

# Biotechnología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional

## Microalgal biotechnology in Costa Rica: Business opportunities to the national productive sector

Fabián Villalta-Romero<sup>1</sup>, Francinie Murillo-Vega<sup>2</sup>, Bernal Martínez-Gutiérrez<sup>3</sup>, Johnny Valverde-Cerdas<sup>4</sup>, Andrés Sánchez-Kopper<sup>5</sup>, Maritza Guerrero-Barrantes<sup>6</sup>

Villalta-Romero, F; Murillo-Vega, F; Martínez-Gutiérrez, B; Valverde-Cerdas, J; Sánchez-Kopper, A; Guerrero-Barrantes, M. Biotechnología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 85-93.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4634>

- 1 Químico. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: fvillalta@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0001-7484-8125>
- 2 Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: frmurillo@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-2751-8390>
- 3 Administrador de Empresas. Escuela de Administración de Empresas, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: bmartinez@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-0436-5229>
- 4 Químico. Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: jovalverde@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-2192-5144>
- 5 Químico. Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: ansanchez@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-8469-4366>
- 6 Bióloga. Escuela de Biología Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: mguerrero@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-8253-5919>





## Palabra clave

Microalgas; biorremediación; biofertilizantes; alimento animal.

## Resumen

La biotecnología microalgal se presenta como una oportunidad de mercado para el sector productivo costarricense. En esta revisión se detallarán algunos aspectos de los potenciales y limitaciones que tiene este sector de la biotecnología para nuestra región. La visualización de este potencial se remonta a más de una década, en donde en el Centro de Investigación en Biotecnología se dio inicio con el proceso de selección y conservación de cepas de microalgas nativas y su escalamiento. Se describirá brevemente algunos sistemas de cultivo de microalgas y de procesamiento, que pueden ser destinadas para diferentes mercados, entre los que se destaca la alimentación de humanos y animales, biofertilizantes, tratamiento de aguas, captura de CO<sub>2</sub> y la generación de metabolitos de alto valor. Paralelamente, se ha avanzado en la generación de protocolos para el escalamiento de las microalgas mediante la formulación de medios orgánicos con residuos agroindustriales. También se ha desarrollado el cultivo en diferentes zonas del territorio costarricense, mostrando la posibilidad de adaptación en diferentes regiones climáticas.

## Keywords

Microalgae; bioremediation; biofertilizer; animal feed.

## Abstract

Microalgal biotechnology is presented as a market opportunity for the productive sector. In this review some aspects of the potential and limitations of this biotechnology sector for our region will be detailed. The visualization of this potential goes back more than a decade when the Biotechnology Research Center began the process of selecting and preserving native microalgae strains, and scaling-up their biomass. We will briefly describe some microalgae cultivation and microalgal biomass processing systems that can be used for different markets, including the feeding of humans and animals, biofertilizers, water treatment, CO<sub>2</sub> capture and the generation of metabolites of high value. At the same time, progress has been made in the generation of protocols for the scaling of microalgae through the formulation of organic media with agroindustrial residues such as dairy manure, sugar cane, vinasse, pig manure and chicken manure. Cultivation has also been developed in different areas of the Costa Rican territory, showing the possibility for adaptation in different climatic regions.

## Introducción

Las microalgas son un amplio grupo de organismos procariotas y eucariotas, que poseen la habilidad de realizar fotosíntesis, capaces de convertir la energía lumínica y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en biomasa de alto valor. El potencial que ofrecen las microalgas puede ser aprovechado para su uso como herramienta de la biotecnología ambiental, especialmente en los campos de la bioenergía [1], biorremediación [2], captura de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) [3], tratamiento de aguas residuales, pudiendo ser aprovechada para eliminar metales pesados [4] y algunos contaminantes emergentes [5], [6], [7].

Las microalgas representan un formidable recurso gracias a la enorme gama de sustancias bioquímicas valiosas y novedosas para generar investigaciones y productos en las industrias alimentaria, agrícola y farmacéutica [8], [9], [10]. El mercado de estas aplicaciones sigue emergiendo, y se han abierto nuevas áreas de investigación en biotecnología microalgal para satisfacer las nuevas demandas de productos de la industria y los consumidores [10].

