

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Ambiente y Desarrollo**  
**Ingeniería en Ambiente y Desarrollo**



Proyecto Especial de Graduación  
**Evaluación del potencial de aplicación de microalgas como bioestimulante  
del cultivo de frijol común Amadeus 77 (*Phaseolus vulgaris*)**

Estudiante

Rodrigo Eduardo Mendoza Martínez

Asesores

Victoria Alejandra Cortés Matamoros, Dra.

Euro Ignacio Torres Torres, Mtr.

Honduras, agosto 2024

**Autoridades**

**SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO**

Rector

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**VICTORIA CORTÉS MATAMOROS**

Directora Departamento de Ambiente y Desarrollo

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

### **Agradecimientos**

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al personal del Programa de Investigación del Frijol (PIF) por brindarme las instalaciones necesarias para llevar a cabo el experimento de mi tesis, la capacitación sobre el manejo del cultivo del frijol, el seguimiento y el apoyo necesario para llevar a cabo de manera efectiva mi investigación. A sí mismo, quisiera agradecer al personal del Laboratorio de Suelos por brindarme la orientación necesaria acerca de la fertilización del cultivo de frijol.

## Contenido

Agradecimientos .....	3
Índice de Cuadros .....	6
Índice de Figuras .....	7
Índice de Anexos .....	8
Resumen .....	9
Abstract .....	10
Introducción .....	11
Metodología .....	14
Área de Estudio .....	14
Recolección de Muestras para Cultivos Mixtos de Microalgas.....	14
Protocolo para Establecimiento y Escalamiento de Cultivos Mixtos de Microalgas .....	16
Identificación de Especies de Microalgas .....	17
Dosificación y Aplicación de Microalgas .....	17
Recolección y Caracterización de Biol Porcino .....	18
Cálculo de Fertilizante, Dosis y Aplicación .....	19
Establecimiento del Cultivo .....	21
Producción de Biomasa y Rendimiento del Cultivo .....	24
Datos Observacionales.....	24
Diseño Experimental .....	26
Resultados y Discusión .....	28
Escalamiento de Microalgas .....	28
Identificación de Microalgas .....	29
Caracterización de Sustrato y Biol .....	30
Aspectos Relevantes Registrados Durante el Ciclo del Cultivo .....	31

	5
Producción de Biomasa y Rendimiento del Cultivo .....	32
Conclusiones .....	49
Recomendaciones .....	50
Referencias.....	51
Anexos.....	58

### Índice de Cuadros

Cuadro 1 Análisis para determinación de N y P presentes en el biol .....	18
Cuadro 2 Requerimiento de N y P del frijol .....	20
Cuadro 3 Cálculo de volumen aplicado por etapa fenológica del frijol .....	23
Cuadro 4 Etapas fenológicas del cultivo de frijol .....	25
Cuadro 5 Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos .....	26
Cuadro 6 Resultado del análisis de suelo del lote la Vega 2 y 3 .....	30
Cuadro 7 Dosis total de aplicación por macetero y cantidad de biol suministrada al suelo .....	31
Cuadro 8 Resultados del análisis estadístico de las variables de crecimiento y desarrollo del cultivo de frijol .....	33
Cuadro 9 Resultado de análisis estadístico de las variables de rendimiento .....	40

## Índice de Figuras

Figura 1 Ubicación de la laguna número 2 de la Unidad de Ganado Porcino.....	15
Figura 2 Ubicación de la zona de extracción de suelo .....	22
Figura 3 Resumen de tratamientos.....	27
Figura 4 Medición de Sólidos Suspendidos Totales (SST) en fotobiorreactores, por lotes de cultivos de microalgas .....	29
Figura 5 Resultados de biomasa seca (g/planta) y altura de tallo (cm) .....	35
Figura 6 Comparación entre peso seco de biomasa (g/planta) y longitud de raíz (m) .....	38
Figura 7 Días a floración y días a madurez fisiológica.....	39
Figura 8 Resultado de número de granos (núm/macetero) y número de vainas (núm/macetero).....	41
Figura 9 Temperaturas ambientales promedio de los meses marzo a mayo, 2024 .....	42
Figura 10 Rendimiento de las plantas de frijol .....	43
Figura 11 Recuento total de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras .....	46
Figura 12 Resultado de análisis de suelo de Fósforo y Potasio .....	47
Figura 13 Resultado de análisis de suelos de Carbono Orgánico, Materia orgánica y Nitrógeno total.....	48

### Índice de Anexos

Anexo A Laguna número 2 durante los muestreos de microalgas .....	58
Anexo B Composición del medio de cultivo BG-11 .....	59
Anexo C Centrifugación de muestras de laguna #2 .....	60
Anexo D Montaje de fotobiorreactor para el escalamiento de cultivos mixtos de microalgas .....	61
Anexo E Aplicación de microalgas en el sustrato.....	62
Anexo F Mezcla de arena lavada con sustrato.....	63
Anexo G Desinfección de maceteros con solución de cloro .....	64
Anexo H Protocolo para la caracterización de microorganismos presentes en el suelo.....	65
Anexo I Siembra de placas de Petri con medios de cultivo .....	66
Anexo J Laguna número 2 durante los muestreos preliminares y previo al cambio en la población de microalgas .....	67
Anexo K Identificación de Chlorella sp. en fotobiorreactores .....	68
Anexo L Clorosis en hojas de plantas con ausencia de fertilización. ....	69
Anexo M Presencia de mosca blanca en el cultivo .....	70
Anexo N Paraheliotropismo en las hojas de frijol debido al exceso de irradiancia .....	71
Anexo O Biomasa microalgal total aplicada según la dosis de microalgas .....	72
Anexo P Aborto de flores debido a las altas temperaturas en el invernadero.....	73
Anexo Q Vainas deformes o vacías y granos de tamaños irregulares encontrados en la cosecha .....	74
Anexo R Resultado de análisis de suelos antes y después del experimento .....	75

## Resumen

La disponibilidad y absorción de nutrientes, el desarrollo radicular, la actividad microbiana en el suelo y el manejo agronómico son esenciales para incrementar el rendimiento de los cultivos. Los bioestimulantes, como las microalgas, pueden mejorar el desarrollo y rendimiento de los cultivos al aumentar la tolerancia a factores abióticos y la salud del suelo. Este estudio evaluó el efecto bioestimulante de cultivos mixtos de microalgas en combinación con biol porcino como fertilizante orgánico, en la producción de biomasa y el rendimiento del frijol (variedad Amadeus 77) cultivado en maceteros bajo condiciones semicontroladas. Se analizó la variación en la población de hongos, levaduras y bacterias, y el contenido de nutrientes en el suelo. Se evaluaron seis tratamientos de cultivo de frijol con biol porcino, cultivos mixtos de microalgas y su combinación. Las variables medidas fueron peso seco de biomasa, longitud radicular, número de hojas, altura de tallo, días a floración y madurez fisiológica, número de granos y vainas, y rendimiento por hectárea. Los resultados indicaron que aumentar la dosis de microalgas junto con biol porcino incrementó la producción de biomasa y el rendimiento del cultivo. La aplicación de microalgas también estimuló la absorción de nitrógeno en el suelo por las plantas. Aunque los resultados no son definitivos, sugieren un potencial positivo de las microalgas como bioestimulantes, mejorando la producción de biomasa, el crecimiento radicular y el rendimiento del cultivo de frijol.

*Palabras clave:* Agricultura sostenible, bioinsumos, desarrollo radicular, rendimiento del cultivo de frijol común

### **Abstract**

Nutrient availability and uptake, root development, soil microbial activity, and agronomic management are essential for increasing crop yields. Biostimulants, such as microalgae, can improve crop development and yield by increasing tolerance to abiotic factors and soil health. This study evaluated the biostimulant effect of mixed microalgae cultures in combination with swine biol as organic fertilizer, on biomass production and yield of beans (Amadeus 77 variety) grown in pots under semi-controlled conditions. Variations in fungal, yeast and bacterial populations and soil nutrient content were analyzed. Six treatments of bean cultivation were evaluated with swine biol, mixed microalgae cultures, and their combination. The variables measured were biomass dry weight, root length, number of leaves, stem height, days to flowering and physiological maturity, number of grains and pods, and yield per hectare. The results indicated that increasing the dose of microalgae along with porcine biol increased biomass production and crop yield. The application of microalgae also stimulated nitrogen uptake in the soil by plants. Although the results are not definitive, they suggest a positive potential for microalgae as biostimulants to improve biomass production, root growth, and yield of the bean crop.

*Keywords:* Bioinputs, common bean crop yield, sustainable agriculture, root development

## Introducción

Durante la década de los cuarenta, tuvo lugar la revolución verde con el objetivo de generar altas tasas de producción agrícola mediante la intensificación del riego y el uso masivo de agroquímicos (Ceccon, 2008). A pesar de que los niveles de producción fueron incrementados, no todos los efectos fueron positivos. En las últimas décadas se ha encontrado que las prácticas agrícolas convencionales desarrolladas en aquel entonces han causado la necesidad y dependencia creciente de agroquímicos, deterioro de la salud del suelo, agotamiento y contaminación de los recursos hídricos, entre otros (Pazos-Rojas et al., 2016).

El suelo ha sido uno de los componentes claves de la agricultura más afectado debido al mal manejo, el cual, ha causado la erosión y el uso indiscriminado de agrotóxicos y fertilizantes químicos, los cuales han esterilizado al suelo, reduciendo la actividad microbiana y la fauna de este (Ceccon, 2008). La microbiota en el suelo interviene en procesos de descomposición de la materia orgánica, formación y estabilización de los agregados del suelo y constituye un reservorio lábil de nutrientes, por lo que, se considera de gran interés agronómico, ya que esta tiene el potencial de reciclar nutrientes, mejorar la nutrición de las plantas y minimizar o sustituir la aplicación de fertilizantes industriales (Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004, 2004; Sivila y Hervéz, 2001).

Una de las alternativas para el manejo de los cultivos es el uso de bioinsumos, que consisten en productos basados en compuestos y/o extractos de microorganismos vivos o plantas y que tienen la capacidad de impactar positivamente el manejo de los cultivos (Mamani y Filippone, 2018). Existen diferentes tipos de bioinsumos con efectos agronómicos distintos, entre ellos están los biofertilizantes y los bioestimulantes. Los biofertilizantes son compuestos de origen orgánico que, de forma general, contienen microorganismos que al ser aplicados al cultivo o al suelo y colonizar la rizosfera y/o el interior la planta, promueven el crecimiento al incrementar la disponibilidad de nutrientes primarios para la planta (Vessey, 2003). El biol es considerado un biofertilizante y es el producto de la descomposición anaerobia de desechos orgánicos y que es considerado una alternativa viable a los

fertilizantes químicos, debido a que es una fuente orgánica de fitorreguladores que promueven actividades fisiológicas y estimulan el desarrollo de los cultivos (Montalvo Córdova, 2020).

Por otro lado, los bioestimulantes, son bioinsumos que, a pesar de no tener un efecto de fertilización o control de plagas, tienen efectos positivos en el desarrollo, crecimiento y producción de los cultivos, principalmente debido a su alto contenido de aminoácidos y otros nutrientes (Vargas Díaz, 2019). Estos tienen un efecto positivo en la salud del suelo, debido a cambios producidos en la actividad enzimática y el incremento de la actividad microbiana, lo que, a su vez, puede aumentar la disponibilidad y absorción de nutrientes por la planta, tolerancia a estrés abiótico e incremento de la calidad de los cultivos (Du Jardin, 2015; Sible et al., 2021).

Actualmente, los extractos de macroalgas o algas marinas son ampliamente utilizadas para la formulación de bioestimulantes, debido a sus numerosos componentes tales como: macro y micronutrientes, aminoácidos, vitaminas, auxinas, entre otros, los cuales, mejoran el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Khan et al., 2009). Sin embargo, el uso extenso de macroalgas trae consigo ciertas desventajas, debido a la dificultad para estandarizar la calidad del material puesto que estas son cosechadas desde el mar, además de la propagación de la contaminación marina en diferentes partes del mundo, lo cual limita su producción (Chiaiese et al., 2018).

Es por ello por lo que, las microalgas representan una alternativa para la formulación de bioestimulantes, puesto que tiene la capacidad de crecer en ambientes adversos y su alto índice de producción de biomasa. Además, pueden cultivarse y cosecharse de forma continua, incrementan la disponibilidad de nutrientes, aumentan el crecimiento y rendimiento de nutrientes e impulsan la actividad microbiana en el suelo (Solomon et al., 2023; Vargas Díaz, 2019).

En los estudios llevados a cabo en los últimos años, se han formulado y utilizado bioestimulantes, a partir de cultivos puros de especies de microalgas, así como se han utilizado cianobacterias y consorcios de cianobacterias y microalgas, reportando múltiples efectos positivos en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos, así como, el incremento de la actividad

microbiana, carbono inorgánico, nitrógeno y carbono total (García-González y Sommerfeld, 2016; Marks et al., 2019; Mera et al., 2020; Shariatmadari et al., 2013). Por otro lado, el uso de cultivos mixtos de microalgas, en los cuales existe más de una especie de microalga, tienen la ventaja de presentar una alta productividad, puesto que mantienen el equilibrio que tenían en condiciones naturales (Trujillo, 2022). Adicionalmente, se ha comprobado que la aplicación del biol porcino en distintas variedades del cultivo de frijol, aumenta la producción de biomasa seca y el rendimiento por hectárea (Tello García, 2018).

En la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, la investigación sobre el uso de cultivos mixtos de microalgas como bioestimulantes para el cultivo de frijol es particularmente relevante para desarrollar prácticas agrícolas sostenibles, ya que pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes y la salud del suelo, incrementando la resiliencia del sistema agrícola ante condiciones adversas. Estos beneficios, pueden incrementar al combinarse con fertilizantes orgánicos como el biol. En este contexto, la presente investigación evalúa el potencial de los cultivos mixtos de microalgas como bioestimulantes para el cultivo de frijol a través de los siguientes objetivos específicos: 1) Evaluar el efecto de adición de cultivos mixtos de microalgas en combinación con biol porcino sobre el crecimiento y rendimiento del cultivo de frijol bajo condiciones semicontroladas, 2) Evaluar el efecto de la aplicación de los bioinsumos aplicados sobre la cuantificación de microorganismos en el suelo y, 3) Evaluar los efectos de los bioinsumos en la composición físico química del sustrato.

## **Metodología**

### **Área de Estudio**

La cosecha de microalgas se llevó a cabo en la laguna de oxidación número 2 de la Unidad de Ganado Porcino de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano (Figura 1), ubicada en el municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras. El análisis de las muestras obtenidas y el establecimiento de los cultivos mixtos de microalgas se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del departamento de Ambiente y Desarrollo. El establecimiento del cultivo y diseño experimental se llevó a cabo en el invernadero 2 del Programa de Investigaciones de Frijol (PIF) del departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. El trabajo experimental se desarrolló durante los meses de marzo y junio del 2024.

### **Recolección de Muestras para Cultivos Mixtos de Microalgas**

La Unidad de Ganado Porcino cuenta con un sistema de tratamiento para sus efluentes, del cual forman parte dos lagunas anaerobias conectadas en paralelo, las cuales cuentan con una profundidad de 1.2 m y un área superficial 40 × 20 m (González Martínez, 2022). Estas lagunas realizan una digestión de la materia orgánica presente mediante la acción de bacterias anaeróbicas, sin embargo, a pesar de que dichas lagunas están destinadas a operar con la ausencia de oxígeno, se observa un crecimiento atípico de microalgas sobre la superficie de esta.

**Figura 1**

*Ubicación de la laguna número 2 de la Unidad de Ganado Porcino*



Se recolectaron muestras de microalgas utilizando una varilla y una pala, extrayendo únicamente la capa superficial de microalgas en recipientes de boca ancha de 500 ml de color transparente, en los horarios de 11:00 a.m. y las 2:00 p.m., donde se espera la mayor actividad fotosintética debido a la alta irradiancia (Anexo A). Se realizaron cuatro muestreos entre los meses de marzo y abril, donde se registró una temperatura ambiente promedio de 26 °C y 0.004 mm de precipitación, según los datos provistos por la Unidad de Maquinaria y Riego. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio del Departamento de Ambiente y Desarrollo, para ser procesadas haciendo uso de un tamiz, con el fin de retirar la mayor cantidad posible de sedimentos y macroorganismos presentes. Posteriormente, durante la preparación de los fotobiorreactores, las muestras fueron almacenadas en condiciones de oscuridad y refrigeración de 4 °C, puesto que al ser expuestas a temperatura ambiente y a la luz, ocurren cambios en su metabolismo, alterando las condiciones iniciales de la muestra y el rendimiento de los fotobiorreactores (Kalinina et al., 2023).

