uso de esferas de alginato ofrece varias ventajas: la preparación de las esferas es más sencilla y económica, pueden almacenarse en refrigeradores y facilitar la rápida introducción de células inmovilizadas en cultivos líquidos sin necesidad de descongelación (Romo & Bécares, 1992). Además, en estudios con *Pseudanabaena galeata*, las células inmovilizadas en alginato conservaron mejor su tasa de crecimiento y composición bioquímica que las sometidas a congelación (Romo & Bécares, 1992)

2. PROBLEMA

La degradación de los suelos es definida como el conjunto de procesos inducidos por acción antrópica que disminuyen la capacidad actual y futura del suelo para sostener la vida humana (Oldeman, 1989), este proceso es acelerado principalmente por actividades humanas, como la deforestación, el sobrepastoreo y prácticas de manejo inadecuadas, que degradan tanto la estructura como la calidad química y biológica del suelo, reduciendo su capacidad para retener nutrientes y agua afectando así su biodiversidad.

En respuesta a este desafío, se han investigado diversas soluciones, entre las cuales se destaca el uso de biofertilizantes. Sin embargo, la implementación efectiva de biofertilizantes a base de cianobacterias, como *Anabaena cylindrica*, enfrenta obstáculos significativos debido a la falta de estrategias efectivas para su estabilización y preservación. La formación de acinetos ha sido una vía explorada, dado que estas estructuras de resistencia permiten la supervivencia de las cianobacterias en condiciones adversas y facilitan la liberación de nutrientes en el suelo. Paralelamente, la microencapsulación mediante esferas de alginato se presenta como una alternativa prometedora, ya que permite inmovilizar y proteger las cianobacterias, conservando sus características y efectividad durante el almacenamiento y su posterior aplicación en cultivos.

Este estudio se enfoca en evaluar la eficacia de ambas estrategias de estabilización a través de la formación de acinetos y la microencapsulación en *Anabaena cylindrica*, con el objetivo de desarrollar un biofertilizante capaz de mejorar la fertilidad del suelo y ofrecer una solución sostenible y ecológica a la problemática de la degradación de suelos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Desarrollar un biofertilizante estable en base a cianobacterias de la especie *Anabaena cylindrica*.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar las estrategias de estabilización de las cianobacterias a través de microencapsulación y formación de acinetos
- Evaluar parámetros de formulación de biofertilizante con la estrategia de estabilización seleccionada.
- Evaluar la viabilidad del formulado en base a cianobacterias *Anabaena cylindrica*.

4. METODOLOGÍA

4.1. Objetivo 1 - Etapa 1: Evaluar las estrategias de estabilización de las cianobacterias a través de microencapsulación y formación de acinetos

Para esta etapa, es esencial disponer de un stock suficiente de biomasa de cianobacterias de la cepa *Anabaena cylindrica* para implementar las estrategias de estabilización. La primera estrategia se enfoca en la formación de acinetos mediante la aplicación de métodos fisicoquímicos, como la variación de la calidad lumínica y la modificación de la concentración de iones, con el objetivo de maximizar la cantidad de acinetos formados y seleccionar el método más eficaz. La segunda estrategia consiste en la microencapsulación de las cianobacterias en esferas de alginato, proporcionando protección y estabilidad. Ambas estrategias se llevarán a cabo a través de las siguientes actividades.

4.1.1. Cultivo de cianobacterias en medio líquido para evaluar estrategias de estabilización.

Para obtener el stock de biomasa necesario para la implementación de las estrategias de estabilización, tanto para la formación de acinetos como para la microencapsulación y todos sus ensayos preliminares, se debe iniciar con cultivos celulares de *Anabaena cylindrica* en botellas de un litro y en fotobiorreactores de placa de 7 litros, en modalidad por lotes.

4.1.1.1. Preparación del medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado es una modificación del medio Allen-Arnon, específicamente formulado para el crecimiento de cianobacterias. Su preparación se realiza en dos soluciones separadas, como se muestra en la Figura 4.1:

Tabla 4.1: Composición del medio de cultivo Allen-Arnod modificado.

Solución A		Solución B	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
KH ₂ PO ₄	0,54 g	MgSO ₄ •7H ₂ O (5g/L)	50 ml
Fe- EDTA	2ml	CaCl ₂ •2H ₂ O (5g/L)	10 ml
Elementos traza	1ml	NaNO ₃ (5g/L)	20 ml

Para la preparación del medio de cultivo, se realizó en dos soluciones por separado, ya que durante la esterilización en autoclave podría formarse un precipitado entre el fosfato y el calcio debido a las altas temperaturas alcanzadas. Además, este método dificulta la proliferación espontánea de microorganismos indeseados, dado que cada solución por separado no era óptima para el cultivo.

Una vez preparado, se esterilizó en autoclave a 121°C durante un tiempo mínimo de 20 minutos. Posteriormente, para su uso como medio de cultivo, se mezclaron las soluciones en una proporción 1:1, y se midió el pH utilizando un multiparámetro.

4.1.1.2. Cultivos en placa petri.

Se prepararon medios de cultivo sólidos en placas Petri estériles, utilizando el medio de cultivo Allen-Arnon modificado. Una vez que el medio de cultivo alcanzó las condiciones óptimas, se inocularon por triplicado las placas Petri con cepas de cianobacterias de la especie *Anabaena cylindrica*, extraídas y aisladas de tapetes microbianos del tranque La Luz en el año 2023.

Para el proceso, se tomó una muestra con micropipeta o asa de argolla (previamente esterilizada) de una placa inoculada anteriormente, la cual se traspasó a una nueva placa con medio de cultivo sólido, trazando una línea en zigzag para asegurar una mejor distribución. Luego, se incubaron las placas a una temperatura y condiciones de luz adecuadas para el crecimiento óptimo de las cianobacterias, generalmente entre 25-30°C, durante un período de 2 a 4 semanas, hasta que se observaron colonias visibles.

La inoculación se realizó bajo campana de flujo laminar para garantizar condiciones de asepsia, y este protocolo se aplicó en todas las inoculaciones posteriores, incluidas las realizadas en matraces Erlenmeyer y botellas de 1 litro de volumen.

4.1.1.3. Cultivos en matraz Erlenmeyer

Para llevar a cabo el cultivo de cianobacterias en matraces, primero se esterilizó la superficie de la campana de flujo laminar con etanol al 70%. Posteriormente, se mezclaron las soluciones A y B del medio Allen-Arnod modificado (previamente esterilizadas en autoclave) en las proporciones adecuadas para preparar 500 ml de medio de cultivo. Este medio se distribuyó equitativamente en dos matraces Erlenmeyer esterilizados de 250 ml cada uno.

Dentro de la campana de flujo laminar, se abrió una placa Petri con crecimiento previo de cianobacterias. Utilizando un asa de siembra o una pipeta Pasteur estéril, se tomó una pequeña muestra del crecimiento de la placa. Con esta muestra, se inoculó el primer matraz Erlenmeyer (réplica 1) introduciendo el asa o pipeta en el medio de cultivo estéril. El mismo procedimiento se repitió para la réplica 2.

Una vez finalizado el proceso, se taparon los matraces con algodón y tela hidrófoba para permitir el intercambio de aire, y se colocaron en agitadores Shaker a 150 rpm, bajo condiciones de luz adecuadas y temperatura ambiente, hasta que se observó el crecimiento de cianobacterias mediante colorimetría

4.1.1.4. Cultivos en botellas 1L y fotobiorreactor 7 litros

Se prepararon las botellas de vidrio conectadas con 3 mangueras, donde 2 de ellas son para la aireación del sistema o intercambio de gases y una para la toma de muestras conectada a una jeringa de 20 ml. Este conjunto armado se esterilizó en autoclave con los parámetros definidos.

Posteriormente, bajo campana de flujo laminar, se tomó uno de los matraces Erlenmeyer con el cultivo de cianobacterias en crecimiento, agitando suavemente el matraz para homogeneizar el cultivo. Utilizando una pipeta estéril, se transfirió asépticamente un inóculo del cultivo del matraz a la botella con medio fresco (50-100 ml por cada litro de medio fresco). Por último, se agitó para homogenizar la mezcla, se tapó y se dispuso en el laboratorio de cultivos fotosintéticos bajo los parámetros descritos en la tabla 4.2. Este procedimiento se realizó por triplicado para obtener al menos 3 litros de cultivo.

En el caso del fotobiorreactor de placa, este tiene un principio de funcionamiento similar al de los sistemas en botellas, pero con una mayor capacidad de almacenamiento. Para su llenado, se mezcló 1 litro del medio de cultivo previamente diseñado en la etapa anterior con 1 litro de inóculo proveniente de las botellas de cultivo, para llegar a los 7 litros de llenado se fue alimentando constantemente con medio de cultivo a través de una bomba conectada a un temporizador programable, de esta forma se pudo alcanzar el volumen deseado. este procedimiento se realizó por duplicado

Tabla 4.2: Descripción del cultivo de cianobacterias para crecimiento en botellas y fotobiorreactor.

Elemento	Descripción
Especie CB	<i>Anabaena cylindrica</i>
Modalidad de operación	Semicontinuo, lote alimentado
Iluminación	Foco led 50W (Luz blanca)
Irradiancia	25 W/m ² (120 μmol*m ⁻² *s ⁻¹)
Fotoperiodo	12 horas de luz / 12 horas de oscuridad
Temperatura	Ambiente (25°C aprox)

4.1.1.5. Cuantificación de biomasa producida.

Un método para cuantificar la biomasa producida fue la determinación del peso seco de las cianobacterias incubadas en las botellas.

Para ello, se homogeneizó bien el cultivo de cianobacterias en la botella agitándola suavemente. Luego, se tomaron 4 muestras de 10 ml cada una del cultivo y se transfirieron a 4 tubos tipo Falcon de 15 ml. Estos se centrifugaron a 4000 rpm durante aproximadamente 10 minutos para sedimentar completamente las células de cianobacterias. (Innok et al., 2009)

Después de la centrifugación, se decantó cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo, procurando no perder el pellet de células sedimentadas. Cada pellet se resuspendió con agua destilada y se agitó en un vortex por aproximadamente 10 segundos. Posteriormente, se centrifugó nuevamente para lavar y eliminar las sales residuales del medio de cultivo. Una vez descartados los sobrenadantes, los 4 pellets de células lavados se transfirieron a 4 capachos previamente pesados por separado en una balanza analítica.

Los 4 capachos con los pellets se colocaron en estufa a 105°C durante 24 horas hasta alcanzar peso constante. Después, se retiraron de la estufa y se dejaron enfriar en un desecador. Posteriormente, se pesaron con las cianobacterias secas en una balanza analítica.

El peso seco se calculó para cada muestra, restando el peso inicial de los capachos vacíos del peso final con las cianobacterias secas. De esta manera, se obtuvieron 4 valores de peso seco correspondientes a las 4 muestras de 10 ml. Además, se calculó la concentración promedio (g/L) y la desviación estándar de los 4 valores de peso seco obtenidos para tener una estimación más confiable de la biomasa presente en el cultivo.

Tabla 4.3: Tabla a utilizar para la cuantificación de biomasa y seguimiento de los cultivos.