Por ejemplo, en los últimos 15 años, China se ha convertido en el principal productor de biomasa de microalgas en el mundo. La espirulina (*Arthrospira sp.*) es el producto microalgal más importante por tonelaje y valor, seguido de *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.* y *Haematococcus sp.*, las cuatro principales microalgas cultivadas comercialmente. La producción de China se estima en alrededor de dos tercios de la biomasa mundial de microalgas, de los cuales aproximadamente 90% se vende para consumo humano como productos nutracéuticos, con mercados más pequeños en piensos principalmente para la acuicultura marina [11].

La posibilidad de usar aguas de baja calidad y el hecho de que no se necesita tierra fértil para su cultivo [12], las convierte en una opción que no compite con la soberanía alimentaria. Sin embargo, la relación costo/eficiencia de los actuales sistemas de producción han reservado la biomasa microalgal principalmente para aplicaciones de alto valor en salud, cosmética, nutracéuticos, alimentos humanos y la acuicultura [9].

La maximización de la producción y la minimización de costos son los temas más importantes para todos los involucrados en el cultivo de algas, para tal fin, se han implementado medios de cultivo alternativos basados en fertilizantes inorgánicos (NPK) [13]. El aporte nutricional es una herramienta primordial en el mantenimiento y el desarrollo de los cultivos microalgales; la selección del medio de cultivo adecuado para la microalga que se desea cultivar es un factor clave de éxito en aplicaciones industriales [14].

Los fertilizantes inorgánicos son simples y se pueden utilizar como medio alternativo para el cultivo microalgas, se disuelven fácilmente, tienen una composición definida y mantienen un pH moderado en el medio [15]. Sin embargo, al ser productos no renovables y con un costo considerable, no ha sido factible cultivar microalgas en altos volúmenes para aplicaciones bioenergéticas, biofertilizantes o como alimento animal. Además, varios países incluyendo Costa Rica están buscando limitar la utilización de estos químicos con el fin de reducir la huella de carbono y el impacto ambiental.

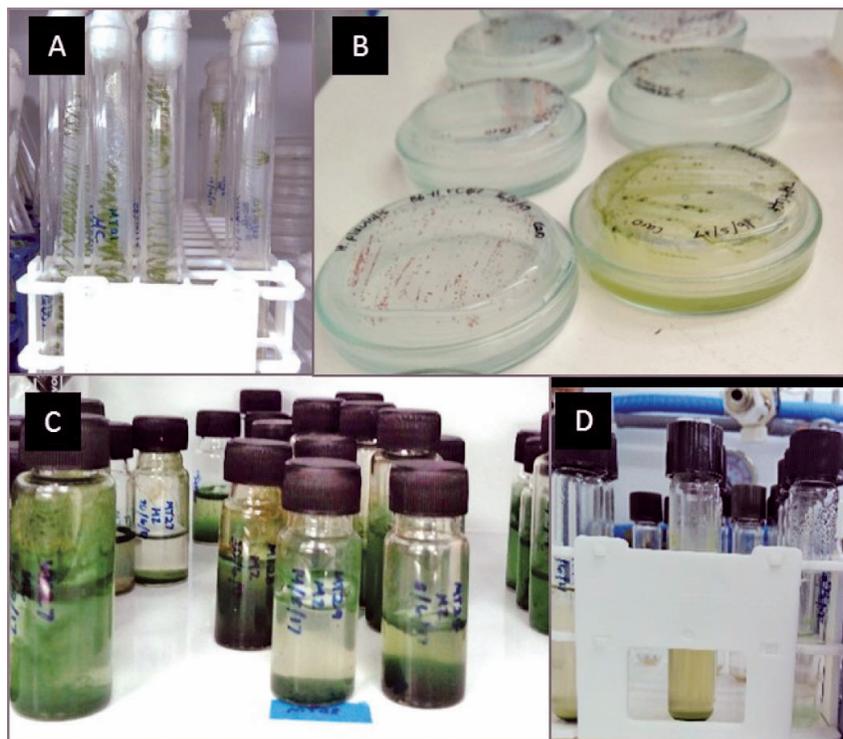
Una alternativa a los fertilizantes inorgánicos son los subproductos de los sustratos orgánicos de la agroindustria; su composición química proporciona una alternativa de fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, oligoelementos y otros nutrientes. El crecimiento de las microalgas en el agua residual de la industria alimentaria se ha establecido como una alternativa tecnológica viable, y reduce el alto costo de tratamiento del agua para la empresa, como la de palmito [16]. Por lo tanto, la reutilización de estas aguas contribuye en la utilización eficiente de los residuos, generando una biomasa con alto potencial económico. Además, se contribuye con la captura de dióxido de carbono y la producción de oxígeno; a su vez, esto permite reducir del impacto ambiental y por ende a mejorar las evaluaciones ambientales en las industrias [17].