### **Protocolo para Establecimiento y Escalamiento de Cultivos Mixtos de Microalgas**

A partir de las muestras obtenidas de la laguna, se montaron fotobiorreactores abiertos utilizando un contenedor de vidrio con capacidad de 3 galones. Se utilizó el medio de cultivo BG-11 de la marca Millipore® (Anexo B) adicionando las microalgas recolectadas como inóculo. Se estimó el volumen de los fotobiorreactores a partir de la cantidad requerida para realizar las aplicaciones en los cultivos. Cada fotobiorreactor fue operado con un volumen de 7 L, utilizando una relación de 1:10 para la adición de microalgas y medio de cultivo, es decir que por cada 10 ml de medio de cultivo disuelto se añadió 1 ml de inóculo. La dilución del medio de cultivo se realizó en agua destilada, con una relación de 1:100, es decir que por cada 100 ml de agua destilada se añadió 1 ml de medio de cultivo. Como resultado, los fotobiorreactores fueron operados utilizando 6.3 L de agua destilada y 63 ml de BG-11. Previo a la adición del inóculo, 700 ml de la muestra recolectada fue centrifugada a 1,500 rpm durante 5 min para concentrar la biomasa microalgal (Anexo C).

El periodo de mantenimiento del cultivo fue de 10 días, con un suministro de luz en fotoperiodos de 24 horas utilizando luces artificiales LED8W-BV1 de marca Rayovac® con un arreglo de 6 focos con una intensidad luminosa de 800 lm y una potencia de 8 W cada uno (Anexo D). Estos asemejan al espectro lumínico adecuado para el crecimiento de organismos fotosintéticos, el cual, se encuentra entre 600 y 700 nm (Kommareddy y Anderson, 2003). Se mantuvieron estas condiciones durante el ensayo, ya que se ha observado que incrementan el crecimiento y la producción de biomasa de las microalgas (Khalili et al., 2015; Wahidin et al., 2013). A sí mismo, el experimento se desarrolló a temperatura ambiente, registrando valores entre los 25 y 28 °C.

Se realizaron muestreos para la cuantificación de biomasa de los cultivos mixtos de microalgas en los días 1, 5 y 10 del periodo de retención. Previo al monitoreo, los reactores fueron sometidos a una mezcla mecánica para su homogenización. La cuantificación de biomasa se realizó mediante mediciones de Solidos Suspendidos Totales (SST) (Antolinez Auguello y Acosta Cruz, 2022). Los

resultados fueron reportados en mg/L y se registró el incremento o decrecimiento de SST durante el periodo de escalamiento.

### **Identificación de Especies de Microalgas**

La identificación de microalgas se realizó a partir de los fotobiorreactores, luego de concluir con el periodo de escalamiento. Esto se hizo para únicamente caracterizar aquellas especies mayoritarias que lograron adaptarse y reproducirse en el fotobiorreactor. La identificación se llevó a cabo haciendo uso del microscopio óptico y comparando las características morfológicas de las imágenes tomadas, utilizando las guías de identificación descritas por Bellinger y Sigee (2010) y Wehr et al. (2015).

Para la obtención de la mezcla de microalgas, el fotobiorreactor se mezcló con un agitador magnético, recolectando una alícuota de 1.5 ml para la separación de la fracción suspendida. Esta porción se depositó en tubos volumétricos de 2.5 ml, que fueron centrifugados a 10,800 rpm durante 5 minutos para separar los sólidos en suspensión de la muestra líquida. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se recolectó el material precipitado haciendo uso de asas de inoculación, para colocarlo sobre un portaobjetos agregando yodo de Lugol al 0.7%, para preservar la muestra y obtener la coloración necesaria para su identificación (Pearson et al., 1987). Las muestras procesadas se observaron haciendo uso del microscopio óptico con el lente de aumento a 100× agregando previamente gotas de aceite de inmersión. Este proceso se repitió en cada uno de los fotobiorreactores montados, observando tres placas por cada uno. Se tomaron fotos para identificar las especies presentes haciendo uso de guías de identificación de microalgas.

### **Dosificación y Aplicación de Microalgas**

Las dosis de microalgas seleccionadas fueron de 200 y 800 ml, las cuales estuvieron divididas en cuatro aplicaciones de 50 y 200 ml en diferentes etapas del ciclo del cultivo. Se eligieron estas dosis debido a que por lo general, en estudios similares se suele trabajar con extractos de microalgas y realizando diluciones hasta alcanzar diferentes concentraciones para realizar una aplicación foliar

(Garcia-Gonzalez y Sommerfeld, 2016; Gharib et al., 2024; Mazepa et al., 2021). Debido a que no se dispone de los medios para realizar estas concentraciones, se optó por realizar aplicaciones en volumen, tomando en cuenta también los requerimientos hídricos del cultivo para no exceder la Capacidad de Campo (CC). Asimismo, se estimó una aplicación entre 100 y 500 mg de microalgas como punto de partida para el estudio exploratorio.

La dosis total de microalgas aplicada se dividió en cuatro aplicaciones distintas que se llevaron a cabo a los 4, 20, 25 y 30 días del ciclo del cultivo de frijol. La aplicación de las microalgas se realizó en *drench*, es decir, directamente en el sustrato (Anexo E). Debido a que la aplicación de los cultivos mixtos de microalgas ocurrió en diferentes momentos y que el rendimiento de producción celular disminuye conforme pasa el tiempo, se realizaron cultivos de microalgas por lotes para cada una de las aplicaciones contempladas, montando un fotobiorreactor para cada uno, los cuales, se prepararon 10 días antes de la aplicación calendarizada, esto con el objetivo de que los cultivos de microalgas alcancen la máxima producción de biomasa al momento de realizar la aplicación.

### **Recolección y Caracterización de Biol Porcino**

Para la fertilización del cultivo, se hizo uso de un biol porcino obtenido de los efluentes del biodigestor ubicado en la granja porcina de Zamorano. Posteriormente, este se llevó al laboratorio de IAD, donde se realizó el proceso de caracterización para determinar las concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P). Los métodos de análisis se muestran en el Cuadro 1. Este aspecto es clave para realizar el cálculo de la dosis a aplicar, ya que permite conocer el aporte de nutrientes del biol porcino al cultivo.

### **Cuadro 1**

#### *Análisis para determinación de N y P presentes en el biol*

Análisis	Referencia
Nitrógeno Total: Lovibond <i>method</i> #281	4500 N. C-Persulfate method (STWW)
Fósforo Total: Lovibond <i>method</i> #318	4500 P. J-Persulfate method (STWW)

### Cálculo de Fertilizante, Dosis y Aplicación

Con los resultados obtenidos de la caracterización del biol porcino, se realizó el cálculo de fertilización, sin embargo, previo a esto, se llevó a cabo el cálculo de disponibilidad de nutrientes en el suelo. Para esto, se calculó el peso de la capa arable (Ecuación 1), el porcentaje de nitrógeno aprovechable (Ecuación 2), disponibilidad de nitrógeno en el suelo (Ecuación 3) y disponibilidad de fósforo en el suelo (Ecuación 4).

$$PCA = \rho_b (g/cm^3) \times profundidad (m) \times \text{área de 1 hectárea} (m^2) \times \text{Factor de conversión} \quad [1]$$

Donde:

PCA = Peso de la Capa Arable, en kg

Factor de conversión = 1 kg es igual a 1,000 g y 1 m<sup>3</sup> es igual a 1,000,000 cm<sup>3</sup>

$\rho_b$  = Densidad aparente, en g cm<sup>-3</sup>

$$\%NA = NT \times 0.025 \quad [2]$$

Donde:

%NA = Porcentaje de Nitrógeno aprovechable

%NT = Porcentaje de Nitrógeno total

$$DNS_{NA} = \frac{NA\% \times PCA}{100\%} \quad [3]$$

Donde:

$DNS_{NA}$  = Disponibilidad de nutrientes en el suelo (Nitrógeno aprovechable), en kg N ha<sup>-1</sup>

%NA = Porcentaje de nitrógeno aprovechable

PCA = Peso de la capa arable

$$DNS_P = \frac{P (mg/ha) \times PCA}{1,000,000 \text{ mg de suelo}} \quad [4]$$

Donde:

$DNS_p$  = Disponibilidad de nutrientes en el suelo (Fósforo), en  $kg P ha^{-1}$

P = Cantidad de fósforo en  $mg kg^{-1}$  de suelo

PCA = Peso de la capa arable en kg

Para realizar el cálculo de fertilización, se utilizó la densidad de siembra recomendada por el *Manual de Producción de Frijol* descrito por la United States Agency for International Development (2013), siendo esta de 200,000 plantas/ha y para el requerimiento nutricional o dosis de nutrientes se tomaron de referencia los valores de N y P descritos por Espinoza et al. (2019) en *el Instructivo de Manejo de Fertilización de Maíz y Frijol -4R*, los cuales se muestran en el Cuadro 2. Asimismo, estos valores se utilizan para calcular la dosis de fertilización requerida (Ecuación 5).

## Cuadro 2

### Requerimiento de N y P del frijol

Nivel de nutrientes en el suelo	Rendimiento (qq/mz)	Dosis de nutrientes requerido (kg/ha)	
		Nitrógeno	Fósforo
Pobre	50	100.6	30.5

*Nota.* Adaptado de Espinoza et al. (2019). Una manzana equivale a 0.70 ha.

$$Dosis\ de\ fertilización\ (kg/ha) = \frac{RC - DNS}{E} \times 100 \quad [5]$$

Donde:

RC = Requerimiento del cultivo, en  $kg ha^{-1}$

DNS = Disponibilidad de nutrientes en el suelo, en  $kg ha^{-1}$

%E = Porcentaje de eficiencia de fertilización

A partir de la Ecuación 6, se obtiene la cantidad de mg de nitrógeno y fósforo que tiene que ser suplido por el biol hacia la planta. Para determinar el volumen que se aplicó de biol a la planta, se utilizó la Ecuación 7.

$$Dosis\ por\ planta\ \left(\frac{mg}{planta}\right) = \frac{Dosis\ de\ fertilización\ (kg/ha)}{Densidad\ de\ siembra(plantas/ha)} \quad [6]$$

$$VA = \frac{Cc}{Cb} \times 1000 \quad [7]$$

Donde:

VA = Volumen de aplicación, en ml

Cc = Cantidad de nutriente requerida por el cultivo, en mg

Cb = Concentración de nutriente en el biol, en mg/L

La dosificación del biol porcino se dividió en diferentes aplicaciones, tomando en cuenta los días de prefloración y floración del cultivo (40 días), puesto que a partir de estas etapas comienza la extracción de todos los nutrientes (Lata-Tenesaca et al., 2017). Para saber el número de aplicaciones de biol, se dividió el total de días hasta la floración por el intervalo de aplicación (Ecuación 8). El biol porcino se aplicó en *drench*, es decir, directamente en el sustrato.

$$No. \text{ aplicaciones} = \frac{40}{3} = 13.3 \approx 14 \text{ aplicaciones} \quad [8]$$

### **Establecimiento del Cultivo**

El sustrato utilizado en el estudio se extrajo del lote 2 y 3 de la Vega (Figura 2), dado que estos lotes tienen un uso continuo para la siembra de maíz y frijol. La extracción del sustrato se realizó posterior a la etapa de cosecha y preparación del suelo, extrayendo la capa arable del suelo, es decir, entre los primeros 20 cm de profundidad.

**Figura 2**

*Ubicación de la zona de extracción de suelo*



Se utilizó el mismo suelo para llenar 60 maceteros con una capacidad de 8 lb cada uno con el fin de proveer homogeneidad al estudio. Adicionalmente, para la preparación del sustrato se realizó una mezcla con arena lavada en una carreta con una relación de 2:1, mezclando 2 libras de arena por cada libra de suelo, esto con el objetivo de brindarle al suelo la porosidad adecuada para el desarrollo radicular de los cultivos (Anexo F). Previo, al llenado de maceteros, se tomó una muestra homogenizada del sustrato para realizar una caracterización fisicoquímica en el Laboratorio de Suelos del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria.

La variedad de frijol utilizada fue Amadeus 77, debido a que ya se ha identificado una buena respuesta de esta variedad utilizando fertilización con biol porcino (Tello García, 2018). Previo, al establecimiento del cultivo, los maceteros utilizados fueron lavados con detergente para remover la presencia de materia orgánica; y posteriormente, se desinfectaron con una solución de cloro para eliminar la presencia de actividad microbiana de ensayos o cultivos anteriores, esto con el fin de evitar

algún tipo de sesgo en los análisis microbiológicos (Anexo G). Se utilizó un total de 180 semillas de frijol, las cuales, fueron sembradas directamente en los maceteros, colocando tres semillas por cada uno de estos.

### Prácticas Culturales y Mantenimiento del Cultivo

Se llevó a cabo un raleo posterior al trasplante para retirar la plántula que presentó la menor vitalidad, de tal forma que se dispuso de dos plántulas por macetero. El riego fue suministrado de forma manual, haciendo uso de una manguera, con una frecuencia de riego de dos veces al día. Se aforó el caudal de la manguera con una probeta para saber cuánto tiempo se tenía que regar cada maceta. El volumen de riego requerido se determinó a través de un cálculo de evapotranspiración del cultivo, utilizando la ecuación de Penman-Monteith (Cuadro 3). Se tomaron en cuenta los valores de Coeficiente del cultivo (Kc) dado por Espinoza Tejada et al. (2016) y Arias Restrepo et al. (2007).

### Cuadro 3

*Cálculo de volumen aplicado por etapa fenológica del frijol*

Etapa de cultivo	Kc por etapa	ETO/ día (mm)	ETC (mm)	Vol * Area (L/m <sup>2</sup> )	Área/macetero (m <sup>2</sup> )	Vol/macetero (ml/día)
Inicial	0.4	5	2	2	0.053	0.106
Desarrollo	1	5	5	5	0.053	0.265
Media	1.15	5	5.75	5.75	0.053	0.305
Final	0.35	5	1.75	1.75	0.053	0.093

*Nota.* Adaptado de Espinoza Tejada et al. (2016) y Arias Restrepo et al. (2007)

Adicionalmente, se realizó un desmalezado manual cada vez que fue necesario y se realizó un tutorio del cultivo para evitar su caída y posibles daños mecánicos. Para ello, se enterró una estaca junto al tallo y se sujetó la planta con alambres. Esta actividad fue repetida según el aumento del tamaño de la planta. A sí mismo, se tomaron medidas de temperatura dentro de la casa malla utilizando un termómetro infrarrojo modelo LX-26E de la marca ThermoFlash® entre las 12:00 m. y 2:00 p.m. y se obtuvieron los registros de temperatura ambiental de los meses de marzo a mayo del presente año.

### **Producción de Biomasa y Rendimiento del Cultivo**

Las variables analizadas fueron peso seco de la biomasa, crecimiento radicular, altura de tallo y rendimiento del cultivo. La toma de datos se llevó a cabo en dos partes, evaluando 24 muestras para la variable de peso seco de biomasa, crecimiento radicular y altura de tallo; y 24 muestras para la variable de rendimiento al concluir el ciclo del cultivo. Cuando la planta alcanzó la madurez fisiológica, se cortó el tallo en la base y colocó en bolsas de plástico rotuladas, que posteriormente se sometieron a un proceso de secado en un horno a 105 °C durante 24 horas. Al concluir el proceso de secado, se registró el peso de la biomasa utilizando una balanza analítica de la marca OHAUS®, con una precisión de 0.01 g. El mismo proceso fue repetido al finalizar el experimento, extrayendo las raíces residuales en los maceteros.

El crecimiento radicular (m) se midió al final del experimento, utilizando las raíces de las plantas destinadas para medir las variables de rendimiento. Estas fueron retiradas de los maceteros y lavadas con agua, colocándolas en bolsas plásticas rotuladas. Posteriormente, se hizo uso del equipo *Epson Scan Perfection V700*® para obtener imágenes de las raíces y analizarlas mediante el programa *WinRizho*® que proporcionó datos sobre la longitud radicular. La altura de tallo se midió utilizando las plantas extraídas para el peso seco de la biomasa, haciendo uso de una regla graduada.

El rendimiento del cultivo se midió al finalizar el ciclo del cultivo, registrando las variables de: Rendimiento por hectárea (kg/ha), número de vainas (vainas/planta) y número de granos por planta (granos/planta). Las vainas fueron cosechadas en bolsas para contar el número de vainas por planta. Posteriormente, se retiraron y cuantificaron los granos de las vainas pertenecientes a cada planta, colocando estos en bandejas para ser secados a 105 °C en un horno durante 24 horas. Los granos obtenidos fueron pesados en una balanza OHAUS® con una precisión de 0.01 g.

