

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**USO DE LIXIVIADO PARA LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE ARTHROSPIRA
MAXIMA Y SU APLICACIÓN COMO BIOESTIMULANTE EN *Lactuca sativa* L.,
Cucumis sativus L. y *Solanum lycopersicum* L.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

PRESENTA

M.C. KATTY SHCARLEN HERNÁNDEZ GAYTÁN

General Escobedo, N.L.

Junio de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**USO DE LIXIVIADO PARA LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE ARTHROSPIRA
MAXIMA Y SU APLICACIÓN COMO BIOESTIMULANTE EN *Lactuca sativa* L.,
Cucumis sativus L. y *Solanum lycopersicum* L.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

P R E S E N T A

M.C. KATTY SHCARLEN HERNÁNDEZ GAYTÁN

General Escobedo, N.L.

Junio de 2023

**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

COMITÉ PARTICULAR

Dr. Celestino García Gómez

Director de Tesis

Dr. Fernando de Jesús Carballo Méndez

Co-director

Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy

Asesor Auxiliar

Dra. Julia Mariana Márquez Reyes

Asesor Auxiliar

Dr. Santiago Iván Suárez Vázquez

Asesor Auxiliar

DEDICTORIA

A mis padres Idalia Gaytán Ramírez y José Hernández Acosta, por haberme criado con tanto amor y confianza en mí. Mis logros siempre serán también de ustedes, lo que soy ahora es gracia a ustedes. Los amo mucho.

A mis hermanos Kassandra Hernández Gaytán y Kalel Hernández Gaytán por su apoyo siempre incondicional, por lograr una sonrisa en cada momento que pasamos juntos. Los amo mucho, mucho.

A mi esposo Christian Sánchez Llanes por el apoyo constante y no dejarme vencer, por creer en mí, incluso más que yo. Te agradezco el estar conmigo durante esta etapa, difícil pero grata. Te amo para siempre.

A mi hermosa hija Sofia Sánchez Hernández por ser siempre mi inspiración, mi musa, mi todo. Gracias por tu valiosa comprensión, por no estar molesta si pasaba horas lejos de ti y entender el porqué. Gracias por ayudarme a terminar este proyecto, literalmente, con tus bellas manitas pasando datos a una hoja de Excel, cuando estaba agotada. Te amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Celestino García Gómez por el apoyo brindado durante todo este proyecto, por no limitarme en nuevas ideas y alentarme a lograrlo todo.

Gracias al Dr. Fernando de Jesús Carballo Méndez por el apoyo aún y cuando todavía no era parte de todo esto, siempre estaré eternamente agradecida por eso. Gracias por todo su tiempo dedicado.

A la Dra. Mariana Márquez Reyes, Dra. Rocío Chávez Santoscoy y al Dr. Santiago Suárez Vázquez por formar parte de este comité y brindarme todo su apoyo. Al Dr. Humberto Rodríguez Fuentes por el apoyo durante el proyecto.

A la M.C. Judith Soto Cuevas mi amigalga, por tu apoyo durante todo este proyecto, por ser mis manos y mis ojos cuando no podía estar ahí. Gracias por tu amistad.

A la Ing. Fernanda Valdez López por hacer las mañanas más amenas y las tardes divertidas. Por sacarme una sonrisa cuando la necesitaba y decirme si puedes. Te quiero.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pigmentos obtenidos de microorganismos fotosintéticos como microalgas, macroalgas y cianobacterias.	15
Figura 2. Representación del proceso de extracción de biomoléculas a partir de algas y cianobacterias.	30
Figura 3. Contenedor de desechos de frutas y verduras.	51
Figura 4. Diagrama del montaje de biorreactores.	53
Figura 5. Biomasa de <i>Arthrospira maxima</i> pulverizada.	58
Figura 6. Método por ultrasonicación, utilizando un sonotrodo (a) y método de congelación-descongelación (b).	58
Figura 7. Estructura de metal en el área de hidroponía.	61
Figura 8. Charolas de germinación con roca volcánica.	63
Figura 9. Semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	65
Figura 10. Liofilización de las plantas de lechuga.	66
Figura 11. Diagrama para la cuantificación de antioxidantes en lechuga.	67
Figura 12. Charola de poliestireno con perlita como sustrato.	69
Figura 13. Medición del crecimiento en (a) lechuga, (b) pepino y (c) tomate. ...	70
Figura 14. Extracción de antioxidantes en plantas de pepino y tomate.	71
Figura 15. Producción de biomasa de <i>Arthrospira maxima</i>	80
Figura 16. (a) Concentración de DQO, (b) reducción de DQO.	83
Figura 17. (a) Concentración de ortofosfatos, (b) Remoción de ortofosfatos.	84
Figura 18. (a) Evaluación de la distribución normal de los datos del tratamiento experimental para la producción de <i>Arthrospira maxima</i> , (b) gráfico de superficie de respuesta.	87
Figura 19. Porcentaje de contribución de los factores y sus interacciones.	89

Figura 20. Concentración de aminoácidos en los tratamientos de ruptura celular.	91
Figura 21. Micrografías SEM-EDS de <i>Arthrospira maxima</i> (a) control, (b) sin ruptura celular (c) con ruptura celular.....	92
Figura 22. Longitud de la parte aérea de las plantas de lechuga.....	96
Figura 23. Longitud de raíces de lechuga.	98
Figura 24. Peso fresco de las plantas de lechuga.	99
Figura 25. Peso seco de las plantas de lechuga.....	100
Figura 26. Gráfico de la curva de calibración para el ácido Clorogénico.	101
Figura 27. Gráfico de la curva de calibración para el ácido Cafeico.....	101
Figura 28. Longitud de plantas de pepino.....	109
Figura 29. Longitud de hojas de plantas de pepino	109
Figura 30. Peso fresco de plantas de pepino	110
Figura 31. Peso seco de plantas de pepino.....	111
Figura 32. Longitud de la parte área de las plantas de tomate.....	112
Figura 33. Longitud de las hojas de las plantas de tomate.....	113
Figura 34. Peso fresco de las plantas de tomate.....	114
Figura 35. Peso seco de las platas de tomate.	114

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Algas utilizadas como bioestimulantes en cultivos vegetales.....	24
Cuadro 2. Diseño experimental de los tratamientos en la producción de <i>Arthrospira maxima</i>	53
Cuadro 3. Composición de la solución nutritiva.....	62
Cuadro 4. Tratamientos en la producción de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	64
Cuadro 5. Tratamientos de la producción de pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.) y tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	69
Cuadro 6 Composición fisicoquímica del lixiviado.....	79
Cuadro 7. Producción de biomasa de <i>Arthrospira maxima</i>	81
Cuadro 8. Composición bioquímica de <i>Arthrospira maxima</i>	86
Cuadro 9. Matriz de diseño y resultados según el formato de optimización.	88
Cuadro 10. Porcentaje en peso (wt %, DE) de los elementos encontrados en la biomasa de <i>Arthrospira</i> control, <i>Arthrospira</i> sin ruptura celular y <i>Arthrospira</i> con ruptura celular (ultrasonicación).	94
Cuadro 11. Cuantificación de Ácido cafeico y Ácido clorogénico en plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	104
Cuadro 12. Parámetros agronómicos de semillas de lechuga.	106
Cuadro 13. Antioxidantes en plántulas de tomate.....	116
Cuadro 14. Antioxidantes en plántulas de pepino.....	116

RESUMEN

Al utilizar lixiviado de frutas y verduras en un 9% se logró una concentración de 4.88 g/L de *Arthrospira maxima*, mientras que el control alcanzó 3.51 g/L, además, la concentración de ortofosfatos y el consumo de la demanda química de oxígeno fue reducida, lo que convierte a la *Arthrospira* una fuente de remediación en el tratamiento de residuos tóxicos. Después de obtener el mejor tratamiento para la producción de biomasa a partir de algas se evaluaron dos métodos de ruptura celular para la cuantificación de aminoácidos libres y el grado de hidrólisis. El mejor tratamiento fue el T4m (4 min de ultrasonicación con 20 volts) con una concentración de 25 mg/g de aminoácidos libres, mientras que en el control (TBG) se obtuvo 13 mg/g, y en la biomasa de tipo comercial 7 mg/g sin romper la pared celular. Los tratamientos por el método de congelación-descongelación generaron entre 21 y 19 mg/g de aminoácidos libres, es decir, que la ultrasonicación fue el mejor método para romper la pared celular de *Arthrospira*, en términos de tiempo y consumo de energía. EL método de ultrasonicación por 4 min a 20 volts se aplicó a diferentes dosis de *Arthrospira* para su evaluación como bioestimulante en plantas y semillas de lechuga, además, de plántulas de pepino y tomate. Los parámetros para evaluar fueron longitud de

parte aérea, raíces y hojas, peso fresco y seco, además de índice de germinación. En todos los tratamientos se aplicó solución nutritiva (SN) en diferentes porcentajes. En las plantas de lechuga el mejor tratamiento para la longitud de la parte aérea fue el T100 y T75, con 21 y 20 cm, respectivamente, sin encontrar diferencia significativa, es decir, se disminuyó el consumo de la solución nutritiva del 25%. En la longitud de raíz el mejor tratamiento fue T75 con 18 cm, mientras que el control T0 y el T100 midieron 4 y 11 cm, esto debido a la aportación de las fitohormonas que contiene la *Arthrospira maxima*. Los tratamientos T100 y T75 con 20 g por planta en peso fresco para y 1.0 g por planta en peso seco, respectivamente, fueron los mejores para producción de biomasa.. El mayor índice de germinación en las semillas de lechuga fue para el T9 (50% SN-1.0 g/L *Arthrospira*) con 227.59 %, mientras que el T100 alcanzó el 101.72%, lo que indica que la *Arthrospira* impacta en la germinación de las semillas de lechuga de forma positiva. En las plántulas de pepino y tomate se encontró un comportamiento similar a la producción de lechuga, donde se logró reducir en algunos casos hasta un 25 % del consumo de la solución nutritiva.

ABSTRACT

By using 9% leachate from fruits and vegetables, a concentration of 4.88 g/L of *Arthrospira maxima* was achieved, while the control reached 3.51 g/L, in addition, the concentration of orthophosphates and the consumption of chemical oxygen demand were reduced, which makes *Arthrospira* a source of remediation in the treatment of toxic waste. After obtaining the best treatment for algae biomass production, two methods of cell disruption were evaluated for the quantification of free amino acids and the degree of hydrolysis. The best treatment was T4m (4 min ultrasonication with 20 volts) with a concentration of 25 mg/g of free amino acids, while in the control (TBG) 13 mg/g was obtained, and commercial type biomass 7 mg./g without breaking the cell wall. The treatments by the freeze-thaw method generated between 21 and 19 mg/g, that is, ultrasonication was the best method for the rupture of the *Arthrospira* cell wall, in terms of time and energy consumption. The ultrasonication method for 4 min at 20 volts was applied to different doses of *Arthrospira* for its evaluation as a biostimulant in lettuce plants and seeds, as well as cucumber and tomato seedlings. The parameters to evaluate were aerial part length, root length, fresh weight, dry weight, germination index and leaf length. Nutrient solution (NS) was applied in different percentages in all treatments. In lettuce plants, the best treatment for the length of the aerial part was T100 and T75, with 21 and 20 cm, respectively,

without finding a significant difference, that is, the consumption of the 25% nutrient solution was decreased. In root length, the best treatment was T75 with 18 cm, while the control T0 and T100 measured 4 and 11 cm, this due to the contribution of phytohormones contained in *Arthrospira maxima*. The highest fresh weight and dry weight were for treatments T100 and T75 with 20 g per plant in fresh weight and 1.0 g per plant in dry weight. The highest lettuce seed germination index was for T9 (50% SN-1.0 g/L *Arthrospira*) with 227.59 %, while T100 reached 101.72%, indicating that *Arthrospira* impacts the germination of lettuce, lettuce seeds in a positive way. In cucumber and tomato seedlings, a behavior similar to lettuce production was found, where it was possible to reduce in some cases up to 25 % of the consumption of the nutrient solution.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores desafíos al que se enfrenta la humanidad es encontrar el equilibrio entre el desarrollo de la tecnología y la sostenibilidad (Khoo et al., 2019). En este contexto, la agricultura actualmente está interesada en la generación y aplicación de bioestimulantes (Giorgos et al., 2014), debido a que la elaboración de los fertilizantes sintéticos como nitrógeno (N) y fósforo (P) requieren de mucha energía, además, de emitir gases tóxicos al ambiente (Froehlich 2013; Kool, A., Marinussen, M. & Blonk 2012).

Un bioestimulante es cualquier sustancia que mejora la eficacia ya sea de la asimilación o absorción de nutrientes, tolerancia al estrés ya sea biótico o abiótico, o alguna mejorar agronómica, todo esto independientemente de la cantidad de nutrientes que contenga la sustancia (García et al., 2017). Al paso del tiempo se han utilizado ampliamente los extractos como bioestimulantes en el crecimiento vegetal. Los extractos a partir de algas marinas son aplicados en la agricultura como bioestimulantes, ya que tienen la capacidad de aumentar el índice de germinación, el desarrollo de sistema radicular, número de brotes, área foliar,

número de hojas calidad del fruto, peso fresco y vigor (Rayorath et al., 2008; Sunarpi et al., 2010; Khan et al., 2009; Craigie, 2011; Babu y Rengasami, 2012; Mattner et al., 2013; ;Chbani et al., 2013; Layek et al., 2018; Vinoth et al., 2012a, b; Arioli et al., 2015; Vinoth et al., 2014; Prakash et al., 2018; Bharath et al., 2018;).

Utilizar extractos de algas es una alternativa viable para reemplazar los bioestimulantes sintéticos convencionales de la agricultura. Existen métodos que se basan en una extracción muy convencional con disolventes, diversos valores de pH o mediante una hidrólisis (Hernández-Herrera et al., 2016).

Las macro y microalgas son una fuente de compuestos naturales los cuales actúan como bioestimulante, debido a que contienen proteínas, carbohidratos, fitohormonas, terpenos y polifenoles, los cuales tienen la capacidad de mejorar el crecimiento en las plantas (du Jardin, 2015).

La forma en la que actúan los bioestimulantes en las plantas no es clara, ya que contienen un complejo conjunto de moléculas bioactivas. Es debido a esto que los extractos a partir de alga pueden llegar a causar efectos negativos y no solo positivos, lo cual está directamente relacionado con la concentración en que son aplicados a las plantas y a las semillas (Ertani *et al.*, 2018).

El mecanismo de los extractos no siempre es consistente entre las diversas especies de las plantas, es por eso que los umbrales de sensibilidad son diferentes (Colla *et al.*, 2015).

Las algas más utilizadas como bioestimulantes son el grupo de algas pardas, debido a su tamaño, composición química y abundancia (Khan *et al.*, 2009), sin embargo, existen bioestimulantes a partir de algas verdes y rojas (Hong *et al.*, 2007).

Un ejemplo de alga verde es la *Arthrospira maxima*, debido a su alto contenido de proteína, vitaminas, antioxidantes y minerales la convierte en una fuente de bioestimulantes. Contiene entre un 60 y 70 % de proteína de materia seca con alta biodisponibilidad, además, contiene vitaminas y ácidos grasos esenciales, fitohormonas, antioxidantes, polisacáridos y oligoelementos. También puede contener lípidos, xantofilas y clorofila a (Hong *et al.*, 2007).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MICROALGAS

Las algas son clasificadas principalmente por el ciclo de vida, pigmentación y estructura celular. Existen alrededor de 800 000 especies de algas, y se han estudiado 600 000. Debido al gran número de especies hay una gama muy amplia de posibles usos. Las algas se dividen en cuatro categorías según sus características morfológicas y su tamaño. La clasificación incluye algas unicelulares, multicelulares, coloniales y filamentosas, seguido de esta clasificación se dividen principalmente en dos grupos: macro y microalgas. Las macroalgas son organismos multicelulares, macroscópicos, con una longitud de hasta 65 m. Por otra parte, las microalgas alcanzan un tamaño desde 1 a 900 μm , son organismos fotosintéticos unicelulares y microscópicos. Pueden producirse en agua dulce como aguas residuales, lo que reduce su costo de producción. Las

especies de microalgas más comerciales son *Chlorella spp* y *Arthrospira spp* (Ronga et al., 2019).

Las algas tienen la capacidad de absorber la luz solar para realizar fotosíntesis, es decir, transforman la energía de la luz en energía química, capturando el CO₂ y liberando oxígeno (O₂). Debido a esto es que las algas se consideran los verdaderos pulmones de nuestro planeta, incluso por encima de la selva amazónica (Gaspar et al., 2020).

La biomasa producida a partir de las microalgas es utilizada en la producción de alimentos, combustibles y cultivos. El color de las macroalgas es muy variado, sin embargo, todas contienen clorofila, pigmento que le da la coloración verde a las plantas y se encuentra dentro de los cloroplastos. La coloración o pigmentación de un alga se debe a la combinación de los pigmentos fotosintéticos que están presentes en las células, es por ello que una clasificación de las algas es debido a su coloración (Figura 1) (Pererieia et al., 2015). Por ejemplo:

1. Las macroalgas rojas son pertenecientes al filo Rhodophyta, contienen clorofila a y algunos carotenoides como pigmentos fotosintéticos;

2. Las macroalgas verdes son incluidas en el filo Chlorophyta, y tienen una pigmentación idéntica a la de las plantas vasculares, es decir, carotenoides y clorofilas a y b;
3. Las macroalgas pardas pertenecen al filo Ochrophyta, y se agrupan en la clase Phaeophyceae, contiene pigmentos de carotenoides y clorofilas a y c, predominando Fucoxantina, lo que le da su color pardusco;
4. Por último, las macroalgas verdeazuladas incluidas en el filo Cianobacteria, sus pigmentos son debido a carotenoides, clorofila a, ficocianina y ficoeritrina (Pereira et al., 2015).

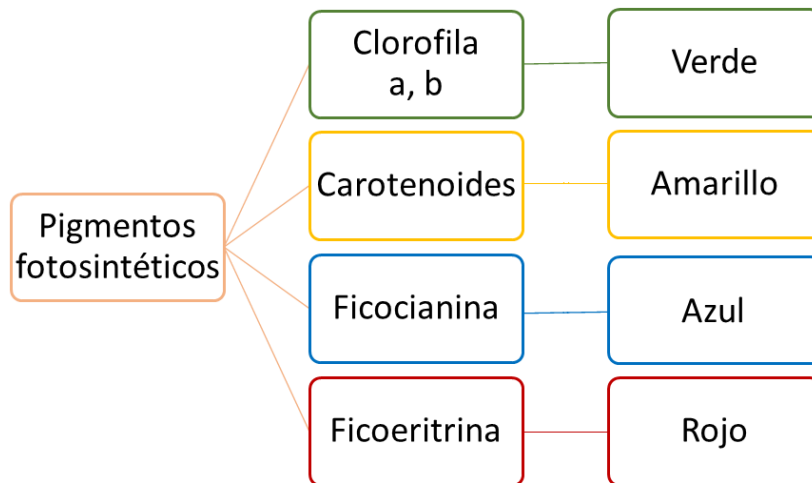


Figura 1. Pigmentos obtenidos de microorganismos fotosintéticos como microalgas, macroalgas y cianobacterias.

Las macro y microalgas tienen un alto valor comercial. China y Japón son los principales consumidores a nivel mundial. Las macroalgas se utilizan para

fines distintos ya sea como alimento, pienso, medicina, farmacéuticos y en la agricultura (Gaspar et al., 2020).

Desde los años 50 se han utilizado algas en la agricultura para obtener mayores rendimientos en cultivos, e incluso prevenían y trataban ciertas enfermedades. Por otro lado, la creciente demanda de alimentos debido al aumento de la población mundial lleva al uso de agroquímicos como los fertilizantes, buscando aumentar la producción, sin embargo, la mala utilización de los agroquímicos tiene como resultado la degradación de la capa fértil del suelo, la disminución de la biodiversidad e incluso ha eliminado a los depredadores naturales de las plagas (Battacharyya et al., 2015). La gran necesidad de proteger el medio ambiente nos ha llevado a buscar alternativas eficientes y de nula toxicidad hacia el mismo.

2.2 EFECTO DE BIOESTIMULANTES EN MATRICES DE SUELO Y PLANTAS

2.2.1 Efectos en el suelo

Dentro de la productividad de los cultivos, el suelo es fundamental ante la sequía y fuertes lluvias, sin embargo, las labores intensivas dentro de la agricultura

han ocasionado una preocupación, debido a la degradación del suelo, además de la liberación de nutrientes. La compactación, erosión y pérdida de materia orgánica en los suelos son los cambios que repercuten en las propiedades físicas y químicas, el estado en el que se encuentran los nutrientes y la estabilidad de los agregados. Existen indicadores clave de la calidad del suelo, que son los agregados estables al agua: (1) proteger la materia orgánica de la descomposición, (2) aumentar la capacidad de retener agua, (3) espacios porosos para la infiltración del agua y el crecimiento de las raíces, y (4) resistencia a la erosión, por último, evitar la formación de costra en la superficie, además de la lixiviación, lo que conlleva a la contaminación de agua subterránea. El agotamiento de la materia orgánica (MO) del suelo se debe a la intensidad con la que se ara el suelo, utilizando altas concentraciones de minerales. La MO se encarga de almacenar nutrientes y de mantener la estructura del suelo, lo que genera la pérdida de nutrientes en los cuerpos de agua. Este fenómeno se ha ido agravando debido a la erosión de la capa donde se encuentran los nutrientes. En países del reino unido existen tierras de cultivo continuo, esto conlleva a la pérdida de las partículas más finas como la MO. Debido a esto se genera una dependencia de los fertilizantes orgánicos, como los residuos vegetales, estiércol animal, biocarbón, entre otros. El uso del estiércol animal ha causado contaminación ecológica relacionada con los antibióticos de grado veterinario y metales como Cu y Zn. Utilizar los clásicos fertilizantes

químicos tiene ventajas financieras, sin embargo, presentan un riesgo toxicológico significativo que afecta a la salud humana y la integridad de la biota. Existen fuentes de fertilizantes alternativas que pueden aportar a las plantas micro y macronutrientes, además de beneficiar al suelo, una de ellas son las algas. Las algas se producen en cuerpos de agua y es estimulado por nutrientes minerales (Alobwede et al., 2019).

La fertilización a partir de biomasa de algas yace de las primeras civilizaciones. Lo que demuestra su importancia y lo benéfico que pueden llegar a ser en el área agrícola, el día de hoy se conoce que la biomasa algas modifica el pH del suelo al actuar como fijador de nitrógeno y fuentes de MO (Nekpavil et al., 2021). Las algas se han utilizado para enmendar el suelo, ya que aumenta hasta 6 veces más el contenido de nitrógeno, en comparación con el nitrógeno mineral (Mulbry et al., 2007).