Otras ventajas que ofrecen las microalgas serían su capacidad de crecer en tierras áridas no productivas, en aguas salinas y en aguas residuales domésticas e industriales y, por consiguiente, no compiten con los sistemas convencionales cultivados en tierras agrícolas, por lo tanto, no representan una amenaza para la seguridad alimentaria [18].

Las biomásas de microalgas pueden cumplir los requisitos nutricionales de aves, cerdos, ganado, peces y humanos. La composición bioquímica de las microalgas (vitaminas, minerales, ácidos grasos y antioxidantes) puede ser considerada como un alimento funcional, ya que complementan la función nutritiva y ayudan a la prevención de ciertas enfermedades.

## Colección de cepas

Para potencializar la biotecnología microalgal en Costa Rica se procedió a establecer una colección de cepas de microalgas nacionales. Las colecciones de cepas son depósitos de biodiversidad que permiten resguardar material biológico en forma viable, pura y estable. Las colecciones más grandes del mundo se encuentran en USA, Reino Unido, Japón, Alemania, Francia y Australia (UTEX, CCAP, NIES, SAG, Roscoff y CSIRO); sin embargo, en todo el mundo existen colecciones más pequeñas y que no tienen gran visualización internacional, pero que representan un patrimonio biológico único para estudios de ciencia básica y aplicada. El Grupo de Investigación Microalgal del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) inició la investigación con microalgas desde el 2007 y se vio la necesidad de crear una estructura tecnológica y logística para el resguardo de las especies de microalgas autóctonas. Actualmente se cuenta con más de 60 cepas aisladas de distintos ambientes, registradas ante la oficina de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO). Se desarrollaron protocolos de conservación a corto plazo y largo plazo (figura 1) por criogénesis y se han identificado morfológicamente unas 40 cepas hasta nivel de familia; de estas microalgas, un total de 24 cepas fueron seleccionadas para hacer la identificación molecular empleando el gen del ADNr 18S. A partir de los análisis de secuencias de amplificación se logró determinar que de las cepas pertenecen a la clase Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Prymnesiophyceae y Cyanidiophyceae [19], en muchas de las cuales se han descubierto interesantes propiedades que las hacen muy atractivas para su uso a nivel comercial y permite el estudio en ciencia básica como aplicada, contribuyen al conocimiento, valoración, conservación y uso sustentable de estos interesantes recursos biológicos.



**Figura 1.** Respaldo de cepas microalgales en medio semisólido y líquido, tanto a temperatura ambiente como a baja temperatura. A). Agar inclinado a baja temperatura, B). Placas de agar a temperatura ambiente, C). Respaldo líquido a baja temperatura, D). Respaldo líquido