### **Datos Observacionales**

Para evaluar el efecto de los tratamientos en el comportamiento y crecimiento del cultivo de frijol, se llevó un registro de los días a floración y días a madurez fisiológica. La floración se consideró

cuando la planta presentó la primera flor abierta, en el caso de la etapa de madurez fisiológica, esta se tomó cuando la primera vaina de la planta comenzó su decoloración y secado; y en el caso de la cosecha, esta se llevó a cabo cuando las plantas perdieron todas sus hojas, las vainas perdieron su pigmentación y los granos redujeron su humedad (J. C. Rosas, 2003). Se utilizó de referencia las etapas de desarrollo del cultivo de frijol mostrados en el Cuadro 6, según la *Guía Técnica del Cultivo de Frijol* (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2009).

#### **Cuadro 4**

##### *Etapas fenológicas del cultivo de frijol*

Fase	Etapas	Código	Días
Vegetativa	Germinación	V0	0-5
	Emergencia	V1	5-7
	Hojas primarias	V2	7-11
	1° hoja trifoliada	V3	11-16
	2° hoja trifoliada	V4	16-23
Reproductiva	Prefloración	R5	23-32
	Floración	R6	32-36
	Formación de vainas	R7	36-44
	Llenado de vainas	R8	44-62
	Maduración	R9	62-77

*Nota: De la Guía Técnica del Cultivo de Frijol (IICA, 2009)*

#### **Caracterización Físicoquímica y Microbiológica del Sustrato**

Adicionalmente, se tomó una segunda muestra para llevar a cabo una caracterización microbiológica del sustrato antes y después del experimento para comprobar los efectos de los tratamientos en la cuantificación microbiana del suelo (Anexo H). La cuantificación de microorganismos se realizó mediante la siembra en placas de Petri con medios de cultivos (Anexo I). Los parámetros físicoquímicos y microbiológicos del suelo que se caracterizaron están descritos en el Cuadro 5, los cuales consistieron principalmente en los macronutrientes y la fracción orgánica del suelo y la cuantificación de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levadura.

## Cuadro 5

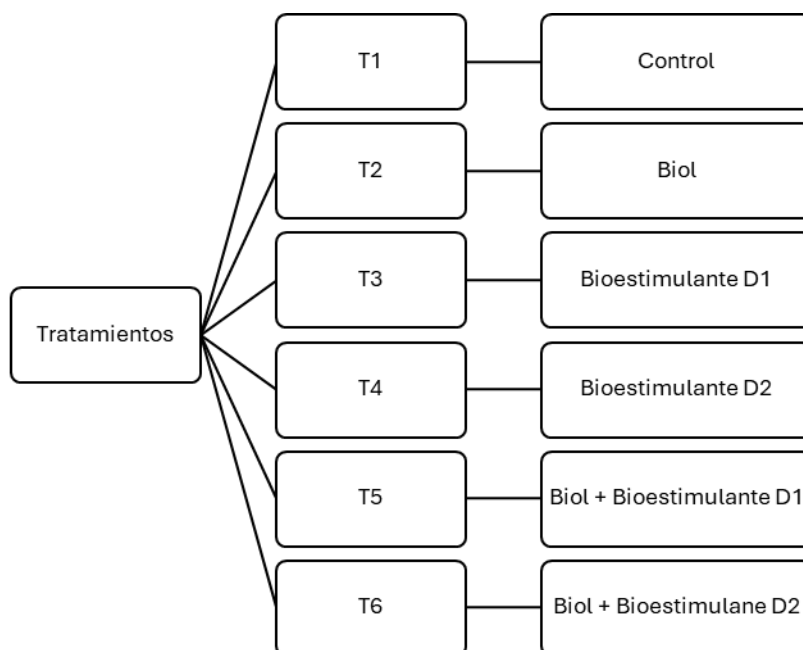
### *Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos*

Parámetro	Metodología	Referencia
pH	Multiparámetro	(Carter y Gregorich, 2008)
Carbono Orgánico (C.O)	Walkley y Black	(Carter y Gregorich, 2008)
Materia Orgánica (M.O)	Walkley y Black	(Carter y Gregorich, 2008)
Nitrógeno total (N)	Kjeldahl	(Carter y Gregorich, 2008)
Fósforo (P)	Método de Olsen	(Carter y Gregorich, 2008)
Potasio (K)	Mellich 3	(Carter y Gregorich, 2008)
Recuento total de hongos y levaduras	Conteo de UFC	(Carter y Gregorich, 2008)
Recuento total de bacterias aerobias mesófilas	Conteo de UFC	(Carter y Gregorich, 2008)

*Nota.* Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

## Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo 10 × 4. Considerando que cada macetero con dos plantas de frijol representa una unidad experimental, se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento, los cuales, son la aplicación del biol, la aplicación del bioestimulante, la combinación de ambos y un control negativo al que no se le añadió ningún tipo de fertilización. En total, se contaron con 24 unidades experimentales. Se trabajó con dos dosificaciones de bioestimulante D1 (100 ml) y D2 (200 ml). Los tratamientos contemplados fueron T1 (Control), T2 (Biol), T3 (Microalgas D1), T4 (Microalgas D2), T5 (Biol + Microalgas D1) y T6 (Biol + Microalgas D2), los cuales, se resumen en la Figura 3. Esta investigación, tuvo un diseño experimental puro, puesto que, se realizó la asignación aleatoria de los tratamientos, se controlaron múltiples variables independientes y se utilizó un grupo control para determinar el efecto del bioestimulante y biofertilizante en los parámetros de crecimiento, rendimiento y cuantificación microbiana en el suelo.

**Figura 3***Resumen de tratamientos*

Con el fin de observar el potencial de bioestimulación de las microalgas, el análisis estadístico se llevó a cabo a partir de los datos obtenidos de las variables de peso seco de biomasa, longitud de raíz, número de hojas, altura de tallo, número de vainas, número de granos y rendimiento. Una vez realizada la recolección de datos, se realizó una prueba de normalidad *Shapiro-Wilk* y un análisis de los residuales estandarizados y residuales predichos utilizando un gráfico Q-Q para verificar la distribución normal y homogeneidad de los datos. A partir de esto se realizó un análisis de variancia no paramétrico aplicando la prueba de *Kruskal Wallis*, estableciendo el nivel de confianza de  $p < 0.05$ . Posteriormente, se comprobó la significancia de las diferencias entre los tratamientos a través de la separación de medias de rango múltiple de Duncan haciendo uso del programa InfoStat®.

Las variables de días a floración, días a madurez fisiológica, caracterización microbiológica y fisicoquímica del sustrato, fueron analizadas de forma descriptiva, observando tendencias y diferencias en los resultados obtenidos para cada tratamiento.

## Resultados y Discusión

### Escalamiento de Microalgas

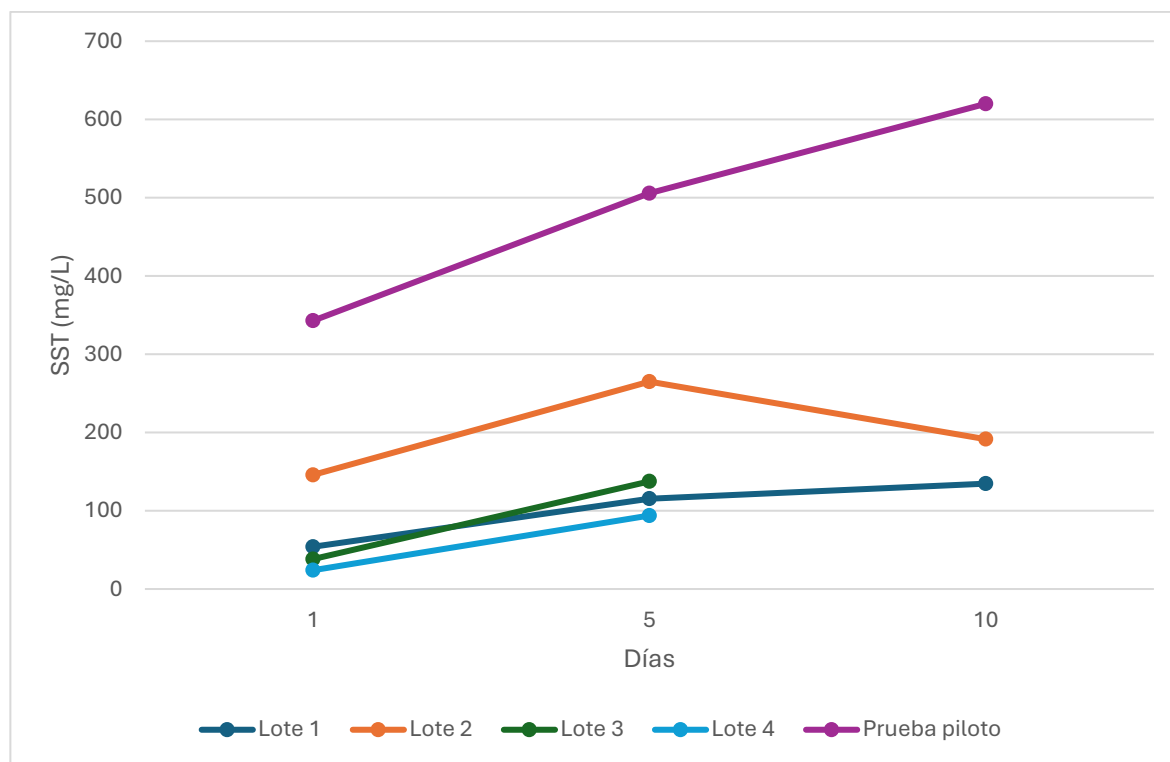
A partir de las mediciones de SST realizadas en los diferentes días del proceso de escalamiento de microalgas, se observó un incremento en los valores de SST (mg/L), por lo que, se puede afirmar que se registró un incremento en la biomasa microalgal, alcanzándose concentraciones en un rango de 90 mg/L a 265 mg/L (Figura 4). Sin embargo, en comparación a las pruebas iniciales donde se alcanzaron concentraciones superiores a los 500 mg/L, la concentración de microalgas fue menor en los lotes aplicados al cultivo. Esto se debe a la reducción de biomasa microalgal en el inóculo causada por cambios en las condiciones ambientales, las cuales a su vez alteraron la población y concentración de microalgas presentes en la laguna número 2 (Anexo J). Adicionalmente, debido a que en los dos primeros lotes se observó una disminución de SST después de cinco días de cultivo, para el lote 3 y 4 el periodo de retención se redujo a 5 días, realizando la aplicación de microalgas en el cultivo después de los 5 días del periodo de escalamiento.

Las concentraciones de microalgas pueden afectar las dosis y el volumen aplicado a cada tratamiento. En este caso las concentraciones alcanzadas no coinciden con las concentraciones utilizadas en otros experimentos, tales como el de Mazepa et al. (2021), donde se utilizaron soluciones de biomasa microalgal con concentraciones entre 200 mg/L a 1,000 mg/L.

Adicionalmente, también es importante tomar en cuenta otros factores que pudieron limitar el incremento de la biomasa microalgal durante los periodos de cultivo, siendo uno de los principales el suministro constante de CO<sub>2</sub>, el cual, es utilizado como una fuente de carbono inorgánico ya que es la forma más biodisponible para las microalgas y se vuelve un factor limitante para su producción puesto que el carbono representa alrededor del 50% de la biomasa seca de las microalgas (Beltrán-Rocha et al., 2017).

**Figura 4**

Medición de Sólidos Suspendedos Totales (SST) en fotobiorreactores, por lotes de cultivos de microalgas



### Identificación de Microalgas

Durante el proceso de identificación se observaron diferentes especies de microalgas presentes en cada uno de los fotobiorreactores, sin embargo, el género *Chlorella sp.* fue el predominante (Anexo K). Esto podría explicarse debido a que dicho género posee una elevada tolerancia y resiliencia, lo cual, le permite habitar en la laguna número 2 que posee una alta concentración de nutrientes y condiciones limitantes (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). Este género, también posee la capacidad de colonizar la superficie del suelo e incluso, para evitar la desecación y congelamiento, pueden penetrar algunos centímetros en el suelo y desempeñar varias funciones ecológicas como ayudar a la retención de humedad, germinación de semillas y dinámicas de nutrientes (Wehr et al., 2015).

### Caracterización de Sustrato y Biol

El resultado del análisis del sustrato se muestra en el Cuadro 6. En este se observa que el sustrato utilizado cuenta con 0.1% de N, lo cual, nos indica una deficiencia de dicho nutriente. Por otro lado, el contenido de fósforo (P) se encuentra en un rango medio. A sí mismo, se observa que el contenido de carbono orgánico (C.O.) y materia orgánica (M.O.) es bajo según los rangos medios establecidos por el Laboratorio de Suelos de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Por otro lado, el contenido de calcio (Ca) y potasio (K) es alto, a diferencia del contenido de magnesio (Mg) y sodio (Na), los cuales, están dentro del rango medio.

#### Cuadro 6

*Resultado del análisis de suelo del lote la Vega 2 y 3*

Sustrato	pH	(%)			Saturación de bases (%)				mg kg <sup>-1</sup>	
		C.O.	M.O.	N <sub>total</sub>	Ca	Mg	K	Na	P	
Suelo lote Vega 2 y 3	5.52	1.14	1.97	0.1	70.73	12.53	16.27	0.48	26	
Rango medio establecido por el laboratorio		1.2	2	0.1	55	15	3	<5	13	
		2.3	4	0.2	70	20	5		30	

Los resultados de la caracterización del biol mostraron que este contiene 505 ppm de N y 50 ppm de P. Un estudio realizado por Tello García (2018), quien evaluó el rendimiento de dos variedades de frijol utilizando diferentes dosis de biol porcino, obtuvo concentraciones de 1,300 ppm de N y 250 ppm de P en la composición del fertilizante orgánico. Dichos resultados difieren con la presente investigación debido a que las concentraciones de nutrientes varían en relación con la frecuencia de alimentación y el manejo del biodigestor.

Debido a que el nitrógeno fue identificado como el nutriente deficiente en el sustrato, el cálculo de fertilización y dosificación del biol porcino se llevó a cabo tomando en cuenta el contenido de nitrógeno presente en el sustrato de cada macetero y la cantidad de nitrógeno que tenía que aportar el biol porcino para cumplir el requerimiento nutricional del cultivo. De esta forma, se obtuvo

la dosis total de biol porcino y la dosis por aplicación, así como cantidad total de N aplicado. Los resultados de dicho cálculo se presentan en el Cuadro 7.

### **Cuadro 7**

*Dosis total de aplicación por macetero y cantidad de biol suministrada al suelo*

Dosis total (ml/macetero)	Número de aplicaciones	Dosis por aplicación (ml/aplicación)	Cantidad de N total aplicado (mg/macetero)
1,007	14	72	509

### **Aspectos Relevantes Registrados Durante el Ciclo del Cultivo**

Transcurridos 15 días posteriores a la siembra, se observó una mayor elongación de las plantas que recibían menor cantidad de luz, lo cual, se presenta como una respuesta de la planta para garantizar el éxito competitivo en condiciones de ausencia de luz (Blanco-Valdés, 2019). Así mismo, luego de 30 días del ciclo del cultivo, los tratamientos sin fertilización con biol presentaron una clorosis de las hojas y un crecimiento reducido en términos de longitud de tallo y producción de hojas, en comparación con los tratamientos con fertilización de biol porcino (Anexo L). Esto puede asociarse con la deficiencia de Nitrógeno, elemento esencial para la división celular y la síntesis de clorofila (Sepúlveda et al., 2014).

Adicionalmente, alrededor de estas fechas, se detectó una alta afectación de la plaga de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) (Anexo M). Dicha plaga puede llegar a tener efectos negativos directos en los cultivos al alimentarse de los jugos floemáticos de la planta y al ser un vector transmisor del virus del mosaico dorado en frijol (Muñoz López, 2008). Por último, durante las etapas de prefloración y floración, se observó que las plantas con mayor exposición a la luz solar presentaron un movimiento vertical de las hojas (Anexo N), lo cual es conocido como pareaheliotropismo y es una respuesta de la planta para regular la radiación incidente en sus hojas, orientándolas de forma perpendicular a los rayos del sol (Zamorano Vanegas, 2012).

A sí mismo, cabe destacar que la variedad Amadeus 77 fue desarrollada como una línea tolerante al calor, es de hábito arbustivo-indeterminado tipo II y es una variedad precoz a intermedia, cuya floración ocurre a los 36-38 días y su madurez fisiológica a los 68 - 70 días y tiene una semilla de color rojo brillante y un peso individual de 0.25 g (J. C. Rosas et al., 2004; Valentinetti, 2012). Durante el experimento, se pudo observar que la etapa de madurez fisiológica de las plantas de frijol se alcanzó un con un ligero adelanto de 8 a 10 días.