Procedencia muestra	Nro muestra	Masa (g)	Masa capacho + CB (g)	masa CB (g)	Volumen (ml)	Concentración (g/L)	Promedio concentración (g/L)	Desv. est.
botella o fotobiorreactor	1							
	2							
	3							
	4							

4.1.2. Estrategias de formación de acinetos

4.1.2.1. Método de cambio de calidad lumínica

Se partió de cultivos stock de *Anabaena cylindrica* mantenidos en botellas de cultivo bajo las condiciones estándar descritas anteriormente. Para iniciar el experimento, se seleccionó una botella de 1 litro de dicho stock con un mínimo de 800 ml de cultivo de CB con biomasa suficiente, cuantificada previamente mediante la metodología de peso seco. Posteriormente, se aplicaron las condiciones necesarias para inducir la formación de acinetos.

Tabla 4.4: Descripción del cultivo de cianobacterias en condiciones de estrés con luz roja.

Elemento	Descripción
Especie CB	<i>Anabaena cylindrica</i>
Modalidad de operación	Semicontinuo, lote alimentado
Iluminación	Ampolleta led 2W
Longitud de onda	620 Nm (Luz Roja)
Irradiancia	1,9 W/m ² (10 μmol*m ⁻² *s ⁻¹)
Fotoperiodo	12 horas de luz / 12 horas de oscuridad
Temperatura	Ambiente

Se removieron alícuotas una vez por semana durante el período de 1 mes para seguir la formación de acinetos, la cual fue evaluada mediante inspección microscópica directa.

4.1.2.2. Método de limitación de hierro como nutriente.

Para inducir la formación de acinetos, se utilizó un medio de cultivo Allen-Arnon modificado, carente de hierro al no agregar Fe-EDTA según las indicaciones de la formulación original. A partir de este medio, se prepararon cuatro matraces con diferentes concentraciones de Fe-EDTA: 0%, 25%, 50% y 75%, en relación con la cantidad indicada en la fórmula del medio de cultivo Allen- Arnon modificado (Hori et al., 2003).

Los cultivos de *Anabaena cylindrica* previamente crecidos en botella fueron inoculados bajo campana de flujo laminar en 4 matraces con los diferentes medios de cultivo Allen-Arnon sin Fe-EDTA. Para ello, se utilizaron matraces de 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL. Los cultivos se incubaron bajo condiciones ambientales en agitadores tipo shaker a 150 rpm. Durante el período de incubación, se tomaron muestras periódicamente cada 2 semanas, y se analizaron mediante microscopía óptica para evaluar la presencia y diferenciación de estructuras celulares en acinetos.

4.1.3. Microencapsulación de Cianobacterias en esferas de alginato.

En la presente sección se realizó una prueba experimental sin adición de resultados respecto a la microencapsulación en solución de alginato de CB de la especie *Anabaena cylindrica*, esto con la finalidad de comprobar la viabilidad técnica del proceso utilizando los equipos disponibles en el laboratorio de biotecnología ambiental, asegurando que las condiciones y los procedimientos fueran adecuados para replicar y optimizar el proceso, para ello se ha utilizando una metodología referenciada descrita a continuación.

4.1.3.1. *Preparación de solución a microencapsular*

Se preparó una solución de alginato al 1,5% p/v (Romo & Pérez-Martínez, 1997), disolviendo 3,75 g de alginato de sodio en 250 ml de agua destilada a 50°C . La disolución se realizó en un vaso precipitado, agitando de forma constante hasta lograr una consistencia espesa. Posteriormente, la mezcla se filtró utilizando un embudo cubierto con gasa absorbente, y se aplicó vacío mediante una bomba para succionar el líquido, permitiendo eliminar los grumos y homogeneizar la solución.

Posteriormente se tomó un volumen conocido del cultivo a microencapsular, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min esto permitió obtener un pellet de cianobacterias, el cual fue resuspendido y añadido a la solución de alginato. La mezcla final se homogeneizó utilizando una varilla agitadora de vidrio.

4.1.3.2. *Formación de esferas de alginato*

Se preparó una solución de cloruro de calcio 1% p/v (Hernández et al., 2018) para ello se disolvió 10 g de este soluto en 1 litro de agua destilada dispuesto en un vaso precipitado de 2 litros, en esta solución se precipitó por goteo la solución de alginato mezclada con el pellet de cianobacterias a través de una bomba peristáltica conectada con una manguera a una velocidad de rotor de 4 rpm, Al entrar en contacto con la solución de cloruro de calcio, la mezcla de alginato con cianobacterias se gelificó, formando esferas de alginato con un diámetro aproximado de 1 mm.

Una vez formadas las esferas, estas se dejaron reposar con un mínimo de 15 minutos y luego se separaron del líquido de cloruro de calcio lavándose con agua destilada para eliminar residuos. Posteriormente, las esferas se secaron a temperatura ambiente y guardadas en frascos de vidrio para su conservación.

4.2. Objetivo 2 - Etapa 2: Evaluar parámetros de formulación del biofertilizante con la estrategia de estabilización seleccionada.

Una vez concluida la fase experimental correspondiente al primer objetivo de este estudio, se realizó una evaluación comparativa de las estrategias de estabilización implementadas, con el propósito de identificar aquella que presentó los resultados más prometedores. Este análisis preliminar permitió seleccionar la estrategia más adecuada para proceder con la determinación y optimización de los parámetros necesarios para el desarrollo del biofertilizante.

4.2.1. Condiciones de formulación del biofertilizante a través de microencapsulación.

Se realizaron cuatro lotes de microencapsulación de cianobacterias, utilizando diferentes concentraciones para evaluar su resistencia estructural y capacidad de conservación. Los primeros dos lotes se llevaron a cabo con una concentración de 0,468 g/L de cianobacterias en la solución de alginato a microencapsular, mientras que el tercer y cuarto lote se realizó con una concentración de 1,499 g/L.

Como parte del diseño experimental, se consideró la edad del cultivo como una variable de interés, trabajando con dos tipos de cultivos de *Anabaena cylindrica*: uno con más de un mes de antigüedad y otro más reciente (menos de un mes). Esto permitió evaluar la microencapsulación en función de la concentración, edad del cultivo y estado de conservación.

Para llegar a las concentraciones determinadas de biomasa de CB en solución de alginato en los 4 lotes a microencapsular, se tuvo que cuantificar el peso seco de los cultivos donde fueron extraída la biomasa y calcular el volumen a centrifugar de estas.

Para el primer y segundo lote, se centrifugaron 180 ml de cultivo joven y cultivo envejecido de cianobacterias, mientras que para el tercero y cuarto se centrifugaron 315 ml de ambos cultivos. En cada caso, el cultivo envejecido fue diluido para igualar la concentración del cultivo joven utilizando la ecuación de dilución.

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

Donde: C_i = Concentración inicial ; V_i = Volumen inicial ; C_f = Concentración final ; V_f = Volumen final

Ya formadas las esferas por cada lote, estas fueron divididas en dos frascos de vidrio en proporciones similares. Un frasco fue almacenado a temperatura ambiente bajo luz blanca con una irradiancia de $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mientras que el otro se conservó en oscuridad y refrigeración a 4°C (Trivedi & Pandey, 2008). Este último procedimiento se replicó por cada lote realizado en esta experiencia.

A continuación se presenta una tabla resumen sobre las condiciones y parámetros establecidos para la microencapsulación de cianobacterias y posterior almacenamiento.

Tabla 4.5 Resumen de microencapsulación de CB en esferas de alginato.

Lote	Edad de cultivo de procedencia	Volumen requerido a centrifugar (ml)	Concentración en solución de alginato (g/L)	Condiciones de almacenamiento
1	Cultivo joven	180	0,468	Refrigerado 4°C y oscuridad
1	Cultivo joven	180	0,468	T° ambiente, luz blanca
2	Cultivo envejecido	180	0,468	Refrigerado 4°C y oscuridad
2	Cultivo envejecido	180	0,468	T° ambiente, luz blanca
3	Cultivo joven	315	1,499	Refrigerado 4°C y oscuridad
3	Cultivo joven	315	1,499	T° ambiente, luz blanca
4	Cultivo envejecido	315	1,499	Refrigerado 4°C y oscuridad
4	Cultivo envejecido	315	1,499	T° ambiente, luz blanca

4.3. Objetivo 3 - Etapa 3: Evaluar la viabilidad del formulado en base a cianobacterias *Anabaena cylindrica*.

4.3.1. Pruebas de viabilidad, monitoreo y seguimiento del formulado.

Para evaluar la viabilidad, monitorear y realizar seguimiento al formulado, se realizaron inoculaciones del biofertilizante microencapsulado de los lotes 1 y 2, los cuales previamente fueron disueltos en hexametáfosfato de sodio para desestabilizar y romper su estructura gelificante, permitiendo la liberación de las cianobacterias encapsuladas sin comprometer su integridad. La inoculación se realizó en medio de cultivo Allen-Arnon modificado, bajo condiciones óptimas de crecimiento, con el fin de garantizar un entorno adecuado para su posterior monitoreo y evaluación. A continuación se detalla el procedimiento.

4.3.1.1. Disolución de esferas de alginato para inoculación.

Después de un periodo de almacenamiento de dos semanas de las cianobacterias en perlas de alginato, se tomaron 4 muestras de 2,5 g de cada experiencia de CB microencapsuladas del primer y segundo lote y se disolvieron cada una de ellas en 40 ml de una solución de hexametáfosfato de sodio al 5% p/v y pH 6,08 (Romo & Pérez-Martínez, 1997) De esta forma se pudo obtener una dilución de las perlas de alginato.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas en tubos Falcon de 45 ml. El pellet resultante se resuspendió y lavó una vez con agua destilada para eliminar cualquier residuo, luego se resuspendió en 5 ml de agua destilada y se agitó en un vortex para homogeneizar. Finalmente, se inocularon 4 matraces Erlenmeyer de 250 ml con el pellet resuspendido de cada experiencia en medio de cultivo Allen-Arnon modificado, y se colocaron bajo condiciones controladas de temperatura (25°C) y fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad, con agitación constante a 150 rpm para su incubación.

4.3.1.2. *Medición de absorbancia.*

Para evaluar el crecimiento de los cultivos de *Anabaena cylindrica* en los matraces Erlenmeyer previamente inoculados en la etapa anterior, se realizó una medición semanal de la absorbancia a 550 nm. Cada semana, se recolectaron alícuotas de 5 ml de cada matraz bajo campana, para minimizar posibles contaminaciones. Las muestras fueron aplicadas directamente, sin diluir, en el espectrofotómetro SpectroVis Plus Go Direct utilizando el software Spectral Analysis.

Los valores obtenidos se emplearon para determinar la densidad celular de las cianobacterias en el cultivo, correlacionando la absorbancia obtenida en relación al tiempo de los distintos cultivos, permitiendo el monitoreo detallado del crecimiento de estos durante el periodo de medición.

4.3.1.3. *Medición de rendimiento cuántico (QY) de fluorescencia de la clorofila A.*

Además de la absorbancia medida para comprobar la viabilidad del formulado, también se midió el rendimiento cuántico (QY) estimado a partir de la fluorescencia de la clorofila A, esto es la eficiencia con la que las cianobacterias convierten la luz en energía fotosintética en el fotosistema II. Para ello se utilizó un fluorómetro de amplitud modulada (PAM) marca AquaPen modelo AP 110.