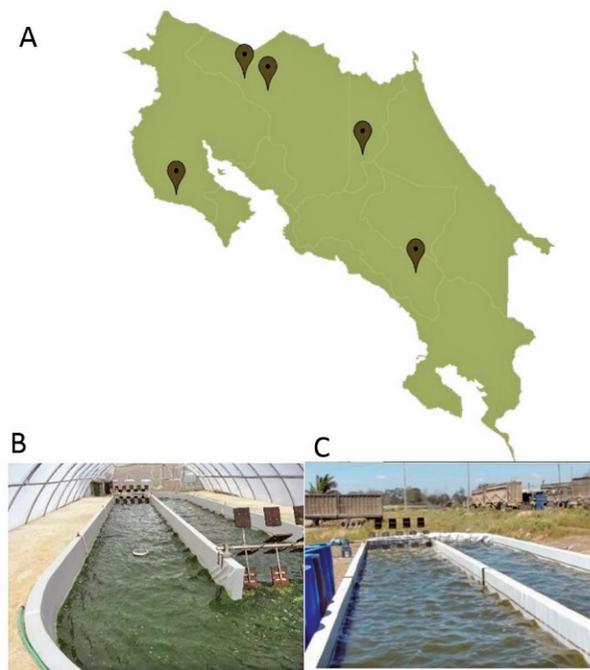
## Escalamiento de cultivos

### Fotobiorreactores cerrados

Los cultivos microalgales se realizan en sistemas acuáticos llamados biorreactores y pueden ser cerrados o abiertos. Dentro de los sistemas cerrados, usualmente se emplean las cámaras de microalgas que consisten en sistemas a pequeña escala donde se realiza el escalamiento para aumentar su volumen. Estos pueden ser diversos en formas y tamaños, desde tubos de ensayo, Erlenmeyer a botellas de plástico (PET). Bajo estas condiciones la temperatura, luz, agitación, etc., se mantienen controladas. Los fotobiorreactores, son sistemas cerrados que permiten realizar cultivos microalgales con la mayor producción y mayor control de la mayoría de los parámetros de crecimiento (temperatura, CO<sub>2</sub>, pH, etc.), y se reducen el riesgo de contaminaciones y las pérdidas de CO<sub>2</sub>.

A pesar de la complejidad de cultivar a intemperie, con adecuadas prácticas de manejo se ha logrado desarrollar cultivos microalgales hasta volúmenes de 40.000 L en Costa Rica [17], adaptándolas a diferentes residuos agroindustriales y a diferentes condiciones climáticas. Esta experiencia ha permitido poder desarrollar un *know-how* TEC que tiene un valor económico, ambiental y social muy importante para su posterior transferencia de la tecnología desarrollada al Sector Productivo.

Los sistemas de cultivo en reactores abiertos tipo *Raceways* o canales poseen un sistema de agitación mediante paletas o hélices, y pueden alcanzar 40 cm de profundidad en el CIB (figura 2), superando los estándares internacionales que usan menos profundidad. El suelo y paredes suelen estar recubiertos por una geomembrana. Algunas limitaciones son el mantenimiento de cultivos monoalgales, por lo que su empleo a gran escala se ha limitado a ciertas cepas de crecimiento vigoroso en medios selectivos y resistentes a condiciones de intemperie.



**Figura 2.** A) Localización de estanques de cultivos de microalgas en Costa Rica. B) Cultivo de microalgas en sistema Raceway en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. C) Cultivo de microalgas en sistema Raceway en el Hacienda El Viejo en Guanacaste.

## Aplicaciones

### Biofertilizantes

Las microalgas han sido objeto de estudio por parte del sector académico y la industria para lograr el desarrollo y la innovación (I+D+i) de nuevos productos en el sector agrícola, especialmente en el diseño de nuevas formulaciones de biofertilizantes [20], [21], [22]. El potencial del uso de las biomásas microalgales como biofertilizantes radica en que contienen altos niveles de micronutrientes y macronutrientes esenciales, así como algunos reguladores de crecimiento, poliaminas, enzimas, hidratos de carbono naturales, proteínas y vitaminas que tienen un efecto favorable en el crecimiento vegetativo, en el estado nutricional de las plantas y el rendimiento de los cultivos. Algunas investigaciones han mostrado que la aplicación de formulaciones de biofertilizantes microalgales en semillas de arroz acelera el proceso de germinación y el crecimiento de las plántulas; este mismo efecto se ha reportado para las semillas de tomate y trigo [23].

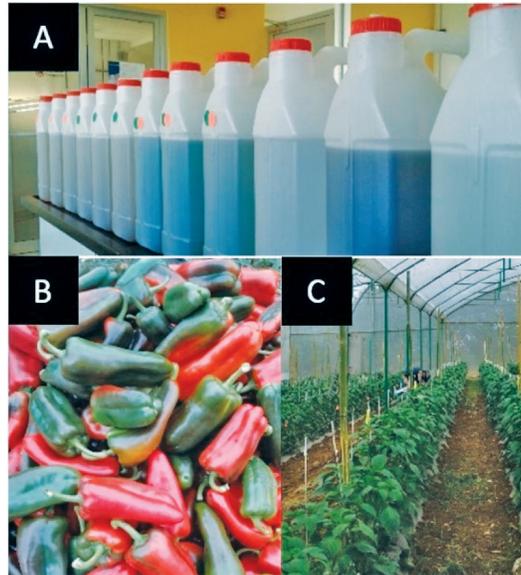
Por otra parte, la aplicación de biofertilizantes microalgales contribuye en el aporte de materia orgánica, reducción del contenido de materia oxidable de la tierra, oxigenación de la rizósfera sumergida, control de la salinidad y el pH, solubiliza los fosfatos, y aumentan la eficiencia del uso de fertilizantes [24].