### **Producción de Biomasa y Rendimiento del Cultivo**

El análisis estadístico mostró que, existe una diferencia significativa entre los tratamientos respecto a la producción de peso seco de biomasa con un valor y número de hojas por planta con un valor  $p \leq 0.05$ , siendo los tratamientos que presentaron mejores resultados el T2 (Biol), T6 (Biol + Microalgas D2) y T5 (Biol + Microalgas D1) con un resultado de 10.67 g/planta, 10.58 g/planta y 9.71 g/planta respectivamente, los cuales, no presentaron diferencias significativas entre ellos, a comparación del T1 (Control) que presentó un peso de biomasa seco de 3.43 g/planta (Cuadro 8). Esto puede adjudicarse al cumplimiento del requerimiento de nitrógeno de la planta, gracias a la aplicación del biol porcino, debido a que el nitrógeno juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo vegetativo del frijol. Dichos resultados son comparables a los obtenidos por Tello García (2018), quien obtuvo un peso seco de biomasa promedio con y sin fertilización con biol porcino de 8.2 g/planta y 4.8 g/planta respectivamente.

**Cuadro 8**

*Resultados del análisis estadístico de las variables de crecimiento y desarrollo del cultivo de frijol*

Tratamiento	Peso seco biomasa (g/planta)		Longitud de raíz (m)		Número de hojas (Núm/planta)		Altura de Tallo (cm)	
Control	3.43	c	13.38	b	18.00	d	31.15	b
Biol	10.67	a	31.19	a	50.25	a	45.6	ab
Microalgas D1	3.51	c	18.67	b	19.25	cd	32.45	b
Microalgas D2	7.25	b	19.25	b	35.00	bc	49.1	a
Biol + Microalgas D1	9.71	a	21.25	b	55.50	a	43.2	ab
Biol + Microalgas D2	10.58	a	40.37	a	50.00	ab	45.25	ab
Valor P	0.0025		0.019		0.0035		0.0562	

*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas*

Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Coulibaly et al. (2023), en el cual, utilizaron diferentes dosis de fertilizantes químicos y orgánicos en el cultivo de frijol y encontraron que los tratamientos de fertilizantes orgánicos presentaron el mayor desarrollo vegetativo en comparación con los tratamientos con fertilizantes químicos. Sin embargo, también cabe destacar que el tratamiento T4 (Microalgas D2) presentó mayor producción de biomasa y número de hojas en comparación con los tratamientos T1 (Control) y T3 (Microalgas D1) (Figura 4). Lo cual, indica una tendencia favorable en la producción de biomasa al incrementar la dosis de microalgas aplicadas.

Esto muestra que la dosis de microalgas aplicada el tratamiento T3 (Microalgas D1), no fue suficiente para tener un impacto significativo en la planta, a diferencia del tratamiento T4 (Microalgas D2), en el cual la aplicación de microalgas si tuvo un efecto estimulante en la producción de biomasa a pesar de que la planta no contaba con la fertilización adecuada. La razón de esto puede explicarse debido que las microalgas tienen la capacidad de producir compuestos fitorreguladores, tales como las auxinas y citoquininas, las cuales, promueven la expansión y la división celular y están implicadas en procesos de dominancia apical, elongación del brote, xilogénesis, síntesis de proteínas entre otros, lo cual, resulta en un incremento de la producción de biomasa de la planta (Marschner y Marschner, 2012).

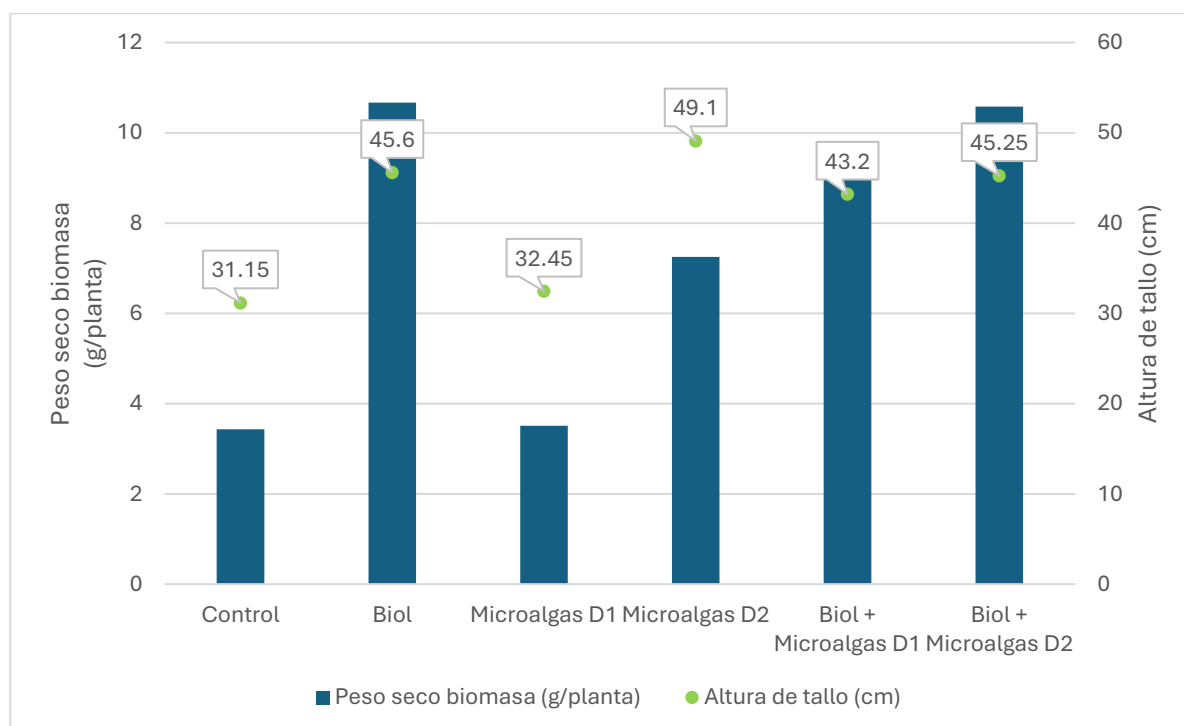
A sí mismo, se puede decir que la diferencia en las dosis de microalgas tuvo un efecto importante, puesto que, en el caso del tratamiento T3 (Microalgas D1) se aplicó un total de 28 mg de biomasa de microalgas, mientras que en el tratamiento T4 (Microalgas D2) se aplicó un total de 111 mg, teniendo una diferencia del 400% en la biomasa microalgal aplicada entre ambos tratamientos (Anexo O).

El mismo comportamiento puede observarse en la variable de altura de tallo, la cual, presentó diferencia significativa entre los tratamientos con un valor  $p \leq 0.05$ , siendo el tratamiento T1 (Control) y T3 (Microalgas D1) los que presentaron la menor altura de tallo siendo 31.15 cm y 32.45 cm respectivamente. Los tratamientos T2 (Biol), T4 (Microalgas D2), T5 (Biol + Microalgas D1) y T6 (Microalgas D2) no presentaron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, de forma descriptiva, pudo observarse que el tratamiento T4 (Microalgas D2) presentó la mayor altura de tallo de 49.1 cm en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 8). Estos resultados se alinean con la investigación realizada por Gitau et al. (2021), la cual consistió en la aplicación de dos especies de *Chlorella* y una cepa de *Chlamydomonas reinhardtii* en plantas de *Medicago truncatula*, perteneciente a la familia de las leguminosas, y se observó que la aplicación de estas microalgas incrementó la altura de los tallos y la producción de biomasa total.

Todos los tratamientos que tuvieron fertilización con biol porcino presentaron la mayor producción de biomasa. Por otro lado, los resultados del control son comparables con el tratamiento con la dosis más baja de microalgas, sin embargo, al incrementar la dosis, la producción de biomasa aumentó aún en ausencia de biol porcino (Figura 5). Esto podría deberse a que el cultivo tuvo una mayor capacidad de absorber el nitrógeno presente en el sustrato como resultado del efecto bioestimulante de las microalgas.

Figura 5

Resultados de biomasa seca (g/planta) y altura de tallo (cm)



Respecto a la variable de longitud de raíces, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos con un valor  $p \leq 0.05$ . Los tratamientos T2 (Biol) y T6 (Biol + Microalgas D2) presentaron el mayor desarrollo radicular, mientras que los tratamientos T1 (Control), T3 (Microalgas D1), T4 (Microalgas D2) y T5 (Biol + Microalgas D1) no mostraron diferencias significativas entre ellos (Cuadro 8). Esto indica que la combinación de biol y dosis adecuadas de microalgas tiene un efecto positivo en el desarrollo radicular y que el cultivo, en ausencia de biol porcino, a pesar de la aplicación de las microalgas, este se comporta como el control.

Cuando se comparan los tratamientos T2 (Biol), T5 (Biol + Microalgas D1) y T6 (Biol + Microalgas D2) que cuentan con la fertilización adecuada con aquellos que no la incluyen, es decir, los tratamientos T1 (Control), T3 (Microalgas D1) y T4 (Microalgas D2), se observa que los tratamientos con biol tienen un mayor desarrollo radicular. Esto puede relacionarse con la incorporación de nitrógeno por parte del biol, ya que el suministro de nutrientes, especialmente de nitrógeno, puede

influenciar considerablemente el crecimiento, la morfología y la distribución del sistema radicular (Marschner y Marschner, 2012). Estos resultados son congruentes con la investigación realizada por Tello García (2018), quien reportó que la variedad Amadeus 77, sin aplicación de biol y con un sustrato deficiente en nitrógeno, presentó las menores longitudes de raíz comparado con tratamientos con fertilización de biol porcino.

Entre los tratamientos con biol, el tratamiento T6 (Biol + Microalgas D2) y el tratamiento T2 (Biol) no presentaron diferencias significativas entre ellos, mientras que estos dos si presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento T5 (Biol + Microalgas D1). Sin embargo, cabe destacar que el tratamiento T6 (Biol) mostró la mayor longitud de raíces con 46.37 m, en comparación con los tratamientos T2 (Biol) y T5 (Biol + Microalgas D1), los cuales, tuvieron una longitud de raíces de 31.19 m y 21.25 m respectivamente (Cuadro 8). Esto muestra que, a parte del aporte de nutrientes realizado por el biol, el incremento en la dosis de microalgas provocó una mayor longitud de raíces. Esto puede atribuirse a la capacidad de las microalgas de producir fitorreguladores como las citoquininas, que están involucradas en múltiples procesos fisiológicos de las plantas como el desarrollo radicular y la movilización de nutrientes (Kang et al., 2021). Estos resultados coinciden con estudios de Bumandalai y Tserennadmid (2019) y V. Barone et al. (2018), quienes reportaron que la aplicación de *Chlorella vulgaris* y extractos de *Scenedesmus quadricauda* en cultivos de tomate, pepino y remolacha incrementaron la longitud total de raíces.

Estos resultados son congruentes con la investigación realizada por Tello García, 2018 (Tello García, 2018), el cual, a pesar de no encontrar diferencias significativas entre las longitudes de las raíces, este reportó que la variedad Amadeus 77, al no aplicársele biol y utilizando un sustrato que presentó una deficiencia de nitrógeno (0.11% N), presentó las menores longitudes de raíz en comparación a los tratamientos que si tenían fertilización con biol porcino.

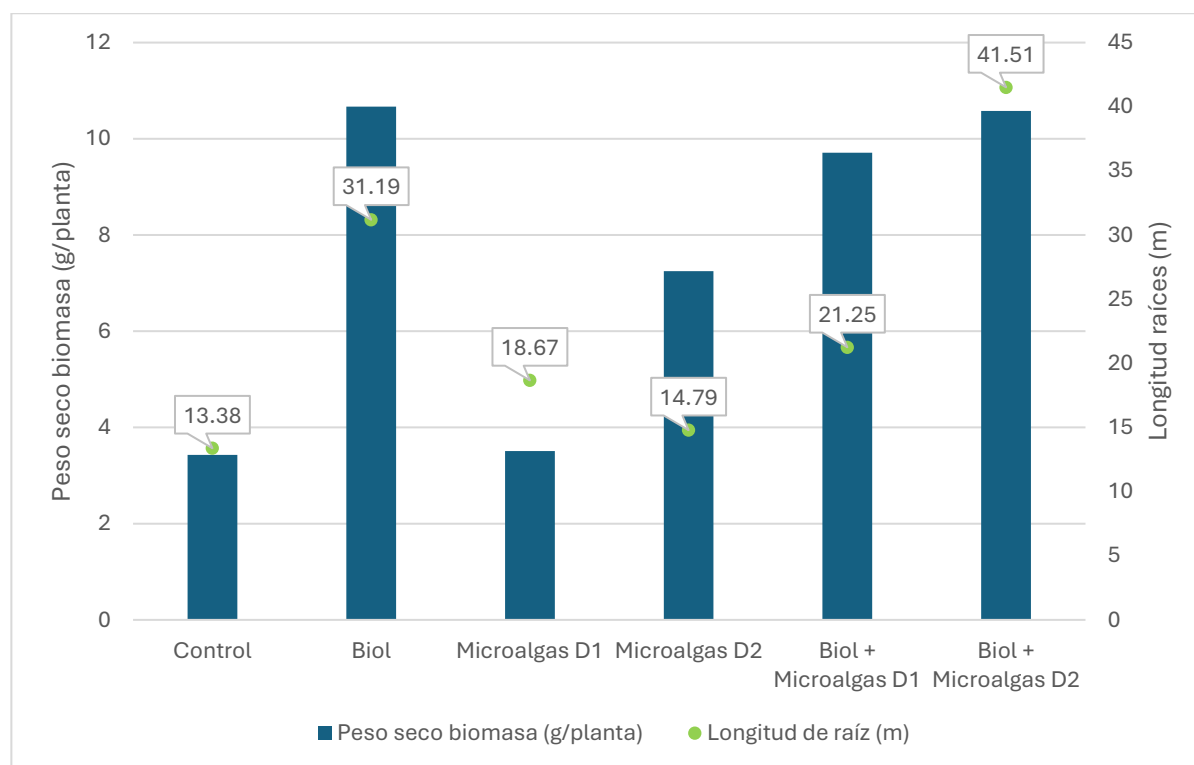
Así mismo, estos resultados son comparables con la investigación realizada por Gallardo Salazar (2013), en la cual, se evaluaron tratamientos con y sin fertilización química en ocho genotipos

de frijol, en condiciones de campo y casa malla y en el caso de la variedad de Amadeus 77 en condiciones semicontroladas con fertilización química, se reportó una longitud de raíz de 32.4 m. Estos resultados son similares a los obtenidos con el tratamiento T2 (Biol) que tuvo una longitud de raíces de 31.9 m. Por otro lado, se obtuvieron resultados superiores con el tratamiento T6 (Biol + Microalgas D2) de 46.37 m de longitud de raíces, lo cual, podría atribuirse al efecto bioestimulante causado por el incremento de la dosis de microalgas. Adicionalmente, en la Figura 6 se muestra que las longitudes de raíces estuvieron relacionadas con la producción de biomasa total únicamente en los tratamientos T1 (Control), T2 (Biol) y T6 (Biol + Microalgas D2).

El incremento de la longitud radicular observada en el tratamiento T6 (Biol + Microalgas D2), ocasionado por el efecto bioestimulante de las microalgas, también puede relacionarse al método de aplicación utilizado, puesto que, ya que al realizarlo directamente en el sustrato, se obtuvo una mejor distribución de nutrientes y/o compuestos bioactivos a través de la rizosfera, lo que a su vez estimuló el desarrollo de la planta y mejoró la fertilidad del suelo (Gonçalves et al., 2023). Por otro lado, pese que también existe el método de aplicación foliar, este se utiliza principalmente cuando se aplican extractos de microalgas para ser absorbidos mediante los estomas de las hojas y obtener respuestas inmediatas en la absorción de nutrientes y aumento de la resistencia al estrés abiótico de la planta (Bello et al., 2021).