Este procedimiento se realizó semanalmente para cada matraz inoculado con el formulado de los lotes 1 y 2 como también al mismo formulado microencapsulado refrigerado y a temperatura ambiente.

Para ello se tomaron alícuotas de 3 ml de cada cultivo inoculado con el formulado, mientras que para el formulado microencapsulado se utilizaron muestras de 1,8 g correspondientes a los lotes 1 y 2. Todas las muestras se colocaron en una cubeta especial para fluorescencia. Las muestras extraídas se adaptaron a la oscuridad durante 10 minutos antes de la medición.

Con estos datos, se verificó la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II, que es un parámetro clave para evaluar el rendimiento fotosintético y la viabilidad de las células a lo largo del tiempo de conservación e incubación.

5. RESULTADOS

5.1. Objetivo 1 - Etapa 1: Evaluar las estrategias de estabilización de las cianobacterias a través de microencapsulación y formación de acinetos.

5.1.1. Cultivo de cianobacterias en medio líquido para evaluar estrategias de estabilización.

En el presente estudio hasta la fecha, se generaron 3 botellas y dos fotobiorreactores de 7 litros de cultivos de *Anabaena cylindrica*. dispuestas en el laboratorio de cultivos fotosintéticos que se utilizaron para las experiencias de formación de acinetos y microencapsulación.



Figura 5.1: Cultivos en botellas 1L de CB *Anabaena cylindrica*.

Para evaluar la biomasa celular, se cuantificó la biomasa de las botellas B1, B2 y B3 mediante el método de peso seco. Entre estas, la botella B1 mostró mejores resultados de biomasa, por lo cual fue seleccionada para la experiencia de formación de acinetos mediante método de calidad lumínica mientras que las botellas B2 y B3 sirvieron de inóculo para un fotobiorreactor de placa de 7 litros. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.1. y 5.2

Tabla 5.1: Cuantificación de biomasa botella B1.

Procedencia muestra	Nro muestra	Masa capacho (g)	Masa capacho + CB (g)	masa CB (g)	Volumen (ml)	Concentración (g/L)	Promedio concentración (g/L)	Desv. est.
Botella B1	1	0,359	0,3747	0,0157	10	1,57	1,64	0,053
	2	0,2438	0,2605	0,0167	10	1,67		
	3	0,3306	0,3469	0,0163	10	1,63		
	4	0,3448	0,3617	0,0169	10	1,69		

Tabla 5.2: Cuantificación de biomasa Fotobiorreactor 7 L.

Procedencia a muestra	Nro muestra	Masa capacho (g)	Masa capacho + CB (g)	masa CB (g)	Volumen (ml)	Concentración (g/L)	Promedio concentración (g/L)	Desv. est.
FB 7L	1	22,2469	22,2616	0,0147	10	1,47	1,50	0,057
	2	22,8451	22,86	0,0149	10	1,49		
	3	23,5806	23,5951	0,0145	10	1,45		
	4	24,4361	24,4519	0,0158	10	1,58		

5.1.2. Estrategia de formación de acinetos a través de método de calidad lumínica

Una vez cuantificada y aprobada la biomasa de la botella B.1, ésta se incubó bajo condiciones específicas de calidad lumínica para inducir la formación de acinetos. En estas condiciones, se obtuvieron muestras para análisis óptico y se evaluó el proceso de incubación

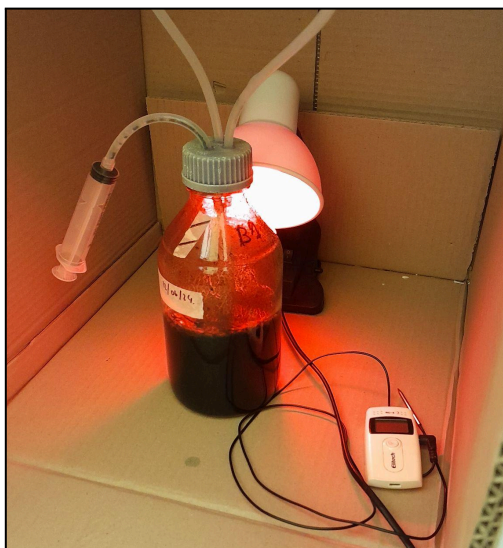


Figura 5.2: Botella B1 dispuesta a irradiancia 1,9 W/m² bajo luz roja

La figura 5.3 muestra los resultados obtenidos mediante observación microscópica del cultivo expuesto a condiciones de estrés por calidad lumínica, presentados con dos niveles de aumento diferentes.

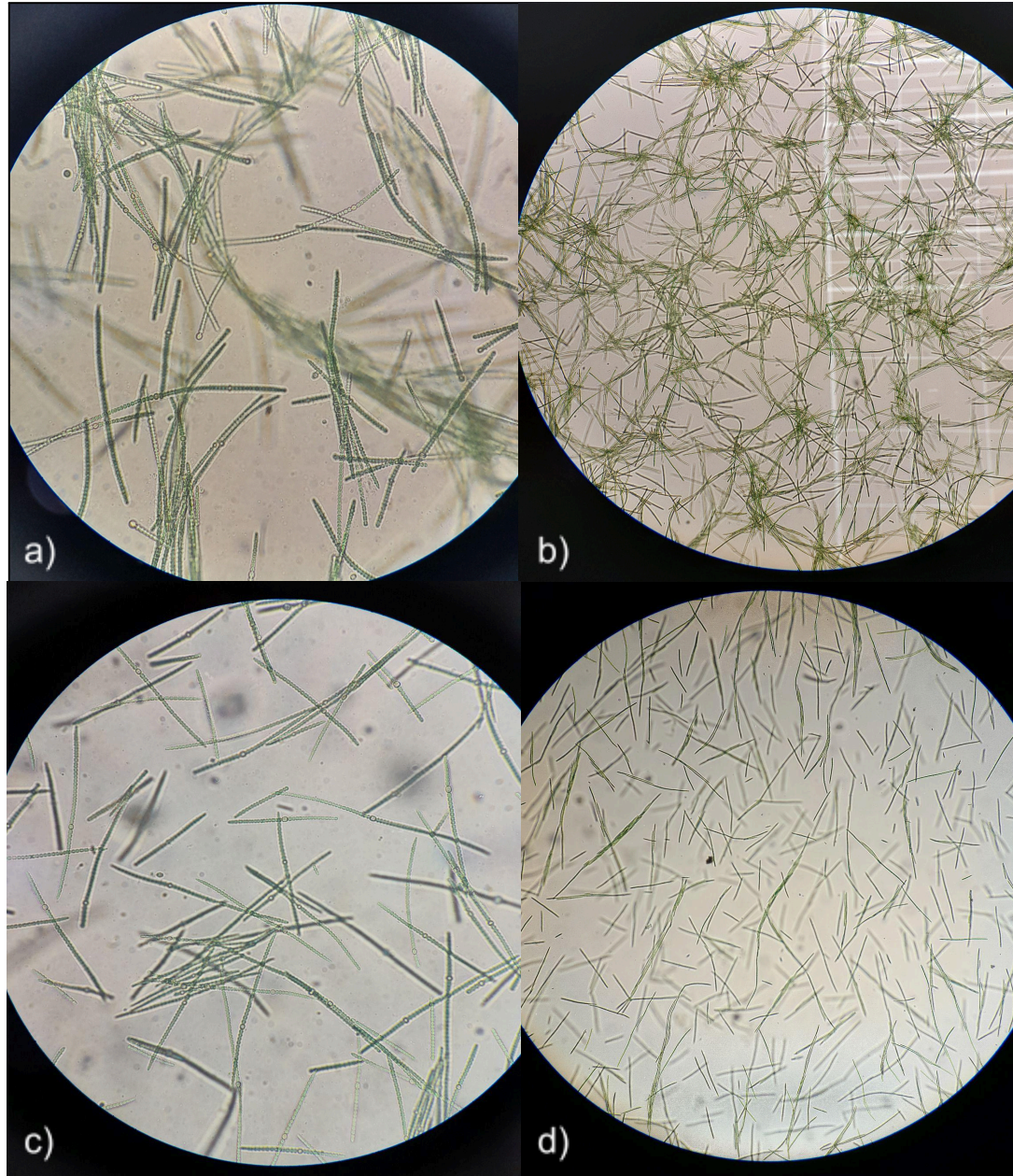


Figura 5.3: Muestras extraídas de la botella B1 incubada en condiciones de formación de acinetos con luz roja, (muestras a y b), 3 días posteriores a la incubación (aumento: 40x y 10x respectivamente); (muestras c y d), 14 días posteriores a la incubación (aumento 40x y 10x respectivamente).

En las imágenes de las muestras extraídas de la botella B1, incubadas bajo condiciones de luz roja, se observa una alta densidad de filamentos de cianobacterias en todas las etapas de observación. A los tres días de incubación, los filamentos muestran una estructura continua con heterocistos intercalados entre las células vegetativas, sin indicios de formación de acinetos. Tras 14 días de incubación, se mantiene la estructura filamentosa característica y la presencia de heterocistos libres, sin evidencia de desarrollo de acinetos en las muestras analizadas.

5.1.3. Estrategia de formación de acinetos a través de método de limitación de hierro como nutriente.

En la figura 5.4 y 5.5 se muestran los resultados de la observación microscópica de muestras representativas, extraídas de los matraces Erlenmeyer sometidos a condiciones de formación de acinetos mediante la limitación de hierro en el medio de cultivo Allen-Arnon modificado.