Conforme aumenta la contaminación antropogénica aumenta la formación de algas, además se espera que el cambio climático agrave el problema. Una opción es cultivar y cosechar la biomasa de las microalgas, debido a que puede utilizarse como un fertilizante orgánico, aportando nutrientes y carbono al suelo e incluso mejorar el crecimiento y nutrición de los cultivos. La producción de alga

a gran escala ha ido aumentando en los últimos años para producir biocombustibles, alimento para animales y como removedor de nutrientes en el tratamiento de aguas residuales (Alobwede et al., 2019).

Aunque las aguas residuales contienen altos porcentajes de fósforo y nitrógeno no pueden utilizarse como riego, debido a que contiene contaminantes como antibióticos, analgésicos y antihipertensivos, lo que genera un riesgo en los cultivos y al medio ambiente (Avagyan, 2018). Esto abrió paso al desarrollo de fertilizantes a base de algas. Algunas especies de microalgas como *Arthrospira* y *Chlorella* son ampliamente utilizadas para la remoción de nutrientes (P y N) en el tratamiento de aguas residuales, lo que las vuelve una gran opción como acondicionadores de suelo, ya que se ha reportado que la *Arthrospira* mejora la disponibilidad de macronutrientes del suelo. La *Arthrospira* es una cianobacteria que contiene aminoácidos, carotenoides, xantofila y es una fuente natural de vitamina B12 (Alobwede et al., 2019).

Otras especies utilizadas como biofertilizantes son las especies *Ulva reticulata*, *Gelidium crinale*, *Turbina ornata*, *Brassic napus* y *Ulva Lactuca*. Se ha informado que las algunas algas marinas están compuestas por bioactivos y metabolitos secundarios que han demostrado ser efectivos contra nemátodos y fitopatógenos (Nekpavil et al., 2021).

2.2.2 Biocarbón como alternativa de mejorador de suelo

Por otro lado, la producción de la biomasa puede transformarse en biocarbón. El biocarbón es un sólido rico en carbono que se obtiene a partir de la pirolisis o carbonización. El biocarbón tiene la capacidad de mejorar la calidad del suelo y la productividad de los cultivos y, lo cual lo vuelve rentable. Se ha propuesto al biocarbón como una alternativa para acondicionar el suelo y mejorar la retención de humedad, la actividad microbiana, la disponibilidad de algunos nutrientes y la agregación del suelo. El biocarbón a partir de algas previene la pérdida de nutrientes debido a una lenta liberación principalmente de nitrógeno y fósforo. Además de aportar sustancias como aminoácidos, vitaminas y carotenoides que pueden mejorar la calidad en los frutos. El biocarbón puede mejorar propiedades fisicoquímicas del suelo, como el carbono residual, mejora el pH y la conductividad eléctrica y aumenta el nitrógeno. La interacción de la población microbiana del suelo y los metales tóxicos genera la mutagénesis, que son cambios en su funcionamiento y su genoma, sin embargo, se conoce que adicionar carbono como fuente de energía mantiene o mejora la abundancia microbiana del suelo, e incluso en suelos contaminados con metales. También se puede usar para la generación de energía y almacenamiento de carbono, lo que

impacta en disminuir el cambio climático al controlar la liberación de gases de efecto invernadero (Amin et al., 2016).

Recientemente se ha considerado utilizar el biocarbón como remediador de suelos contaminados por metales. Las bacterias son de suma importancia en los procesos biogeoquímicos del suelo, como la degradación de la materia orgánica. La aplicación de biocarbón en el suelo genera una abundancia de miembros del filo *Bacteroidetes*. Obtener una caracterización fisicoquímica completa del biocarbón, suele ser complicado, sin embargo, para el uso agrícola se conocen ciertos valores, por ejemplo, el contenido de carbono es superior al 50%, 1% de nitrógeno y 15% de fósforo. El biocarbón a partir de *Chlorella vulgaris* contiene 9.76 % de nitrógeno, 61.32 % de carbono, tiene un pH de 8.1 y un contenido de humedad de 3.81 % lo que es beneficioso para el suelo (Santos et al., 2018; Ahmad et al., 2016).

Evidentemente el biocarbón puede ser ampliamente utilizado para incrementar la calidad y la productividad del suelo agrícola, ya que repercute en las propiedades y funciones del suelo.

2.3 EFECTOS EN CULTIVOS

La demanda alimenticia lleva a la agricultura a buscar alternativas sin degradar el medio ambiente, buscando fertilizantes naturales sustituyendo los sintéticos. Los bioestimulantes, vitaminas, polisacáridos, fitohormonas, entre otros compuestos, son sustancias a partir de materiales naturales que promueve el crecimiento de las plantas (Supraja et al., 2020).

Los bioestimulantes tienen la capacidad de brindar una opción renovable para mejorar rendimientos en los cultivos, debido a que son amigables con el medio ambiente y permiten mayor absorción de fósforo, nitrógeno y potasio los cuales se aplican en grandes volúmenes (Kapoor et al., 2021), en cambio los bioestimulantes se aplican en pequeñas cantidades. Las macroalgas y microalgas son una fuente de biofertilizantes y bioestimulantes para producir cultivos, debido a que contienen lípidos, fitohormonas, polisacáridos y proteínas (Supraja et al., 2020).

Usar la biomasa a partir de algas como fertilizante ha sido implementada por España, Gran Bretaña, Francia y al este de Asia (China y Japón).

Recientemente los derivados de las algas han despertado un interés como bioestimulante (Nedumaran et al., 2015).

Dicho interés por los bioestimulantes a partir de algas ha incrementado en la agricultura sostenible, aumentando el rendimiento y crecimiento en los cultivos. La cianobacteria *Spirulina plantesis* y la microalga *Senedesmusquadricauda* son ejemplos de promotores de crecimiento en raíces y hojas (Gemin et al., 2019).

La biomasa algal está compuesta por cantidades importantes de hormonas vegetales, betaínas, poliamidas, auxinas y citoquininas (Stirk et al., 2013a). Por otro lado, la fertilización aplicada directamente al suelo puede no cumplir los requisitos del cultivo, por lo tanto, la fertilización foliar es una alternativa para lograr altos rendimientos. En los últimos años la aplicación foliar de sustancias orgánicas ha aumentado la sostenibilidad agrícola. Existe un efecto positivo al fertilizar de forma foliar con microalgas en cultivos como pimiento, tomate y ajo, obteniendo una respuesta más rápida al aplicar de manera foliar comparado con la aplicación al suelo (Ronga et al., 2019). El cuadro 1 muestra algunas aplicaciones de algas en cultivos.

Cuadro 1. Algas utilizadas como bioestimulantes en cultivos vegetales.

Alga	Cultivos	Referencia
<i>Laminaria digitata</i>	Plátano	Aziz et al., 2003
<i>Lessonia vadosa</i>	Trigo	Chandia et al., 2004
<i>Padinagymnospora</i>	Frijol	Hernández et al., 2016
<i>Gigartina acicularis</i>	Tabaco	Mercier et al., 2001
<i>U. lactuca</i>	Tomate	Hernández et al., 2016
<i>Ulva spp.</i>	Frijol	Bosarto et al., 2010

Las plantas tienen mecanismos de defensa contra los patógenos, mecanismos que son inducidos al aplicar moléculas elicitoras ya sea de forma directa o sistémicamente. Las algas son ricas en compuestos bioactivos que ayudan a mejorar la salud de las plantas, protegiendo a una amplia variedad de patógenos (Gunupuru et al., 2019).

Aplicar bioestimulantes en hortalizas aumenta el contenido de clorofila lo que es más atractivo para los consumidores (Ferrante et al., 2004).

Los vegetales como las papas, tomates, berenjenas y pimientos son del género *Capsicum*, parte de la familia *Solanaceae*, con un alto valor comercial, nativos de un área amplia de América, que incluye México (Ashour et al., 2021).

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo rico en β -carotenos, vitaminas, licopeno, minerales y compuestos anticancerígenos, es considerado una hortaliza de alto valor económico y de gran importancia alimenticia (Supraja et al., 2020). Consumir tomate disminuye el riesgo de cáncer, gracias a sus altos contenidos de antioxidantes, licopeno y carotenoides. Su sabor está relacionado con las condiciones del crecimiento y las técnicas de cultivarlo (Higo et al., 2020).

Debido al aumento de la demanda alimenticia, es necesario abordar prácticas de fertilización sin degradar el medio ambiente. Por otro lado, al utilizar la microalga *Acutodesmus dimorphus* en tomate aumenta la altura de la planta, ramas por planta y cantidad de flores, aplicar la misma microalga a las semillas disminuye el tiempo de germinación (Ronga et al., 2019). Fertilizar de manera foliar utilizando *Arthrospira* mejora el tamaño del tomate, aumenta el peso de las raíces, además del número de nudos (Elarroussia et al., 2016).

Debido a esto existe una creciente demanda y se limitan los rendimientos. Por lo tanto, se busca aumentar la producción utilizando bioestimulantes de algas (Sharma et al., 2014). Los bioestimulantes, además de los efectos positivos ante la sequía, promueve el crecimiento de brotes y raíces, genera una resistencia ante

plagas y enfermedades, mejora el uso del agua y absorción de nutrientes (Stadnik y de Freitas, 2014).

2.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DE BIOMADA DE ALGA

2.4.1 Extractos benéficos para la agricultura

Se ha estudiado mucho de la viabilidad económica de las algas en el sector salud, incluido el área de los cosméticos, mientras que se ha dejado de lado proteger el medio ambiente. La fabricación de bioestimulantes a partir de algas es una opción muy atractiva (Carrillo et al., 2020).

Las algas son una importante fuente de bioactivos en aplicaciones agrícolas (Aziz et al. 2003). Principalmente se han aplicado al suelo como fertilizante, sin embargo, recientemente se han observado efecto ventajoso al aplicar de manera foliar extractos crudos sobre el crecimiento de los cultivos (Chandía and Matsuhira, 2008).

Los métodos para la producción de biomasa de alga para extraer metabolitos abarcan desde la agricultura oceánica hasta los fotobiorreactores, o una serie de

opciones de sistemas como estanques abiertos. Los extractos aportan múltiples beneficios directos e indirectos tanto a seres humanos como a las plantas, ya que contienen bioactivos, así como macro y micronutrientes (Carrillo et al., 2020).

Los extractos a partir de biomasa de alga son utilizados ampliamente dentro del área agrícola como bioestimulantes en diversos cultivos. Los extractos son una alternativa para disminuir e incluso remplazar a los fertilizantes químicos. Las algas son una fuente de extractos debido a su composición química, que como ya se mencionó incluye proteínas, carbohidratos, fitohormonas, polisacárido, lípidos y metabolitos secundarios como terpenos y polifenoles, mejorando el crecimiento en las plantas (du Jardin, 2015). Además, son capaces de formar iones de Zn (II), indispensables en la formación de quelatos (Michalak et al., 2017). Los quelatos (átomos de boro) son considerados un nutriente vegetal importante, el cual puede formarse a partir de oligosacáridos (ulvanos), provenientes de algas (Dembitsky et al., 2002).

El primer extracto algal alcalino patentado fue de *Macrocystispyrifera* y al paso de los años se han utilizado diferentes especies de algas de diversos países productores (Khan et al., 2009).

Los manera de acción de algunos extractos pueden tener efectos positivos o negativos, dependiendo directamente de la concentración y componentes aplicados a las semillas y a las plantas, ya que cada planta tiene un umbral de sensibilidad diferente para las moléculas bioactivas (Ertani et al., 2018).

2.4.2 Métodos para la obtención de extractos de algas

Existen bioestimulantes como polisacáridos, alginatos, carragenina, laminarán y fucoidanos, así como extractos acetónicos y etanólicos que se obtienen de algas y aumentan el crecimiento vegetal (Rengasamy et al., 2014).

Para formular bioestimulantes se utilizan diversos métodos de extracción. Generalmente la biomasa obtenida durante la fase de crecimiento exponencial es recuperada mediante microfiltración y centrifugación, y el proceso más común de conservación es pasteurizar o deshidratar, después pasa por molienda y finalmente se almacena para su posterior utilización (Shaaban et al. 2010).

Los componentes activos de las algas se encuentran dentro de la pared celular y/o vinculados a sus estructuras, para lograr su liberación la biomasa debe

someterse a diversos procesos, como el crioprocesamiento donde la biomasa previamente congelada pasa por un molino y es enfriada con nitrógeno líquido para obtener partículas muy finas, y tratamientos con alta presión puede lograr la ruptura celular, liberando su contenido. Otro método es el enzimático, utilizando celulasa, proteasa, xilanasas, glucanasas, glucosidasas y pectinasas (Gil et al., 2013).

Para extraer los compuestos de las algas se puede utilizar diversas técnicas de extracción, por ejemplo, la extracción sólido-líquido o líquido-líquido, las extracciones usando CO₂, la extracción de líquido pasteurizado, por ultrasonificación o extracciones asistidas por microondas. El método de extracción con fluidos super críticos (presión~500bar, temperatura~50 °C y~100 kg de CO₂ por cada kg de biomasa) atrae mucho interés ya que el extracto que se obtiene es libre de solventes (Ronga et al, 2019). Una representación de los procesos de extracción para la obtención de biomoléculas es mostrada en la figura 2.

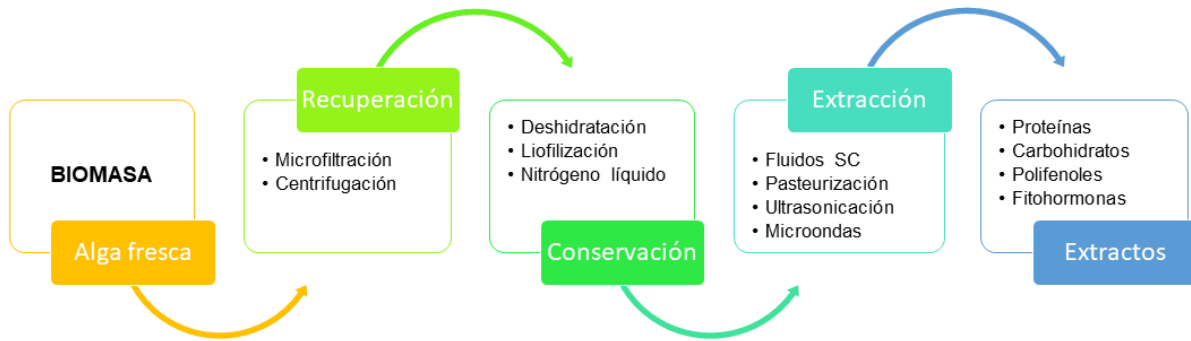


Figura 2. Representación del proceso de extracción de biomoléculas a partir de algas y cianobacterias.

Los extractos varían en cuanto a olor, composición, viscosidad y color (desde incoloro hasta un color negro). Los métodos de extracción deben ser enfocados al metabolito que se desea obtener, no es razonable esperar que utilizando el mismo método se pueda extraer todos los metabolitos del alga. Por ejemplo, la extracción de proteínas se logra mediante métodos acuosos, ácidos y alcalinos, y para recuperarlos se centrifuga, precipita o microfiltra. En busca de aumentar la eficiencia para extraer proteínas, se aplica polisacaridasas (alginatos, galactanos, almidón, celulosa, fucoidanos, xilanos y laminarina) para degradar las enzimas y mejorar la descomposición de la pared celular. Es posible obtener un rendimiento de 98% de proteínas mediante la ruptura celular a alta presión (Carrillo et al., 2020).

Por otro lado, la extracción con un método acuoso para la obtención de polisacáridos y solventes orgánicos como metanol, etanol, acetona y acetato de etilo para lograr compuestos de bajo peso molecular son de suma importancia para formular mezclas y así lograr la obtención de extractos que estimulen el crecimiento vegetal. Los polisacáridos tienen funciones importantes dentro de la planta, actúan como una hormona al hidrolizar a oligosacáridos controlando el desarrollo de las plantas (Trouvelot et al., 2014).

Durante los últimos años se han evaluado a los polisacáridos algales en cultivos como uva, maíz, frijol y cebada, obteniendo aumento de peso seco en las plantas, mejora la tolerancia en cuestiones ambientales, además, aumenta el porcentaje de germinación y en el crecimiento de diversos cultivos (Kannan et al., 2014).

Los polisacáridos derivados de las algas tienen un efecto protector en las plantas, lo que induce un evento de defensa contra patógeno microbianos, como activar las vías metabólicas secundarias. Como una herramienta alternativa para controlar enfermedades en las plantas se han considerado a los elicitores y, dado que los extractos de algas contienen ciertos polisacáridos, estos pueden utilizarse para controlar enfermedades en cultivos. La *Ulva armuricana* (Norte de Francia) está compuesta por polisacáridos sulfatados, los cuales protegen a la alfalfa

(*Medicago truncatula*) contra *C. trifolii*, al expresar genes que están relacionados con patogenicidad, como PR-10 (Cluzet et al. 2004).

En microalgas se inició la extracción de polisacáridos para producir biocombustibles, sin embargo, en la actualidad se extraen otros metabolitos como clorofila, carotenoides y carbohidratos (Carrillo et al., 2020).

Como ya se ha mencionado las algas son una excelente materia prima para la formulación de bioestimulantes, ya que pueden aportar diversos nutrientes y funciones de protección. Existen ocho categorías de bioestimulantes: 1) Sales inorgánicas, 2) Sustancias húmicas, 3) Extractos de algas, 4) Compuestos inorgánicos, 5) Quitosanos y otros biopolímeros, 6) Hongos, 7) Proteínas hidrolizadas y 8) Bacterias (du Jardin, 2015).

Las algas pueden usarse como sustancias húmicas al agregarse al suelo, son materia orgánica, y pueden acumular sales inorgánicas. Contienen aminoácidos y proteínas que producen metabolitos como florotaninos los cuales recientemente han sido probados como bioestimulantes (Rengasamy et al., 2016b).

Además, después haber obtenido y utilizado de los extractos como fertilizante líquido, comenzó la industrializarse y estudiarse sobre los efectos de

extractos a partir de algas como bioestimulantes en el crecimiento de plantas. Lo que ha generado diversas industrias que se dedican a la comercialización de bioestimulantes algales (Sharma et al., 2014).

2.5 ESTRÉS ABIÓTICO PRESENTE EN CULTIVOS VEGETALES

2.5.1 Condiciones que generan estrés abiótico

Los derivados o extractos de algas son típicamente aplicados al suelo como un fertilizante de lenta liberación y mejorar las propiedades biológicas y físicas del suelo. Recientemente se ha despertado el interés de los bioestimulantes con un objetivo principal, la respuesta al estrés abiótico y el déficit hídrico en los cultivos (Carrillo et al., 2020).

Las plantas frecuentemente se encuentran en condiciones desfavorables, lo que se denomina estrés ambiental. Los factores que llevan a la planta al estrés se dividen en dos tipos: abióticos y bióticos (químicos, físicos y fisicoquímicos). Los de tipo abiótico cubren los factores ambientales como temperatura, radiaciones, agua, sustancias químicas y otros. El estrés abiótico incluye los factores como

temperaturas y salinidad extremas, causando grandes pérdidas en la producciones agrícolas a nivel mundial (Mittler et al., 2010).

2.5.1.1 Salinidad del suelo

La salinidad en suelo puede ser ocasionada por causas naturales como las aguas de las costas, la lluvia salada, sales oceánicas y por rocas parentales, sin embargo, las malas prácticas agrícolas también han aumentado la concentración de sales en la rizosfera. Se estima que la salinización en los suelos cultivables provocará pérdidas del 30% de suelo en los siguientes 25 años y hasta un 50% en los próximos 40 años (Porcel et al., 2012).

La salinidad del suelo puede llegar afectar el desarrollo de los cultivos lo que genera bajos rendimientos. En un suelo salino se restringe la disponibilidad de CO₂ atmosférico, debido a que se cierran los estomas y se reduce el consumo de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) por el ciclo de Calvin (Miller et al., 2010).

Existen tres efectos negativos de la salinidad en la fisiología de las plantas, el primero es inhibir la síntesis de las proteínas causado por los efectos tóxicos de

los iones de cloruro y sodio, alteración de la estructura de las enzimas, afecta la respiración y la fotosíntesis. En segundo lugar, ocasiona un desequilibrio de nutrientes debido a que se disminuye la absorción y el transporte de nutrientes al brote de la planta, y finalmente la dificultad de la absorción de agua por las raíces, causado por los potenciales osmóticos del suelo, debido a las sales acumuladas, lo que conduce a una sequía fisiológica de las plantas (Evelin et al., 2019).

2.5.1.2 Estrés hídrico

El estrés hídrico y térmico reprimen desarrollar las raíces y los procesos de nodulación. Al exponer las plantas al estrés hídrico hay un efecto negativo en la productividad y en el crecimiento de las plantas. Las condiciones de sequía y altas temperaturas promueven cambios a nivel celular sobre proteínas debido al incremento de radicales libres (ROS) y cambios dentro del sistema de defensa de las plantas. Inactivar los ROS impacta sobre el rendimiento de los cultivos (Boote et al., 2005)

2.5.2 Bioestimulantes como alternativa contra el estrés abiótico

El utilizar bioestimulantes tiene como ventajas moderar la síntesis de los fitoreguladores endógenos, los cuales son los responsables de regular el desarrollo de los cultivos, lo que favorece la fijación de flores. Los extractos de bioestimulantes son una fuente de antioxidantes como cofactores y folcisteina como riblofavina, tiamina, piridoxina niacina, y vitaminas B1, B2, B3 y B12 (Liu et al., 2004).

Los bioestimulantes son una útil herramienta para manejar cultivos en ambientes adversos. El potencial de los extractos como bioestimulantes para la salinidad es poco explorado, uno de los tipos de estrés abióticos más importantes en cuanto a daños en el área agrícola. La efectividad de los extractos contra la salinidad depende directamente del momento en que es aplicado. Las aplicaciones pueden ser en 3 etapas diferentes: antes de que se dañe el cultivo, durante las condiciones del estrés y después del estrés, es decir, cuando las plantas presentan signos. Es necesario utilizar extractos de algas que contengan moléculas que puedan activar la biosíntesis vegetal endógena de metabolitos protectores y adaptadores fisiológicas relacionados con el estrés. Es importante entender que el resultado de la aplicación de los extractos está relacionado con la concentración y el momento de aplicación e igualmente que no todos los cultivos responden de la misma forma (Carillo et al., 2019).

Por otro lado, recientemente surgió un paradigma sobre que las plantas no son independientes dentro de su entorno, en decir, existe una sociedad entre las plantas y los microorganismos (bacterias y hongos). Las plantas hospedan diversas microbiotas y estas asociaciones ya sea dentro o fuera de sus tejidos les permite adaptarse y responder ante el estrés abiótico (Vandenkoornhuyse et al., 2015). Evidentemente si se optimizan esas asociaciones, se fortalece la protección contra el estrés en las plantas.