A pesar de los múltiples beneficios del uso de las microalgas como biofertilizantes, es necesario una adecuada formulación para hacer más eficiente la asimilación de los nutrientes por la planta. Una estrategia ampliamente usada es el empleo de surfactantes como adyuvantes para facilitar la acción de las otras moléculas. Estos permiten reducir el tamaño de las gotas, aumentar la adhesión en la planta y facilitan la movilidad de las moléculas por la cutícula [25], [26], [27], [28].

Con las investigaciones desarrolladas se pretende continuar con los avances alcanzados en el desarrollo de productos de potencial biotecnológico con cepas de microalgas nativas de Costa Rica (figura 3), disponibles en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

### Alimentos para animales

Los perfiles nutricionales de las microalgas se caracterizan por altos contenidos de proteína, carbohidratos y lípidos funcionales por lo que, generalmente, el contenido nutricional en microalgas es superior a los piensos convencionales. La proteína se considera el nutriente más caro en la alimentación animal, siendo la soja el grano que aporta la mayor porción a nivel proteico en piensos animales, y se prevé que su precio seguirá aumentando, lo que conlleva un efecto económico negativo en los productores agropecuarios del país. Un aporte para solucionar la problemática actual es el desarrollo de alternativas orgánicas a base de microalgas como sustituto parcial a la harina de soja. La biomasa obtenida de la microalga *Arthrospira sp.* contiene altas cantidades de proteínas, entre 55 y 70% del peso seco y se ha demostrado que genera beneficios en las dietas animales, aumentando en muchos casos la productividad. Por su parte, las microalgas del género *Isochrysis galbana* se caracterizan por su alto contenido lipídico en donde predominan algunos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como los omega-3, que actúan a nivel neurológico y cardiovascular por lo que constituyen un alimento funcional de alto potencial. Además, estas microalgas poseen micronutrientes, antioxidantes, vitaminas, minerales, y ficonutrientes, por lo que su aporte en las dietas no solo se limita a proteínas y lípidos, sino que constituye una fuente integral de otros nutrientes. Haciendo uso de la infraestructura y conocimiento generado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) se ha desarrollado el cultivo de estas microalgas que presentan un mayor potencial como suplemento en piensos, donde se han iniciado los primeros ensayos en la formulación de piensos para gallinas y cerdos.



**Figura 3** A) Formulación de biofertilizantes a base de microalgas costarricenses. B) Chiles tratados con los Biofertilizantes a base de microalgas costarricenses. C) Cultivo de Chile dulce tratado con Biofertilizantes a base de microalgas.

### Flujos metabólicos

El análisis de rutas metabólicas es una herramienta que permite la caracterización de cepas en sus potenciales de producción. El análisis de flujos metabólicos basado en marcación con  $^{13}\text{C}$  permite evaluar la dirección hacia la cual el metabolismo fotoautotrófico de cepas específicas de microalgas está dirigido. Con estos análisis es posible descubrir cuellos de botella en las rutas metabólicas y elucidar mecanismos de regulación del sistema, permitiendo determinar posibles objetivos para realizar ingeniería metabólica o modificaciones en las estrategias de cultivo que favorezcan la formación de un producto determinado. Para cultivos controlados en fotobioreactores se realiza la incorporación de un marcaje de  $^{13}\text{C}$  mediante la adición de  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  al medio de cultivo. La toma de muestras sucesiva después de la adición hace posible observar cómo se incorpora el  $^{13}\text{C}$  en los metabolitos intracelulares mediante el análisis de extractos por espectrometría de masas. Mediante un modelo matemático que toma en cuenta la rapidez de producción de moléculas marcadas y con la información de la ruta metabólica, se calcula para cada paso del metabolismo central el flujo de cada ruta metabólica. Esta investigación nos permitirá mejorar modelos para la producción de aceites, proteínas, pigmentos y otros metabolitos con propiedades industriales.

### Transferencia tecnológica y estudios económicos

El Laboratorio de Microalgas del CIB (TEC) cuenta con más de 10 años de experiencia en la investigación y desarrollo aplicada a la biotecnología de las microalgas, desarrollando con éxito ensayos de cultivo de estos organismos en su laboratorio en Cartago, y diferentes zonas del país. Durante este periodo se ha desarrollado un paquete tecnológico de producción de microalgas, con alto contenido proteico y lipídico (25% de aceites, 29% de proteína y 19% de carbohidratos) convirtiendo ésta en un producto adecuado para ser implementado en las dietas animales. Por tanto, se está desarrollando un modelo de transferencia de tecnología hacia el sector productivo animal y, de esta manera, contribuir con la reducción de los altos costos de importación de materias primas como la soja. En la actualidad el proyecto ha iniciado un proceso de transferencia del paquete tecnológico con el sector productor, en el año 2017 se firmó el contrato de Transferencia con la Empresa del Grupo Zamora, quienes están interesados en sustituir parcialmente la soja con microalgas.