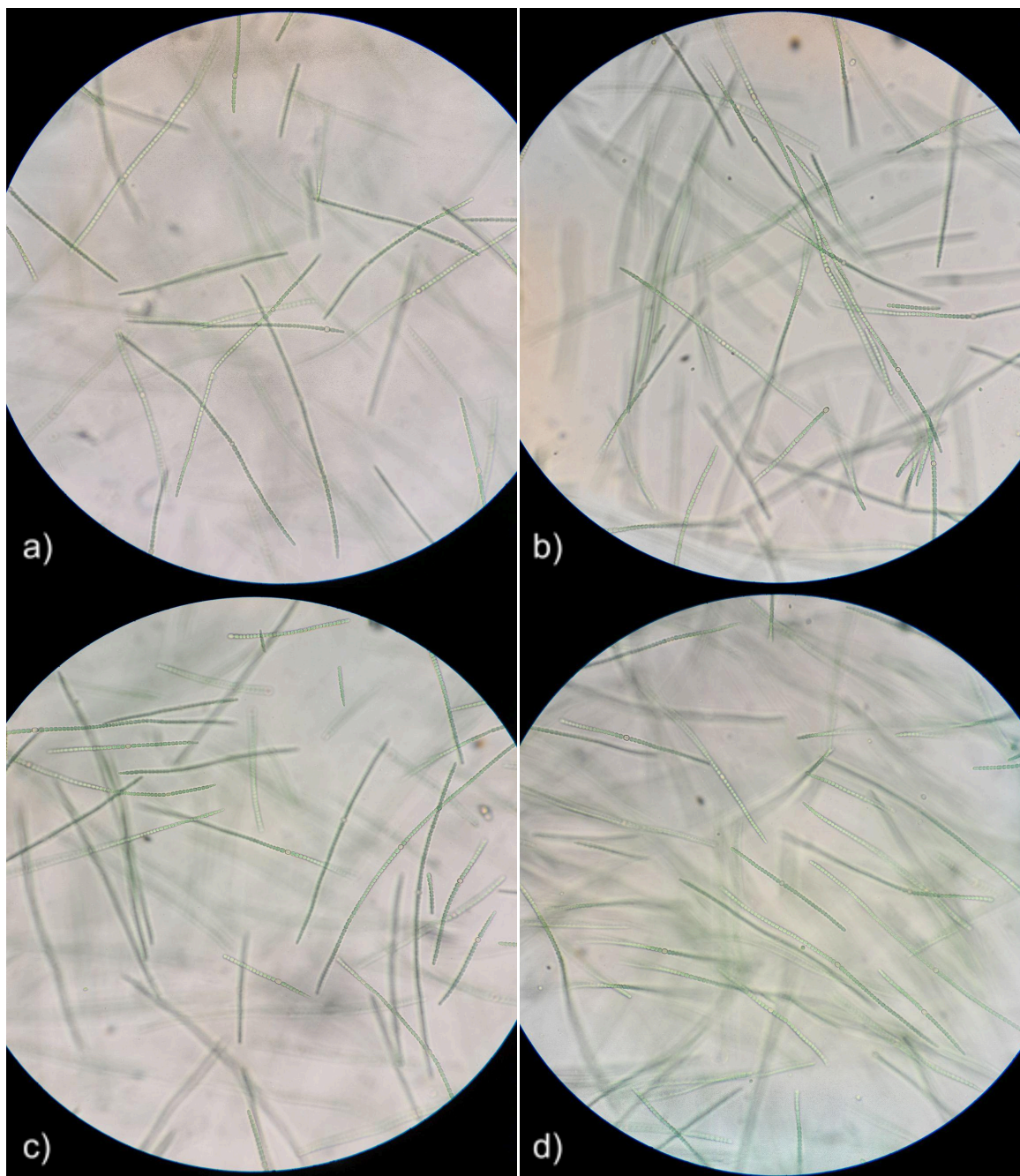


Figura 5.4: Muestras extraídas de matraces Erlenmeyer bajo condiciones de formación de acinetos 2 semanas posterior a inoculación con método de la limitación de hierro como nutriente. a) 0% Fe-EDTA; b) 25% Fe-EDTA; c) 50% Fe-EDTA; d) 75% Fe-EDTA. Valores porcentuales respecto al valor de Fe-EDTA ocupado en el medio Allen-Arnon modificado para crecimiento de cultivos. Aumento microscopio en muestras: 40x

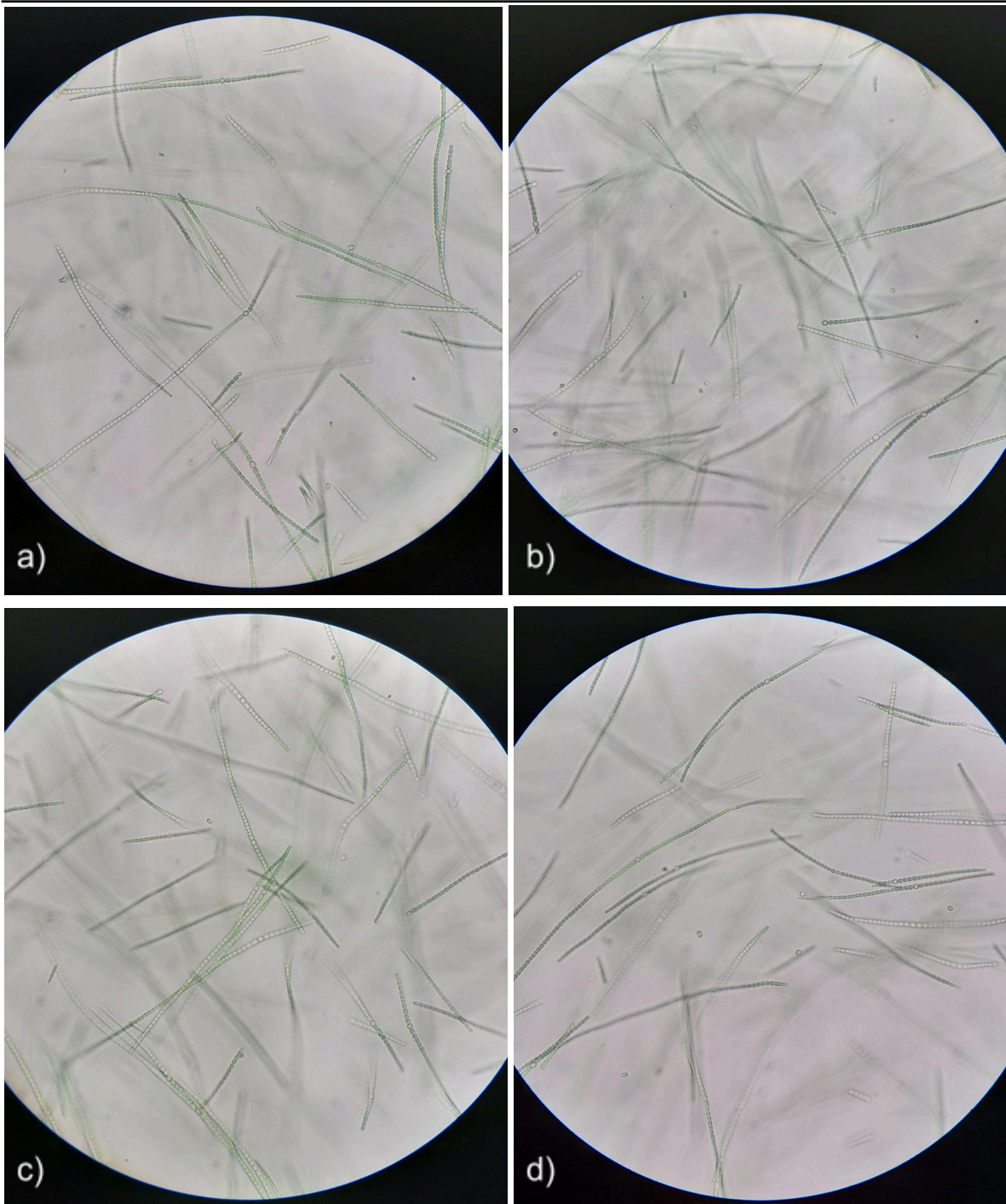


Figura 5.5: Muestras extraídas de matraces Erlenmeyer bajo condiciones de formación de acinetos 4 semanas posterior a inoculación con método de la limitación de hierro como nutriente. a) 0% Fe-EDTA; b) 25% Fe-EDTA; c) 50% Fe-EDTA; d) 75% Fe-EDTA. Valores porcentuales respecto al valor de Fe-EDTA ocupado en el medio Allen-Arnon modificado para crecimiento de cultivos. Aumento microscopio en muestras: 40x

En las muestras sin Fe-EDTA (0%) de las figuras 5.4 y 5.5, se observa la presencia de filamentos de *Anabaena cylindrica*, sin signos evidentes de diferenciación en acinetos. En las muestras con 25%, 50%, y 75% de Fe-EDTA de ambas figuras, se puede observar mayor presencia de filamentos que mantienen su estructura típica, con células vegetativas intercaladas junto a heterocistos, pero baja presencia de estos últimos, no se detectan acinetos en ninguna de las concentraciones evaluadas y las muestras parecen tener poca diferenciación. Estos resultados sugieren que, bajo las concentraciones de Fe-EDTA utilizadas, no se logró la formación de acinetos en las cianobacterias.

5.2. Objetivo 2 - Etapa 2: Evaluar parámetros de formulación del biofertilizante con la estrategia de estabilización seleccionada.

5.2.1. Condiciones de formulación del biofertilizante a través de microencapsulación.

En esta etapa se realizaron las 4 experiencias de microencapsulación establecidas ya las condiciones o parámetros descritos en la metodología correspondiente.

En las tablas 5.3 y 5.4 se presentan los resultados de peso seco de los cultivos utilizados para la determinación de la concentración de biomasa en solución de alginato a microencapsular para los lotes 1 y 2, en las tablas 5.5 y 5.6 se presentan resultados similares pero para microencapsulación de los lotes 3 y 4.

Tabla 5.3: Cuantificación de biomasa Botella 3 (3 semanas post inoculación).

Procedencia muestra	Nro muestra	Masa capacho (g)	Masa capacho + CB (g)	masa CB (g)	Volumen (ml)	Concentración (g/L)	Promedio concentración (g/L)	Desv. est.
Botella B3 (Cult. nuevo)	1	22,8883	22,8945	0,0062	10	0,62	0,65	0,032
	2	21,6426	21,6489	0,0063	10	0,63		
	3	23,376	23,3826	0,0066	10	0,66		
	4	24,9694	24,9763	0,0069	10	0,69		

Tabla 5.4: Cuantificación de biomasa Fotobiorreactor (7 semanas post inoculación)

Procedencia muestra	Nro muestra	Masa capacho (g)	Masa capacho + CB (g)	masa CB (g)	Volumen (ml)	Concentración (g/L)	Promedio concentración (g/L)	Desv. est.
FB 7 L (Cult. viejo)	5	22,7557	22,78	0,0243	10	2,43	2,40	0,029
	6	23,6648	23,6884	0,0236	10	2,36		
	7	24,9125	24,9365	0,024	10	2,4		
	8	22,998	23,022	0,024	10	2,4		

Tabla 5.5: Cuantificación de biomasa Fotobiorreactor nuevo (4 semanas post inoculación)

Procedencia muestra	Nro muestra	Masa capacho (g)	Masa capacho + CB (g)	masa CB (g)	Volumen (ml)	Concentración (g/L)	Promedio concentración (g/L)	Desv. est.
FB 7 L (cult. nuevo)	1	23,82	23,8317	0,0117	10	1,17	1,19	0,063
	2	21,6753	21,6867	0,0114	10	1,14		
	3	23,6963	23,7091	0,0128	10	1,28		
	4	21,833	21,8446	0,0116	10	1,16		

Tabla 5.6: Cuantificación de biomasa Fotobiorreactor viejo (10 semanas post inoculación)

Procedencia muestra	Nro muestra	Masa capacho (g)	Masa capacho + CB (g)	masa CB (g)	Volumen (ml)	Concentración (g/L)	Promedio concentración (g/L)	Desv. est.
FB 7 L (Cult. viejo)	5	23,7126	23,7365	0,0239	10	2,39	2,41	0,041
	6	23,3748	23,3986	0,0238	10	2,38		
	7	24,9687	24,9927	0,024	10	2,4		
	8	21,6413	21,666	0,0247	10	2,47		

Con base en estos resultados, se determinó el volumen de centrifugación necesario para cada lote presentado en la tabla 4.5. En el proceso de preparación de las esferas de cianobacterias en alginato, se utilizó como referencia la concentración del cultivo más joven para ambas concentraciones. El cultivo más longevo fue diluido para igualar esta concentración de referencia. Los detalles específicos de esta dilución se encuentran documentados en las tablas 9.1, 9.2, 9.3 y 9.4 presentes en el anexo de este informe.