Dentro de los últimos años se ha estudiado a los extractos de algas para controlar el estrés en las plantas causado por el frío. Utilizar extractos ricos en zinc y manganeso en el cultivo de maíz, mejora la tolerancia a las bajas temperaturas, debido a las respuestas mejoradas de ROS y en cuanto a los micronutrientes, estos juegan un papel de cofactor en las enzimas antioxidantes (Bradáčová et al., 2016). La clave ante esta tolerancia son los genes. Los lipofílicos con ricos en ácido butírico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico y esterol fucosterol, extractos que aumentan la concentración de azúcares solubles, lo que influye en la tolerancia a bajas temperaturas (congelación) (Nair et al., 2012).

De la misma forma se han utilizado citoquininas a partir de extractos de alga para mejorar la tolerancia al estrés por las altas temperaturas y por la falta de agua en cultivos ornamentales, hortícolas y árboles. En plantas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) bajo estrés por sequía se reduce la capacidad de quelación de iones ferrosos y mejora el crecimiento de cotiledón, respectivamente. Aplicar de manera foliar extractos de isopropanol en plantas de uva (*Vitis vinifera* L) bajo condiciones de estrés por falta de agua aumenta la conductancia estomática (Xu et al., 2015).

La poca disponibilidad de agua y el cambio climático hace que la promesa de los bioestimulantes de aumentar la capacidad de tolerar el estrés abiótico tenga gran potencial desde un punto de vista agronómico.

2.6 ARTHROSPIRA MAXIMA COMO BIOESTIMULANTE

Utilizar la *Arthrospira* dentro de la agricultura sostenible demuestra que genera mayor producción, mejor calidad en los cultivos, además, genera resistencia a ciertas enfermedades y estrés, también aumenta el índice de germinación y enraizamiento al aplicarse en el suelo. Diversos autores reportan que el comparar un fertilizante químico contra la biomasa de *Arthrospira*, esta posee cantidades inferiores de N-P-K, sin embargo, esta alga tiene la capacidad

de estimular el crecimiento de los cultivos de una manera muy similar a la de un fertilizante químico, esto gracias a que contiene cantidades superiores de otros elementos como hierro, zinc, calcio y selenio. Además se ha reportado que el combinar extractos de *Arthrospira* con otros bioestimulantes o biofertilizantes estimulan significativamente el rendimiento, crecimiento y producción de aceites.

Extractos de *Arthrospira platensis* y *Chlorella vulgaris* mejoran la producción de papa y de las semillas del tipo híbridas en la India (Fundación Caja Rural Valencia, 2000).

Todos estos efectos positivos en diferentes cultivos están directamente relacionado con la composición de la *Arthrospira*, debido a su alto contenido de aminoácidos, proteínas y carbohidratos, los cuales influyen en el desarrollo y crecimiento de las plantas, además, contiene antioxidantes los cuales pueden incrementar la tolerancia ante algunos tipos de estrés. Por ejemplo, en el cultivo de tomate al aplicar *Arthrospira* incrementó el rendimiento, en el cultivo de lechuga se aplicó de manera foliar lo cual aumentó el contenido de clorofila a, sólidos solubles y vitamina C (Fundación Caja Rural Valencia, 2000).

2.7 CARACTERÍSTICAS DE LA LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

Vavilov creía que su origen estaba situado en el Cercano oriente, en la actualidad se conoce que *Lactuca scariola* L., es el antecesor de la lechuga, siendo una planta silvestre la cual puede encontrarse en áreas con clima templado (Fundación Caja Rural Valencia, 2000).

2.7.1 Clasificación

La lechuga es una planta anual, que se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Macrophyllophita

Sub-División: Magnoliophytina

Clase: Paenopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Tribu: Lactuceae

Género: *Lactuca*

Especie: *sativa*

Nombre Científico: *Lactuca sativa* L. (López, 2016)

2.7.2 Descripción botánica

Hablando de la taxonomía, la lechuga es un cultivo de la familia *Asteraceae*, su sistema radicular es muy ramificado alcanzando los 35 cm cuando se tiene un riego por goteo. Sus hojas no tienen peciolo y son lisas, es decir, emergen en forma de roseta, su color varía de un verde amarillo hasta un morado. Al exponer el cultivo a temperaturas altas por varios días los tallos se alargan y ramifican en una inflorescencia amarilla en racimos (Rincón, 2008).

2.7.3 Requerimientos para el cultivo

2.7.3.1 Clima

Se ha reportado que las hortalizas como lechuga y acelga se adaptan mejor a las condiciones climáticas templadas, sin embargo, la tecnología en mejoramiento genético permite que algunas variedades de lechuga puedan adaptarse a diferentes tipos de clima, debido a esto es que se pueden cultivar durante todas las estaciones del año. Las variedades criollas como las de repollo pueden ser sembradas en todo el año, ya que existen algunas variedades que logran resistir altas temperaturas (Valencia, 1995).

2.7.3.2. Suelo

Este cultivo no es exigente en cuanto a la calidad del suelo, debido a que tolera la acidez con pH5, siendo pH 8 el óptimo para su crecimiento. La conductividad eléctrica, es decir, la salinidad del suelo mayor a 1.2 mmhos/cm afecta el desarrollo cuando no se maneja de manera eficiente. En la agricultura el objetivo principal es la rentabilidad, lo cual está directamente relacionado con el rendimiento y la calidad del producto, para lograr esto la lechuga requiere de un suelo fértil, es decir, alto en contenido de materia orgánica, sin salinidad y un buen drenaje, sin embargo, este cultivo ofrece la alternativa de adaptarse a sistemas hidropónicos, los cuales pueden obtener productos de muy buena calidad y en menor tiempo, debido a que no sufren estrés al momento del trasplante o por las carencias del suelo (Valencia, 1995).

2.7.3.3. Agua

Para lograr el aprovechamiento del agua las dosis deben ser reguladas por las necesidades del cultivo en base a su etapa fenológica, de manera que. Las pérdidas por escorrentía o evaporación sean mínimas, además, de no saturar el suelo con humedad al grado de ocasionar problemas en las raíces de las plantas. Debido a que el sistema radicular de la lechuga es poco, lo convierte en un cultivo muy sensible al estrés por agua en el suelo (Valencia, 2000).

2.8 CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

La planta de tomate tiene origen en la región de los Andes (Colombia, Perú, Chile, Bolivia y Ecuador), es donde se encuentran la mayor cantidad de variedades de tipo silvestre. México es considerado como el centro más importante en la domesticación del tomate a nivel mundial (Valadéz, 1997).

2.8.1 Clasificación taxonómica

Reino: Metaphyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Lycopersicon*

(Villarreal, 2005).

La fertilización en condiciones de suelos con problemas de salinidad debe aportar calcio y potasio, ya que estos compiten con el sodio para entrar en las

raíces, lo cual suele tener efectos negativos en el desarrollo de las plantas (Hu y Schimdhalter, 2005).

Se ha reportado que aplicar soluciones con 550 nM de cloruro de sodio retrasa el crecimiento de tallos y hojas, sin embargo, al aplicar potasio el desarrollo del cultivo se optimiza (Satti-SME et al., 1994).

Otra forma de contrarrestar la salinidad es adicionando MO en forma de abono verde o compost, mejorando la estructura del suelo, además de infiltración de agua (Munns et al., 2005).

2.9 CULTIVO DE PEPINO (*Cucumis sativus* L.)

El cultivo de pepino es de la familia *Cucurbitácea*, la cual comprende 90 géneros y 750 especies. El género de *Cucumis* abarca más de 30 especies, las cuales están distribuidas en dos áreas geográficas distintas: el grupo asiático y el grupo africano (Tatlioglu, 1993).

2.9.1 Importancia nutricional

El pepino no tiene un gran valor nutricional, sin embargo, tiene una gran demanda debido a que tiene cualidades refrescantes, ya que es un fruto cuya parte

comestible es inmadura y el mayor porcentaje de su composición es agua. Está en el cuarto puesto de la superficie sembrada (CEDRSSA, 2020).

2.9.2 Importancia económica a nivel mundial

En el 2018 la FAO reportó una producción de 75,219,440.0 ton a nivel mundial en la categoría de pepinillos y pepino, centrándose a China con la mayor producción con 56,240,428.0 ton representando el 74.7% del total del mundo, México obtuvo el sexto puesto con una producción anual de 1,072,048.0 ton (CEDRSSA, 2020).

2.9.3 Importancia económica en México

El consumo anual per cápita de pepino en México es de 2.4 kg, sin embargo, existe un constante aumento de demanda y por consecuencia de producción, es por esto que es factible producirlo bajo un sistema controlado. El 72% de la producción es producto de exportación a Estados Unidos, en promedio se siembra alrededor de 17,000 ha por año en México. La mayoría de la producción se centra en Sinaloa y Sonora que juntos obtienen el 57.2%. La mayor producción es en el periodo de enero a mayo con una producción de 100 mil ton (CEDRSSA, 2020; SIAP, 2020).

2.10 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos polifenólicos se componen de uno o más grupos de hidroxilo los cuales se unen a anillos aromáticos, cada uno de estos anillos están conformado por una molécula de benceno. Todos los compuestos polifenólicos provienen de carbohidrato, los cuales se generan durante la fotosíntesis y son producidos dentro de las plantas como metabolitos como respuesta al medio que los rodea (Vermerris y Nicholson, 2006; Ghosh et al., 2012).

2.10.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos cumplen diferentes funciones como actividad enzimática, alelopatía, absorción de nutrientes, protección a la radiación UV y síntesis de proteínas (Goleniowski et al., 2013).

Además tienen cualidades antioxidantes, debido a esto es que diversas industrias muestran interés en ellos, pueden aplicarse como conservadores y retrasan la peroxidación de las grasas. Dentro de la industria farmacéutica atrapan a los ROS, los cuales dañan las células, se utilizan para los tratamientos contra enfermedades cardiovasculares y contra el cáncer (Maqsood et al., 2014; Gawlik-Dziki et al., 2012; Irakli et al., 2012; Boz, 2015; Goleniowski et al., 2013).

2.10.2 Flavonoides

Los flavonoides también son conocidos como fitonutrientes ya son encontrados en la mayoría de los vegetales. Se dividen principalmente en los grupos auronas, flavonas, flavononas, isoflavonoides, chalconas y antocianinas (Vermerris y Nicholson, 2006).

3. HIPÓTESIS

Utilizar un lixiviado de frutas y verduras como fuente de nutrientes en la producción de *Arthrospira maxima* aumenta la concentración de biomasa, logrando obtener un subproducto el cual actúa como bioestimulante en plantas de lechuga, pepino y tomate.

3.1 OBJETIVO GENERAL

Generar biomasa de *Arthrospira maxima* con la valorización de un lixiviado de frutas y verduras a través de economía circular para generar un subproducto bioestimulante y su aplicación en plantas de lechuga, pepino y tomate.

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar la producción de biomasa de *Arthrospira maxima* en biorreactores de tipo airlift para la valorización de un lixiviado de frutas y verduras.

2. Comparar dos métodos de ruptura celular en la biomasa de *Arthrospira maxima* para la cuantificación de aminoácidos libres y grado de hidrolisis.

3. Evaluar el efecto bioestimulante de *Arthrospira maxima* con y sin ruptura celular en la germinación y producción de plantas de lechuga.

4. Determinar el impacto de *Arthrospira maxima* como bioestimulante en plantas de pepino y tomate para disminuir el requerimiento de fertilizantes químicos.

4. METODOLOGÍA

4.1 ETAPA 1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

4.1.1 Cepa de cianobacteria

La cepa de *Arthrospira maxima* se adquirió del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de Cuajimalpa (CNVESTAV) y se preservó a 4°C para la experimentación. La cepa se cultivó en medio zarrouk el cual consistió en: NaNO₃, NaHCO₃, K₂HPO₄, NaCl, K₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O y EDTA ajustado a pH de 9 y esterilizado en autoclave durante 15 min a 121°C. La cepa se mantuvo en cultivo líquido estéril a 25 ± 3°C, en aireación continua e iluminación de 12 h luz (1000 Klux) y 12 h oscuridad, hasta alcanzar la fase estacionaria de la cepa se utilizó para la siguiente experimentación.

4.1.2 Fuente de nutrientes

El lixiviado de residuos de frutas y verduras se recolectó del mercado de Abastos “Estrella” (latitud 25°42'46.1"N, longitud 100°17'44.0"W) (Figura 3) ubicado en el municipio de San Nicolás de Los Garza, Nuevo León, México. En este trabajo se evaluó el efecto de la proporción de lixiviado de residuo alimentario al 0, 3 y 9 % sobre el rendimiento de crecimiento de biomasa de *Arthrospira maxima* en biorreactores del tipo airlift con una capacidad de 3.5 L.

Al lixiviado se le determinó: dureza, turbidez, pH, conductividad, alcalinidad, nitrito, demanda química de oxígeno, nitrato y solidos totales.



Figura 3. Contenedor de desechos de frutas y verduras.

4.1.3 Preparación de biorreactores

Los biorreactores se construyeron tipo airlift a partir de acrílico y varillas de metal para el soporte, tienen una capacidad de 3.5 L e inyección de aire constante.

El montaje de los biorreactores se realizó usando mechero para prevenir alguna contaminación. Primero se colocó el medio zarrouk, después la cepa de *Arthrospira maxima* y finalmente el residuo (de acuerdo con cada tratamiento), todo esto en un recipiente de 19 L para lograr la homogenización antes de colocar la cepa en los biorreactores, cada tratamiento se llevó por triplicado (Figura 4). Todo el material utilizado se esterilizó previamente.

La *Arthrospira* se cultivó durante 16 días, tomando muestras de 15 mL cada cuatro días para su posterior análisis. Cada biorreactor contó con tres lámparas LED y aireación continua. Se evaluaron dos fotoperiodos, dos inóculos y dos porcentajes de lixiviado, generando siete tratamientos, además del control (Cuadro 1).

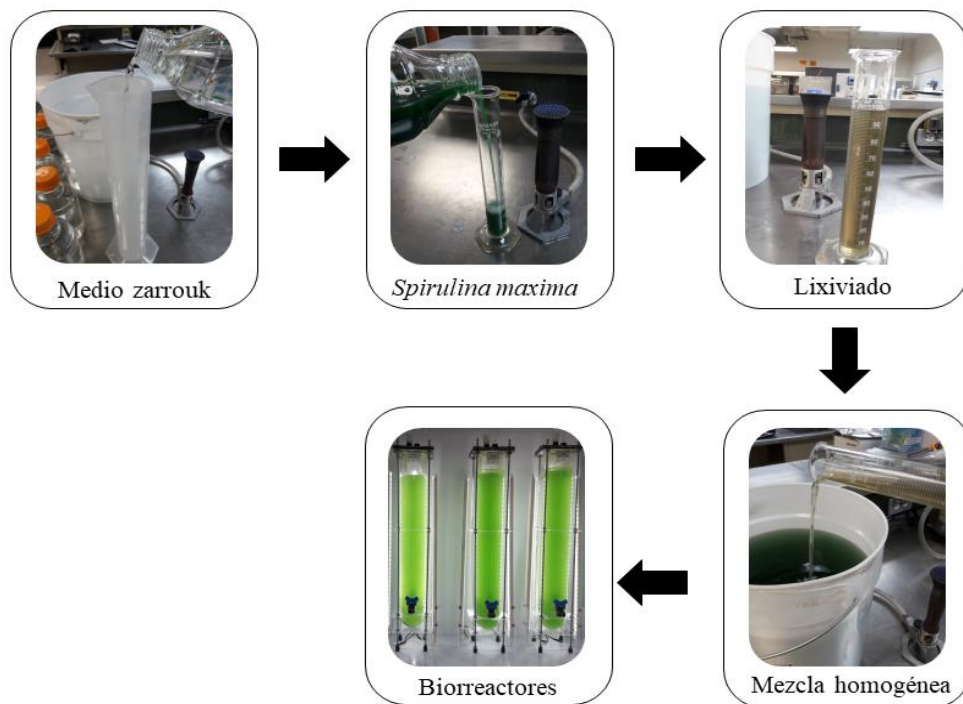


Figura 4. Diagrama del montaje de biorreactores.

Cuadro 2. Diseño experimental de los tratamientos en la producción de *Arthrospira maxima*.

Tratamiento	Lixiviado (%)	Fotoperiodo (h)	Inóculo (g/L)
T0	0	16	0.3
T1	3	16	0.3
T2	9	8	0.3
T3	3	8	0.3
T4	9	8	0.3
T5	3	8	1.0
T6	9	8	1.0
T7	3	16	1.0
T8	9	16	1.0

4.1.4 Producción de *Arthrospira maxima*

La concentración de biomasa se evaluó mediante de la correlación entre la densidad óptica (DO) y el peso seco de sólidos totales (ST) en biomasa de *Arthrospira* determinado por gravimetría. La DO se midió a 680 nm mediante un espectrofotómetro (Thermo EVOLUTION 10-Vis) cada 4 días.

4.1.5 Análisis de nutrientes

A las diferentes biomásas generadas se les cuantificó la concentración de azúcares totales, proteína, clorofila a y lípidos, así como demanda química de oxígeno y densidad óptica, después de 16 días.

4.1.5.1 Métodos analíticos

- Clorofila. Para cuantificar la concentración de clorofila, se tomó una muestra de 10 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Los sedimentos fueron suspendidos en una solución de 10 mL de acetona al 90% a 4° C durante 24 h en la oscuridad y finalmente se centrifugó a 4° C y 4000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se midió usando el método de Lorenzen (1966) a tres longitudes

de onda: 470 nm, 662 nm y 645 nm en un espectrofotómetro, se utilizó acetona al 90% como blanco.

- Azúcares totales. Para cuantificar la cantidad de azúcar total se utilizó el método de antrona-ácido sulfúrico (Koehler, 1952). Se mezcló 1 mL de solución de algas con 4 ml de solución de ácido sulfúrico de antrona al 0.2% (p/v). Las muestras se sometieron a 100° C durante 10 minutos. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 640 nm.

- Lípidos totales. Para la cuantificación de lípidos se tomó biomasa seca con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1, v/v), después se sonicaron durante 30 minutos (Yu et al., 2012). La suspensión se centrifugó a 4000 rpm por un período de 15 minutos hasta obtener un sobrenadante claro. La solución de disolvente se dejó evaporar por 24 h y los lípidos extraídos se determinaron por gravimetría.

- Proteínas. La extracción de proteínas se realizó mediante el método Bradford (1966), el cual consiste en romper la pared celular mediante una solución de hidróxido 1 N, para posteriormente leer la solución mediante un espectrofotómetro bajo una longitud de onda de 595 nm.

Las muestras de biomasa fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se resguardó a una temperatura de 4°C antes de realizar el análisis.

Se analizó amonio ($\text{NH}_4\text{-N}$), ortofosfatos ($\text{PO}_4\text{-P}$) y la demanda química de oxígeno (DQO) usando un espectrofotómetro según los métodos estándar (APHA, 1998).

La cepa fue seleccionada de ensayos preliminares en base a la alta concentración de biomasa, a la capacidad de adaptación a diferentes condiciones, a su composición bioquímica para evaluar tres métodos de ruptura celular.

4.1.6 Optimización de la producción de *Arthrospira maxima*

La optimización de la biomasa se realizó para encontrar el máximo porcentaje del lixiviado a emplearse en el cultivo de microalgas. Se utilizó el software Design-expert 12 para el análisis de los datos.

4.2 RUPTURA CELULAR DE LA BIOMASA

4.2.1 Ruptura de la pared celular

Después de 16 días de cultivar la biomasa de *Arthrospira maxima*, se centrifugó, liofilizó (Liofilizador Freezone^{4.5}) y molió hasta obtener un polvo fino (Figura 5). Se preservó una porción para uso como control y el resto se sometió a 2 métodos de ruptura.

El método de ultrasonicación y congelación-descongelación se llevaron a cabo mediante la metodología de Wang (2012) (Figura 6). A la biomasa generada (TBG) y a la biomasa comercial (TBC) no se les aplicó algún método de ruptura.

La ultrasonicación se aplicó durante 2 min (T2m), 4 min (T4m) y 8 min (T8m) a una intensidad de 20 volts; y el método de ruptura con congelación-descongelación fue durante 1 hora (T1h), 2 horas (T2h) y 3 horas (T3h) con un ciclo de descongelación (figura 6).

Después de la ruptura con los diferentes métodos se cuantificó la concentración de aminoácidos y el grado de hidrólisis.



Figura 5. Biomasa de *Arthrospira maxima* pulverizada.

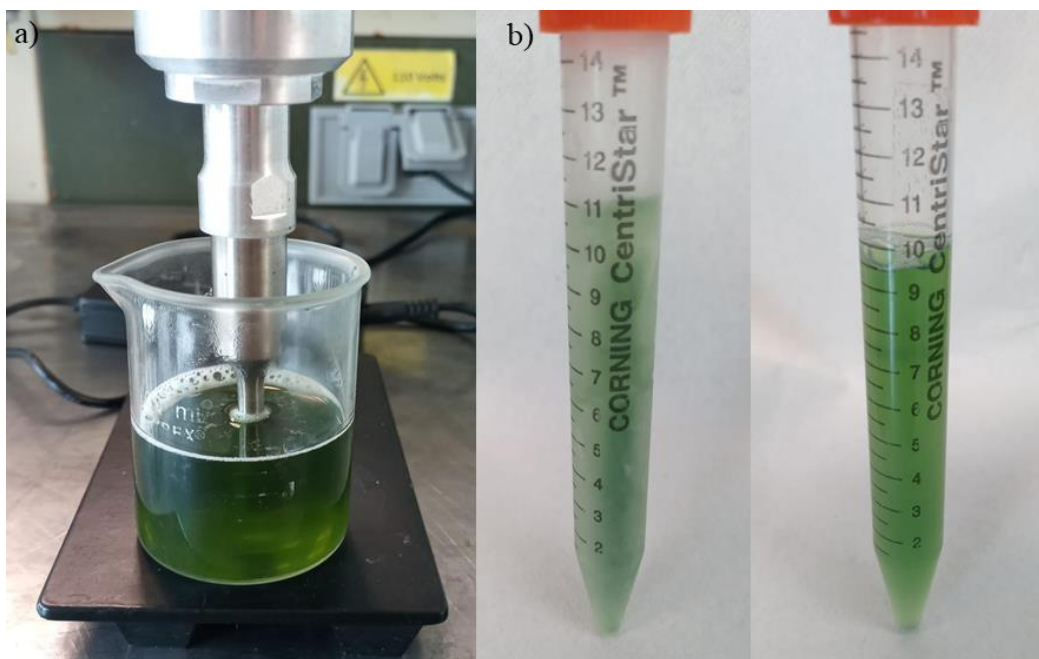


Figura 6. Método por ultrasonificación, utilizando un sonotrodo (a) y método de congelación-descongelación (b).