## Estudios económicos

Es indispensable para el crecimiento socioeconómico de Costa Rica enfocar esfuerzos para disminuir la pobreza en zonas rurales, y esto se lograría a través de la generación de empleos de calidad. La industria de microalgas podría traer más inversiones públicas y privadas a las zonas rurales, generar empleo adicional e ingresos para los agricultores, productores pecuarios y las personas sin terrenos. La capacidad de las microalgas para ser cultivadas en tierras subutilizadas aumenta los potenciales impactos rurales en comparación con otros sistemas productivos. La producción de microalgas en pequeña escala podría ofrecer nuevas oportunidades de empleo, que se verían reflejados de dos maneras: directo (trabajadores de la planta, operadores y sus familias) e indirecto (educación, desarrollo de infraestructura y la estimulación global de la economía local a través de inversiones) [29].

Se ha evaluado la factibilidad económica, legal, ambiental y financiera para la instalación de empresas productoras de alimento animal y biofertilizantes a base de microalgas cultivadas de forma orgánica en Costa Rica y se ha obtenido en ambos casos factibilidad de los proyectos, en un periodo de 5 años, mediante financiamiento, a escalas de cultivo de entre 5 a 13 ha, lo que evidencia el valor generado a partir de la investigación en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. La inversión inicial ronda los 900.000 dólares debido a la base altamente tecnológica que requieren empresas de tipo biotecnológicas; sin embargo, es completamente factible la inversión en estos proyectos bioindustriales, que actualmente vendrían a generar empleo y materias primas para la alimentación animal y sector agro nacional.

## Conclusiones

La biotecnología microalgal se presenta como una oportunidad para la generación de una industria productiva que atienda las necesidades del país y contribuya con la economía nacional, principalmente en los ámbitos económicos, sociales y ambientales. Esta puede ser integrada a diversos procesos agroindustriales para la obtención de productos de alto valor agregado a partir de fuentes de residuos que no se han aprovechado.

## Referencias

- [1] M. Singh, R. Shukla and K. Das, "Harvesting of microalgal biomass," *Biotechnological Applications of Microalgae*, pp. 77-88, 2013.
- [2] L. Bulgariu and M. Gavrilescu, "Bioremediation of heavy metals by microalgae," Boston: Academic Press pp. 457-469, 2015
- [3] A.Y. Shekh, P. Shrivastava, K. Krishnamurthi, S.N. Mudliar, S.S. Devi, G.S. Kanade, S.K. Lokhande and T. Chakrabarti, "Stress-induced lipids are unsuitable as a direct biodiesel feedstock: a case study with *Chlorella pyrenoidosa*," *Bioresour.Technol.*, vol. 138, pp. 382-386, 2009.
- [4] Rawat, R.R. Kumar, T. Mutanda and F. Bux, "Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production," *Appl.Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3411-3424, 2011
- [5] de Wilt, A. Butkovskiy, K. Tuantet, L.H. Leal, T.V. Fernandes, A. Langenhoff and G. Zeeman, "Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams," *J.Hazard.Mater.*, vol. 304, pp. 84-92, 2016.
- [6] F. Peng, G. Ying, B. Yang, S. Liu, H. Lai, Y. Liu, Z. Chen and G. Zhou, "Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): transformation kinetics and products identification," *Chemosphere*, vol. 95, pp. 581-588, 2014.
- [7] J. Xiong, M.B. Kurade and B. Jeon, "Can microalgae remove pharmaceutical contaminants from water?" *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 1, pp. 30-44, 2018.