5.2.2. Cianobacterias microencapsuladas en esferas de alginato de sodio.

En las figuras 5.6, 5.7, 5.8 y 5.9 se exhiben muestras de cada lote realizado bajo los parámetros previamente descritos en la metodología y almacenadas bajo 2 condiciones diferentes. Las muestras fueron extraídas 1 semana posterior a su elaboración.

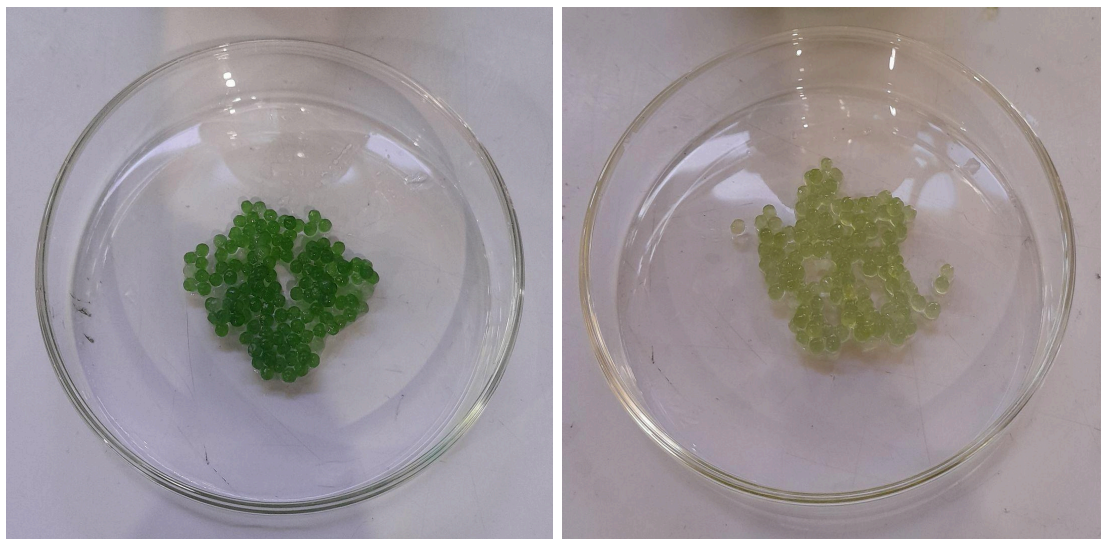


Figura 5.6: Muestras de cianobacterias microencapsuladas en alginato de sodio a una concentración de 0,468 g/L, elaboradas a partir de cultivo joven, correspondiente al lote 1, (izquierda) almacenadas a temperatura ambiente bajo luz blanca; (derecha) almacenadas en refrigeración a 4°C y oscuridad.

En la figura 5.6 se observan grandes diferencias en el color de las esferas bajo distintas condiciones de almacenamiento. En la condición de temperatura ambiente bajo luz blanca (izquierda), las esferas presentan un color verde brillante y levemente translúcido, que sugiere una buena retención de pigmentos, sin embargo presentan desprendimiento de líquido por parte de estas, presentando algunas de menor diámetro al inicial y otras rotas. En la condición de refrigeración a 4°C en oscuridad (derecha), el color de las esferas es de un verde más apagado o ligeramente amarillento, mostrando un tono más tenue en comparación con las esferas almacenadas a temperatura ambiente.

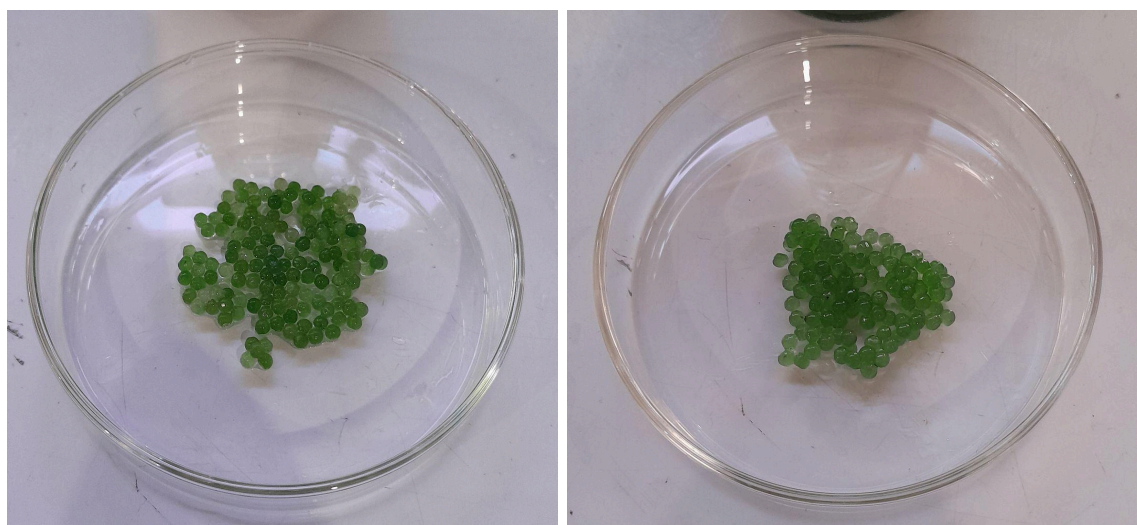


Figura 5.7: Muestras de cianobacterias microencapsuladas en alginato de sodio a una concentración de 0,468 g/L, elaboradas a partir de cultivo envejecido, correspondiente al lote 2, (izquierda) almacenadas a temperatura ambiente bajo luz blanca; (derecha) almacenadas en refrigeración a 4°C y oscuridad.

En la figura 5.7 se perciben diferencias notables en la intensidad del color entre las dos condiciones de almacenamiento. A temperatura ambiente bajo luz blanca (izquierda), las esferas poseen grandes diferencias tonales y muy poco homogéneas ya que van desde el verde oscuro, pasando por verde oliva a grisáceas, además se aprecia desprendimiento de líquido y diferencias de diámetro por parte de estas. Bajo la condición de refrigeración a 4°C en oscuridad (derecha), el color de las esferas es predominantemente verde ligeramente claro y más homogéneo con apariencia apagada, no se aprecian grandes diferencias de diámetro entre ellas.

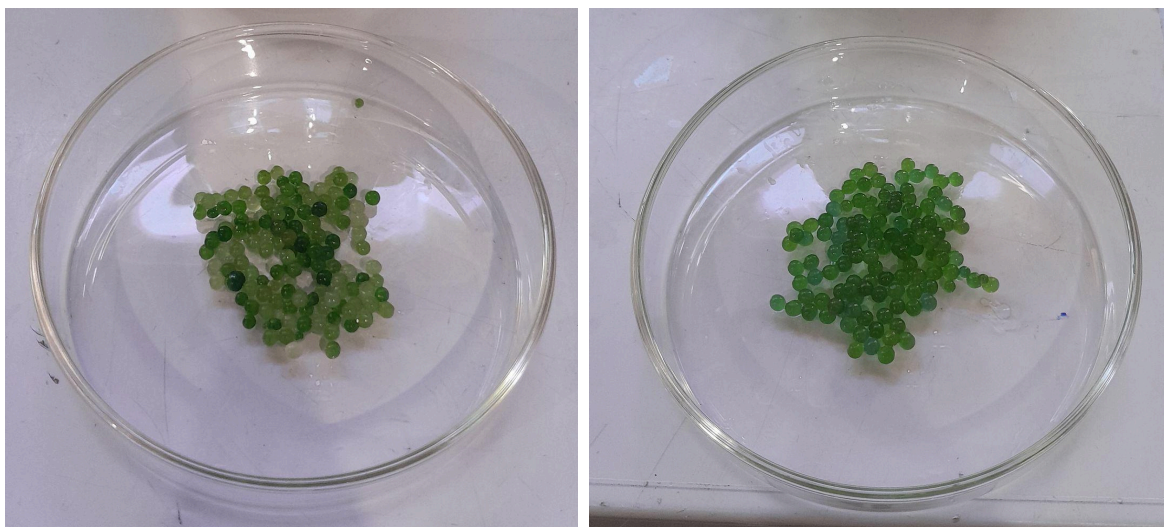


Figura 5.8: Muestras de cianobacterias microencapsuladas en alginato de sodio a una concentración de 1,499 g/L, elaboradas a partir de cultivo joven, correspondiente al lote 3, (Izquierda) almacenadas a temperatura ambiente bajo luz blanca; (derecha) almacenadas en refrigeración a 4°C y oscuridad.

En la Figura 5.8, al igual que en la Figura 5.7, se observan diferencias de tonalidad entre las esferas almacenadas en distintas condiciones. En la condición de temperatura ambiente bajo luz blanca (izquierda), las esferas presentan una gama de colores que incluye tonos de verde oscuro, verde pardo, verde oliva y algunos matices grisáceos, mostrando una marcada variedad tonal entre las esferas. En cambio, en la condición de refrigeración a 4°C en oscuridad (derecha), las esferas tienen un color predominantemente verde oscuro, con tonos más apagados y, en algunas áreas, se aprecian ligeros matices de verde claro.

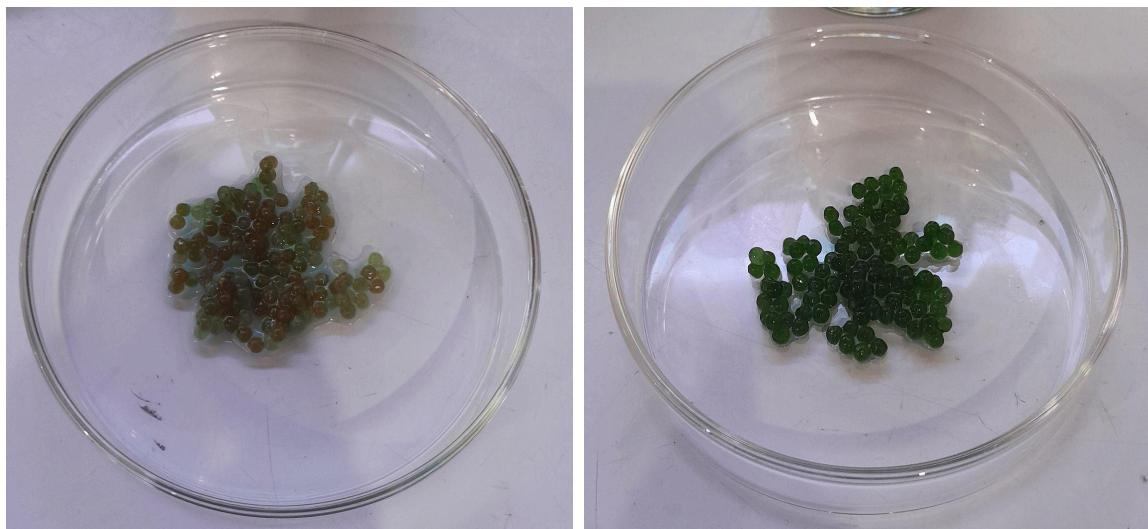


Figura 5.9: Muestras de cianobacterias microencapsuladas en alginato de sodio a una concentración de 1,499 g/L, elaboradas a partir de cultivo envejecido, correspondiente al lote 4, (izquierda) almacenadas a temperatura ambiente bajo luz blanca; (derecha) almacenadas en refrigeración a 4°C y oscuridad.