4.2.1.1 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (DH) se define como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos y la cuantificación de aminoácidos libres (Ecuación 1).

$$DH = h/h_{tot} * 100\% \quad (1)$$

donde h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos por proteína equivalente, y h es el número de enlaces hidrolizados. h_{tot} depende de la composición de aminoácidos de la materia prima (Nielsen et al., 2001).

4.2.2 Caracterización morfológica de *Arthrospira maxima*

Para conocer las texturas de la morfología en la biomasa de *Arthrospira maxima* seca de microalgas, se utilizó un microscopio electrónico de barrido equipado con un detector de espectroscopia de dispersión de energía (SEM-EDS) JEOL 6490LV acoplado INCA-X. Se utilizó espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para la identificación de los grupos funcionales que componen *Arthrospira maxima* de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4

cm⁻¹ (Venkatesan et al., 2012). Estos análisis de biomasa se realizaron antes y después de la disrupción celular.

4.3 ETAPA 2. BIOESTIMULANTE VEGETAL A PARTIR DE *Arthrospira maxima* EN PLANTAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

El tratamiento con el que se logró la mayor concentración de aminoácidos y grado de hidrólisis se utilizó para romper la pared celular de la biomasa seleccionada previamente y se evaluó como bioestimulante vegetal en los cultivos de lechuga, pepino y tomate en un sistema hidropónico en el laboratorio de Hidroponía de la Facultad de Agronomía de la UANL, ubicado en el General Escobedo, Nuevo León, México.

4.3.1 Establecimiento de los cultivos en sistema hidropónico

La estructura donde se colocaron las plantas de los cultivos se muestra en la figura 7.

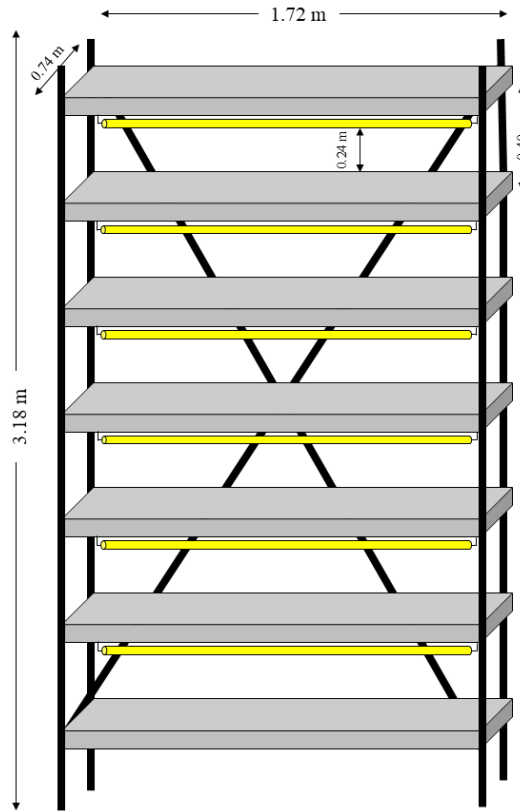


Figura 7. Estructura de metal en el área de hidroponía.

4.3.1.1 Material biológico

Se utilizaron únicamente semillas que fueron certificadas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) de la variedad Parris Island Coss, las cuales se consiguieron del portal comercial La Semillería.

La solución nutritiva utilizada se muestra en el cuadro 3, se utilizaron fertilizantes de grado comercial y agua destilada (Rodríguez et al., 2011).

Cuadro 3. Composición de la solución nutritiva.

Elemento	Concentración (mg/L)	Fuente
Nitrógeno	210	Urea
Fósforo	75	NH ₄ H ₂ PO ₄
potasio	280	KNO ₃
Calcio	250	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O
Magnesio	40	Mg(NO ₃) ₂
Azufre	130	H ₂ SO ₄
Hierro	0.8	FeSO ₄ ·7H ₂ O
Manganeso	0.45	MnSO ₄ ·H ₂ O
Boro	0.35	H ₃ BO ₃
Cobre	0.09	CuSO ₄ ·5H ₂ O
Zinc	0.30	ZnSO ₄ ·H ₂ O
Molibdeno	0.02	NaMoO ₄ ·2H ₂ O

4.3.2 Producción de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

Un par de semillas fueron sembradas por cavidad en charolas de unicel de 160 cavidades, utilizando tezontle (3 mm de diámetro).

Se colocó el sustrato dejando una línea sin utilizar en las charolas de germinación debido al tamaño de la lechuga al final del ciclo (Figura 8).

Fueron evaluados 11 tratamientos, los cuales se observan en el cuadro 4. Se utilizó biomasa con ruptura celular (C/R) y sin ruptura celular (S/R), además de SN en algunos de los tratamientos en diferentes porcentajes.

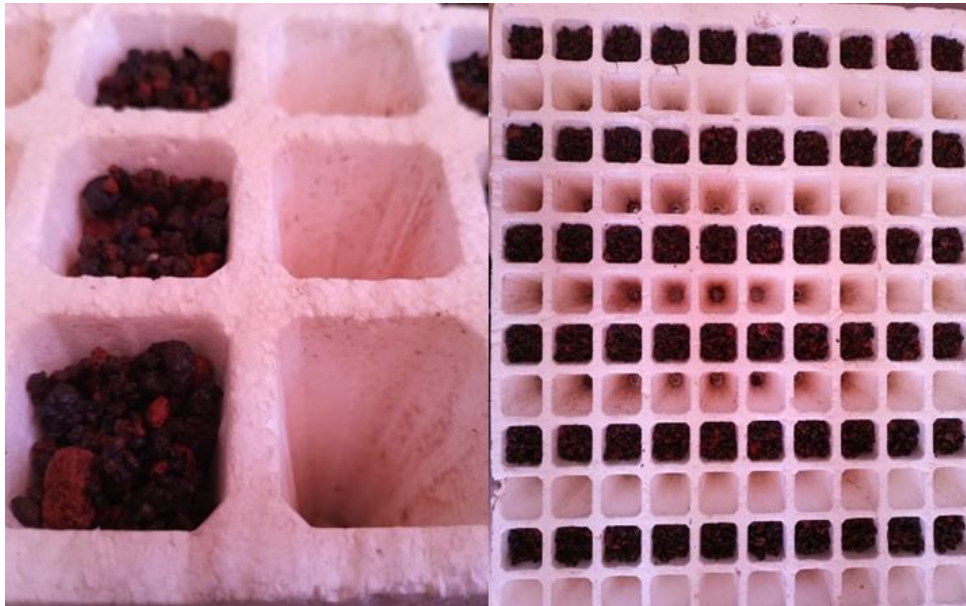


Figura 8. Charolas de germinación con roca volcánica.

Se cultivó la lechuga durante 30 días, tomando muestra y aplicando la *Arthrospira* cada 5 días, la cual fue aplicada de manera foliar con un atomizador de 100 mL. En los tratamientos que se utilizó SN se renovó cada 5 días con un volumen de 5 L.

La producción de lechuga se cuantificó durante 30 días para lechuga y se determinó:

- ✓ Longitud de la raíz
- ✓ Longitud de la parte aérea
- ✓ Peso fresco
- ✓ Peso seco

Cuadro 4. Tratamientos en la producción de lechuga (*Lactuca sativa* L).

Tratamiento	Biomasa (g/L)	Solución nutritiva (%)
TA	0	0
T0.5S	0.5 S/N	0
T1.0S	1.0 S/N	0
T1.5S	1.5 S/R	0
T0.5C	0.5 C/R	0
T1.0C	1.0 C/R	0
T1.5C	1.5 C/R	0
T1C25	1.0 C/R	25
T1C50	1.0 C/R	50
T1C75	1.0 C/R	75
TSN	0	100

A los tratamientos que se observan en el cuadro 4 también se le evaluó el crecimiento inicial de lechuga y el índice de germinación con la ecuación 2.

$$IG (\%) = \frac{G * L}{G_w * L_w} * 100 \quad (2)$$

donde G es el número de semillas germinadas, L es la longitud de las plantas, G_w es al número de semillas germinadas del tratamiento control y L_w es la longitud de las plantas del tratamiento control (Navarro-López et al., 2019).

Para la germinación se utilizaron cajas petri estériles de 10 cm de diámetro con papel absorbente saturado con la solución del tratamiento correspondiente (Figura 9). Se colocaron 20 semillas por caja con 4 réplicas por tratamiento (n=44).



Figura 9. Semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L).

4.3.2.1 Cuantificación de antioxidantes en plantas de lechuga

Las plantas de lechuga después de 30 días de crecimiento fueron liofilizadas para asegurar no degradar los compuestos fenólicos utilizando un secado convencional de 60-70° C. Se utilizó un Liofilizador Freezone^{4.5} a -50° C durante 6 días (Figura 10).



Figura 10. Liofilización de las plantas de lechuga.

Posteriormente fueron molidas en un mortero, hasta lograr un polvo fino, después se realizaron los extractos con metanol al 80% (80:20 metanol: agua v/v), para finalmente la cuantificación de los antioxidantes (Figura 11).

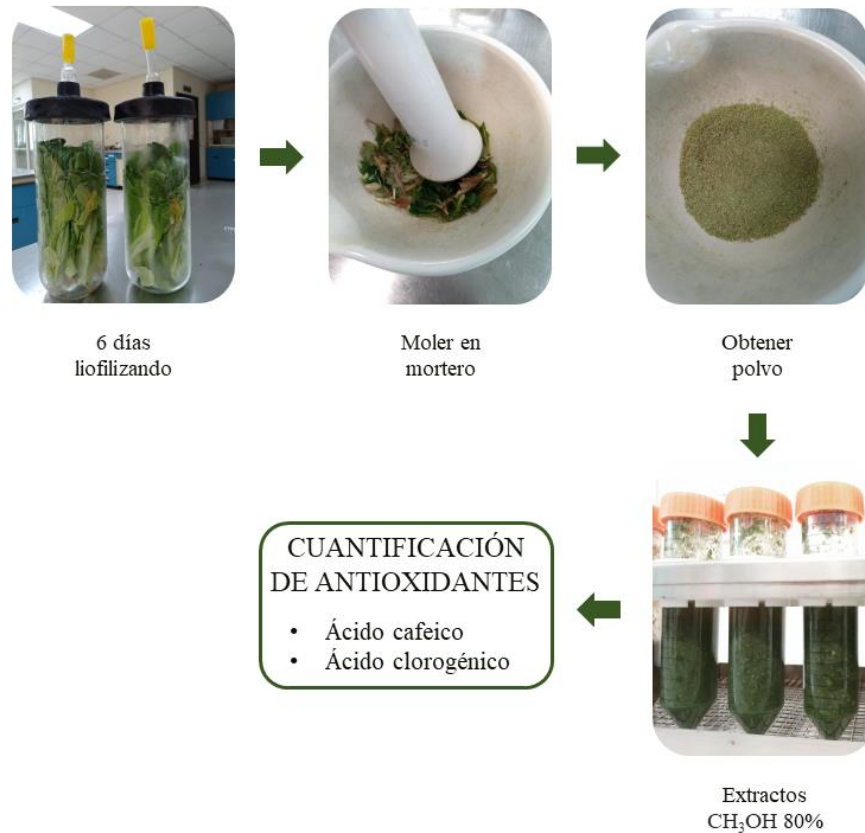


Figura 11. Diagrama para la cuantificación de antioxidantes en lechuga.

4.3.2.1 Análisis cromatográficos (HPLC)

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó siguiendo la metodología de Galieni et al., (2015) con ligeras variaciones. Se utilizó un equipo HPLC 1200 modelo G1329A, Agilent Technologies, una columna C-18 de fase reversa (30 x 150 mm x 3.5 μ). La fase móvil isocrática, es decir, solo agua acidificada 0.1% HCl, con un flujo de 0.1 mL/min a 37° C, con un tiempo de

corrida de 20 min, con un volumen de inyección de 5 μ L, en la región UV (220, 280m 330 y 360).

Se utilizaron estándares (Sigma Aldrich) de ácido cafeico y ácido clorogénico para la elaboración de las curvas de calibración en concentraciones de 1 a 500 mg/L.

4.4 ETAPA 3. BIOESTIMULANTE VEGETAL A PARTIR DE *Arthrospira máxima* EN PLANTAS DE PEPINO (*Cucumis sativus L.*) Y TOMATE (*Solanum lycopersicum*).

La producción de las plántulas se llevó a cabo en el área de hidroponía, en el estante descrito en la sección 4.3.1. En los cultivos de pepino y tomate se colocó la perlita como sustrato en todas las cavidades de las charolas de poliestireno (Figura 12). De igual forma que en el cultivo de lechuga, fueron colocadas dos semillas por cavidad para asegurar una planta por cavidad.



Figura 12. Charola de poliestireno con perlita como sustrato.

Cada una de las charolas de poliestireno se colocaron dentro de una charola plástica, para colocar dentro de la misma la solución nutritiva (SN) correspondiente a cada uno de los tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos de la producción de pepino (*Cucumis sativus* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum*).

Tratamiento	Biomasa (g/L)	Solución nutritiva (%)
T0	0	0
T1	1.0 C/R	25
T2	1.0 C/R	50
T3	1.0 C/R	75
T4	0	100

La producción de pepino y tomate se cuantificó durante 25 días midiendo:

- ✓ Longitud de la raíz
- ✓ Longitud de la parte aérea
- ✓ Peso fresco
- ✓ Peso seco

Se midieron estos parámetros cada 5 días de 4 plantas por tratamiento (Figura 13).



Figura 13. Medición del crecimiento en (a) lechuga, (b) pepino y (c) tomate.

4.3.1 Cuantificación de antioxidantes en plantas de pepino y tomate

La cuantificación de antioxidantes se llevó a cabo mediante extractos en fresco, usando solo hojas de ambos cultivos. Se pesaron 9 g de hojas, se licuaron con metanol al 80% (80:20 metanol: agua v/v) por 30 segundos, se filtraron para recuperar el sobrenadante y se reservaron a -20°C protegidos de la luz (Figura 14).



Figura 14. Extracción de antioxidantes en plantas de pepino y tomate.

4.3.1.1 Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales (CF) fueron cuantificados mediante el método Folin-Ciocalteu (López-Contreras et al., 2015) con algunas variaciones: en un tubo se agregaron 200 μL y fueron diluidos con 2600 μL de agua destilada, posteriormente fueron agregados 200 μL de Folin, 2000 μL de Na_2CO_3 al 7%. Se dejó en reposo durante 90 min en completa oscuridad para finalmente medir la absorbancia 750 nm.

El contenido de CF se determinó en base a la curva de calibración utilizando ácido gálico de 0 hasta 200 mg/L, expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de materia seca (mg EAG 100 g), se usó metanol al 80% como blanco.

4.3.1.2 Flavonoides totales

Se cuantificaron los flavonoides totales de acuerdo a la metodología de López-Contreras et al. (2015) con algunas variaciones: 200 μL de extracto fueron diluidos en 3500 μL de agua destilada, después se agregaron 150 μL de NaNO_3 al 5%, se dejó reposar por 5 min. Después fueron agregados 150 μL de AlCl_3 al 10%

dejando reposar 5 min, seguido se agregó 100 μL de NaOH 1M, dejando reposar por 15 min en oscuridad, finalmente se leyeron a una absorbancia de 510 nm. Se calculó la concentración de flavonoides en base a la curva de calibración utilizando catequina de 0 hasta 200 mg/L. Los resultados se expresan en miligramos equivalentes de catequina por cada 100 g de materia seca (mg EC 100 g).

4.3.1.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se midió por los métodos ABTS (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) y DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazil) con un espectrofotómetro (SP-830 Plus, Barnstead, Turner, EUA).

4.3.1.4 ABTS

Se preparó 1 mL de ABTS a 7.4 mM junto con 1 mL de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a 2.6 mM, se dejó reaccionar durante 12 horas en un ambiente oscuro para el radical ABTS; se diluyó el radical ABTS en metanol al 80% hasta alcanzar una absorbancia de 1 en una longitud de onda de 734 nm para la solución ABTS. Se tomó 50 μL del

extracto con 1.5mL de la solución ABTS, dejándolo reposar durante 30 min en completa oscuridad, después se midió la absorbancia a 734 nm, usando metanol al 80% como blanco.

4.3.1.5 DPPH

Se llevó a cabo mediante la metodología de López-Contreras et al. (2015): la solución DPPH se preparó pesando 0.0024 mg de DPPH en un matraz de 100 mL, después se agregó metano al 80% hasta alcanzar la absorbancia de 1 a una longitud de onda de 517 nm. Se mezclaron 50 μ L del extracto y 1.5 mL de la solución DPPH, se dejaron reposar durante 30 min en oscuridad. Finalmente se midió a 517 nm la absorbancia, con un blanco de metanol al 80%.

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.4.1 Análisis de la producción de biomasa

El experimento se llevó a cabo mediante un diseño factorial 2^3 a través de las variables independientes fotoperiodo, inóculo y % de lixiviado. Se evaluaron

9 tratamientos cada uno por triplicado. Se analizaron los datos utilizando el software Designe expert. El modelo estadístico se muestra en la ecuación 3.

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + \alpha\beta\gamma_{ijk} + \varepsilon_{ijk} \quad (3)$$

donde:

- μ es la media general del experimento
- α_i es el efecto debido al i-ésimo nivel del factor A
- β_j es el efecto del j-ésimo nivel del factor B
- γ_k es el efecto del k-ésimo nivel del factor C.
- $\alpha\beta_{ij}$ representa el efecto de interacción de la combinación ij
- $\alpha\gamma_{ik}$ representa el efecto de interacción de la combinación ik
- $\beta\gamma_{jk}$ representa el efecto de interacción de la combinación jk.
- $\alpha\beta\gamma_{ijk}$ representa el efecto de interacción de la combinación ijk
- ε_{ijk} el error aleatorio

El mejor tratamiento después de la optimización en la producción de *Arthrospira maxima* se evaluó con diferentes métodos de ruptura celular.

4.4.2 Análisis de la ruptura celular

Los datos obtenidos de la ruptura celular se analizaron mediante ANOVA de una sola variable con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó un nivel de significancia de $p < 0.05$ para todas las pruebas, utilizando el software SPSS®. El mejor tratamiento con el mayor porcentaje de ruptura celular se evaluó en los cultivos de lechuga, pepino y tomate.

4.4.3 Análisis de la producción de lechuga, pepino y tomate

La producción de lechuga, pepino y tomate se analizaron mediante ANOVA de una sola variable con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó un nivel de significancia de $p < 0.05$ para todas las pruebas, utilizando el software SPSS®.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ETAPA 1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

5.1.1 Caracterización de lixiviado de frutas y verduras

Las características fisicoquímicas del lixiviado dependen directamente de la composición de los desechos y del contenido de agua de estos. Las características del lixiviado recolectado del mercado de abastos “La estrella” se muestran en el cuadro 6. Se encontró que el valor del pH fue de 4.9, un valor de CE 5.71 μ S y ST de 2.17 g/L lo cual indica materia orgánica presente en las muestras. La concentración de DQO fue de 8,260.5 mg/L lo que indicó una alta concentración orgánica. Dentro de los compuestos nitrogenados, el nitrógeno en forma de amonio estuvo presente en una concentración de 206.53 mg/L, probablemente debido a la descomposición de compuestos orgánicos (Tatsi et al., 2020). Se observaron también bajas concentraciones de nitratos 0.26 g/L y nitritos 1445.65 μ g/L.

La alta concentración de turbidez 717 UNT puede ser debido a la falta de aireación del contenedor (Aziz et al., 2010). La dureza fue de 6,400 mg/L, un valor por encima del límite permitido en agua según la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017(500 mg/L) lo que puede estar relacionado a la alta concentración de alcalinidad 20,000 mg/L (Mor et al., 2006). Los procesos de biodegradación de la materia orgánica producen una cantidad significativa de bicarbonato, que representa el dióxido de carbono disuelto, que también es el principal componente de la alcalinidad (Mahapatra, et al., 2011b).

El lixiviado se constituyó de 296.77 ± 0.92 g/L de amonio, mientras que la concentración de ortofosfatos fue de 95.79 ± 7.2 g/L. En áreas de remediación se ha encontrado que los nutrientes N y P están relacionados con el crecimiento de algas (Xin et al., 2010).

Cuadro 6 Composición fisicoquímica del lixiviado.

Análisis	Concentración	Unidades
COD	788 ± 96.43	mg/L
Nitratos	0.26 ± 0.00	g/L
Nitritos	1,445.65 ± 36.53	µg/L
ST	2.17 ± 0.02	g/L
pH	4.94 ± 0.04	-
CE	5.71 ± 0.02	µS
Dureza	639.33 ± 24.94	mg/L
Turbiedad	2390 ± 49.05	UNT
Alcalinidad	2,000 ± 81.64	mg/L
Amonio	296.77 ± 0.92	mg/L
Ortofosfatos	95.79 ± 7.52	g/L

5.1.2 Producción de *Arthrospira* utilizando lixiviado de frutas y verduras

La producción de la biomasa (g/L) de la *Arthrospira maxima* durante los 16 días se presenta en la figura 15. El tratamiento control alcanzó 3.81 g/L, T1 3% lo superó con 5.3 g/L, una concentración mayor a lo reportado por Celekli (2009), seguido de T8 con 4.88 g/L, T7 con 4.43 g/L, mientras que el resto de los tratamientos no lograron superar al testigo. Durante el crecimiento la *Arthrospira* asimila los nutrientes, lo que está estrechamente relacionado con la fitorremediación, es decir, un mayor crecimiento promoverá una mejor

eliminación de nutrientes (Markou et al., 2014). Se observó crecimiento con un fotoperiodo de 8 h, sin embargo, el fotoperiodo de 16 h obtuvo mejores resultados (Cuadro 7), esto debido a que las algas requieren de la luz para su crecimiento. Se observó una tendencia a disminuir la concentración del lixiviado, esto debido a que las altas concentraciones de dicho residuo aumentan la turbiedad, disminuyendo el paso de la luz (Kumar et al., 2011). Como consecuencia del efecto sombra que produce el incremento del residuo, disminuye la penetración de la luz y el aumento de la biomasa (A. Richmond, 2004).