Figura 6

Comparación entre peso seco de biomasa (g/planta) y longitud de raíz (m)



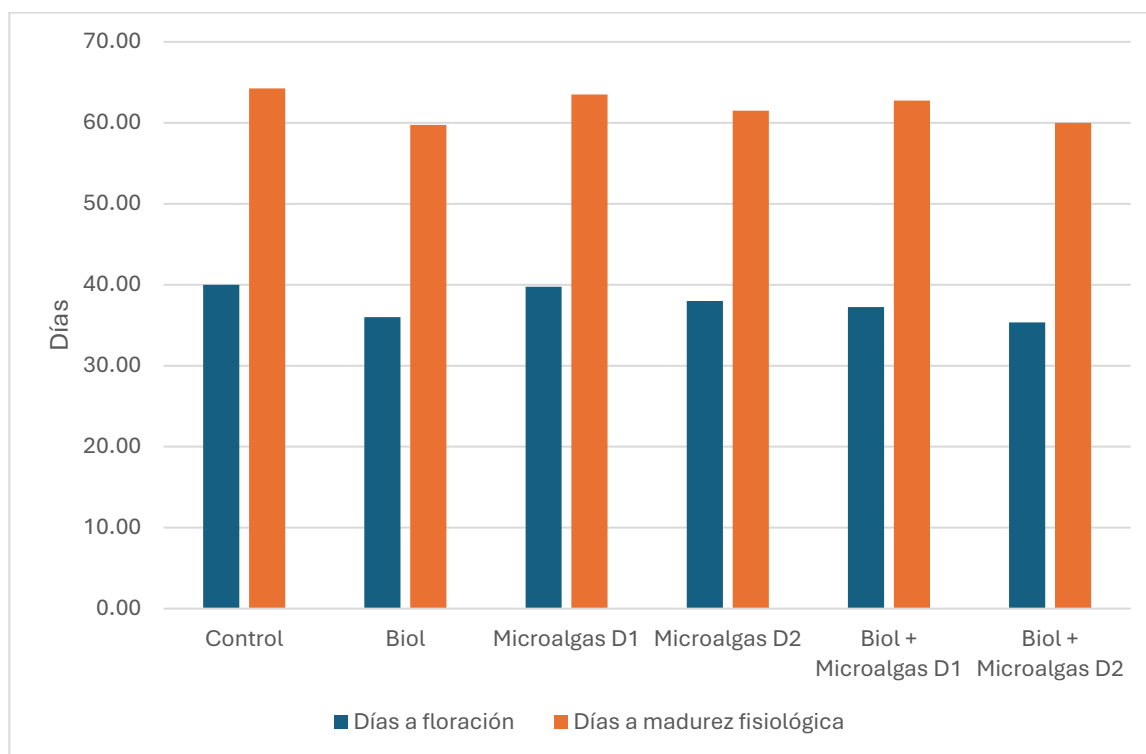
Adicionalmente, de forma descriptiva, se observó que, en las variables de días a floración y días a madurez fisiológica, los tratamientos con adición de biol porcino alcanzaron la madurez fisiológica 2 a 3 días antes que los tratamientos T1 (Control), T3 (Microalgas D2) y T4 (Microalgas D2) (Figura 7). Esto podría atribuirse a la incorporación de nitrógeno por parte del biol, el cual estimuló el desarrollo vegetativo de la planta.

Adicionalmente, en el tratamiento T4 (Microalgas D2) se observó que las plantas entraron ligeramente antes a dichas etapas en comparación del tratamiento T1 (Control) y T3 (Microalgas D1), lo cual, pudo haber sido ocasionado por la misma estimulación por parte de las microalgas, que aumentó la absorción de nitrógeno presente en el sustrato y lo que a su vez condujo a un aumento en la producción de biomasa. Estos resultados son similares a un estudio realizado por García Vásquez et al. (2023), el cual aplicó diferentes dosis en biofertilizantes a base de las microalgas *Chaetoceros*

*gracilis* y *Chlorella vulgaris* y reportó que ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo en los días a floración del cultivo de maíz.

**Figura 7**

*Días a floración y días a madurez fisiológica*



Respecto a las variables de número de granos y número de vainas, el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos con un valor  $p \geq 0.05$  (Cuadro 9). Respecto a la variable de número de granos, el tratamiento T6 (Biol + Microalgas D2) obtuvo el mayor resultado, siendo este de 22 núm/macetero, mientras que en la variable de número de vainas el tratamiento T4 (Microalgas D2) obtuvo el resultado más alto, siendo este de 8.5 núm/macetero. En el caso de la variable de rendimiento la prueba de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas globales, sin embargo, la prueba Duncan permitió identificar diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el tratamiento T5 (Biol + Microalgas D1) el que presentó el menor rendimiento de 365 kg/ha y tuvo diferencia significativa con el resto de los tratamientos.

**Cuadro 9***Resultado de análisis estadístico de las variables de rendimiento*

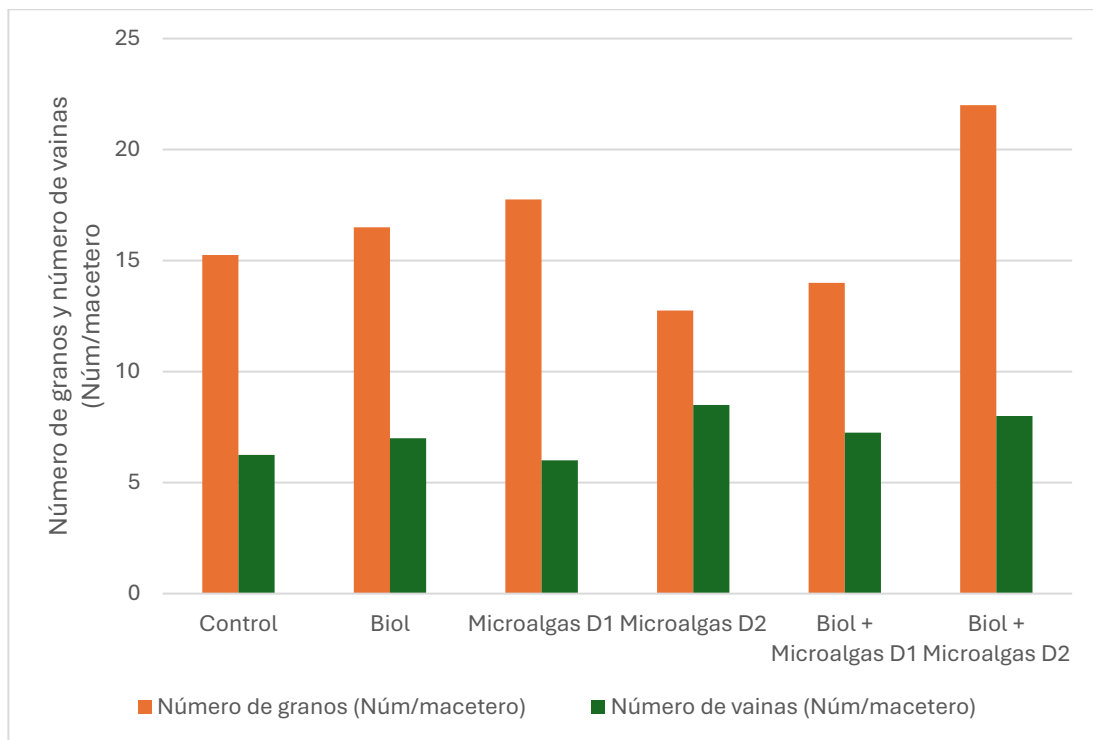
Tratamiento	Número de granos (Núm/macetero)		Número de vainas (Núm/macetero)		Peso de semillas (kg frijol/ha)	
Control	15.25	a	6.25	a	675	ab
Biol	16.5	a	7	a	467	ab
Microalgas D1	17.75	a	6	a	708	ab
Microalgas D2	12.75	a	8.5	a	600	ab
Biol + Microalgas D1	14	a	7.25	a	365	b
Biol + Microalgas D2	22	a	8	a	868	a
Valor P	0.5447		0.7803		0.2244	

*Nota.* Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas

Estos resultados pueden describirse como inusuales, dado que incluso los tratamientos que contaban con fertilización y que no presentaron una deficiencia de nutrientes, rendimientos relativamente bajos, puesto que, en el caso de la variedad Amadeus 77, se espera un rendimiento promedio de 1,318 kg/ha (Pérez Canto y Pimentel González, 2014). A sí mismo, los números de vainas y número de granos fueron por debajo de lo esperado (Figura 8) en comparación con los obtenidos por Tello García (2018), quien para la variedad de Amadeus 77 obtuvo un número de granos de 46 Núm/planta, un número de vainas de 9.8 Núm/planta y un rendimiento de 1,945.5 kg/ha, al realizar la fertilización con biol porcino.

**Figura 8**

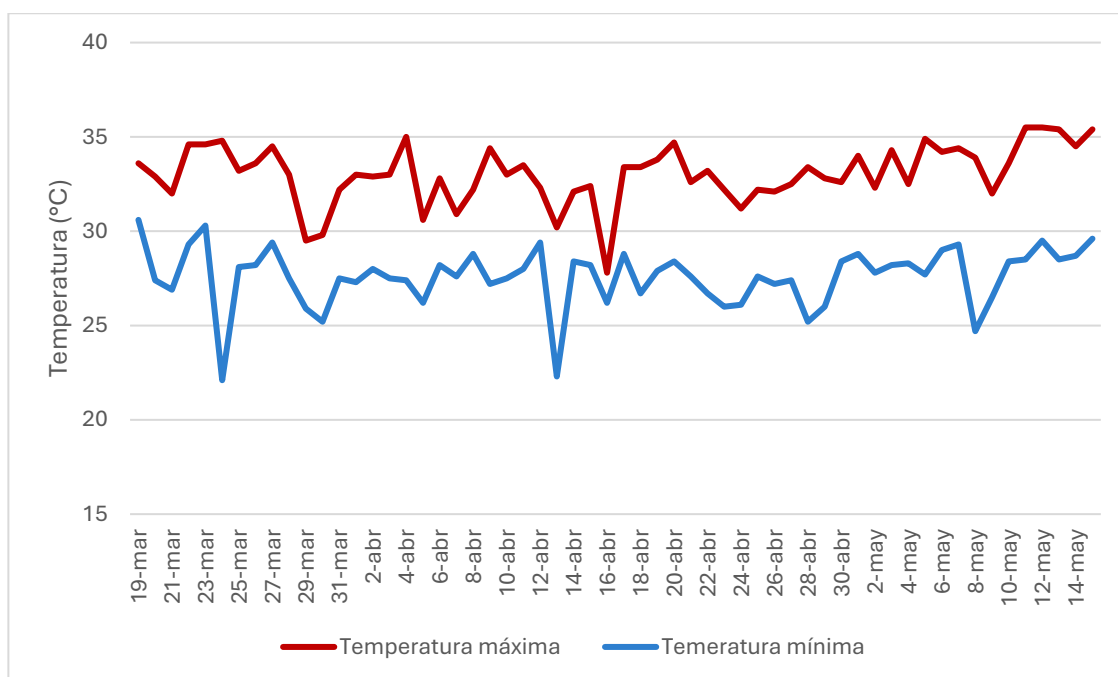
*Resultado de número de granos (núm/macetero) y número de vainas (núm/macetero)*



Sin embargo, esto puede explicarse al contrastar con las condiciones climáticas de la zona experimentadas entre los meses de marzo a mayo, ya que la temperatura ambiental promedio reportada entre las 10:00 am y 6:00 pm fue de 31 °C (Figura 9). Sin embargo, se encontró que la temperatura dentro de la casa malla oscilaba entre los 35 y 40 °C. Entre los efectos adversos de las altas temperaturas en frijol están la reducción de viabilidad del polen, aborto de flores y vainas, reducción del tamaño de las semillas, entre otros (Juan Carlos Rosas et al., 2000).

**Figura 9**

*Temperaturas ambientales promedio de los meses marzo a mayo, 2024*



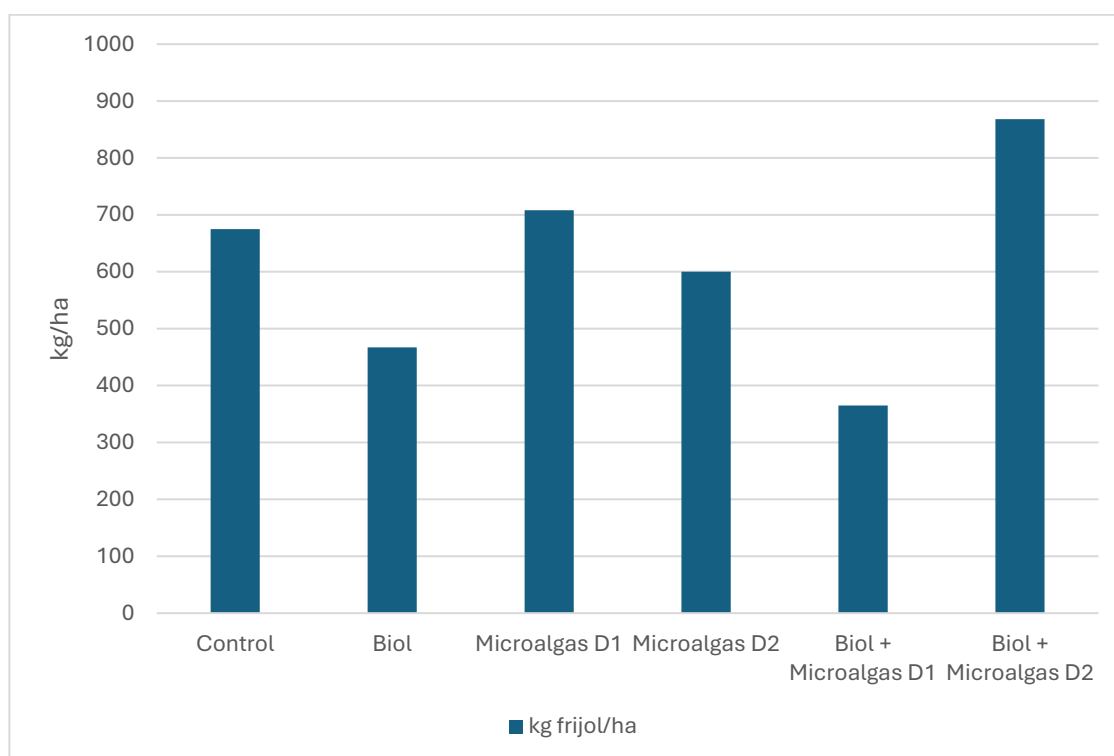
Los efectos de dichas condiciones ambientales se observaron en un principio cuando las plantas con mayor exposición a la luz presentaron una alta tasa de aborto de flores (Anexo P). Sin embargo, aquellas plantas que tenían mayores condiciones de sombra también se vieron afectadas, puesto que, durante la etapa de cosecha, se pudo observar un número significativo de vainas deformes o vacías que presentaban granos de tamaños irregulares (Anexo Q).

En este caso, se observó que el T1 (Control), T3 (Microalgas D1) y T4 (Microalgas D2) presentaron rendimientos mayores de 608 kg/ha, 705 kg/ha y 600 kg/ha respectivamente, en comparación a los tratamientos T2 (Biol) y T5 (Biol + Microalgas D2) quienes tuvieron un rendimiento de 467 kg/ha y 365 kg/ha respectivamente, a pesar de contar con la fertilización adecuada (Figura 10). Esto probablemente se debe a una menor producción de vainas y semillas, lo cual condujo al aumento de peso individual de las semillas debido a una menor competencia por nutrientes entre ellas. Comportamientos similares se observaron en la investigación realizada por Rivera Rodríguez (2017), quien llevó a cabo una evaluación de 24 genotipos de frijol, incluido Amadeus 77, en épocas de

Primera (mayo) y Postrera (Octubre) reportando temperaturas promedio de 31.3 °C y 29.2 °C respectivamente, donde observó efectos considerables de las temperaturas en el rendimiento de cada genotipo, obteniendo 709 kg/ha en la época Primera y 1616 kg/ha en la época Postrera para la variedad Amadeus 77.

**Figura 10**

*Rendimiento de las plantas de frijol*



Adicionalmente, estos resultados son similares a las investigaciones llevadas a cabo por Barrios-Gómez et al. (2011) y Félix-Valencia et al. (2022), los cuales investigaron el efecto de altas temperaturas ambientales ( $\geq 30$  °C) en diferentes variedades de frijol y observaron que estas provocaron una reducción significativa en la producción de flores, número de vainas normales, número de semillas, peso promedio de la semilla y el número de semillas por vaina.

Sin embargo, también cabe destacar de que, el tratamiento T6 (Biol + Microalgas D2), fue el que reportó el mayor rendimiento de 868 kg/ha. Esta diferencia puede asociarse con el hecho de que dicho tratamiento también fue el que presentó el mayor desarrollo radicular, ya que, este ayuda a

optimizar la absorción de agua y nutrientes, aumentando la superficie de contacto con el suelo y reduciendo los efectos del estrés térmico en el desarrollo y rendimiento del cultivo (Luo et al., 2020). No obstante, a pesar de que en los resultados puede observarse una tendencia que al incrementar la dosis de microalgas en combinación con el biol porcino se incrementa el número de granos, número de vainas y el rendimiento, debido a las condiciones ambientales experimentadas, estos no son concluyentes.

### **Cuantificación de Microorganismos en el Sustrato**

De forma descriptiva, se puede decir que todos los tratamientos presentaron un incremento en los conteos de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras reportados en UFC/g de suelo en comparación a la muestra original, a excepción del tratamiento T1 (Control) y T5 (Biol + Microalgas D1) (Figura 8). El tratamiento que presentó mayor conteo de UFC/g de suelo fue el tratamiento T2 (Biol), esto debido a que los biofertilizantes tienen la capacidad de modificar la estructura y funcionamiento de los microorganismos en el suelo a través del incremento de la fuente de nutrientes tales como la incorporación de carbono orgánico, el cual, modifica la actividad y diversidad microbiana (Allouzi et al., 2022; Xu et al., 2019). De acuerdo con una investigación llevada a cabo por Javoreková et al. (2015), el cual midió la biomasa microbiana en el suelo al añadirle un biol porcino-vacuno y un biofertilizante (AZOTER®), observó que en el tratamiento con biol se incrementó la biomasa microbiana en un 230% en comparación con el tratamiento sin ningún tipo de biofertilizante.