En la Figura 5.9, correspondiente a cianobacterias encapsuladas a una concentración de 1,499 g/L a partir de un cultivo envejecido, las esferas muestran diferencias de color en cada condición de almacenamiento. A temperatura ambiente bajo luz blanca (izquierda), las esferas presentan un verde apagado o parduzco, con zonas de decoloración y presencia de líquido en la superficie con posible desprendimiento de ficocianina. En la condición de refrigeración a 4°C en oscuridad (derecha), las esferas tienen un color verde bastante oscuro, con una tonalidad opaca y un aspecto acuoso. Se observa también la presencia de líquido en la superficie de algunas esferas.

5.3. Objetivo 3 - Etapa 3: Evaluar la viabilidad del formulado en base a cianobacterias *Anabaena cylindrica*.

5.3.1. Medición de rendimiento cuántico (QY) sobre cianobacterias microencapsuladas en alginato.

Las tablas 5.7 y 5.8 muestran los resultados del rendimiento cuántico medido directamente en muestras de cianobacterias microencapsuladas de los lotes 1 y 2 a una concentración de 0,468g/L de CB en solución de alginato, mientras que las tablas 5.9 y 5.10 muestran resultados similares para los lotes 3 y 4 correspondientes a una concentración de 1,499 g/L de CB en solución de alginato.

Tabla 5.7: Resultados (QY) sobre CB microencapsuladas en esferas de alginato con 1 semana de conservación.

Lote	Edad de cultivo de procedencia	Condiciones de almacenamiento	Rendimiento (QY)
1	Cultivo Joven	Refrigerado 4°C, sin luz	0,34
1	Cultivo Joven	Temp. ambiente, con luz	0,49
2	Cultivo Envejecido	Refrigerado 4°C, sin luz	0,30
2	Cultivo Envejecido	Temp. ambiente, con luz	0,44

Tabla 5.8: Resultados (QY) sobre CB microencapsuladas en esferas de alginato con 1 mes de conservación.

Lote	Edad de cultivo de procedencia	Condiciones de almacenamiento	Rendimiento (QY)
1	Cultivo Joven	Refrigerado 4°C, sin luz	0,15
1	Cultivo Joven	Temp. ambiente, con luz	0,45
2	Cultivo Envejecido	Refrigerado 4°C, sin luz	0,30
2	Cultivo Envejecido	Temp. ambiente, con luz	0,43

Tabla 5.9: Resultados (QY) sobre CB microencapsuladas concentradas en esferas de alginato con 1 semana de conservación.

Lote	Edad de cultivo de procedencia	Condiciones de almacenamiento	Rendimiento (QY)
3	Cultivo Joven	Refrigerado 4°C, sin luz	---
3	Cultivo Joven	Temp. ambiente, con luz	0,38
4	Cultivo Envejecido	Refrigerado 4°C, sin luz	0,16
4	Cultivo Envejecido	Temp. ambiente, con luz	---

Tabla 5.10: Resultados (QY) sobre CB microencapsuladas concentradas en esferas de alginato con 2 semanas de conservación.

Lote	Edad de cultivo de procedencia	Condiciones de almacenamiento	Rendimiento (QY)
3	Cultivo Joven	Refrigerado 4°C, sin luz	0,01
3	Cultivo Joven	Temp. ambiente, con luz	0,31
4	Cultivo Envejecido	Refrigerado 4°C, sin luz	0,05
4	Cultivo Envejecido	Temp. ambiente, con luz	---

No fue posible obtener mediciones del rendimiento cuántico para las muestras de cianobacterias microencapsuladas presentadas en las tablas 5.9 y 5.10. El fluorómetro utilizado no generó resultados para varias de las muestras, ya que estas mostraban irregularidades, tales como esferas rotas y desprendimiento de líquido azul con presencia de ficocianina

5.3.2. Medición de absorbancia en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.

En esta sección se presentan los resultados de absorbancia a 550 nm medidos cada semana en muestras extraídas de los cultivos de CB inoculados con el formulado microencapsulado acordes a los lotes 1 y 2 con concentración de 0,468 g/L.

Tabla 5.11: Resultados de absorbancia medidos en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.

	Cultivo joven, Refr	Cultivo Joven, T° amb	Cultivo envejecido, Refr	Cultivo Envejecido, T° amb
Día 7	0,0709	0,0234	0,143	0,0923
Día 14	0,07	0,0889	0,324	0,179
Día 21	0,279	0,355	0,529	0,227

En la figura 5.10 se presentan las diferencias de absorbancia medida en diferentes periodos de tiempo de cada uno de los matraces inoculados. Se logra apreciar una mayor absorbancia en los 3 periodos medidos del cultivo inoculado con la biomasa extraída de las esferas microencapsuladas a partir de cultivo envejecido y refrigerado

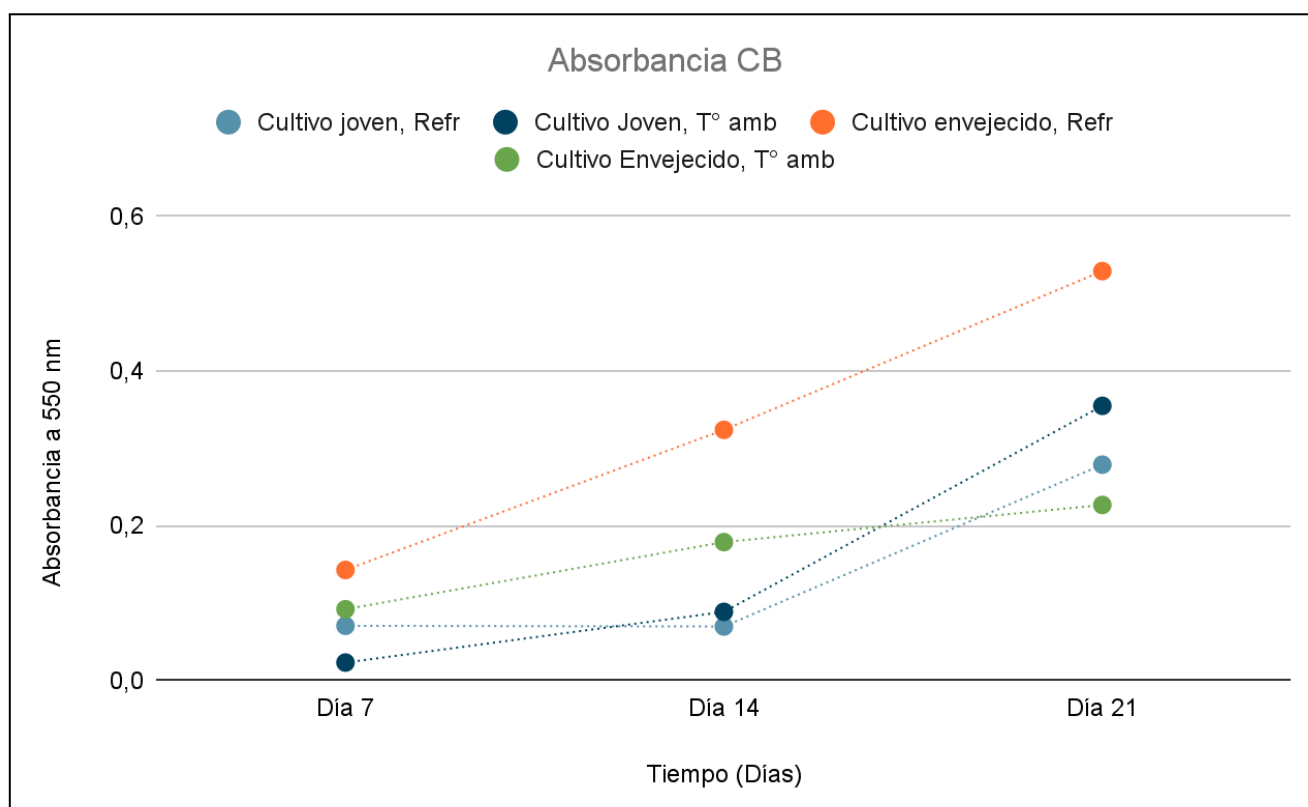


Figura 5.10: Gráfico comparativo de absorbancia medidos en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.

5.3.3. Medición de rendimiento cuántico (QY) en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.

En este apartado se presentan los resultados de rendimiento cuántico medidos de forma paralela a la absorbancia en muestras extraídas de los cultivos de CB inoculados con el formulado microencapsulado acordes a los lotes 1 y 2 con concentración de 0,468 g/L.

Tabla 5.12: Resultados de QY medidos en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.

	Cultivo joven, Refr	Cultivo Joven, T° amb	Cultivo envejecido, Refr	Cultivo Envejecido, T° amb
Día 7	0,5	0,32	0,3	0,57
Día 14	0,55	0,6	0,38	0,64
Día 21	0,44	0,43	0,38	0,58

En la figura 5.11 se observa las diferencias del rendimiento cuántico de los cultivos evaluados en diferentes periodos de tiempo, se logra apreciar que la mayoría de los cultivos alcanzan su valor máximo de QY en la semana 2 y logran estabilizarse posteriormente logrando acotar sus diferencias.