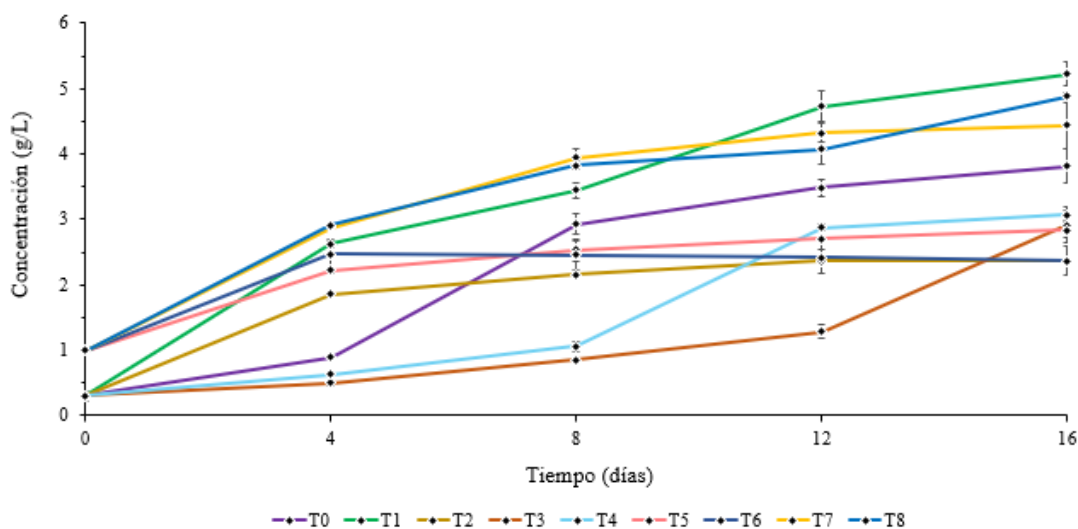


Figura 15. Producción de biomasa de *Arthrospira maxima*.

Cuadro 7. Producción de biomasa de *Arthrospira maxima*.

Tratamiento		g/L
Spi. 0.3g+0%+16h	T0	3.81±0.13
Spi. 0.3g+3%+16h	T1	5.23±0.01
Spi. 0.3g+9%+16h	T2	2.36±0.12
Spi. 0.3g+3%+8h	T3	2.92±0.05
Spi. 0.3g+9%+8h	T4	3.07±0.08
Spi. 1.0g+3%+8h	T5	2.84±0.13
Spi. 1.0g+9%+8h	T6	2.37±0.26
Spi. 1.0g+3%+16h	T7	4.43±0.15
Spi. 1.0g+9%+16h	T8	4.88±0.11

5.1.2.1 Demanda química de oxígeno (DQO)

La figura 16a muestra la concentración de DQO para los diferentes tratamientos durante los 16 días de experimentación. Existe una tendencia de aumento en base al porcentaje de lixiviación de alimentos, mientras que el testigo no presenta ninguna concentración. Debido a que no contiene ninguna fuente de carbono, los tratamientos con mayor concentración de DQO fueron alcanzados por

los tratamientos con 9% de lixiviado con 1,608 mg O₂/L, los tratamientos con 3% alcanzaron 450 mg O₂/L. La figura 16b muestra el porcentaje de DQO que se mantuvo durante los 16 días del experimento. Del día 0 al día 4 se redujo en un 70% para casi todos los tratamientos y para el día 16 los tratamientos con un 9% disminuyeron hasta un 95%, (Kumar et al., 2011). Para aguas residuales la mejor disminución de la concentración de DQO Pire-Sierra et al., (2016) se alcanza en el día 35, mientras que en el T2 disminuye el 95% en el día 16. La DQO constituye cuanto requiere de oxígeno para oxidar el material que se encuentra en el medio líquido, es decir, cuantifica la cantidad de MO susceptible a la oxidación química, debido a esto puede utilizarse como un parámetro de contaminación. En todos los tratamientos los niveles de DQO disminuyeron, debido a la absorción de nutrientes por la *Arthrospira maxima*, ya que la biomasa de algas es eficiente en la reducción de la DQO (Banach et al., 2009).

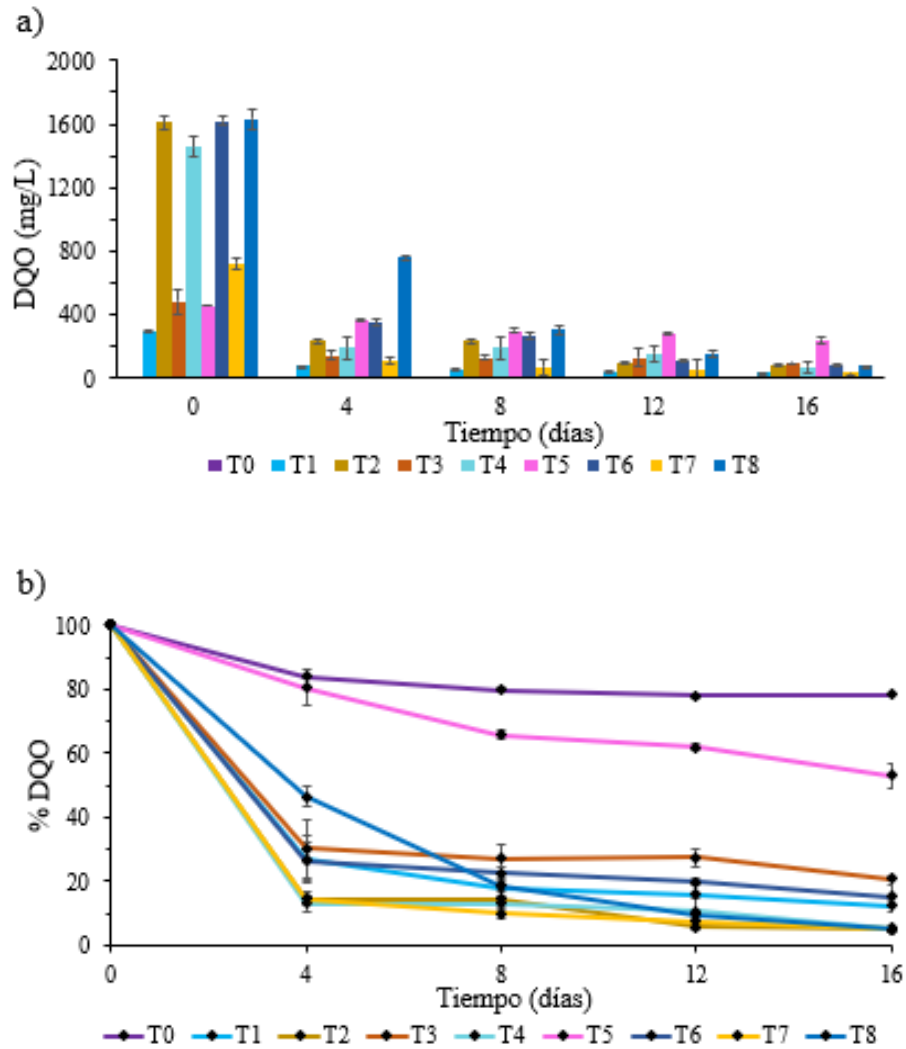


Figura 16. (a) Concentración de DQO, (b) reducción de DQO.

5.1.2.2 Ortofosfatos

En la Figura 17a se muestra la concentración de ortofosfatos en mg/L, el T0 que es el testigo llegó a 91 mg/L, los tratamientos con 3 % de lixiviado inician con 120 mg/L, mientras que los tratamientos con 9 % llegaron a 160 mg/L, debido al

contenido de ortofosfatos en el lixiviado, un nutriente importante en el crecimiento de *Arthrospira maxima* (Cai et al., 2013).

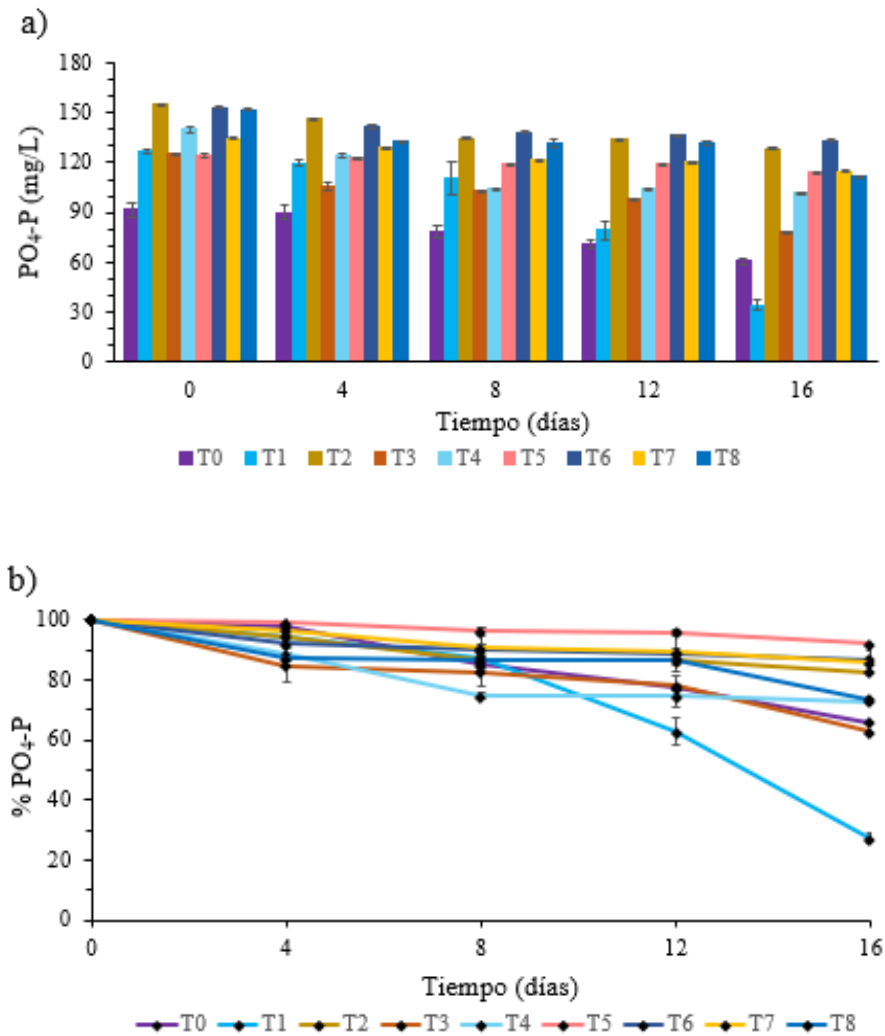


Figura 17. (a) Concentración de ortofosfatos, (b) Remoción de ortofosfatos.

Después de 16 días, la concentración de ortofosfatos disminuyó a 50 mg/L con T1. En la Figura 17b se presenta el porcentaje de ortofosfatos durante la experimentación, en todos los tratamientos se observa una disminución, sin

embargo, se destaca el T1 al lograr una disminución de hasta un 73%, lo que se puede atribuir a las óptimas condiciones de luz e inóculo para absorber el fósforo del medio (Kumar et al., 2011), mientras que, Arias-Martínez et al., (2010) lograron remover 11.63 % de fósforo en aguas residuales porcícolas utilizando *Arthrospira maxima*.

5.1.2.3 Caracterización de la biomasa de *Arthrospira maxima*

La tabla 7 muestra los parámetros que se analizaron para la biomasa después de 16 días. Para clorofila a, el control contiene 6.4 mg/g, T2 y T5 alcanzaron 10.2 y 14.7 mg/g, respectivamente, también se puede observar que al aumentar el % de lixiviado y el fotoperiodo de 8 h, la concentración de clorofila a disminuyó. Mientras que para la clorofila b, el T4 con 9% de lixiviado alcanzó el valor más alto (0.792 mg/g).

En cuanto a los carotenoides, vuelve a destacar el T5, alcanzando los 2.5 mg/g, superando en 1 mg/g al control.

El contenido de lípidos para T0 es de 5.81 %, solo los T2, T3 y T7 no lograron superar al tratamiento control. Mientras que T4 duplica el porcentaje con 10.75 %, esto puede atribuirse a la adición del lixiviado (Kumar et al., 2011).

Finalmente, en el porcentaje de proteínas, el testigo contiene 49.76%, el adicionar 3% de lixiviado con un fotoperiodo de 16 h incrementó este valor a 68.19%, mientras que T8 alcanzó 63.69%, el resto de los tratamientos oscilan entre 30 y 57% (Chinnasamy et al., 2010).

Cuadro 8. Composición bioquímica de *Arthrospira maxima*.

Tratamiento	Clorofila a (mg/g)	Clorofila b (mg/g)	Carotenos (mg/g)	Lípidos (%)	Proteínas (%)
T0	6.41±0.28	0.12±0.02	1.40±0.09	5.81±0.10	49.76±0.60
T1	10.29±0.61	0.10±0.21	1.82±0.02	8.20±1.00	68.19±0.59
T2	1.01±0.00	0.54±0.13	0.34±0.13	5.35±1.30	30.83±0.64
T3	3.76±0.54	0.02±0.16	1.00±0.13	5.69±0.42	38.07±0.54
T4	1.01±0.03	0.79±0.08	0.63±0.02	10.75±0.31	40.03±0.22
T5	14.74±0.28	0.61±0.08	2.46±0.07	6.70±0.82	37.06±0.37
T6	1.06±0.21	0.52±0.05	0.38±0.06	7.67±0.84	30.96±0.28
T7	5.14±0.18	0.27±0.08	1.01±0.04	4.82±0.52	57.87±0.33
T8	1.78±0.01	0.50±0.07	0.50±0.02	8.18±1.04	63.69±0.38

5.1.3 Optimización de producción de biomasa

La figura 18a muestra los puntos que forman un patrón casi lineal, lo que indica que es un buen modelo para los conjuntos de datos, por su parte el ANOVA arrojó un $R^2=0.9877$. La figura 18b muestra la interacción entre los 3 factores y la variable respuesta (biomasa). Los niveles codificados en el modelo factorial utilizado para expresar la producción de biomasa en función de los factores independientes (lixiviado, fotoperiodo e inóculo) se muestran en la ecuación 4, así:

$$g/L = 3.51 - 0.3419A + 0.7132B - 0.2625A + 0.3364AC + 0.3124BC + 0.4909ABC \quad (4)$$

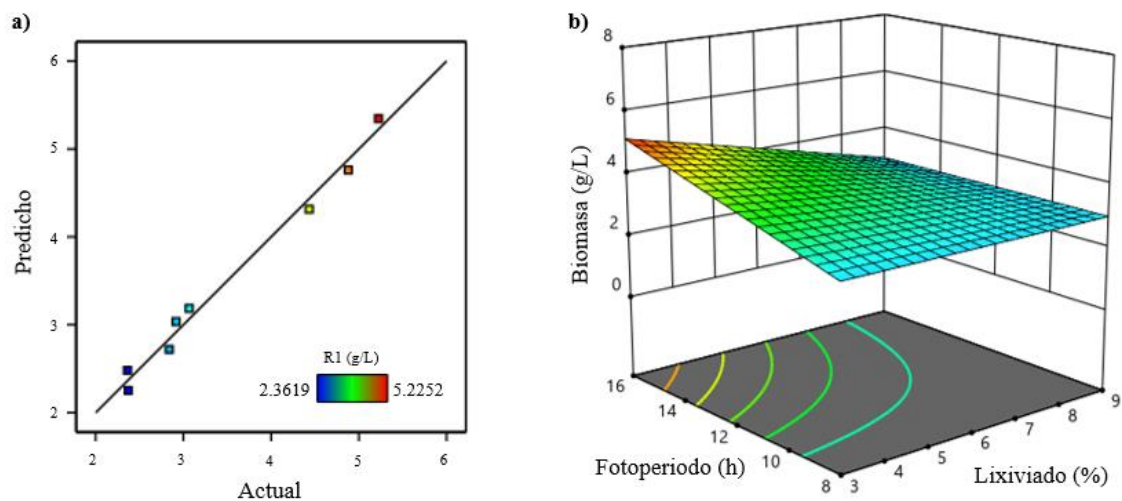


Figura 18. (a) Evaluación de la distribución normal de los datos del tratamiento experimental para la producción de *Arthrospira maxima*, (b) gráfico de superficie de respuesta.

En el cuadro 9 se establece los valores reales y pronosticados de la producción de biomasa, estos resultados confirmaron los valores de respuesta logrados en varios niveles de factores, lo que indica que el diseño experimental es adecuado para la matriz de datos.

Cuadro 9. Matriz de diseño y resultados según el formato de optimización.

Tratamiento	A= Lixiviado (%)	B=Fotoperiodo (h)	C= Inoculo (g/L)	Actual (g/L)	Predicho (g/L)
T1	3	16	0.3	5.23 ± 0.01	5.34
T2	9	8	0.3	2.36 ± 0.02	2.48
T3	3	8	0.3	2.92 ± 0.08	3.03
T4	9	8	0.3	3.07 ± 0.07	3.19
T5	3	8	1.0	2.84 ± 0.01	2.72
T6	9	8	1.0	2.37 ± 0.03	2.25
T7	3	16	1.0	4.43 ± 0.04	4.31
T8	9	16	1.0	4.88 ± 0.05	4.76

La figura 19 muestra el porcentaje de contribución de los factores, % lixiviado (A), fotoperiodo (B) inóculo (C), y su interacción. Se observa que el factor B alcanzó el mayor porcentaje ya que, como se ha informado, las horas de luz son de suma importancia para producir *Arthrospira* (Kumar et al., 2011), seguido del lixiviado (factor A), el cual es de importancia al considerar el lado

ambiental del trabajo, debido a que el residuo que es generado debe ser tratado antes de poder descargarlo en la red de agua.

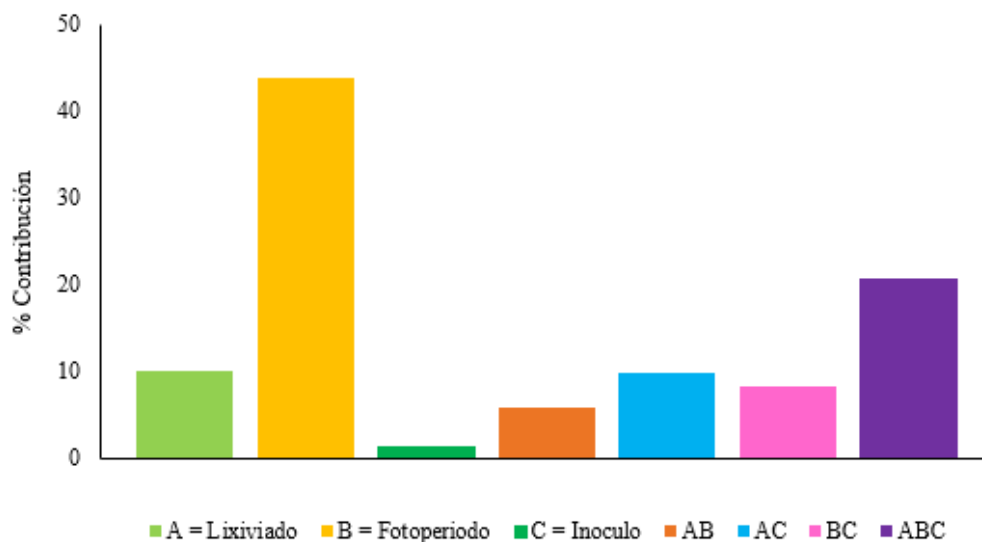


Figura 19. Porcentaje de contribución de los factores y sus interacciones.

5.1.4 Ruptura celular de *Arthrospira maxima*

La ruptura celular se midió cuantificando los aminoácidos por el método OPA (o-ftaldialdehído). La figura 20 muestra la concentración de aminoácidos para cada uno de los tratamientos. En los tratamientos de biomasa sin ruptura se encontraron 13.63 y 7.35 mg/g. Esta diferencia puede deberse al hecho de que TBG es una biomasa liofilizada y TBC es una biomasa seca a temperatura de 60°C.

Se ha informado que la liofilización puede considerarse como un pretratamiento de disrupción celular (Fernández, 2005).

Los tratamientos de congelación-descongelación alcanzaron 21.79 mg/g, mientras que los tratamientos de ultrasonidos alcanzaron 25 mg/g (T4m). En los tratamientos de congelación-descongelación, la célula se rompe cuando se cristaliza. Así lo afirman Phothiset y Charoenrein (2014), quienes corroboran al analizar con varios ciclos de congelación y descongelación, afirmando que, a mayor número de ciclos, mayor pérdida por goteo y menor firmeza, debido al hecho que la estructura celular se deteriora.

En los métodos de ultrasonidos, la ruptura se produce por la alta presión que se produce durante la implosión de las microburbujas, lo que mejora la penetración y el transporte del disolvente. Esto favorece la ruptura, ya que no se requieren solventes ni grandes cantidades de energía para llegar a ultracongelación (-25°C) para lograr la ruptura celular (Mera et al., 2020).

Debido a que el GH se calcula por la concentración de aminoácidos libres, se reportan variaciones de entre 62 a 80% de los tratamientos 2 a 7. El mayor porcentaje lo alcanzó T4m con 80%, debido a las microburbujas que penetran en la célula, como ya se mencionó anteriormente (Wang et al., 2012).

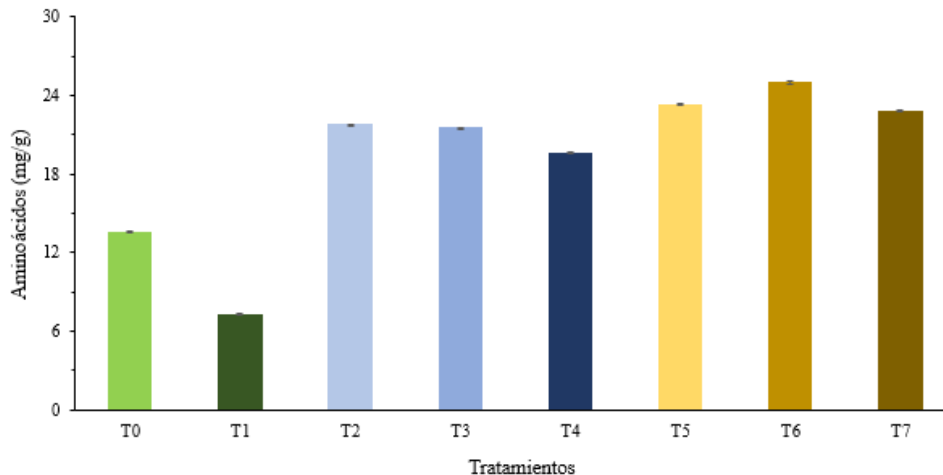


Figura 20. Concentración de aminoácidos en los tratamientos de ruptura celular.

5.1.5 Análisis de *Arthrospira maxima* mediante microscopía electrónica de barrido con detector de espectroscopia de dispersión de energía (SEM-EDS).

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido permitieron visualizar la morfología superficial de *Arthrospira* de control (sin lixiviado), *Arthrospira* sin ruptura celular (con lixiviado) y *Arthrospira* con ruptura celular (con lixiviado).