- [8] F. Bux, "Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value-added products," Boca Raton, FL: CRC Press, 2013
- [9] Hernández-Pérez and J.I. Labbé, "Microalgas, cultivo y beneficios," *Revista de biología marina y oceanografía*, vol. 49, no. 2, pp. 157-173, 2014.
- [10] O. Pulz and W. Gross, "Valuable products from biotechnology of microalgae," *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, vol. 65, no. 6, pp. 635-648, 2004.
- [11] J. Chen, Y. Wang, J.R. Benemann, X. Zhang, H. Hu and S. Qin, "Microalgal industry in China: challenges and prospects," *J.Appl.Phycol.*, vol. 28, no. 2, pp. 715-725, 2016.
- [12] F.G. Acién, J.M. Fernández, J.J. Magán and E. Molina, "Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it," *Biotechnol.Adv.*, vol. 30, no. 6, pp. 1344-1353, 2012.
- [13] L.H. Sipaúba-Tavares, F.A. Berchielli-Morais and B. Scardoeli-Truzzi, "Growth of Haematococcus pluvialis Flotow in alternative media," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 75, pp. 796-806, 2013
- [14] D. James, "Culturing algae". 2014. [Online] Obtenido de <http://catalog.hathitrust.org/Record/009847709>. [Accesado 1 feb, 2019]
- [15] L.H. Sipaúba Tavares, Maria Donadon Lusser Segali, Alexandra and B. Scardoelli-Truzzi, "Aquatic Plants: Alternative Medium for Microalgae growth," *Annals of Aquaculture and Research*, 2015.
- [16] J. Mora-Urpi, and J. Gainza-Echeverría, "*Palmito de pejobaye (bactris gasipaes kunth): Su cultivo e industrialización*," San Jose: Editorial Universidad de Costa Rica, 1999
- [17] Carrasquilla-Batista, A. Chacón-Rodríguez, F. Murillo-Vega, K. Niiñez-Montero, O. Goomez-Espinoza and M. Guerrero-Barrantes, "Characterization of biomass pellets from *Chlorella vulgaris* microalgal production using industrial wastewater," pp. 1-6, 2017.
- [18] Guerrero-Barrantes, "Desarrollan sistema integrado para la producción de microalgas acoplado a un biodigestor ya un emisor de CO<sub>2</sub>," *Investiga. TEC*, vol.19, pp. 21-21, 2014
- [19] O. Gomez-Espinoza, M. Guerrero-Barrantes, K. Meneses-Montero and K. Núñez-Montero, "Identification of a Microalgae Collection Isolated from Costa Rica by 18S rDNA Sequencing," *Acta Biológica Colombiana*, vol. 23, no. 2, pp. 199-204, 2018.
- [20] J. Coppens, O. Grunert, S. Van Den Hende, N. Boon, G. Haesaert and L. De Gelder, "The application of microalgae as a slow-release fertilizer: tomato cultivation as a model," pp. 19, 2015
- [21] J. Coppens, O. Grunert, S. Van Den Hende, I. Vanhoutte, N. Boon, G. Haesaert and L. De Gelder, "The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels," *J.Appl.Phycol.*, vol. 28, no. 4, pp. 2367-2377, 2016.
- [22] S. Zhang, L. Wang, W. Wei, J. Hu, S. Mei, Q. Zhao and Y.F. Tsang, "Enhanced roles of biochar and organic fertilizer in microalgae for soil carbon sink," *Biodegradation*, pp. 1-9, 2018.
- [23] J. Garcia-Gonzalez and M. Sommerfeld, "Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*," *J.Appl.Phycol.*, vol. 28, no. 2, pp. 1051-1061, 2016.
- [24] O. Uysal, F.O. Uysal and K. Ekinici, "Evaluation of microalgae as microbial fertilizer," *European Journal of Sustainable Development*, vol. 4, no. 2, pp. 77-82, 2015.
- [25] Fagerström, "Effects of surfactant adjuvants on plant leaf cuticle barrier properties," Ph.D. dissertation Faculty of Health and Society, Malmö University, Sweden, 2014
- [26] L. Schreiber and J. Schonherr, "Water and solute permeability of plant cuticles," Berlin: Springer, 2009
- [27] J. Frelichowska, M. Bolzinger and Y. Chevalier, "Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions," *J.Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 2, pp. 348-356, 2010.
- [28] J.O. Zoppe, R.A. Venditti and O.J. Rojas, "Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes," *J.Colloid Interface Sci.*, vol. 369, no. 1, pp. 202-209, 2012.
- [29] E. Hytönen, A. Jussila and S. Kuusikunnas, "Algal energy roadmap in India: Opportunities for Finnish industries and SMEs," Finland: VTT Technical Research Centre of Finland, 2014.