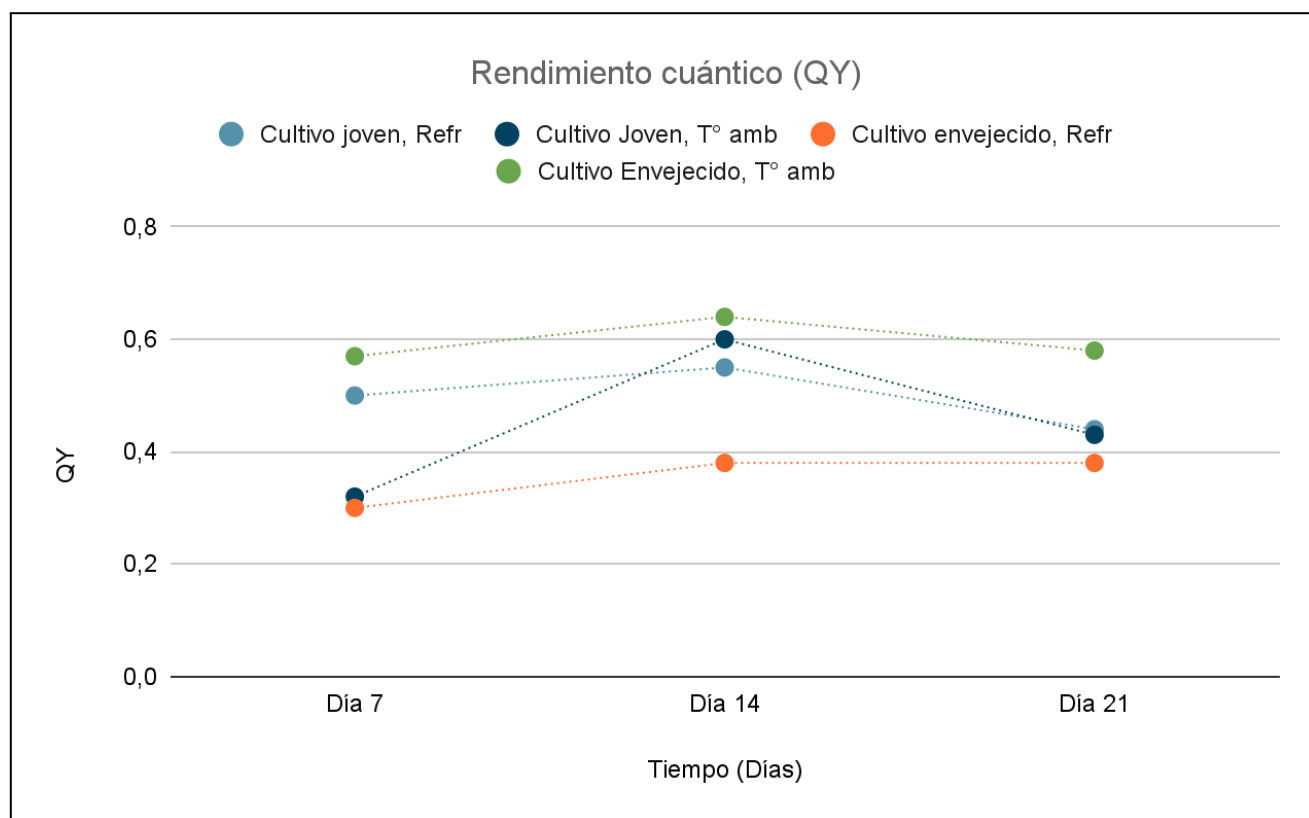


Figura 5.11: Gráfico comparativo de QY medidos en cultivos inoculados con el formulado microencapsulado.

6. DISCUSIÓN

Cultivos de *Anabaena cylindrica*

Los cultivos de *Anabaena cylindrica* que se llevaron a cabo en botellas de 1 L y en fotobiorreactores de 7 L, lograron concentraciones de biomasa variadas que oscilan entre 0,65 g/L y 2.41 g/L, dependiendo del sistema y la edad del cultivo en un periodo determinado; generando una biomasa adecuada para realizar los experimentos de formación de acinetos y microencapsulación, además se mostró una buena adaptación al medio de cultivo Allen-Arnold modificado en las condiciones de cultivo establecidas.

Los fotobiorreactores de 7 L presentaron ventajas sobre las botellas de 1 L al proporcionar un mayor volumen que trae consigo, una mayor cantidad de biomasa total, además los resultados reflejan que, los cultivos más envejecidos tendieron a generar concentraciones de biomasa más altas, sin embargo los cultivos jóvenes también proporcionaron cantidades adecuadas para su uso en las experiencias de microencapsulación y formación de acinetos.

Estrategias de formación de acinetos

En el experimento de cambio de calidad lumínica, las cianobacterias fueron sometidas a luz roja de 620 nm, con irradiancia baja y un fotoperiodo de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad. Durante las primeras etapas de la experiencia, las estructuras filamentosas mostraron una notable aglomeración, la cual logró estabilizarse como indica el segundo muestreo (2 semanas posterior a incubación), tal como se observa en la Figura 5.3. Sin embargo, aunque se mantuvo la estructura filamentosa y se observaron heterocistos, no se logró la diferenciación en acinetos, lo cual indica que la luz roja, a pesar de ser un factor de estrés, no fue suficiente para inducir esta diferenciación celular en las condiciones experimentales.

En cuanto a la estrategia de limitación de hierro como nutriente en el medio de cultivo, los resultados muestran que las diferentes concentraciones de Fe-EDTA (0%, 25%, 50%, y 75%) fueron totalmente indiferentes para inducir la formación de acinetos en cultivos de *Anabaena cylindrica*. Las observaciones microscópicas expuestas en las figuras 5.4 y 5.5 revelaron una estructura filamentosa consistente y una baja presencia de heterocistos, sin formación de acinetos en ninguna de las concentraciones de hierro evaluadas. Esto sugiere que la reducción de hierro en el medio de cultivo, si bien pudo influir en la fisiología general de la cepa, ya sea acortando las estructuras filamentosas y no actuó como un factor desencadenante para la formación de acinetos en las condiciones establecidas.

Microencapsulación de CB en esferas de alginato

Condición de almacenamiento:

La microencapsulación con alginato mostró variaciones notables en la estabilidad y apariencia de las esferas bajo diferentes condiciones de almacenamiento. En general las muestras almacenadas a temperatura ambiente y expuestas a luz blanca, se observaron grandes diferencias tonales entre las esferas de cada lote, lo que indica una retención irregular de pigmentos, también se identificaron signos de deshidratación (presencia de líquido en la botella de conservación), ruptura y reducción en el tamaño

de las esferas. Esto indica que la exposición a luz y calor podría comprometer la integridad estructural del alginato, limitando su efectividad en la conservación de las cianobacterias.

Por otro lado, en las muestras conservadas a 4°C y en oscuridad, se observó un color verde más tenue y homogéneo, lo que sugiere una menor actividad metabólica, dado que estas temperaturas reducen las tasas de respiración y fotosíntesis de las cianobacterias (Barros, P. V., 2022), favoreciendo además una mejor preservación estructural de las esferas de alginato.

Concentración de CB microencapsuladas:

Las esferas con menor concentración (0,468 g/L) mostraron mayor estabilidad estructural, presentando una apariencia más homogénea y sin signos significativos de ruptura o deshidratación, en comparación con aquellas de mayor concentración (1,499 g/L) que evidenciaron una mayor tendencia a la desintegración y a la liberación de líquido, lo que indica que una concentración más elevada de biomasa podría ejercer presión sobre la matriz de alginato, afectando su integridad.

Se han observado resultados similares en otros estudios, donde la concentración de microorganismos en perlas de alginato afecta la estabilidad y funcionalidad. Por ejemplo, En el estudio de Zommere y Nikolajeva (2017), se utilizó una concentración de 0,5 g/L para la microencapsulación de asociaciones bacterianas, logrando una buena retención y estabilidad, aplicados a bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, no obstante, concentraciones cercanas a 1,58 g/L han demostrado ser efectivas para encapsular probióticos, optimizando su rendimiento en condiciones in vitro (Rojas et al., 2023), sin embargo, en otro estudio orientado al tratamiento de aguas residuales, se experimentó con una concentración de 3,46 g/L de *Bacillus subtilis*, logrando una efectiva inmovilización en una matriz de alginato y quitosano. A pesar de esto, la elevada densidad de biomasa presentó desafíos relacionados con la estabilidad estructural de las perlas y su funcionalidad (Guo et al., 2021).

En el caso de este estudio, las concentraciones cercanas a 0,468 g/L podrían representar un equilibrio óptimo entre la viabilidad de las cianobacterias y la resistencia estructural de la matriz de alginato.

Edad de cultivo de procedencia:

En cuanto a la edad del cultivo de procedencia, no se observaron diferencias significativas en el resultado de la microencapsulación entre cultivos jóvenes y envejecidos, salvo en el caso de las esferas con mayor concentración de biomasa, ya que en estas, las esferas provenientes de cultivos envejecidos mostraron una tendencia a condiciones menos óptimas, con signos de desintegración y pérdida de integridad estructural, como se evidencia en la figura 5.9.

Pruebas de viabilidad del formulado

Rendimiento cuántico medido en CB microencapsuladas:

Los valores de rendimiento cuántico de los lotes 1 y 2 acordes a una concentración de 0,468 g/L se mantuvieron relativamente estables entre 0,30 y 0,49 en ambos periodos de medición sin embargo la medición para los lotes 3 y 4 a una concentración de 1,499 g/L fue bastante irregular, con valores muy bajos y en algunos casos sin resultados debido a las condiciones que presentaban estas esferas como se exponen en el punto anterior.

Valores esperados de rendimiento cuántico en un rango amplio son entre 0,30 a 0,45 (Barminski et al., 2016) por lo que se puede afirmar que los valores obtenidos en los lotes 1 y 2 se acercan a este rango, en cambio el lote 3 y 4 están por fuera de dicho rango, es por estos motivos (además de su inspección visual) que estos últimos no fueron inoculados para seguir monitoreando su viabilidad en matraces.

Rendimiento cuántico medidos en cultivos inoculados con el formulado:

En la figura 5.11 se observa un aumento en el rendimiento cuántico (QY) durante la segunda semana en todos los cultivos, en especial aquellos mantenidos a temperatura ambiente, que alcanzan sus valores máximos de QY en esta semana, aunque presentan una disminución en la tercera. En cambio, los cultivos refrigerados muestran una menor variaciones en el QY a lo largo del tiempo, manteniéndose más estables y dentro del rango aceptable que aquellos a temperatura ambiente.

Absorbancia medida en cultivos inoculados con el formulado

Los valores de absorbancia a 550 nm muestran que, en general, los cultivos inoculados con esferas de alginato lograron buenos resultados (ver figura 5.10) en términos de crecimiento y viabilidad. Todos los cultivos presentaron un aumento en absorbancia, reflejando su capacidad para mantenerse activos en condiciones variadas.

7. CONCLUSIONES

El estudio evaluó distintas estrategias de estabilización para desarrollar un biofertilizante a base de la cianobacteria *Anabaena cylindrica*, incluyendo la formación de acinetos y la microencapsulación en esferas de alginato de sodio. La formación de acinetos que fue inicialmente propuesta como método de estabilización, no mostró resultados efectivos, pues los intentos de inducir su desarrollo a través de la modificación de la calidad de luz y la limitación de hierro como nutriente no produjeron las estructuras de resistencia esperadas en las condiciones experimentales.

A través de la microencapsulación, se establecieron parámetros específicos para la formulación del biofertilizante, destacando que las esferas de alginato conservan mejor su integridad y estabilidad bajo condiciones de almacenamiento en refrigeración a 4 °C y oscuridad. Este método de conservación minimizó la deshidratación y la pérdida de pigmentos, que es fundamental para mantener la viabilidad de las cianobacterias a largo plazo. Además, se observó que las esferas con una concentración menor de biomasa (0,468 g/L) mantenían una viabilidad y actividad fotosintética más estables que aquellas con mayores concentraciones, sugiriendo que una menor cantidad de biomasa encapsulada favorece la estabilidad estructural y funcional del biofertilizante durante su almacenamiento.

Estos resultados dejan en evidencia que la microencapsulación en alginato es una técnica prometedora para la estabilización de cianobacterias en formulaciones de biofertilizantes, facilitando así su uso en la recuperación de suelos degradados ofreciendo una solución sostenible a los problemas de degradación de suelos.