Al comparar la biomasa control sin ruptura (sin lixiviado) con la biomasa sin ruptura (con lixiviado), no es posible observar diferencias en la figura 21, sin embargo, en la biomasa con ruptura celular hay diferencia en las partículas, sobre todo en el tamaño, es decir, son partículas más pequeñas, debido a la aplicación eficiente del método de ruptura por ultrasonificación (Mason & Lorimer, 2010).

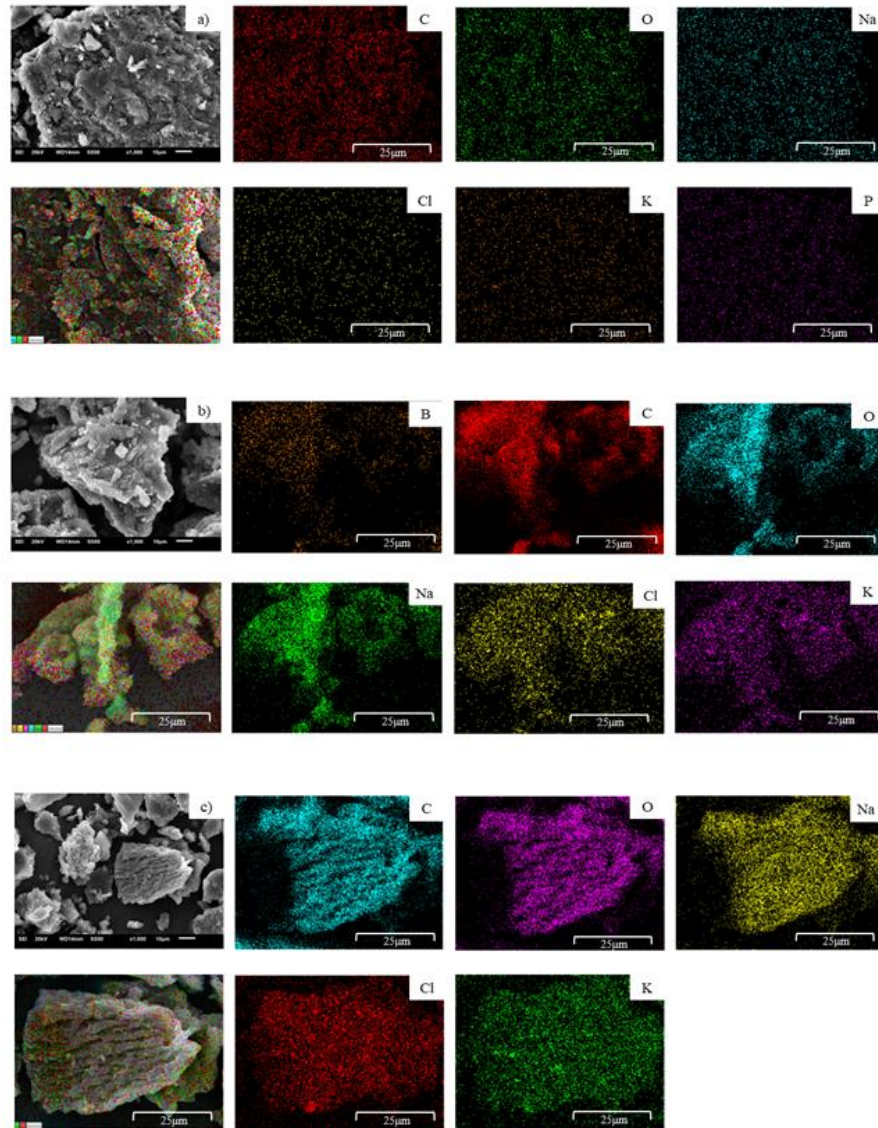


Figura 21. Micrografías SEM-EDS de *Arthrospira maxima* (a) control, (b) sin ruptura celular (c) con ruptura celular.

Además, la combinación de microscopía electrónica de barrido con espectroscopía de dispersión de rayos X (SEM-EDS) permitió identificar algunos de los 17 elementos principales en la nutrición vegetal (Figura 20) (Jones, 2016).

En el cuadro 10 se muestra el porcentaje en peso de los elementos en la biomasa de *Arthrospira maxima* antes de agregarla al lixiviado (testigo), además de la biomasa con y sin ruptura celular, los cuales fueron determinados por SEM-EDS.

Cabe mencionar que solo se examina la superficie de la biomasa, es decir, el área del tamaño del haz de electrones (Michalak et al., 2011).

Cuadro 10. Porcentaje en peso (wt %, DE) de los elementos encontrados en la biomasa de *Arthrospira* control, *Arthrospira* sin ruptura celular y *Arthrospira* con ruptura celular (ultrasonificación).

Elemento	<i>Arthrospira</i> control	<i>Arthrospira</i> sin ruptura	<i>Arthrospira</i> con ruptura
O	49.9 ± 2.7	48.1 ± 1.4	43.1 ± 1.0
Na	15.4 ± 1.0	19.9 ± 0.7	16.6 ± 0.4
N	11.0 ± 4.3	10.8 ± 2.3	12.9 ± 1.7
Cl	3.4 ± 0.3	6.2 ± 0.2	6.6 ± 0.2
K	6.2 ± 0.4	5.7 ± 0.2	5.1 ± 0.2
Cu	1.9 ± 0.5	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.2
Zn	1.3 ± 0.6	3.1 ± 0.4	2.3 ± 0.3
Mg	1.0 ± 0.3	0.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1
P	4.0 ± 0.4	-	2.7 ± 0.1
Ca	0.4 ± 0.2	-	2.1 ± 0.1
Mo	4.9 ± 0.8	-	-
Mn	0.5 ± 0.3	-	-
S	-	1.6 ± 0.3	3.0 ± 0.2

En el cuadro 10 se muestra la comparación de los elementos presentes en las diferentes biomásas. Los elementos más frecuentemente analizados de la biomasa de *Arthrospira maxima* son oxígeno (O), nitrógeno (N), carbono (C) e hidrógeno (H) (Han et al., 2021), sin embargo, debido a la posible aplicación de la biomasa en la agricultura es que analizaron fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca),

magnesio (Mg), azufre (S), boro (B), cloro (Cl), níquel (Ni), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn) y silicio (Si) (Jones, 2016).

Se encontraron diferencias en el porcentaje de Cl, Cu y Zn, las biomásas adicionadas con lixiviado duplican la cantidad en comparación con la biomasa testigo, lo que puede atribuirse a la composición química del lixiviado de frutas y verduras. El porcentaje de S no se encontró en la biomasa control, sin embargo, la biomasa sin ruptura contiene 1.6%, mientras que la biomasa con ruptura contiene 3.0%, seguramente debido a que el contenido de S está dentro de la pared celular, por lo que el porcentaje se duplica al romper la pared celular (Wang et al., 2012).

5.2 ETAPA 2. EVALUACIÓN DE BIOESTIMULANTE VEGETAL EN LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

5.2.1 Bioestimulante en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

La figura 22 muestra las longitudes de las plantas de lechuga durante los 30 días de cada uno de los tratamientos. En el día 30 el tratamiento control y los tratamientos sin ruptura celular, alcanzaron entre 2.5 y 3 cm, mientras que los tratamientos con ruptura celular presentaron 5.5 cm (0.5-C/R), esto puede

atribuirse a la liberación de los compuestos, como los aminoácidos que se encuentran dentro de la pared celular de la *Arthrospira*. Se ha reportado que tienen la capacidad de contribuir en la síntesis de las fitohormonas (Fernández, 2005).

Mientras que en los tratamientos con solución nutritiva del 25 al 100% se observaron alturas de entre 20 y 15 cm, plantas de mayor longitud a lo reportado por Ronga et al., (2019), con plantas de 9 cm en un ciclo de 25 días. No se encontraron diferencias significativas, esto indica que se puede disminuir el consumo de los fertilizantes químicos de la SN al aplicar de manera foliar 1.0 g/L de la biomasa después de la ruptura celular. Causando un gran impacto económico, debido a los costos elevados de los fertilizantes químicos (Cardoso y Moreno, 2014), además de disminución de la contaminación al ambiente por la fabricación de los fertilizantes sintéticos.

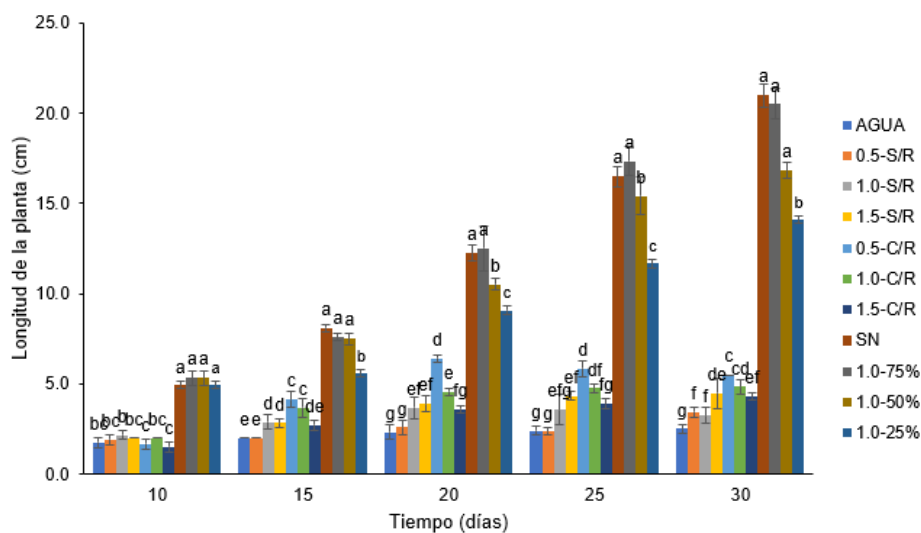


Figura 22. Longitud de la parte aérea de las plantas de lechuga.

En la figura 23 se presenta la longitud de las raíces en las plantas de lechuga. El tratamiento de 1.0 g/L y el 75% de la SN alcanzó la mayor longitud con 17.8 cm de raíz, seguido el T50 de 15.6 cm, mientras que el control llegó a 6.7 cm. Se observó que en los tratamientos donde se aplicó la biomasa de *Arthrospira máxima* con ruptura celular, la raíz alcanza una mayor longitud, debido a la liberación de fitohormonas, ya que se ha reportado que la biomasa de *Arthrospira* contiene hormonas como las citoquininas y auxinas. Navarro Amin et al. (2009) encontraron alto contenido de fitohormonas como el ácido giberélico (AG), ácido jasmónico (AJ), benciladenina (BA), ácido indol-3-acético (AAI) y ácido metil jasmónico (AJMe) en la *Arthrospira*. Las auxinas juegan un papel importante en la inducción de la iniciación de raíces y en la elongación del crecimiento (Mogor et al., 2018), las cuales están presentes dentro de la pared celular de la *Arthrospira maxima* (Zapata et al., 2021).

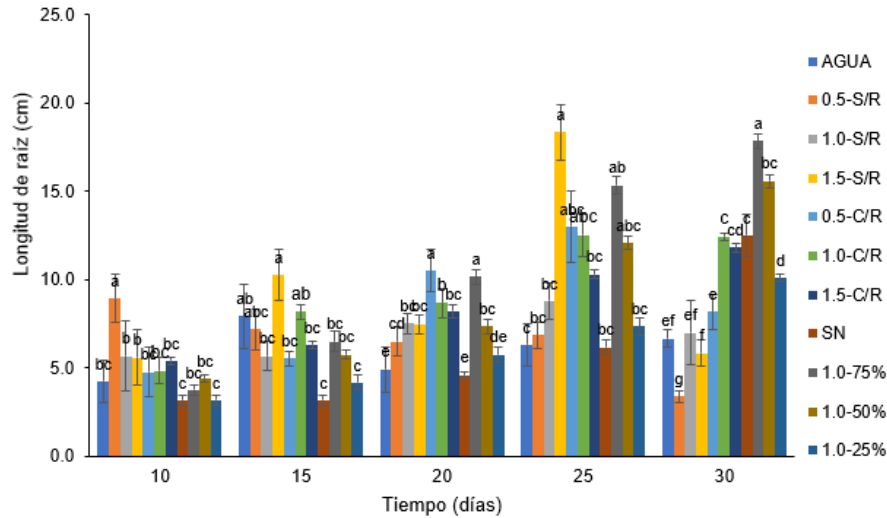


Figura 23. Longitud de raíces de lechuga.

La figura 24 y 25 muestran los resultados del peso fresco y peso seco, respectivamente. En los tratamientos SN y T 75% no se encontró diferencia significativa, pesando 19 g por planta, una producción mayor a lo reportado por Rocha et al., (2020) con un peso fresco de 15 g por planta. Este comportamiento al adicionar la biomasa a partir de la *Arthrospira* es debido a las fitohormonas, compuestos bioactivos que influyen en el proceso fisiológico de las plantas a bajas concentraciones (Navarro et al., 2019).

Mientras que los tratamientos sin la ruptura y sin SN alcanzaron los 0.6202 g. Destaca de nuevo el T con 75% de SN, siendo esto importante al disminuir costos de fertilizantes y el impacto al ambiente (Cardoso y Moreno, 2014).

Se ha demostrado que la mayoría de los extractos de alga contienen fitoreguladores como auxinas, citoquininas, giberelinas, polisacáridos, vitaminas y aminoácidos. Las auxinas estimulan la formación de raíces, además de estimular el crecimiento de tallos (Colavita et al., 2011).

En los valores del peso seco el T SN alcanzó el mayor valor con 1.1332 g de materia seca, seguido del T con 75% y 50% de SN 1.0423 y 0.4842 g, respectivamente, en el resto de los tratamientos oscilaron entre 0.0346 y 0.1969 g.

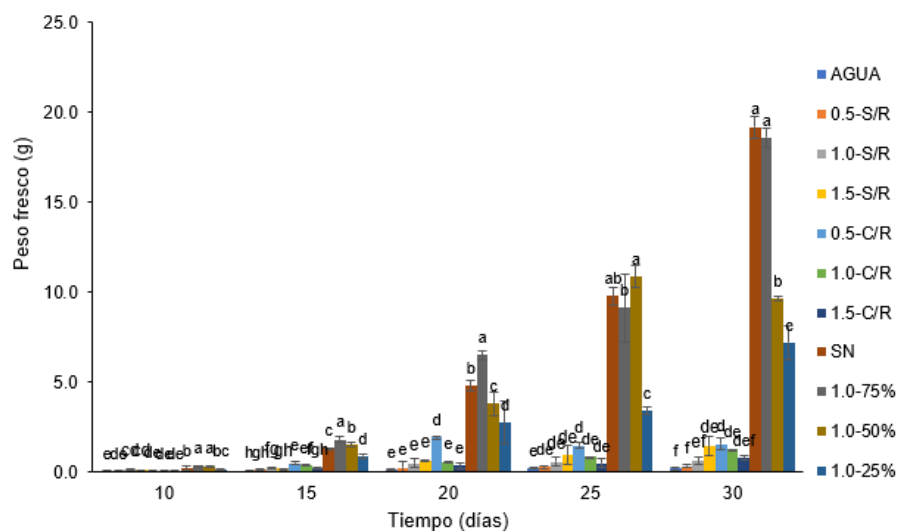


Figura 24. Peso fresco de las plantas de lechuga.

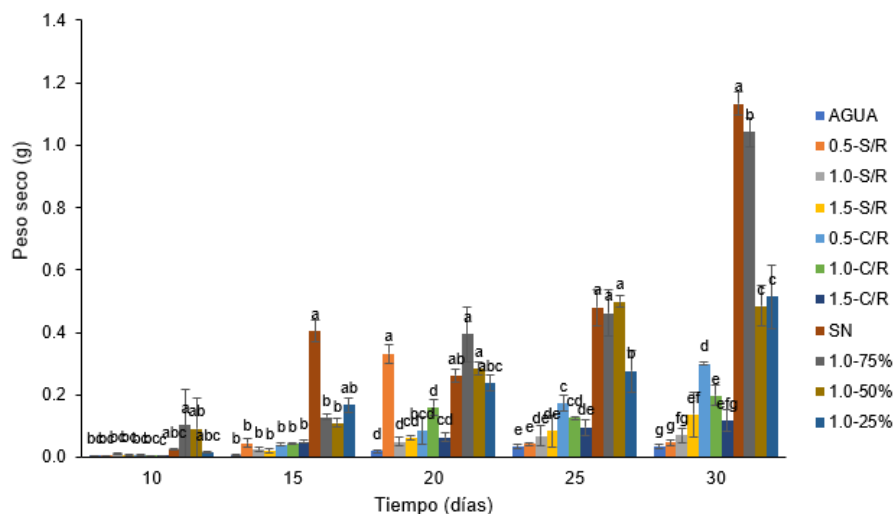


Figura 25. Peso seco de las plantas de lechuga.

5.2.1.1 Cuantificación de compuestos fenólicos en el cultivo de lechuga

En la figura 26 se observa el gráfico donde fueron graficados los puntos de la curva de calibración, donde arrojó un R^2 de 0.9999 para el ácido clorogénico.

En la figura 27 se observa el gráfico donde fueron graficados los puntos de la curva de calibración, donde arrojó un R^2 de 0.9975 para el ácido Cafeico.

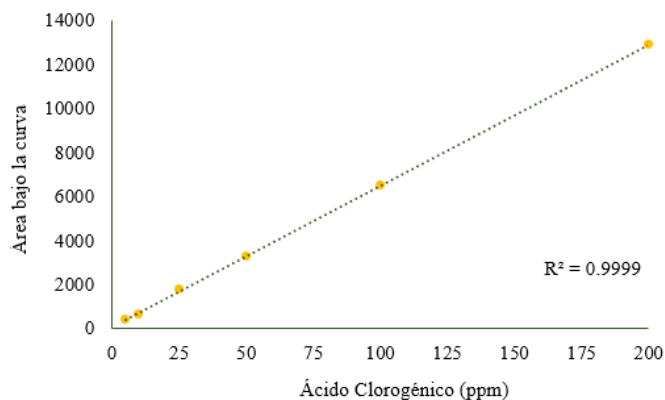


Figura 26. Gráfico de la curva de calibración para el ácido Clorogénico.

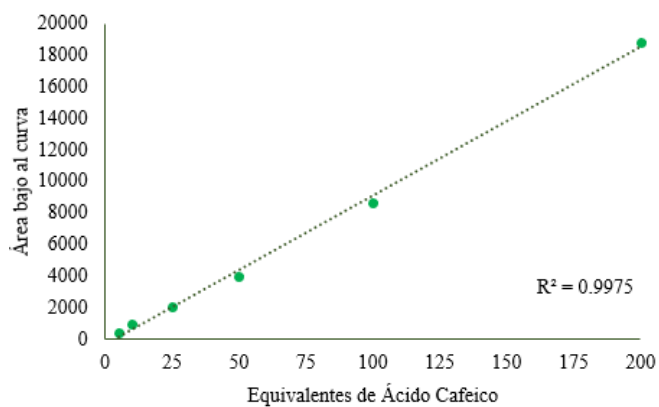


Figura 27. Gráfico de la curva de calibración para el ácido Cafeico

En el cuadro 11 se presentan los valores del área bajo la curva para la cuantificación del ácido cafeico y clorogénico en las plantas de lechuga después de 30 días de maduración. Se evaluaron estos compuestos ya que son los principales antioxidantes presentes en las plantas de lechuga (Galieni et al., 2015).

Se encontró que el valor más alto de ácido cafeico lo obtuvo el tratamiento 1.5-C/R con 316.562 mg/L, mientras que el tratamiento control alcanzó 181.735 mg 100 g⁻¹ FW, es decir, que la adición de la biomasa con ruptura celular al cultivo de lechuga aumenta la concentración del ácido cafeico (Riss et al., 2007), ya que en los tratamientos sin ruptura presentaron 133.454 mg/L con la concentración más alta de la biomasa.

Sin embargo, al combinar la solución nutritiva con la adición de la *Arthrospira* de manera foliar las concentraciones de este compuesto fenólico disminuyen drásticamente. Este comportamiento implica una interacción entre los fertilizantes químicos y los compuestos de la *Arthrospira maxima*. Para conocer cómo es que están interactuando estos compuestos es necesario realizar análisis más específicos, como el HPLC acoplado a masas (Cuesto, 2013).

El ácido clorogénico solo se encontró presente en los tratamientos donde se aplicó biomasa con ruptura celular sin ser adicionados con la SN. El tratamiento con 0.5 g/L contiene 692.863 mg 100 g⁻¹ FW, el tratamiento con 1.0 g/L 776.941 mg 100 g⁻¹ FW y el tratamiento con 1.5 g/L 784.356 mg 100 g⁻¹ FW, se puede apreciar un aumento de este compuesto fenólico al incrementar la dosis de la biomasa de la *Arthrospira*, solo en los tratamientos donde se aplicó después de la ruptura celular. En los tratamientos donde se aplicó biomasa de *Arthrospira* sin ruptura celular no se encontró el ácido clorogénico, es decir, este compuesto solo

puede encontrarse dentro de la pared celular del alga. Por otro lado, los tratamientos donde se combinaron biomasa de *Arthrospira* en una concentración de 1.0 g/L y SN al 25, 50 y 75%, no fue encontrado este compuesto antioxidante. Este comportamiento puede atribuirse a que hay una interacción entre el Ác. Clorogénico y la SN que impide ser detectado, ya que la *Arthrospira* fue aplicada después de la ruptura celular.

Cuadro 11. Cuantificación de Ácido cafeico y Ácido clorogénico en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

mg 100 g ⁻¹ FW		
TRAT	ÁC. CAFEICO	ÁC. CLOROGENICO
AGUA	181.735	-
0.5-C/R	292.581	692.863
1.0-C/R	305.057	776.941
1.5-C/R	316.562	784.356
0.5-S/R	-	-
1.0-S/R	143.782	-
1.5-S/R	133.454	-
1.0-25%	59.854	-
1.0-50%	67.751	-
1.0-75%	28.072	-
SN	25.089	-

5.2.2 Evaluación de *Arthrospira* en la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

En el cuadro 12 se presentan las variables evaluadas en la germinación de semillas de lechuga. El tratamiento con la mayor longitud de la planta fue el T8 (50% SN-1.0 g/L *Arthrospira*) con 2.2 cm, mientras que el control (agua) llegó a 1 cm y el T6 (100% SN) a 1.5 cm. La combinación de la solución nutritiva en 50%

con la biomasa de *Arthrospira maxima* en una concentración de 1.0 g/L aumentó la longitud de las plantas, debido a las fitohormonas que contiene el alga (Navarro-López et al., 2019). La longitud de la raíz se vio estimulada al agregar la biomasa de *Arthrospira maxima* en diferentes concentraciones, el control alcanzó una longitud de 4.4 cm, mientras que para el T8 (50% SN-1.0 g/L *Arthrospira*) fue de 10.6 cm, la longitud más alta. El resto de los tratamientos, aunque no superan al T8 si superaron al control (agua), debido a la fitohormona auxina, la cual se encarga del desarrollo y elongación de las raíces (Amin et al., 2009). El peso fresco y seco más alto fue para el T7 (100% SN).