En el caso de los tratamientos T3 (Microalgas D1), T4 (Microalgas D2), T5 (Biol + Microalgas D1) y T6 (Biol + Microalgas D2), el incremento de UFC/g de suelo puede asociarse con la aplicación de las microalgas ya que éstas poseen la capacidad de influenciar las poblaciones de microorganismos, la biomasa, actividad y diversidad microbiana en el suelo, gracias a la liberación de nutrientes por medio de la fotosíntesis o la producción y/o excreción de sustancias orgánicas en respuesta a condiciones poco favorables, las cuales, se adhieren al suelo y son conocidas como Sustancias Exopoliméricas o Exopolisacáridos y que representan una considerable fuente de carbono (Alvarez et al., 2021; Delattre

et al., 2016; Hu et al., 2003). Del mismo modo, en investigaciones llevadas a cabo por Marks et al. (2019) y Valeria Barone et al. (2019) en donde aplicaron cultivos viables o vivos de microalgas de género *Chlorella* sp. en el suelo, observaron un incremento en la biomasa bacteriana y la actividad enzimática.

El mayor incremento del conteo de bacterias aerobias mesófilas y hongos/levaduras se observó en el tratamiento T2 (Biol), sin embargo, en los tratamientos T3 (Microalgas D1), T4 (Microalgas D2), T5 (Biol + Microalgas D1) y T6 (Biol + Microalgas D2) se observó que al añadir microalgas se obtuvo un menor conteo de UFC/g de suelo, en comparación con el tratamiento T2 (Biol). Esto puede asociarse a un efecto antimicrobiano causado por ciertos compuestos bioactivos producidos por algunos géneros de microalgas, tales como la *Chlorella* spp., la cual, posee una mezcla de ácidos grasos que tiene efectos antimicrobianos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Jena y Subudhi, 2019).

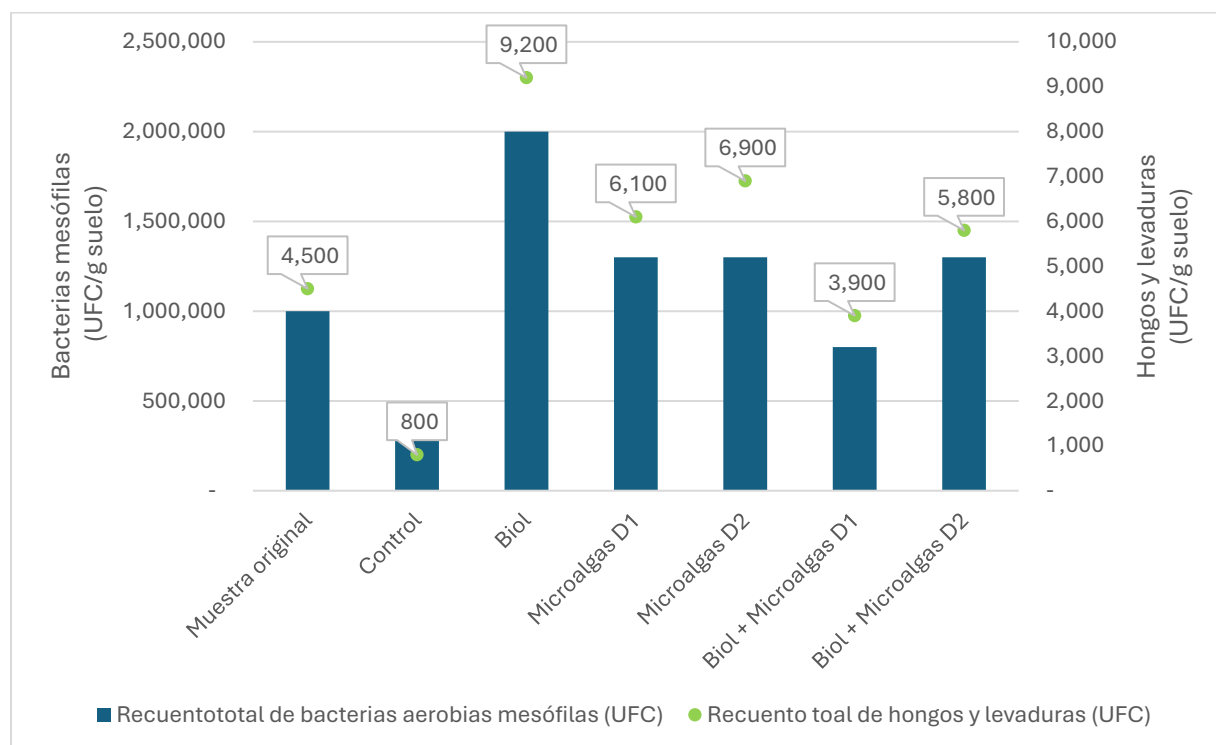
A pesar de que la aplicación de microalgas tuvo un efecto bacteriostático en la actividad microbiana del suelo, esto no es necesariamente negativo. Las propiedades bacteriostáticas de las microalgas pueden limitar la proliferación de microorganismos patógenos, promoviendo un equilibrio microbiano más favorable y saludable para las plantas (Falaise et al., 2016). Este equilibrio puede mejorar la disponibilidad de nutrientes y aumentar la tolerancia a factores abióticos, lo cual es beneficioso para el desarrollo y rendimiento de los cultivos.

Por último, en el tratamiento T1 (Control) se observa un decrecimiento en la cantidad de UFC/g suelo, esto debido a que, dado que no se le aplicó ningún tipo de fertilización, la disponibilidad de nutrientes tuvo un descenso al finalizar el ciclo del cultivo de frijol. Sin embargo, cabe destacar que las muestras tomadas podrían no mostrar el resultado real de los tratamientos, debido a que no se muestrearon más de una unidad experimental, además, se debe tomar en cuenta que el método de recuento de placas puede no ser el ideal para medir cambios en la actividad microbiana en el suelo

debido a la selectividad de los medios de cultivo la adhesión a partículas del suelo y la incapacidad de algunas células de formar colonias (Ramos Vásquez y Zúñiga Dávila, 2008).

**Figura 11**

*Recuento total de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras*



### Características Físicoquímicas del Suelo

De forma descriptiva, a partir los resultados del análisis de suelo obtenidos antes y después del ciclo del cultivo (Anexo R), se observa que no hubo mayor cambio en las propiedades físicoquímicas del suelo, en comparación a la muestra original (Figura 12 y Figura 13). De forma general, se observa una disminución de los valores de Carbono Orgánico (CO), Materia Orgánica (MO), Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) posterior al ciclo del cultivo de frijol. Esto puede deberse a que la aplicación del biol porcino se realizó con el objetivo de suplir las necesidades nutricionales del cultivo y que el intervalo de tiempo en el que se aplicó fue muy corto, en comparación con un estudio llevado a cabo por Xu et al. (2019), en el que evaluó el efecto de la aplicación, en cultivos de arroz y colza en un periodo de 3 años, de diferentes dosis de biol porcino en las propiedades físicoquímicas

del suelo y reportó una leve tendencia en el incremento del contenido de MO, N, P y K a medida se incrementaba la dosis de biol porcina aplicada, en comparación con los tratamientos de suelo sin tratar y fertilización química.

**Figura 12**

*Resultado de análisis de suelo de Fósforo y Potasio*

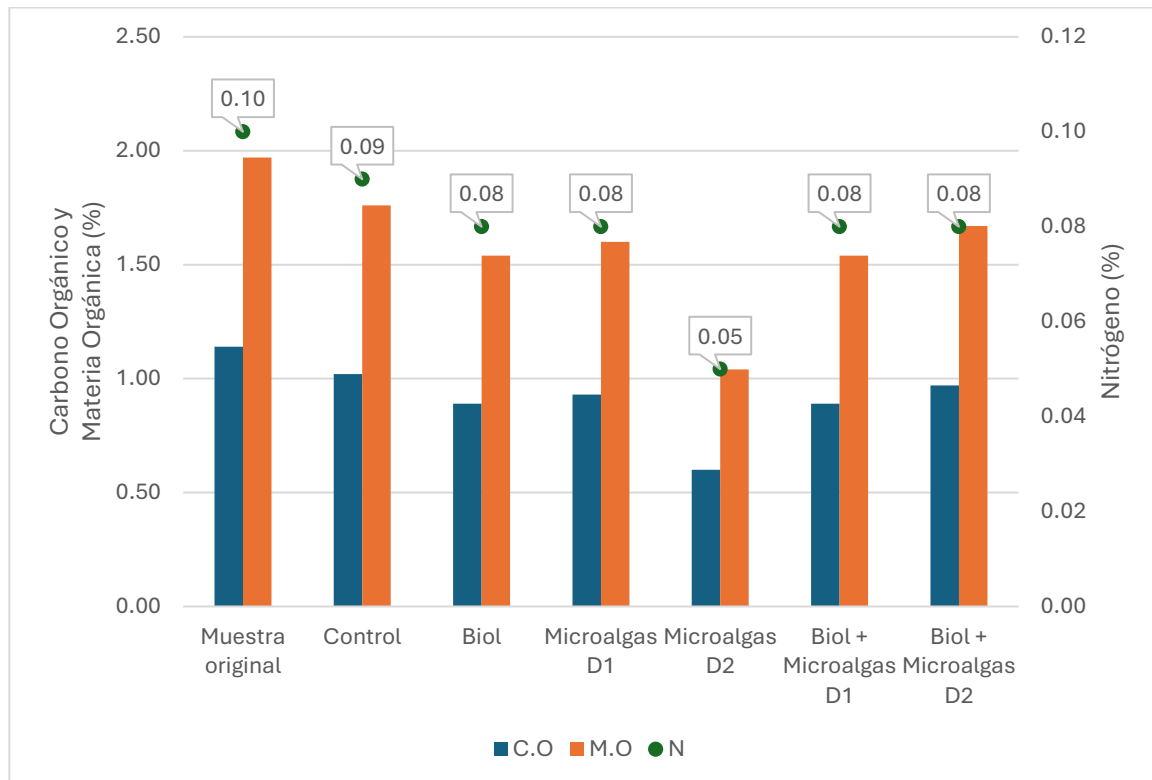


Adicionalmente, también se observa que en el tratamiento T4 (Microalgas D2) hubo una disminución del contenido de nitrógeno en el suelo en comparación con los tratamientos T1 (Control) y T3 (Microalgas D2), los cuales no tuvieron la incorporación de nitrógeno por parte del biol porcino (Figura 13). Esto sugiere que las plantas pertenecientes al tratamiento T4 (Microalgas D2) tuvieron una mayor absorción del nitrógeno que ya estaba presente en el suelo. Esto puede atribuirse a un efecto bioestimulante provocado por la aplicación de microalgas en una mayor dosis, puesto que, según un estudio llevado a cabo por Puglisi et al. (2020) en el que aplicó extractos de *Scenedesmus quadricauda* en plantas de lechuga, reportó que estos influían en la actividad de enzimas involucradas

en el metabolismo primario del nitrógeno, incrementando la producción de biomasa y crecimiento del cultivo.

**Figura 13**

*Resultado de análisis de suelos de Carbono Orgánico, Materia orgánica y Nitrógeno total*



## Conclusiones

El incremento de la dosis de microalgas resultó en un mayor rendimiento y desarrollo radicular del cultivo, lo cual, puede atribuirse a un efecto bioestimulante que es potenciado al combinar la adición de microalgas con la aplicación de biol porcino. A sí mismo, el incremento de la producción de biomasa del cultivo de puede atribuirse a la adición del biol porcino, sin embargo, esto no se encuentra relacionado directamente con los rendimientos obtenidos. Es importante señalar que los resultados obtenidos respecto al rendimiento no son concluyentes debido a que el cultivo se desarrolló bajo condiciones climáticas atípicas que pudieron afectar las variables fisiológicas y el rendimiento.

El uso de los bioinsumos de biol porcino como biofertilizante y las microalgas como bioestimulante contribuyó al incremento de la población de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras presentes en el sustrato. Sin embargo, dicho efecto se observa limitado con la adición de microalgas en el sustrato en comparación al efecto individual del biol porcino. Esto puede ser ocasionado por el efecto antimicrobiano causado por ciertos compuestos bioactivos producidos por las microalgas.

El incremento en la dosis de microalgas favoreció la absorción del nitrógeno presente en el sustrato por las plantas, lo cual, también se relaciona con una mayor producción de biomasa en comparación con aquellos tratamientos que no contaban con la fertilización adecuada y que tuvieron una menor dosis de microalgas.

### Recomendaciones

Se recomienda incrementar la dosis de cultivos mixtos de microalgas, aplicando volúmenes mayores o iguales a 800 ml con una concentración mayor o igual a 500 mg/L de microalgas.

Se recomienda medir la actividad microbiana en el suelo, a través de la medición de la respiración microbiana, cuantificando el CO<sub>2</sub> producido haciendo uso de una trampa de NaOH.

Para evaluar el efecto de la aplicación de biol porcino y microalgas en la absorción de nutrientes de forma más precisa se recomienda llevar a cabo una medición de las concentraciones presentes en la vegetación aérea de las plantas. Así mismo, se recomienda evaluar los efectos de la aplicación de biol y microalgas en las propiedades fisicoquímicas del suelo a largo plazo.

Se recomienda repetir el experimento bajo diferentes condiciones ambientales de temperatura y luminosidad, para disminuir el estrés por factores abióticos en el cultivo y prevenir posibles efectos negativos en las variables de rendimiento. Así mismo, se recomienda incluir un control positivo con fertilización química para realizar una comparación entre los efectos de la fertilización convencional y la adición de bioinsumos en el cultivo de frijol.

Para futuras investigaciones se recomienda evaluar el efecto de la aplicación de microalgas en el cultivo de frijol, utilizando el método de aplicación foliar y aplicación directamente al sustrato. Esto con el fin de evaluar y comparar cual de ambos métodos presenta un mayor efecto bioestimulante y mejores resultados en el desarrollo y rendimiento del cultivo, la actividad microbiana del suelo y las propiedades fisicoquímicas del sustrato.