8. REFERENCIAS

- Allen, M. B., & Arnon, D. I. (1955). Estudios sobre algas azul verdosas fijadoras de nitrógeno. I. Crecimiento y fijación de nitrógeno por *Anabaena cylindrica* Lemm. *Fisiología Vegetal*, 30(4), 366.
- Alloush, G. A., Zeto, S. K., & Clark, N. (2000). Phosphorus source, organic matter, and arbuscular mycorrhizal effects on growth and mineral acquisition of chickpea grown in acidic soil. *Journal of Plant Nutrition*, 23(9), 1351-1369. <https://doi.org/10.1080/01904160009382105>
- Armenta Bojórquez, A. D., García Gutiérrez, C., Camacho Báez, J. R., Apodaca Sánchez, M. Á., Montoya, L. G., & Nava Pérez, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46112896007.pdf>
- Barbotin, J. N. (1994). Immobilization of recombinant bacteria: A strategy to improve plasmid stability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 721(1), 303-309. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb47403.x>
- Barminski, R., Storteboom, H., & Davis, J. G. (2016). Development and evaluation of an organically certifiable growth medium for cultivation of cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 28, 2623–2630. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0819-2>
- Barros, P. V. (2022). Efecto de la temperatura sobre la actividad transcripcional y metabolismo energético de la cianobacteria termal *Fischerella thermalis* (Master's thesis, Pontificia Universidad Católica de Chile). <https://doi.org/10.7764/tesisUC/BIO/64401>
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1225-1228.
- Chica Toro, F. J., Londoño Benítez, L. M., & Álvarez Herrera, M. I. (2006). La zeolita en la mitigación ambiental. *Revista Lasallista de Investigación*, 3(2), 53-59. <https://www.redalyc.org/pdf/695/69530106.pdf>
- De la Noüe, J., & Proulx, D. (1988). Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 292-297.
- Garg, R., & Maldener, I. (2021). The dual role of the glycolipid envelope in different cell types of the multicellular cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Frontiers in Microbiology*, 12, 645028.
- Guo, J., Chen, C., Chen, W., Jiang, J., Chen, B., & Zheng, F. (2021). Effective immobilization of *Bacillus subtilis* in chitosan-sodium alginate composite carrier for ammonia removal from anaerobically digested swine wastewater. *Chemosphere*, 284, 131266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131266>
- Hernández Mendoza, J. L., Hinojosa López, P. L., Salazar Bravo, Á., García Olivares, J. G., Rodríguez Castillejos, G. C., & Quiroz Velásquez, J. D. C. (2018). The conservation of the agricultural use bacteria *Azospirillum Brasilense* by microencapsulation. *Revista Boliviana de Química*, 35(4), 117-122.

- Hertzberg, S., & Jensen, A. (1989). Studies of Alginate-immobilized Marine Microalgae. *Botanica Marina*, 32(4), 267-274. <https://doi.org/10.1515/botm.1989.32.4.267>
- Hori, K., Okamoto, J., Tanji, Y., & Unno, H. (2003). Formation, sedimentation and germination properties of *Anabaena* akinetes. *Biochemical Engineering Journal*, 14(1), 67-73. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00136-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00136-5)
- Innok, S., Chunleuchanon, S., Boonkerd, N., & Teaumroong, N. (2009). Cyanobacterial akinete induction and its application as biofertilizer for rice cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 21(6), 737-744. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9409-x>
- Irisarri, P., Gonnet, S., Deambrosi, E., & Monza, J. (1999). Diversidad de cianobacterias con heterocistos en suelos cultivados con arroz. *Ciencia del Suelo*, 17(1), 15-22. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/6649/1/Agrociencia-1999-v.31-p.31-37-E.Deambrosi.pdf>
- Joshi, H., Shourie, A., & Singh, A. (2020). Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. In *Advances in Cyanobacterial Biology* (pp. 385-396). Academic Press.
- Khadatare, S., & Suryawanshi, D. S. (2016). Isolation blue green algae from maize fields of Mohol Tahasil in Solapur. *International Journal of Science and Research*, 5(6), 1597-1599. <https://www.ijsr.net/archive/v5i6/NOV164599.pdf>
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., & Miller, T. D. (1980). Effects of Rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70, 1078-1082. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n11_1078.pdf
- Lal, R., De Vleeschauer, D., & Malafa Naganje, R. (1989). Changes in properties of a newly cleared tropical Alfisol as affected by mulching. *Soil Science Society of America Journal*, 44, 827-833.
- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86, 1-25. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e>
- Fouz, M. L. (2016). Degradación de limonina por células de *Rhodococcus fascians* inmovilizadas por atrapamiento en criogel de alcohol polivinílico y perlas huecas de alginato de calcio: aplicación en zumos (Doctoral dissertation, Universidad de Burgos).
- Maldener, I., & Summers, M. L. (2014). Cellular differentiation in filamentous cyanobacteria. In E. Flores & A. Herrero (Eds.), *The Cell Biology of Cyanobacteria* (pp. 263-291). Caister Academic Press.
- Manjunath, M., Prasanna, R., Nain, L., Dureja, P., Singh, R., Kumar, A., Jaggi, S., & Kaushik, B. D. (2010). Biocontrol potential of cyanobacterial metabolites against damping off disease caused by *Pythium aphanidermatum* in solanaceous vegetables. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(7), 666-677.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 1-20. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221548>

- Meeks, J. C., Campbell, E. L., Summers, M. L., & Wong, F. C. (2002). Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Archives of Microbiology*, 178(6), 395-403.
- Morales, I., & de la Rosa, F. F. (1992). Hydrogen peroxide photoproduction by immobilized cells of the blue-green alga *Anabaena variabilis*: a way to solar energy conversion. *Solar Energy*, 49(1), 41-46. [https://doi.org/10.1016/0038-092X\(92\)90125-T](https://doi.org/10.1016/0038-092X(92)90125-T)
- Ördög, V., Stirk, W. A., Takács, G., Pöthe, P., Illés, A., Bojtor, C., Széles, A., Tóth, B., van Staden, J., & Nagy, J. (2021). Plant biostimulating effects of the cyanobacterium *Nostoc piscinale* on maize (*Zea mays* L.) in field experiments. *South African Journal of Botany*, 140, 153–160.
- Rana, A., Joshi, M., Prasanna, R., Shivay, Y. S., & Nain, L. (2012). Biofortification of wheat through inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *European Journal of Soil Biology*, 50, 118–126.
- Rojas-Muñoz, Y. V., Santagapita, P. R., & Quintanilla-Carvajal, M. X. (2023). Probiotic Encapsulation: Bead Design Improves Bacterial Performance during In Vitro Digestion. *Polymers*, 15(21), 4296. <https://doi.org/10.3390/polym15214296>
- Romo, S., & Bécares, E. (1992). Preservation of filamentous cyanobacteria cultures (*Pseudanabaena galeata*) Böcher and *Geitlerinema amphibium* (Ag. ex Gom.) Anagn. under low temperatures. *Journal of Microbiological Methods*, 16(2), 85-89. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(92\)90028-3](https://doi.org/10.1016/0167-7012(92)90028-3)
- Romo, S., & Pérez-Martínez, C. (1997). The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. *Journal of Phycology*, 33(6), 1073-1076.
- Rossi, F., Li, H., Liu, Y., & de Philippis, R. (2017). Cyanobacterial inoculation (cyanobacterisation): Perspectives for the development of a standardized multifunctional technology for soil fertilization and desertification reversal. *Earth-Science Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.05.006>
- Sahu, D., Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Cyanobacteria as potential biofertilizer. *CIBTech Journal of Microbiology*, 1(2-3), 20-26. <https://www.cibtech.org/J-Microbiology/PUBLICATIONS/2012/Vol-1-No-2-3/04-008...Biswajit...Cyanobacteria...Biofertilizer.pdf>
- Sintra, T. E., Bagagem, S. S., Ahsaie, F. G., Fernandes, A., Martins, M., Macário, I. P. E., Pereira, J. L., Gonçalves, F. J. M., Pazuki, G., Coutinho, J. A. P., & Ventura, S. P. M. (2022). Sequential recovery of C-phycoyanin and chlorophylls from *Anabaena cylindrica*. *Bioresource Technology*, 348, 126767. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126767>
- Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., & Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 7, 529. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00529>
- Swarnalakshmi, K., Dhar, D. W., Senthilkumar, M., & Singh, P. K. (2013). Comparative performance of cyanobacterial strains on soil fertility and plant growth parameters in rice. *Vegetos*, 26, 227-236. doi: [10.5958/j.2229-4473.26.2.079](https://doi.org/10.5958/j.2229-4473.26.2.079)

Pankaj Trivedi, Anita Pandey, Recovery of plant growth-promoting rhizobacteria from sodium alginate beads after 3 years following storage at 4 °C, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 35, Issue 3, 1 March 2008, Pages 205–209, <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0284-7>

Zommere, Ž., & Nikolajeva, V. (2017). Immobilization of bacterial association in alginate beads for bioremediation of oil-contaminated lands. *Environmental & Experimental Biology*, 15(2). DOI: 10.22364/eeb.15.09

9. ANEXOS

Tabla 9.1: Resumen de cálculo de concentración de CB en solución de alginato para lote 1

Concentración de biomasa en botella	0,65	g/L
Volumen tubos de centrifuga utilizados	45	ml
Volumen de solución de alginato	250	mL
% p/v de alginato en agua destilada	1,5	(g/100 mL)
Masa de alginato utilizada	3,75	g
Volumen de tubo	45	mL
Número de tubos real (1 centrifugación)	4	
Volumen real de caldo a centrifugar	180	mL
Concentración de CB en solución de alginato	0,468	g/l

Tabla 9.2: Resumen de cálculo de concentración de CB en solución de alginato para lote 2

Concentración de biomasa en fotobiorreactor 7 L	2,3975	g/L
<i>Concentración de biomasa diluida para experiencia (utilizando ecuación de dilución)</i>	0,65	g/L
Volumen tubos de centrifuga utilizados	45	ml
Volumen de solución de alginato	250	mL
% p/v de alginato en agua destilada	1,5	(g/100 mL)
masa de alginato utilizada	3,75	g
Volumen de tubo	45	mL
Número de tubos real (1 centrifugación)	4	
Volumen real de caldo a centrifugar	180	mL
Concentración en solución de alginato	0,468	g/l

Tabla 9.3: Resumen de cálculo de concentración de CB en solución de alginato lote 3

Concentración de biomasa en Fotobiorreactor nuevo 7L	1,19	g/L
Volumen tubos de centrifuga utilizados	45	ml
Volumen de solución de alginato	250	mL
% p/v de alginato en agua destilada	1,5	(g/100 mL)
Masa de alginato utilizada	3,75	g
Volumen de tubo	45	mL
Número de tubos real (1 centrifugación)	7	
volumen real de caldo a centrifugar	315	mL
concentración en solución de alginato	1,4994	g/l

Tabla 9.4: Resumen de cálculo de concentración de CB en solución de alginato lote 4

Concentración de biomasa en fotobiorreactor viejo	2,41	g/L
<i>Concentración de biomasa diluida para experiencia (utilizando ecuación de dilución)</i>	1,19	g/L
Volumen tubos de centrifuga utilizados	45	ml
Volumen de solución de alginato	250	mL
% p/v de alginato en agua destilada	1,5	(g/100 mL)
Masa de alginato utilizada	3,75	g
volumen de tubo	45	mL
Número de tubos real (1 centrifugación)	7	
Volumen real de caldo a centrifugar	315	mL
Concentración en solución de alginato	1,4994	g/l