El índice de germinación (IG %) para el tratamiento control fue de 96.70 %, en los tratamientos donde se aplicó la biomasa de 0.5, 1.0 y 1.5 g/L sin ruptura celular y sin solución nutritiva aumentó a 101.72 %, mientras que en los tratamientos de 1.0 y 1.05 g/L con ruptura celular y sin SN aumentó a 152.59 y 155.17 % respectivamente. El tratamiento con el 100 % de la SN sin aplicarle biomasa de *Arthrospira maxima* superó al tratamiento control con 5.02 %, debido a los nutrientes que contiene dicha solución, sin embargo, al disminuir el porcentaje de la SN y añadir biomasa de *Arthrospira maxima* en una concentración de 1.0 g/L con ruptura celular aumentó hasta un 227.59 % para el tratamiento T9 (50% SN-1.0 g/L *Arthrospira*), ya que se ha reportado que la biomasa de alga

contiene fitohormonas como las citoquininas y auxinas, las cuales son capaces de aumentar la velocidad de germinación (Amin et al., 2009).

Cuadro 12. Parámetros agronómicos de semillas de lechuga.

Tratamiento	IG (%)	Planta (cm)	Raíz (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
T0	96.70 ^{ef}	1.0 ^e	4.4 ^f	0.0259 ^f	0.0017 ^e
T1	100.00 ^e	1.0 ^e	5.8 ^{ef}	0.0350 ^{cd}	0.0021 ^{cd}
T2	101.72 ^e	1.0 ^e	6.4 ^{def}	0.0337 ^{cdf}	0.0022 ^{bc}
T3	101.72 ^e	1.0 ^e	7.5 ^{cde}	0.0333 ^{cdf}	0.0019 ^{cde}
T4	101.72 ^e	1.0 ^e	6.9 ^{cde}	0.0276 ^{df}	0.0017 ^e
T5	152.59 ^d	1.5 ^d	10.1 ^{ab}	0.0367 ^c	0.0018 ^{de}
T6	155.17 ^d	1.5 ^d	8.8 ^{abc}	0.0362 ^c	0.0054 ^e
T7	101.72 ^e	1.8 ^{bc}	8.1 ^{bcd}	0.0714 ^a	0.0027 ^a
T8	183.10 ^c	2.2 ^a	10.6 ^a	0.0639 ^{ab}	0.0025 ^{ab}
T9	227.59 ^a	1.9 ^b	8.2 ^{bcd}	0.0615 ^b	0.0022 ^{bc}
T10	196.55 ^b	1.8 ^c	8.2 ^{bcd}	0.0566 ^b	0.0019 ^{cde}

5.3 ETAPA 3. EVALUACIÓN DE BIOESTIMULANTE VEGETAL EN PEPINO (*Cucumis sativus L.*) Y TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*)

El tomate y el pepino se consideran las plantas vegetales más importantes y comunes en muchos países. Se han realizado muchos estudios en tomate para desarrollar bioestimulantes, que pueden mejorar la formación de raíces laterales y longitudinales, la absorción de nutrientes de las raíces, aumentando el volumen total y el vigor del sistema radicular.

5.3.1 Bioestimulante en plántulas de pepino (*Cucumis sativus L.*)

La evaluación de la biomasa como bioestimulante vegetal en la producción de plántulas de pepino se presenta a continuación. La figura 28 muestra la longitud de las plantas de pepino durante los 25 días de producción. Se puede apreciar un aumento gradual de su crecimiento, en el día 25 alcanzaron 6.9, 9.3, 8.6 y 9.3 cm, los tratamientos de P25, P50, P75 y P100 respectivamente. No se encontró diferencias significativas entre los tratamientos T50 y T100, esto indica que se puede reducir hasta un 50% el uso de la SN adicionando la biomasa de *Arthrospira maxima* con ruptura celular en una concentración de 1.0 g/L. Esto debido a que la biomasa a partir de algas contiene fitohormonas, compuestos bioactivos que influyen en el crecimiento de las plantas (Navarro et al., 2019).

Se han descrito compuestos como el ácido abscísico (ABA), el cual genera presión en los puntos de crecimiento, es decir, que actúa como un inhibidor, evitando el crecimiento vegetal (Niemann & Doring, 1980). Plaza et al. (2018) analizaron el contenido de *Arthrospira* sp. hidrolizada y encontraron contenido de ABA, entre otras fitohormonas como las giberelinas.

En la figura 29 se presenta la longitud de las hojas, la mayor longitud la alcanzó el P100 con 10 cm, mientras que en el resto es de 6 a 8 cm. La *Arthrospira* no tuvo influencia en la longitud de las hojas de pepino como en las hojas de lechuga, esto comportamiento puede atribuirse a la diferencia de familias; la lechuga pertenece a la familia *Asterácea*, mientras que la familia del pepino es *Cucurbitácea*.

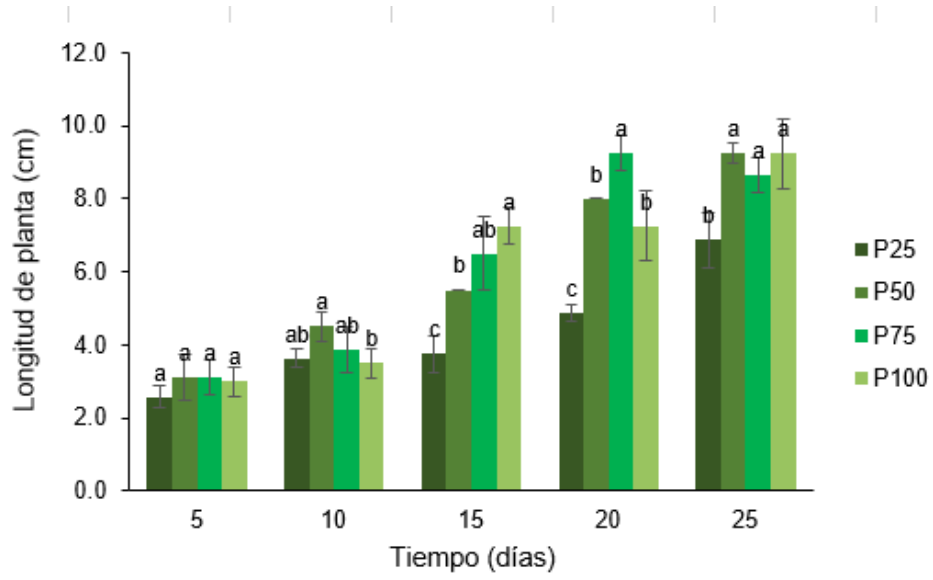


Figura 28. Longitud de plantas de pepino.

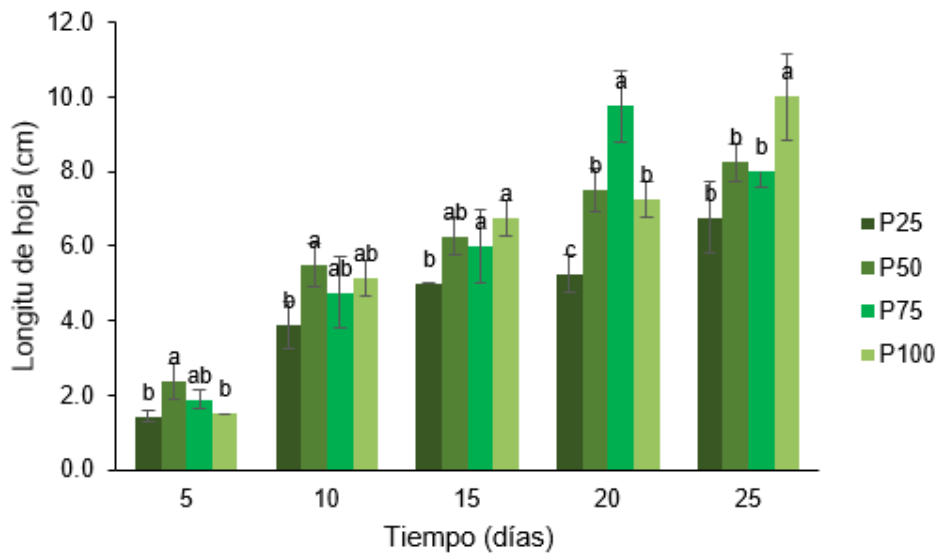


Figura 29. Longitud de hojas de plantas de pepino

El peso en fresco de las plantas se muestra en la figura 30. En el día 25 se alcanzaron 2.8, 4.1, 5.5 y 5.4 g, en los tratamientos P25, P50, P75 y P100 respectivamente. Entre los P50, 75 y 100 no se encontró diferencia significativa, mientras que en el día 20 el peso fresco más alto lo alcanzó el P75, superando al P100 con 2.0 g por planta, ya que se ha demostrado que la biomasa de alga mejora el crecimiento en las plantas de pepino (Abd Elhafiz et al., 2015). El tratamiento con el valor más alto de materia seca fue el P50 con 1.30 g, seguido de P25 con 1.09 g, P100 0.62 g y finalmente P75 0.45 g.

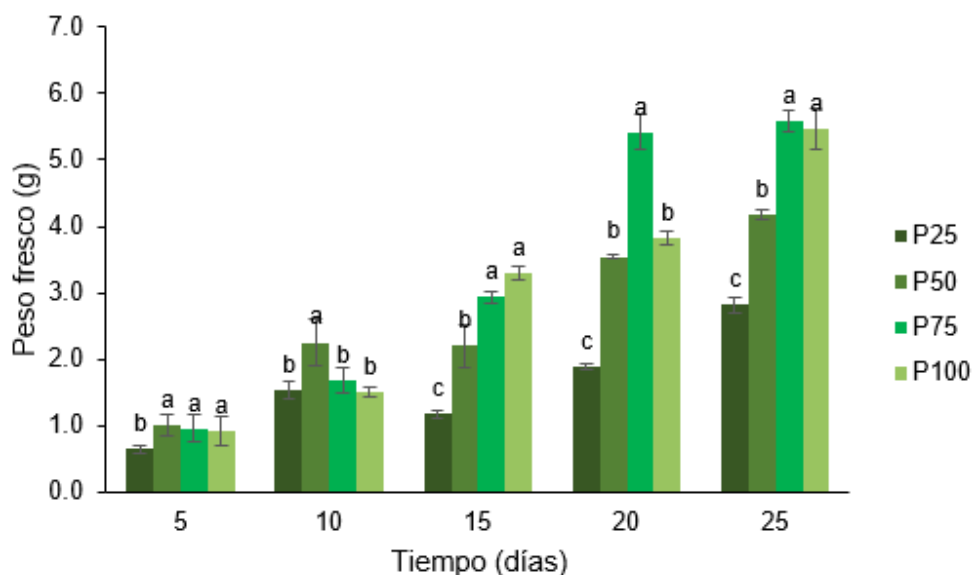


Figura 30. Peso fresco de plantas de pepino

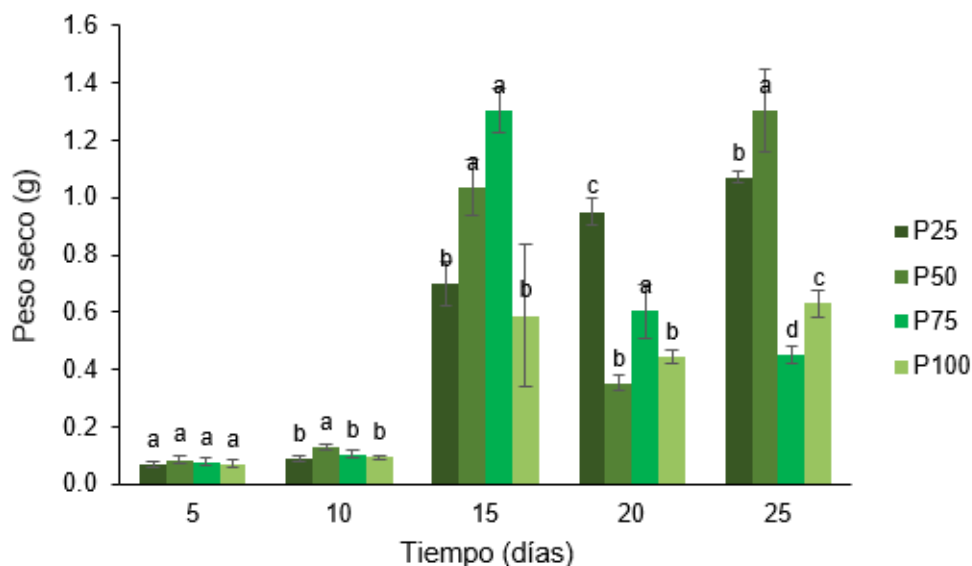


Figura 31. Peso seco de plantas de pepino.

5.3.2 Bioestimulante en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Se ha estudiado el uso de alga en el sistema de riego para la producción de tomate en suelos con poca disponibilidad de nutrientes (García-Senin, 2013).

Hernandez-Herrera et al. (2014) reportaron mejor germinación de semillas y crecimiento en plántulas de tomate utilizando extractos de alga, un comportamiento similar a los resultados que se muestran en la figura 32. La mayor longitud de las plántulas de tomate la alcanzó el T75, tratamiento con solo el 75% de la solución nutritiva más la biomasa de *Arthrospira maxima* en una concentración de 1.0 g/L.

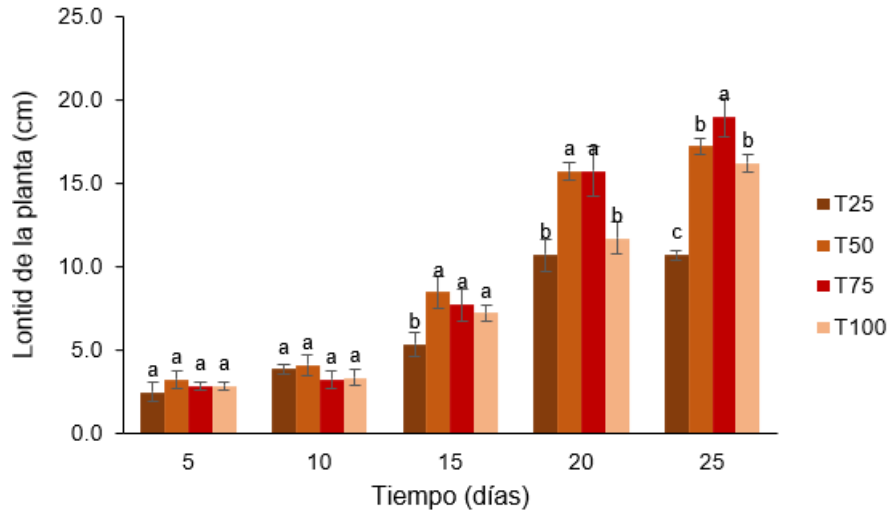


Figura 32. Longitud de la parte aérea de las plantas de tomate.

La figura 33 presenta la longitud de hojas de las plántulas de tomate, a los 25 días el T25 alcanzó una longitud de 5 cm, mientras que los T50, T75 y T100 una longitud de 6 cm. No encontró diferencia significativa entre los cuatro tratamientos. Se logra reducir el consumo de la solución nutritiva hasta un 75%, ya que la biomasa de *Arthrospira maxima* contiene una alta concentración de citoquininas, fitohormona que controla la división celular, el desarrollo de las yemas y el desarrollo de las hojas (Tarakhovskaya et al., 2007).

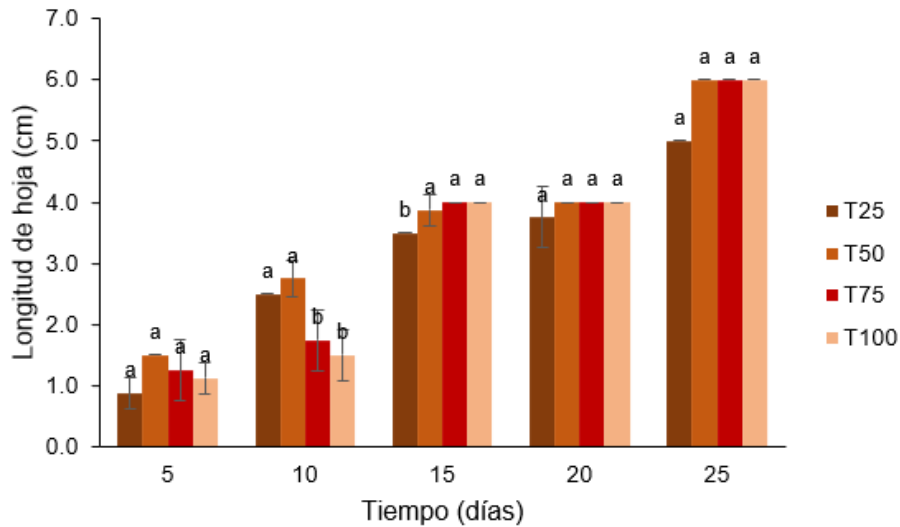


Figura 33. Longitud de las hojas de las plantas de tomate.

El peso fresco de las plántulas de tomate se observa en la figura 34. El tratamiento con el peso más alto es el T75 (5 g por planta), superando al resto de los tratamientos por 3 g por planta. La aplicación de *Arthrospira* le aportó la fitohormona citoquinina, la cual tiene influencia sobre el crecimiento de las plantas.

Stirk et al. (2002) evaluaron la presencia de citoquininas en diez cepas diferentes de microalgas y afirmaron un resultado positivo en todas ellas, siendo especialmente significativo en especies como *Scenedesmus quadricuada* y *Chlamydomonas sp.*

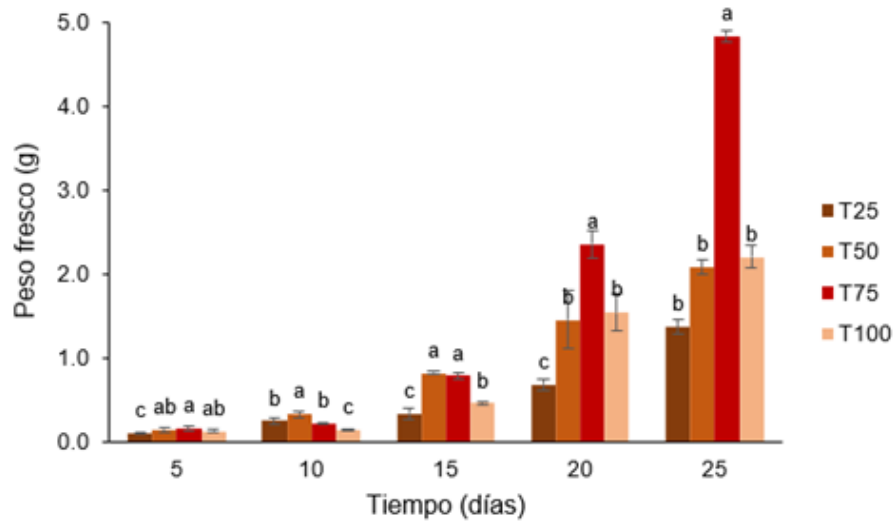


Figura 34. Peso fresco de las plantas de tomate.

La figura 35 presenta el peso seco de las plántulas de tomate, el mejor tratamiento fue el T50 con 1.3 g por planta, superando al T100 por 1 g, debido a que al utilizar algas permite incrementar el peso seco, como lo reportan (Barone et al., 2019).

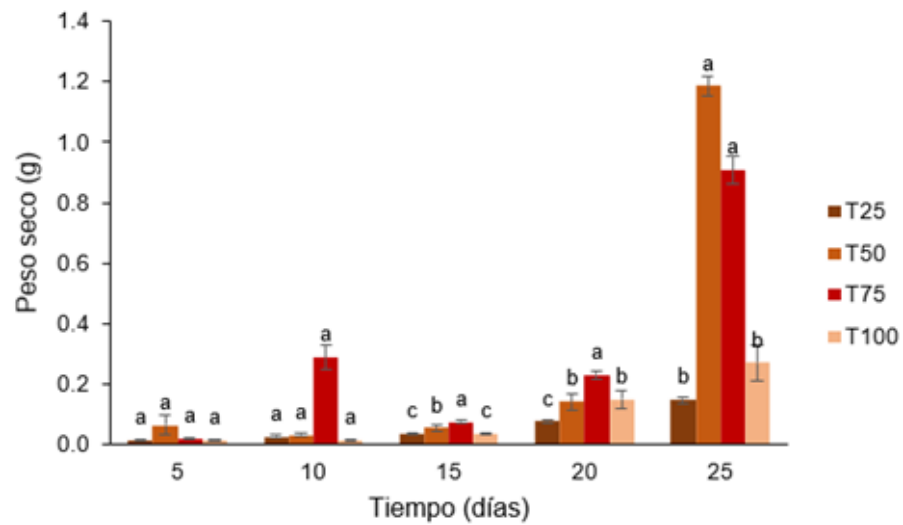


Figura 35. Peso seco de las plantas de tomate.

5.3.3 Cuantificación de antioxidantes en plántulas de pepino y tomate

La cuantificación de los antioxidantes presentes en las hojas de las plántulas de pepino y tomate se presentan en el cuadro 13.

En las plántulas de pepino se observa un incremento en la concentración de fenoles al disminuir el porcentaje de la solución nutritiva, este comportamiento es debido a que se ha reportado que cuando la planta es expuesta a estrés de algún tipo genera una mayor cantidad de antioxidantes (Domínguez et al., 2014). Se provocó estrés en la planta debido a la falta de algunos nutrientes (Sarabia et al., 2010), sin embargo, en los parámetros agronómicos no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos P50, P75 y P100, es decir se ahorra hasta un 50 % de la SN, además de aumentar la concentración de fenoles.

En las plántulas de tomate el comportamiento fue totalmente opuesto, es decir, en el tratamiento con el menor porcentaje de SN se encontró la menor concentración de fenoles. El tratamiento T75 contiene 146.64 mg EAG 100 g⁻¹ de fenoles, siendo la concentración más alta.

Por otro lado, la concentración de flavonoides y DPPH en las plántulas de pepino el tratamiento con el mayor valor es del P75, mientras que para ABTS en el P50, en donde se logró reducir el consumo de la SN.

Cuadro 13. Antioxidantes en plántulas de tomate.