### Referencias

- Allouzi, M. M. A., Allouzi, S. M. A., Keng, Z. X., Supramaniam, C. V., Singh, A. y Chong, S. (2022). Liquid biofertilizers as a sustainable solution for agriculture. *Heliyon*, 8(12), e12609. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12609>
- Alvarez, A. L., Weyers, S. L., Goemann, H. M., Peyton, B. M. y Gardner, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research*, 54, 102200. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102200>
- Álvarez-Solís, J. y Anzueto-Martínez, M. (2004). Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los Altos de Chiapas, México. *Agrociencia*, 38(1), 13–22. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30238102.pdf>
- Antolinez Auguello, A. y Acosta Cruz, J. R. (2022). *Estudio experimental de los requerimientos energéticos en la separación de biomásas de microalgas utilizadas en tratamiento de aguas residuales por método de centrifugación* [Tesis de grado]. Universidad Autónoma de Bucaramanga, Colombia. [https://repository.unab.edu.co/bitstream/handle/20.500.12749/16879/2022\\_Tesis\\_Antonio\\_Antolinez.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unab.edu.co/bitstream/handle/20.500.12749/16879/2022_Tesis_Antonio_Antolinez.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Arias Restrepo, J. H., Rengifo Martínez, T. y Jaramillo Carmona, M. (2007). *Manual técnico: Buenas prácticas agrícolas (BPA): en la producción de frijol voluble*. Corpoica; Mana; FAO. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/73415d1a-6fb6-4c40-8ac2-67e4c69e6f7c/content>
- Barone, V [V.], Baglieri, A [A.], Stevanato, P., Broccanello, C., Bertoldo, G., Bertaggia, M., Cagnin, M., Pizzeghello, D., Moliterni, V. M. C., Mandolino, G., Fornasier, F., Squartini, A., Nardi, S. y Concheri, G. (2018). Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 1061–1071. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1283-3>
- Barone, V [Valeria], Puglisi, I., Fragalà, F., Stevanato, P. y Baglieri, A [Andrea] (2019). Effect of living cells of microalgae or their extracts on soil enzyme activities. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(5), 712–726. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1521513>
- Barrios-Gómez, E. J., López-Castañeda, C. y Kohashi-Shibata, J. (2011). Relaciones hídricas y temperaturas altas en frijol del tipo “Flor de Mayo”. *Agronomía Costarricense*, 35(1), 131–145. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0377-94242011000100007&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242011000100007&lng=en&tlng=es).
- Bellinger, E. G. y Sigee, D. C. (2010). *Freshwater algae: Identification and use as bioindicators*. Wiley-Blackwell. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470689554>
- Bello, A. S., Saadaoui, I. y Ben-Hamadou, R. (2021). “Beyond the Source of Bioenergy”: Microalgae in Modern Agriculture as a Biostimulant, Biofertilizer, and Anti-Abiotic Stress. *Agronomy*, 11(8), 1610. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081610>
- Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D. y López-Chuken, U. J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista De Biología Marina Y Oceanografía*, 52(3), 417–427. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>

- Blanco-Valdés, Y. (2019). Importancia de la calidad de la luz entre las plantas arvenses-cultivo. *Cultivos Tropicales*, 40(4). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193263189009>
- Bumandalai, O. y Tserennadmid (2019). Effect of *Chlorella vulgaris* as a biofertilizer on germination of tomato and cucumber seeds. *International Journal of Aquatic Biology*, 7(2), 95–99. <https://doi.org/10.22034/ijab.v7i2.582>
- Carter, M. R. y Gregorich, E. G. (2008). *Soil sampling and methods of analysis* (2nd ed.). Canadian Society of Soil Science; CRC Press. <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781420005271/soil-sampling-methods-analysis-gregorich-carter>
- Ceccon, E. (2008). La revolución verde tragedia en dos actos. *Ciencias*, 1(91), 21–29. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=64411463004>
- Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M. C. y Roupshael, Y. (2018). Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1782. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2018.01782/full>
- Coulibaly, N. D., Gadji, A. G., Kimou, S. H., Ossey, C. L., Fondio, L., Paul N’Gbesso, M. F. de, N’Gaza, A. F. y Butare, L. (2023). Yield, Growth and Vegetative Development Parameters Response of Dry Beans to Organic and Inorganic Fertilizers and Biofertilizer. *Agricultural Sciences*, 14(12), 1688–1701. <https://doi.org/10.4236/as.2023.1412109>
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C. y Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Espinoza, A., Valdivia, R. y Pilarte, F. (2019). *Instructivo 3: Manejo de la fertilización de maíz y frijol -4R, basado en la evaluación visual de suelos*. Catholic Relief Services (CRS). <https://asa.crs.org/wp-content/uploads/2020/05/Instructivo-3-Manejo-fertilización-en-granos-básicos-4R.pdf>
- Espinoza Tejada, J. R., Romero Lopez, E. E. y Simba Vaca, A. L. (2016). *Elaboración de un programa de manejo de agua para riego en Zamorano, Honduras* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/items/2cc1445e-2b26-4719-83e5-84d19722fc49>
- Falaise, C., François, C., Travers, M.-A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V. y Mouget, J.-L. (2016). Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Marine Drugs*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/md14090159>
- Félix-Valencia, P., Fuentes-Dávila, G., Torres-Cruz, M. M., Ortiz-Enríquez, J. E. y Padilla-Valenzuela, I. (2022). Effect of temperature on productivity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sown during the fall in southern Sonora, Mexico. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 16(2), 1037–1047. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.16.2.1239>

- Gallardo Salazar, M. A. (2013). *Caracterización fenotípica de patrones de raíces relacionados con la tolerancia a la baja fertilidad y sequía en frijol común* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/items/2691add9-5804-4bc5-8542-2d8e7bd82620>
- García Vásquez, G. E., Álvarez Sánchez, A. R. y Yáñez Cajo, D. J. (2023). Efecto agronómico y productivo de la biofertilización a base de microalgas *Chaetoceros gracilis* y *Chlorella vulgaris* en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en Pueblo Viejo, Ecuador. *Ciencia Y Tecnología*, 16(1), 43–51. <https://doi.org/10.18779/cyt.v16i1.699>
- García-Gonzalez, J. y Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2>
- Gharib, F. A. E. L., Osama, K., Sattar, A. M. A. E. y Ahmed, E. Z. (2024). Impact of *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina*, and *Arthrospira platensis* as bio-stimulants on common bean plant growth, yield and antioxidant capacity. *Scientific Reports*, 14(1), 1398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50040-4>
- Gitau, M. M., Farkas, A., Balla, B., Ördög, V., Futó, Z. y Maróti, G. (2021). Strain-Specific Biostimulant Effects of *Chlorella* and *Chlamydomonas* Green Microalgae on *Medicago truncatula*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/plants10061060>
- Gonçalves, J., Freitas, J., Fernandes, I. y Silva, P. (2023). Microalgae as Biofertilizers: A Sustainable Way to Improve Soil Fertility and Plant Growth. *Sustainability*, 15(16), 12413. <https://doi.org/10.3390/su151612413>
- González Martínez, S. I. (2022). *Análisis de la demanda hídrica y eficiencia en depuración del efluente residual de la planta porcina de Zamorano* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/items/b33aeb05-9be8-4b16-923b-538996fa4693>
- Hernández-Pérez, A. y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista De Biología Marina Y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572014000200001>
- Hu, C., Liu, Y., Smestad Paulsen, B., Petersen, D. y Klaveness, D. (2003). Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/s0144-8617\(03\)00135-8](https://doi.org/10.1016/s0144-8617(03)00135-8)
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2009). *Guía técnica para el cultivo del frijol en los municipios de Santa Lucía, Teustepe y San Lorenzo del Departamento de Boaco, Nicaragua*. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/19856?locale-attribute=es>
- Javoreková, S., Maková, J., Medo, J., Kováčsová, S., Charousová, I. y Horák, J. (2015). Effect of bio-fertilizers application on microbial diversity and physiological profiling of microorganisms in arable soil. *Eurasian Journal of Soil Science (EJSS)*, 4(1), 54. <https://doi.org/10.18393/ejss.07093>
- Jena, J. y Subudhi, E. (2019). Microalgae: An Untapped Resource for Natural Antimicrobials. En L. B. Sukla, E. Subudhi y D. Pradhan (Eds.), *The Role of Microalgae in Wastewater*

- Treatment* (pp. 99–114). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2_8)
- Kalinina, A., Naumov, V., Verakhina, A., Ovchinnikova, S., Yakovleva, D., Dobrov, A., Sokolova, T., Lukyanova, J. y Afanasieva, P. (2023). Study of the Influence of the Temperature and Time of Microalgae Cultivation on the Reproduction Rate of *Chlorella* and *Scenedesmus* Microalgae When Cultured in a Tubular Photobioreactor. *Microbiology Research*, 14(4), 2105–2112. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040142>
- Khalili, A., Najafpour, G. D., Amini, G. y Samkhaniani, F. (2015). Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(2), 284–290. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0845-8>
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J. y Prithiviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386–399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Kommareddy, A. R. y Anderson, G. A. (2003). *Study of Light as a parameter in the growth of algae in a Photo-Bio Reactor (PBR)*. [https://www.researchgate.net/publication/280720969\\_Study\\_of\\_Light\\_as\\_a\\_parameter\\_in\\_the\\_growth\\_of\\_algae\\_in\\_a\\_Photo-Bioreactor\\_PBR](https://www.researchgate.net/publication/280720969_Study_of_Light_as_a_parameter_in_the_growth_of_algae_in_a_Photo-Bioreactor_PBR)
- Lata-Tenesaca, L., Villaseñor-Ortiz, D. y Chabla-Carrillo, J. (2017). Fraccionamiento de la absorción de nutrientes en cuatro etapas fenológicas del cultivo de fréjol. *Universidad Y Sociedad*, 9(1), 18–29. [https://www.researchgate.net/publication/313024818\\_FRACCIONAMIENTO\\_DE\\_LA\\_ABSORCION\\_DE\\_NUTRIENTES\\_EN\\_CUATRO\\_ETAPAS\\_FENOLOGICAS\\_DEL\\_CULTIVO\\_DE\\_FREJOL](https://www.researchgate.net/publication/313024818_FRACCIONAMIENTO_DE_LA_ABSORCION_DE_NUTRIENTES_EN_CUATRO_ETAPAS_FENOLOGICAS_DEL_CULTIVO_DE_FREJOL)
- Luo, H., Xu, H., Chu, C., He, F. y Fang, S. (2020). High Temperature can Change Root System Architecture and Intensify Root Interactions of Plant Seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 11, 160. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00160>
- Mamani, A. y Filippone, M. P. (2018). Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. *Revista Agronómica Del Noreste Argentino*, 38(1), 9–21. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/92661>
- Marks, E. A. N., Montero, O. y Rad, C. (2019). The biostimulating effects of viable microalgal cells applied to a calcareous soil: Increases in bacterial biomass, phosphorus scavenging, and precipitation of carbonates. *The Science of the Total Environment*, 692, 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.289>
- Marschner, H. y Marschner, P. (2012). *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (3rd ed.). Elsevier/Academic Press. [https://home.czu.cz/storage/737/65060\\_Mineral-Nutrition-of-higher-plants-Marschner-2012.pdf](https://home.czu.cz/storage/737/65060_Mineral-Nutrition-of-higher-plants-Marschner-2012.pdf)
- Mazepa, E., Malburg, B. V., Mógor, G., Oliveira, A. C. de, Amatuzzi, J. O., Corrêa, D. O., Lemos, J. S., Ducatti, D. R., Duarte, M. E. R., Mógor, Á. F. y Nosedá, M. D. (2021). Plant

- growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. *Algal Research*, 59, 102434. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102434>
- Mera, M., Recalde, E. y Lema, K. (2020). Evaluación de soluciones de microalgas (*Scenedesmus sp*) como bioestimulante natural en el cultivo hidropónico de lechuga (*Lactuca sativa*). *AXIOMA*(21), 53–60. <https://doi.org/10.26621/XV21.2019.12.A06.PUCESI.2550.6684>
- Montalvo Córdova, M. G. (2020). *Aplicación de biol como fertilizante en la nutrición suplementaria del cultivo de rosas (Rosa sp.), Var. freedom cantón Cotacachi* [Tesis de grado, Universidad Técnica del Norte, Ecuador]. Repositorio Digital Universidad Técnica del Norte. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/10788>
- Muñoz López, M. F. (2008). *Cultivos hospederos para la producción de mosca blanca en Zamorano, Honduras* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/060b7411-2eb6-4e89-9a7a-3d643d605655/content>
- Pazos-Rojas, L., Marín-Cevada, V., Morales-García, Y., Baez, A., Villalobos-López, M., Pérez-Santos, M. y Muñoz-Rojas, J. (2016). Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Revista Iberoamericana De Ciencias*, 3(7), 72–86. <http://www.reibci.org/publicados/2016/dic/2000114.pdf>
- Pearson, H. W., Mara, D. y Bartone, C. R. (1987). Guidelines for the minimum evaluation of the performance of full-scale waste stabilization pond systems. *Water Research*, 21(9), 1067–1075. [https://www.researchgate.net/publication/223295283\\_Guidelines\\_for\\_the\\_Minimum\\_Evaluation\\_of\\_the\\_Performance\\_of\\_Full-Scale\\_Waste\\_Stabilization\\_Pond\\_Systems](https://www.researchgate.net/publication/223295283_Guidelines_for_the_Minimum_Evaluation_of_the_Performance_of_Full-Scale_Waste_Stabilization_Pond_Systems)
- Pérez Canto, D. J. y Pimentel González, J. L. (2014). *Efecto de cuatro densidades poblacionales y tres espaciamientos entre hileras en el rendimiento del frijol Amadeus 77* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/659257bb-213c-4601-afe7-a567d62871ec/content#:~:text=Una%20de%20las%20principales%20variedades,días%20después%20de%20la%20siembra%2C>
- Puglisi, I., La Bella, E., Rovetto, E. I., Lo Piero, A. R. y Baglieri, A [Andrea] (2020). Biostimulant Effect and Biochemical Response in Lettuce Seedlings Treated with A *Scenedesmus quadricauda* Extract. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/plants9010123>
- Ramos Vásquez, E. y Zúñiga Dávila, D. (2008). Efecto de diferentes inoculantes sobre la actividad microbiana en la rizósfera del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus var. sieva*) en condiciones de campo. *Ecología Aplicada*, 7(1,2), 131–139. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-22162008000100016&lng=es&tln=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162008000100016&lng=es&tln=es).
- Rivera Rodríguez, K. M. (2017). *Evaluación fenotípica de líneas de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) a altas temperaturas* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

- <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/5d6638d5-feda-476c-99c1-466f5722e253/content>
- Rosas, J. C [J. C.]. (2003). *El cultivo de frijol común en América Tropical*. <https://bdigital.zamorano.edu/items/f00d71f9-ec0a-4dfd-a1d1-84eb6d1330e3>
- Rosas, J. C [J. C.], Beaver, J. S [J. S.], Beebe, S. y Viana, A. (2004). Nomenclatura de variedades de frijól común liberadas en Centro América y El Caribe. *Agronomía Mesoamericana*, 15(2), 221–224. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43715213.pdf>
- Rosas, J. C [Juan Carlos], Castro, A., Beaver, J. S [James S.], Pérez, C. A., Morales, A. y Lepiz, R. (2000). Mejoramiento genético para tolerancia a altas temperaturas y resistencia a mosaico dorado en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*, 11(1), 1–10. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43711101.pdf>
- Sepúlveda, Y. L., Díez, M. C., Osorio, N. W., Moreno, F. H. y León, J. D. (2014). Caracterización de los síntomas visuales de deficiencias nutricionales en plántulas del roble andino en invernader. *Agronomía Costarricense*, 38(1), 161–173. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/ac/v38n1/a10v38n1.pdf>
- Shariatmadari, Z., Riahi, H., Seyed Hashtroudi, M., Ghassempour, A. y Aghashariatmadary, Z. (2013). Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran. *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(4), 535–547. <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.782253>
- Sible, C. N., Seebauer, J. R. y Below, F. E. (2021). Plant bioestimulants: a categorical review, their implications for row crop production, and relation to soil health indicators. *Agronomy*, 11(7), 1297. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071297>
- Sivila, R. y Hervéz, D. (2001). *Análisis de la microbiota en suelos cultivados del Altiplano Central*. [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/divers11-03/010025652.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers11-03/010025652.pdf)
- Solomon, W., Mutum, L., Janda, T. y Molnár, Z. (2023). Potential benefit of microalgae and their interaction with bacteria to sustainable crop production. *Plant Growth Regulation*, 101(1), 53–65. <https://doi.org/10.1007/s10725-023-01019-8>
- Tello García, B. A. (2018). *Evaluación del rendimiento de dos variedades de frijol al aplicar diferentes concentraciones de biol de cerdo como fertilizante orgánico* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/items/272feec5-ce27-4525-a2bb-b7cfc98dca1e>
- Trujillo, S. G. (2022). *Evaluación de la capacidad de remoción de nutrientes a partir de cultivos mixtos de microalgas de Zamorano* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/da88550a-3086-4ae7-97ca-fe7c729bde51/content>
- United States Agency for International Development. (2013). *Manual de producción del frijol*. <https://dicta.gob.hn/files/2012,-manual-de-produccion-de-frijol,-G.pdf>
- Valentinetti, S. (2012). *Estudio de la aceptación de la variedad mejorada de frijol común Amadeus 77 en la aldea de San Lorenzo, Danlí, El Paraíso, Honduras* [Proyecto Especial

- de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.  
<https://bdigital.zamorano.edu/items/8de6a04c-ff6d-4762-bfbe-596d4486c776>
- Vargas Díaz, L. (2019). *Estado actual del estudio de las microalgas como bioestimulantes y perspectivas de su uso en la agricultura sostenible* [Tesis de grado, Universidad de Manizales, Colombia]. RIDUM.  
<https://ridum.umanizales.edu.co/handle/20.500.12746/4791>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Wahidin, S., Idris, A. y Shaleh, S. R. M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 129, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032>
- Wehr, J. D., Sheath, R. G. y Kocielek, J. P. (Eds.). (2015). *Freshwater algae of North America: Ecology and classification* (Second edition). Elsevier/AP Academic Press is an imprint of Elsevier.  
[https://www.researchgate.net/publication/280577972\\_Freshwater\\_Algae\\_of\\_North\\_America\\_Ecology\\_and\\_Classification](https://www.researchgate.net/publication/280577972_Freshwater_Algae_of_North_America_Ecology_and_Classification)
- Xu, M., Xian, Y., Wu, J., Gu, Y., Yang, G., Zhang, X., Peng, H., Yu, X., Xiao, Y. y Li, L. (2019). Effect of biogas slurry addition on soil properties, yields, and bacterial composition in the rice-rapeseed rotation ecosystem over 3 years. *Journal of Soils and Sediments*, 19(5), 2534–2542. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02258-x>
- Zamorano Vanegas, S. C. (2012). *Movimientos paraheliotrópicos en plantas de poroto (Phaseolous vulgaris L. cv. Orfeo INIA) y su efecto como mecanismo de fotoprotección* [Tesis de grado]. Universidad de Chile, Chile.  
<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/151144/Movimientos-paraheliotropicos-en%20plantas-de-porotos-%28Phaseolus-vulgaris-L-cv-Orfeo-INIA%29-y-su-efecto-como-mecanismo-de-fotoproteccion.pdf?sequence=1>

**Anexos**

**Anexo A**

*Laguna número 2 durante los muestreos de microalgas*

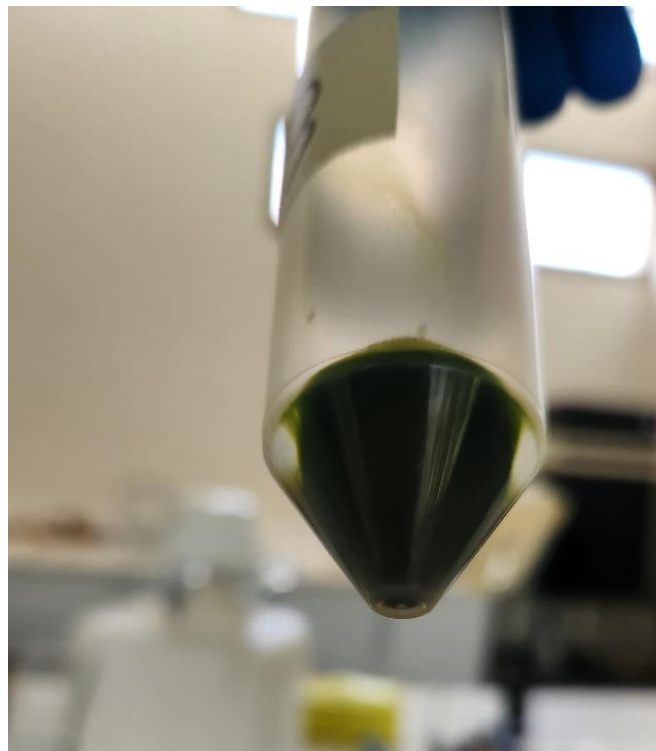


**Anexo B***Composición del medio de cultivo BG-11*

Ingredientes	mg/L
Nitrato de sodio	1,500.0
Fosfato dipotásico	31.4
Sulfato de magnesio	36.0
Cloruro de calcio dihidratado	36.7
Carbonato de sodio	20.0
EDTA de magnesio disódico	1.0
Ácido cítrico	5.6
Citrato férrico de amonio	6.0

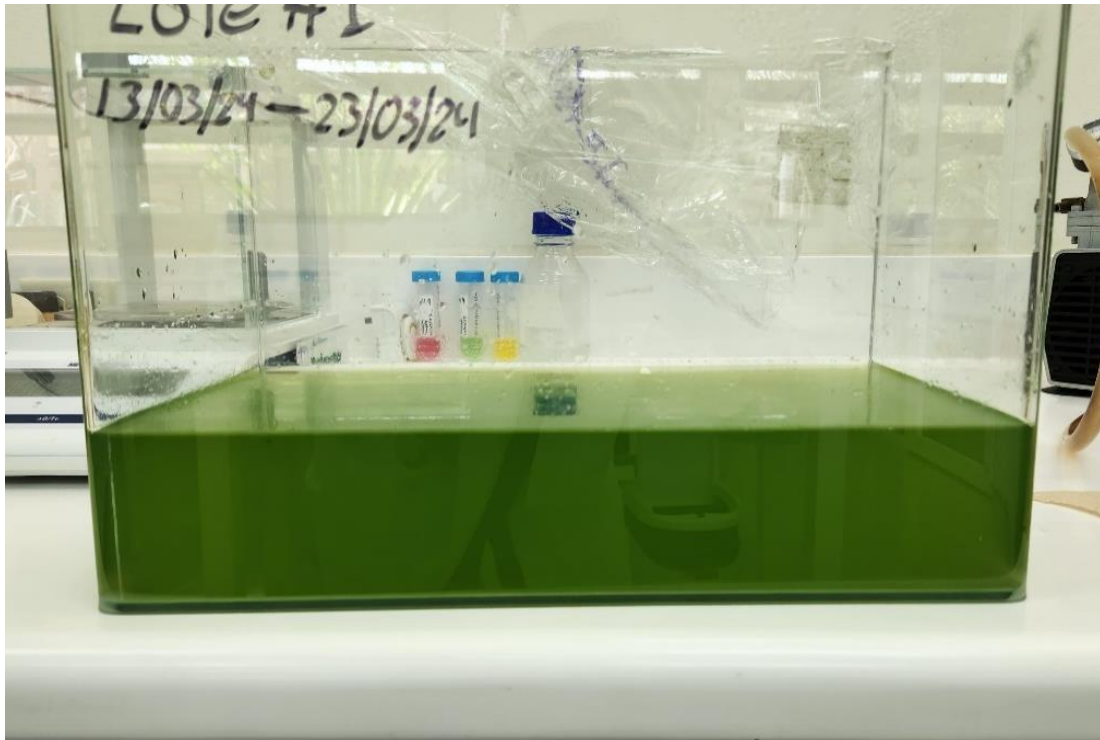
**Anexo C**

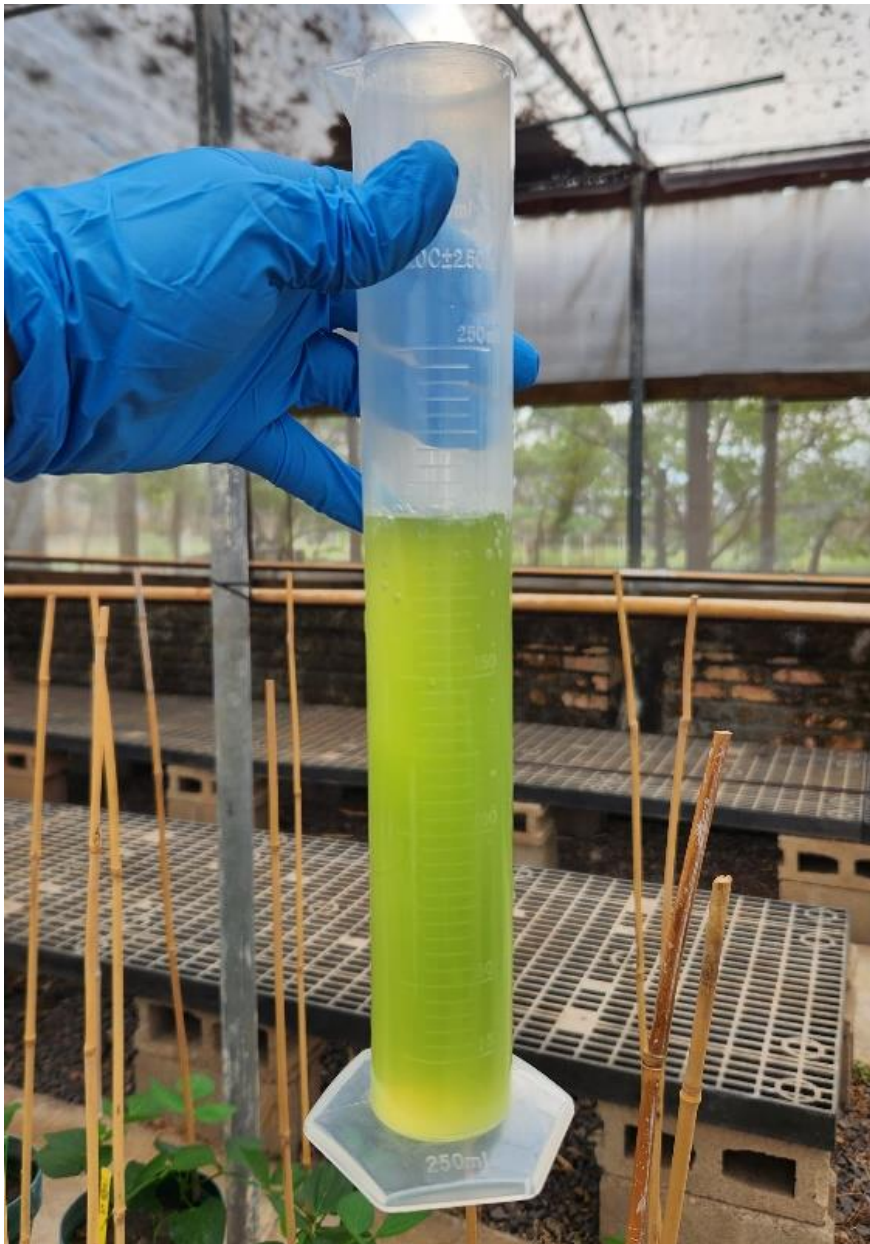
*Centrifugación de muestras de laguna #2*



**Anexo D**

*Montaje de fotobiorreactor para el escalamiento de cultivos mixtos de microalgas*



**Anexo E***Aplicación de microalgas en el sustrato*

**Anexo F**

*Mezcla de arena lavada con sustrato*



**Anexo G**

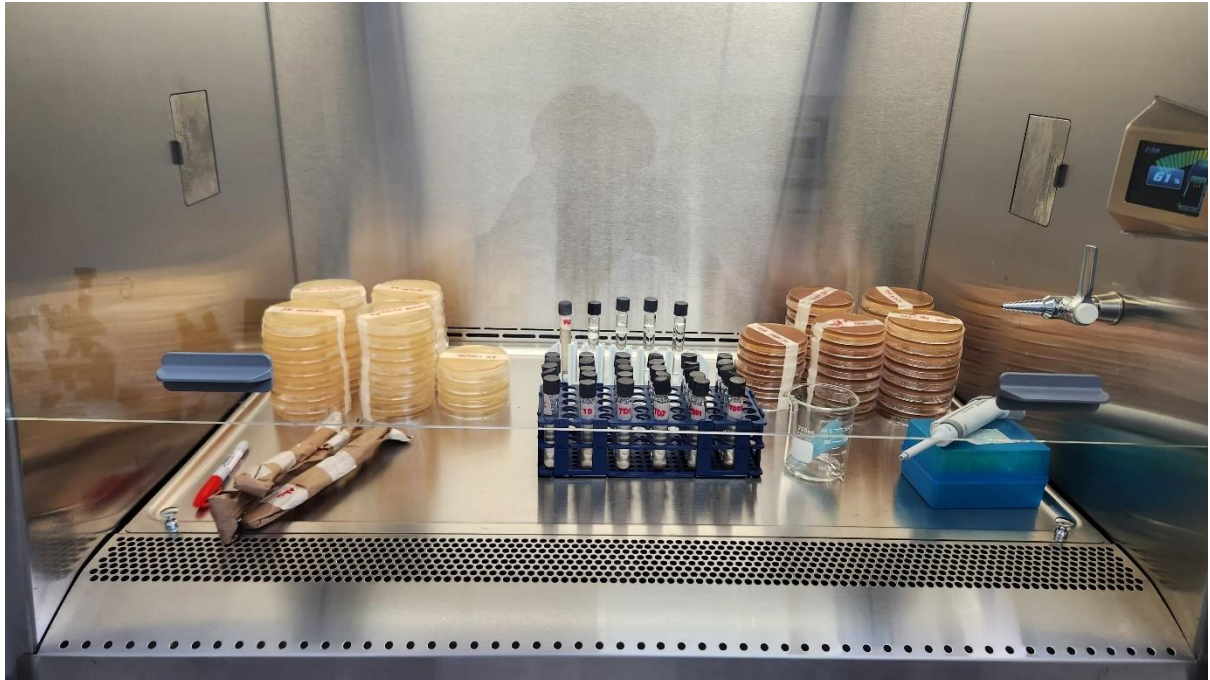
*Desinfección de maceteros con solución de cloro*



## Anexo H

### *Protocolo para la caracterización de microorganismos presentes en el suelo*

1. Homogenizar y diluir 1 g de suelo en 10 ml de agua destilada estéril (o agua peptonada).
2. Agitar durante 5 minutos.
3. Preparar 5 tubos que contengan 9 ml de agua destilada estéril.
4. Realizar diluciones seriadas partiendo de 1 ml del sobrenadante de la dilución original ( $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ ).
5. Tomar con una micropipeta 100  $\mu$ L, de cada tubo de dilución y sembrar por duplicado mediante siembra en superficie en una placa que contenga el medio de cultivo correspondiente (agar nutritivo para evaluación de bacterias, agar PDA para evaluación de hongos y actinomicetos), sembrando de la dilución más alta a la más baja.
6. Extender con la ayuda de un rastrillo de dispersión.
7. Incubar las placas invertidas a 35 °C (agar nutritivo) y a 25 °C (agar PDA) durante 24-28 h y 3-5 días, respectivamente.
8. Contar el número de colonias y aplicar la fórmula #Colonias x FD (inverso de la dilución) x Factor de corrección (10).
9. Reportar el resultado en UFC/g.

**Anexo I***Siembra de placas de Petri con medios de cultivo*

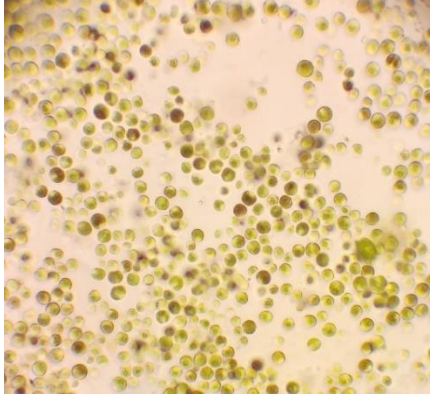
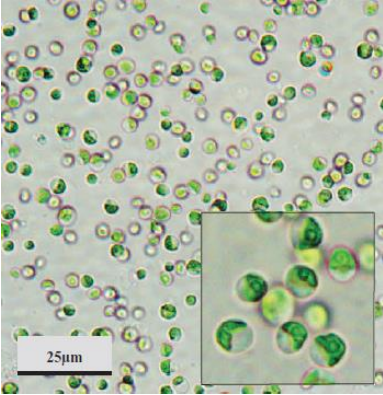
**Anexo J**

*Laguna número 2 durante los muestreos preliminares y previo al cambio en la población de microalgas*



## Anexo K

### Identificación de *Chlorella* sp. en fotobiorreactores

Especie/Género y características	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p>Clórela son células esféricas a subesféricas con un solo cloroplasto parietal que llena casi por completo la célula. Las células tienen un diámetro de 2 a 10 <math>\mu\text{m}</math>. Comunes en aguas ricas en nutrientes, pero fácilmente pasan desapercibidas debido a su pequeño tamaño.</p> <p>(Bellinger y Sigee, 2010)</p>		

**Anexo L**

*Clorosis en hojas de plantas con ausencia de fertilización.*



**Anexo M**

*Presencia de mosca blanca en el cultivo*



**Anexo N**

*Paraheliotropismo en las hojas de frijol debido al exceso de irradiancia*



### Anexo O

#### *Biomasa microalgal total aplicada según la dosis de microalgas*

Lote	Concentración de biomasa microalgal (mg/L)	Volumen aplicado D1 (ml/aplicación)	Volumen aplicado D2 (ml/aplicación)	Biomasa microalgal aplicada D1 (mg)	Biomasa microalgal aplicada D2 (mg)
Lote 1	134.61	50	200	6.7	26.9
Lote 2	191.46	50	200	9.6	38.3
Lote 3	137.495	50	200	6.9	27.5
Lote 4	93.85	50	200	4.7	18.8
Total				28	111
Incremento porcentual entre dosis				400%	

**Anexo P**

*Aborto de flores debido a las altas temperaturas en el invernadero*



**Anexo Q**

*Vainas deformes o vacías y granos de tamaños irregulares encontrados en la cosecha*



## Anexo R

*Resultado de análisis de suelos antes y después del experimento*

Sustrato	pH	C.O. (%)			N <sub>total</sub>	Saturación de bases (%)				mg kg <sup>-1</sup>		cmol <sub>(+)</sub>
		C.O.	M.O.			Ca	Mg	K	Na	P	CICE	
Suelo lote Vega 2 y 3	5.52	1.14	1.97	0.1	70.73	12.53	16.27	0.48	26	8.3		
Control	5.57	1.02	1.76	0.09	74.27	10.23	11.34	4.16	13	7.52		
Biol	5.58	0.89	1.54	0.08	71.12	10.99	13.99	3.9	23	7.78		
Microalgas D1	5.62	0.93	1.6	0.08	71.53	11.38	11.33	5.75	12	8.11		
Microalgas D2	5.91	0.6	1.04	0.05	71.53	9.48	10.85	9.12	13	8.11		
Biol + Microalgas D1	5.65	0.89	1.54	0.08	70.81	9.44	14.22	5.53	23	7.55		
Biol + Microalgas D2	5.61	0.97	1.67	0.08	67.9	9.85	12.47	9.79	23	8.66		
Rango medio establecido por el laboratorio de suelos		1.2	2	0.1	55	15	3		13	10		
		2.3	4	0.2	70	20	5	<5	30	20		