Tratamiento	Fenoles	Flavonoides	DPPH	ABTS
T25	549.35 ^a	329.08 ^a	3204.37 ^a	4705.50 ^a
T50	408.40 ^b	197.00 ^b	2070.00 ^b	2200.50 ^d
T75	343.81 ^c	173.66 ^c	2477.81 ^c	3509.50 ^b
T100	334.21 ^d	146.58 ^d	1723.12 ^d	3104.50 ^c

Cuadro 14. Antioxidantes en plántulas de pepino.

Tratamiento	Fenoles	Flavonoides	DPPH	ABTS
P25	79.89 ^d	18.85 ^c	73.12 ^b	2823.00 ^a
P50	118.67 ^c	26.27 ^b	687.18 ^a	1585.50 ^b
P75	146.64 ^a	31.17 ^a	813.75 ^a	1540.50 ^b
P100	125.70 ^b	27.12 ^b	776.25 ^a	1416.75 ^b

6. CONCLUSIONES

La producción de *Arthrospira maxima* a partir de lixiviado de frutas y verduras en una concentración de un 9% es favorable, en la cual se obtiene una producción de biomasa rica en nutrientes que la hacen útil para su aplicación como bioestimulante.

En la producción de lechuga los mejores tratamientos fueron aquellos que fueron combinados con la solución nutritiva en diferentes porcentajes y la biomasa de *Arthrospira maxima* en una concentración de 1.0 g/L. Se puede concluir que es posible disminuir un 25% de la solución nutritiva al utilizar biomasa de *Arthrospira*, lo que genera un menor costo de producción, además de disminuir el impacto ambiental al estar utilizando biomasa de alga como bioestimulante. Este mismo comportamiento se encontró en la germinación de las semillas de lechuga.

En las plántulas de pepino y tomate se encontraron resultados favorables al aplicar la biomasa de *Arthrospira maxima*. En las plántulas de pepino no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos P100, P75 y P50. De forma que se logró disminuir el consumo de la solución nutritiva en unos casos hasta un 50% al aplicar la biomasa de *Arthrospira maxima*.

La aplicación del bioestimulante a partir de biomasa de alga en plántulas de tomate tiene efectos positivos en la altura de la plántula. En la longitud de las hojas

no se encontró diferencia significativa entre los cuatros tratamientos, es decir que, en este parámetro, se logró disminuir hasta un 75% de la SN. El mayor peso fresco y peso seco fue para el T75, disminuyendo un 25% de la SN.

La aplicación de *Arthrospira maxima* como bioestimulante tiene efectos favorables en las plantas y semillas de lechuga, además, de las plántulas de pepino y tomate, es por esto, que se puede seguir evaluando en diferentes cultivos, y poder disminuir o lograr sustituir a los fertilizantes químicos modificando las condiciones de crecimiento de las algas.

7. REFERENCIAS

A. Ferrante, L. Incrocci, R. Maggini, G. Serra, F. Tognoni. Colour changes of fresh-cut leafy vegetables during storage. *J. Food, Agri. And Environ.* 2004, 2(3&4), 40-44.

A. Richmond, "Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview," *Hydrobiologia* 512:, vol. 512, pp. 33–37, 2004.

Arias-Martínez, S., Betancur, F., Gómez, G., Salazar, J. y Hernández M., 2010. Phytoremediation with artificial wetlands for the treatment of swine wastewater. *Informador Técnico (Colombia)*,74:12-22.

Abd El-Baky HH, Hussein MMand El-Baroty GS, Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. *Afr J Biochem Res.* 2008, 2, 151–164.

Abd Elhafiz A., Abd Elhafiz A., Gaur S.S., Hamdany N., Osman M., Lakshmi T.V.R. 2015. *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* live cells appear to be promising sustainable biofertilizer to grow rice, lettuce, cucumber and eggplant in the UAE Soils. *Recent Research in Science and Technology*, 7: 14-21.

Ahmad Mahtab, Ok Youg, Kim Byan-Moung, Ahn Jae-Nyoung, Lee Young Ha, Zhong Mina, Moon Deok Hyun, Al-wabel Mohammad I. Impacto of soybean stover-and pine needle-derived biochar son Pb and As mobility, microbial community, and carbon stability in a contaminated agricultural soil. *Journal of Environmental Management*. 2016, 166, 131-139.

Ahmad, M., Lee, S.S., Dou, X., Mohan, D., Sung, J.K., Yang, J.E., Ok, Y.S. Effects of pyrolysis temperature on soybean stover- and peanut shell-derived biochar properties and TCE adsorption in water. *Bioresour. Technol.* 2012, 118, 536-544.

AlobwedeEmonga, Leake Jonathan R., JagrronPondhal. Circular economy fertilization: Testing micro and macro algal species as soil improvers and nutrient sources for crop production in greenhouse and field conditions. *Geoderma*, 2019, 334, 113-123.

Amalia Domínguez, Yunel Pérez, Silvia Alemán, Marila Sosa, Leticia Fuentes, Rodolfo Darias, Johny Demey, Ramón Rea, Daynet Sosa. Respuesta de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. al estrés porsequía. *Biotecnología Vegetal*, 2014, Vol. 14, No. 1: 29 – 36.

Amin, G.H., Al-Gendy, A.A., Yassin, M.E.-A., Abdel-Motteleb, A. 2009. Efect of *Spirulina Platensis* extract on growth, phenolic compounds and

antioxidant activities of *Sisymbrium Irio callus* and cell suspension cultures. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 3, 2097–2110.

Ashour, M.; Hassan, S.M.; Elshobary, M.E.; Ammar, G.A.G.; Gaber, A.; Alsanie, W.F.; Mansour, A.T.; El-Shenody, R. Impact of Commercial Seaweed Liquid Extract (TAM®) Biostimulant and Its Bioactive Molecules on Growth and Antioxidant Activities of Hot Pepper (*Capsicum annuum*). *Plants* 2021, 10, 1045.

Avagyan, A.B., *Algae to Energy and Sustainable Development, Technologies, Resources, Economics and System Analyses. New Design of Global Environmental Policy and Live Conserve Industry.* Amazon, ISBN. 2018, 13, 978.

Aziz ShuokrQarani, Abdul Aziz Hamidi, Suffian Yusoff Mohd, Mohammed J.K Bashir, Muhammad Umar. 2010. Leachate characterization in semi-aerobic and anaerobic sanitary landfills: A comparative study. *Journal of Environmental Management* 91, 2608e2614.

Aziz, A., B. Poinssot, X. Daire, M. Adrian, A. Bézier, B. Lambert, J.-M. Joubert, A. Pugin. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2003, 16, 1118-1128.

Barone, V.; Puglisi, I.; Fragalà, F.; Lo Piero, A.R.; Giurida, F.; Baglieri, A. 2019. Novel bioprocess for the cultivation of microalgae in hydroponic growing system of tomato plants. *J. Appl. Phycol.*, 31, 465–470.

Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithviraj B. 2015. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 30(196), 39–48.

Boote K, Allen Jr. LH, V Prasad PV, Baker JT, Gesch RW, Snyder AM, Pan D, Thomas MG. Elevated temperature and CO₂ impacts on pollination, reproductive growth, and yield of several globally important crops. *Journal of Agric. Meteorol.* 2005, 60, 469-474.

Borsato, L.C., R.M. Di Piero & M.J. Stadnik. Mecanismos de defesa eliciados por ulvina contra *Uromyces appendiculatus* em tres cultivares de feijoeiro. *Tropical Plant Pathology*. 2010, 35(5), 318-322.

Bradáčová K, Weber NF, Morad-Talab N, Asim M, Imran M, Weinmann M, et al. Micronutrients (Zn/Mn), seaweed extracts, and plant growth-promoting bacteria as cold-stress protectants in maize. *Chem Biol Technol Agric*. 2016, 3(1), 19.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254.

Cai, Ting, Stephen Y. Park, and Yebo Li. “Nutrient Recovery from Wastewater Streams by Microalgae: Status and Pro-spects.”*Renew. sustain. energy rev*, 2013 19: 360–69.

Cardoso, M. & Moreno, R., 2014. Optimizing fertilizer use in coffee crops. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Esp. Núm. 8* p. 1433-1439.

Carillo, P.; Cirillo, C.; De Micco, V.; Arena, C.; De Pascale, S.; Roupael, Y. Morpho-anatomical, physiological and biochemical adaptive responses to saline water of *Bougainvillea spectabilis* Willd. trained to diferent canopy shapes. *Agric. Water Manag.* 2019, 212, 12–22.

Carrillo Petronia, Ciarmello Loredana F., Woodrow Pasqualita, Corrado Giandomenico, Chiaiese Pasquale and RoophaelYoooset. Enhacingsustainability by improving plant salt tolerance through macro and micro-algal biostimulants. *Biology*. 2020, 9, 253.

Castellanos-Barriga, L.G., F. Santacruz-Ruvalcaba, G. Hernández-Carmona, E. Ramírez-Briones & R.M. Hernández-Herrera. Effect of seaweed extracts from *Ulva lactuca* on seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*). *J. Appl. Phycol.* 2017, 29, 2479–2488.

ÇelekliAbuzer, Yavuzatmaca Mehmet. 2009. Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. *Bioresour Technol*, 100, 1847–1851.

Chandía, N.P., B. Matsuhira, E. Mejías & A. Moenne. Alginic acids in *Lessonia vadosa*: Partial hydrolysis and elicitor properties of the polymannuronic acid fraction. *J. Appl. Phycol.* 2004, 16, 127-133.

Chandía, N.P., B. Matsuhira. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008, 42, 235-240.

Chinnasamy Senthil, Bhatnagar Ashish, Hunt Ryan W., Das K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour. Technol*, 2010, 101, 3097–3105.

Cuesto, S. 2013. Desarrollo de metodologías de cuantificación de compuestos orgánicos basados en dilución isotópica en línea de carbono-13 y espectrometría de masas. Tesis (Doctorado en Análisis Químico, Bioquímico y Estructural Avanzado). Oviedo, España, Universidad de Oviedo, 8 p.

Dembitsky, V.M., R. Smoum, A. Al-Quntar, H.A. Ali, I. Pergament & M. Srebnik. Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant. Sci.* 2002, 163, 931–942.

du Jardin, P. Review: Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hort.* 2015, 196, 3–14.

Elarroussia, H.; Elmernissia, N.; Benhimaa, R.; El Kadmiria, I.M.; Bendaou, N.; Smouni, A.; Wahbya, I. Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. *J. Algal Biomass Utiln.* 2016, 7, 55–63.

Ertani, A., Francioso O, Tinti A, Schiavon M, Pizzeghello D, Nardi S. Evaluation of Seaweed Extracts from *Laminaria* and *Ascophyllum nodosum* spp. as Biostimulants in *Zea mays* L. Using a Combination of Chemical, Biochemical and Morphological Approaches. *Front. Plant. Sci.* 2018, 9, 428.

Evelin H, Kapoor R, Giri B. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany.* 2009, 104, 1263–1280.

Fernández, T. Proteína de la Espirulina con fines terapéuticos. La Habana Cuba. *Revista científica cubana*, 2005.

Galieni Angelica, Di Mattia Carla, De Gregorio Miriam, Speca Stefano, Mastrocola Dino, Pisante Michele, Stagnari Fabio. 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae* 187, 93–101.

Garcia-Senin S. 2013. Microalgae bio-stimulating effect on traditional tomato agriculture. *Botanica Marina*, 34: 469-473.

Gaspar, R.; Fonseca, R.; Pereira, L. *Illustrated Guide to the Macroalgae of Buarcos Bay, Figueira da Foz, Portugal*, 1st ed.; MARE UC, DCV, FCT: Coimbra, Portugal. 2020, p. 128.

Gemin Luis Gabriel, MógorÁtilaFransisco, Amatussi Juliana De Olivera, mógor Gilda. Microalgae associated to humic acid as a navel Biostimulant improving onion growth and yield. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256, 108560.

Graves, A.R., Morris, J., Deeks, L.K., Rickson, R.J., Kibblewhite, M.G., Harris, J.A., Farewell, T.S., Truckle, I. The total costs of soil degradation in England and Wales. *Ecol. Econ.* 2015, 119, 399–413.

Gunupuru LR, Patel JS, Sumarah MW, Renaud JB, Mantin EG, Prithiviraj B. A plant biostimulant made from the marine brown algae *Ascophyllum nodosum* and chitosan reduce *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination in wheat. *PLoS ONE*. 2019, 14(9), e0220562.

Han Jiahui, Li Xing, Kong Shengyan, Xian Guang, Li Hualong, Li Xun, Li Jie, Zhang Jinglai, Meng Han, Wang Huansheng, Du Hongbiao, Zeng Fangang. Characterization of column chromatography separated bio-oil obtained from hydrothermal liquefaction of *Spirulina*. *Fuel*, 2021, 297, 120695.

Hernández-Herrera R.M., Santacruz-Ruvalcaba F., Ruiz-López M.A., Norrie J. 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum Lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology*, 26(1): 619-628.

Hernández-Herrera, R.M., F. Santacruz-Ruvalcaba, J. Zañudo-Hernández & G. Hernández-Carmona. Activity of seaweed extracts and polysaccharide-enriched extracts from *Ulva lactuca* and *Padina gymnospora* as growth promoters of tomato and mung bean plants. *J. Appl. Phycol.* 2016, 28, 2549–2560.

Higo Masao, Azuma Mirai, Kamigoshihara Yosuke, Kanda Akari, Tatewaki Yuya and Isobe Katsunori. Impacto of phosphorus fertilization on tomato growth and Arbuscular Mycorrhizal fungal. *Microorganisms*. 2020, 81, 178.

Jones J. B. Jr, 2016. *Hydroponics: A Practical Guide For The Soilless Grower*. Florida: CRC Press.

Kapoore Rahul Vijay, Wood Eleonor E., Llewellyn Carole A. algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*. 2021, 49, 107754.

Khan, W., U.P. Rayirath, S. Subramanian, M.S. Jithesh, P. Rayorath, D.M. Hodges, A.T. Critchley, J.S. Craigie, J. Norrie & B. Prithiviraj. Seaweed extracts

as Biostimulants of Plant Growth and Development. *J. Plant. GrowthRegul.* 2009, 28, 386–399.

Koehler LH. 1952. Differentiation of carbohydrates by antrone reaction, rate and color intensity. *Analytical Chemistry* 24 (10): 1576-1591.

Kumar Manoj, Kulshreshtha Jyoti, Pal Singh Gajendra. Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium spirulina platensis at different light intensities and temperature. *Braz J Biol* , 2011, 42: 1128-1135.

Liu F, Jensen CR, Andersen MN. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Field Crops Research.* 2004, 86, 1-13.

Liyana-Pathirana and Shahidi F, Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chem.* 2007, 101, 1151–1157.

López-Contreras, J.J., F. Zavala-García, V. Urías-Orona, G.C.G. Martinez-Avila, R. Rojas, and G. Niño-Medina. 2015. Chromatic, phenolic and antioxidant properties of Sorghum bicolor genotypes. *NotulaeBotanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 43(2):366-370.

Lorenzen, C. J. 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep Sea Res.*, 13: 223-227.

Mahapatra, D.M., Chanakya, H.N., Ramachandra, T.V., 2011b. Role of macrophytes in sewage fed urban lake. *Inst. Integr. Omics. Appl. Biotechnol.* 2, 1e9.

Marcela Sarabia Ochoa, Rocío Madrigal Pedraza, Miguel Martínez Trujillo y Yazmín Carreón Abud. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 2010, 12(1): 65 – 71.

Mera Moraima, Recalde Edmundo, Lema Katherine. Evaluación de soluciones de microalgas (*Scenedesmus* sp) como bioestimulante natural en el cultivo hidropónico de lechuga (*Lactuca sativa* L). *Axioma, Revista de Investigación, Docencia y Proyección Social*, 2020, No 21, pp 53-60.

Mercier, L., C. Lafitte, G. Borderies, X. Briand & M-T. Esquerré-Tugayé. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytologist*. 2001, 149, 43-51.

Michalak I., Mironiuk M., Marycz K. A comprehensive analysis of biosorption of metal ions by macroalgae using ICP-OES, SEM-EDX and FTIR techniques, *PLoS One*, 2018, 13 (10), e0205590.

Michalak I., Chojnacka K., Marycz K. Using ICP-OES and SEM-EDX in biosorption studies, *Microchim. Acta*, 2011, 172, 65–74.

Michalak, I., K. Chojnacka & A. Saeid. Plant Growth Biostimulants, Dietary Feed Supplements and Cosmetics Formulated with Supercritical CO₂. Algal Extracts. *Molecules*, 2017, 22 (1), 1–17.

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stress. *Plant, Cell and Environment*. 2010, 33, 453–467.

Mittler, R. y Blumwald, E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 2010, 61, 443-462.

Mógor Átila Francisco, Ördög Vince, Pereira Lima Guiseppina Pace, Molnár Zoltán, Mógor Gilda. 2018. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *J Appl Phycol*, 30:453-460.

Mor Suman, Ravindra Khaiwal, Dahiya R. P. and Chandra A. 2006. Leachate characterization and assessment of groundwater pollution near municipal solidwaste landfill site. *Environmental Monitoring and Assessment*, 118: 435–456.

Mulbry W, Kondrad S and Pizarro C, Biofertilizers from algal treatment of dairy and swine manure effluents. *J Veg Sci*. 2007, 12, 107–125.

Nair P, Kandasamy S, Zhang J, Ji X, Kirby C, Benkel B, et al. Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genom.* 2012, 13(1), 643.

Navarro-López Elvira, Ruíz-Nieto Angela, Ferreira Alice, F. Acién Gabriel and Gouveia Luisa. 2019. Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. *Molecules*, 25, 664.

Nedumaran, T.; Arulbalachandran, D. Seaweeds: A Promising Source for Sustainable Development. In *Environmental Sustainability: Role of Green Technologies*; Thangavel, P., Sridevi, G., Eds.; Springer: New Delhi, India. 2015, 65–88.

Nekvapil, F.; Ganea, I.-V.; Ciorîţ, Ńa, A.; Hirian, R.; Tomšić, S.; Martonos, I.M.; Cintă Pinzaru, S. A New Biofertilizer Formulation with Enriched Nutrients Content from Wasted Algal Biomass Extracts Incorporated in Biogenic Powders. *Sustainability*. 2021, 13, 8777.

Nielsen P.M., Petersen D., and Dambmann C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science* - Vol. 66, No. 5.

Niemann, D.I.; Dörffling, K. 1980. Growth-inhibitors and growth-promoters in *enteromorpha compressa* (chlorophyta)1. *J. Phycol.*, 16, 383–389.

Pereira, L.; Correia, F. Algas Marinhas da Costa Portuguesa—Ecologia, Biodiversidade e Utilizações, 1st ed.; Nota de Rodapé Editores: Paris, France. 2015, p. 341.

Phothiset, S., & Charoenrein, S. Effects of freezing and thawing on texture, microstructure, and cell wall composition changes in papaya tissues. *J SciFoodAgric*, 2014, 94 (2), 189-196.

Piere-Sierra, Cegarra-Badell y Carrasquero-Ferrer, 2016. Nitrogen and COD removal from tannery wastewater using biological and physicochemical treatments. *Revista Facultad de Ingeniería*, 80:63-73.

Plaza, B.M.; Gómez-Serrano, C.; Ación-Fernández, F.G.; Jimenez-Becker, S. 2018. Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on *Petunia x hybrid* growth. *J. Appl. Phycol.*, 30, 2359–2365.

Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2012, 32, 181–200.

Rengasamy, K.R.R., M.G. Kulkarni, H.B. Papenfus & J. van Staden. Quantification of plant growth biostimulants, phloroglucinol and Eckol, in four

commercial seaweed liquid fertilizers and some by-products. *Algal Research*. 2016, 20, 57–60.

Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., Tava, A. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agron J*. 2019, 9 (4), 146–163.

RongaaDomenico, Settia Leonardo, Salvarania Chiara, De LeoRiccardo, Bedina Elisa, Pulvirentia Andrea, Milca Justyna, Pecchionic Nicola, Franciaa Enrico. 2019. Effects of solid and liquid digestate for hydroponic baby leaf lettuce (*Lactucasativa L.*) cultivation. *Scientia Horticulturae* 244, 172–181.

Santos Fransisca M., Pires CM José. Nutrient recovery from wastewater by microalgae and its potential application as bio-char. *Bioresource Technology*. 2018, 267, 725-731.

Shaaban, M.M.; El-Saady, A.K.M.; El-Sayed, A.E.K.B. Green microalgae water extract and micronutrients foliar application as promoters to nutrient balance and growth of wheat plants. *J. Am. Sci*. 2010, 6, 631–636.

Sharma S.H.S., Fleming C., Selby Ch., Rao J.R., Trevor M. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*. 2014, 26, 465-490.

Stadnik M.J., de Freitas M.B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology*. 2014, 39(2), 111-118.

Stirk, W. A., Ördög, V., Novák, O., Rolčík, J., Strnad, M., Bálint, P., & Staden, J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *Journal of Phycology*. 2013, 49, 459-467.

Stirk, W.A.; Ördög, V.; Van Staden, J.; Jäger, K. 2002. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 14, 215–221.

Supraja K.V, Behero Bunoshree, Balasubramanian P. Efficacy of extracts as biostimulants through seed treatment and foliar spray for tomato cultivation. *Industrial Crops & Products*. 2020, 151, 12453.

T.J. Mason, J.P. Lorimer. *Applied Sonochemistry*, Wiley-VCH. 2010, Weinheim, Germany.

Tarakhovskaya E.R., Maslo Y.I., Shishova M.F. 2007. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 54, 163–170.

Tatsi A. A. and Zouboulis, A. I.: 2002, 'A field investigation of the quantity and quality of leachate from a municipal solid waste landfill in a Mediterranean climate (Thessaloniki, Greece)', *Adv. Environ. Res.* 6, 207–219.

Van Oosten MJ, Pepe O, De Pascale S, Silletti S, Maggio A. The role of biostimulants and bio-effectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2017, 4(5), 1–12.

Vandenkoornhuysen P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol*. 2015, 206(4), 1196–206.

Venkatesan S., Pugazhendy K., Sangeetha D., Vasantharaja C., Prabakaran S. and Meenambal M. 2012. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic Analysis of *Spirulina*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*; 3(4):969-972.

Wang Xiaoqin & Zhang Xuewu. 2012. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. *Bioresource Technology* 126, 307–313.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol*, 101 (14), 5494e5500.

Xu C, Leskovar DI. Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Sci Hortic*. 2015, 12(183), 39–47.

Yu X, Zhao P, He C, Li C, Zhou J, Huang Z. 2012. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol.*121:256-262.

Zapata Daniela, Arroyave Catalina, Cardona Lorena, Aristizábal Adriana, Poschenrieder Charlotte, Llugany Mercè. 2021. Phytohormone production and morphology of *Spirulina platensis* grown in dairy wastewaters. *Algal Research* 59, 102469.