



UNIVERSIDAD
DE LA GUAJIRA

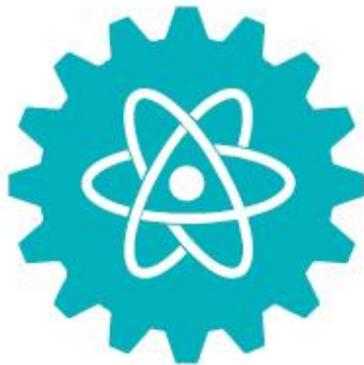
SHIKII EKIRAJIA
PÜLEE WAJIIRA

Vigilado Mineducación

Julio 2023

Diciembre

e-ISSN 2389-9484



Ciencia^e Ingeniería

Revista Interdisciplinaria de Estudios en
Ciencias Básicas e Ingenierías

Número 2 | Volumen 10

Ciencia e Ingeniería

Revista Interdisciplinaria de Estudios en Ciencias
Básicas e Ingenierías

ISSN 2389-9484

Año 2023, enero-junio, Vol. 10, N.º 2, e10370181

Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas y
Facultad de Ingeniería. Universidad de La Guajira
La Guajira, Riohacha, Colombia

<http://revistas.uniguajira.edu.co/index.php/cei>

Este documento fue depositado en Zenodo. DOI

<https://www.doi.org/10.5281/zenodo.10370181>

Mayra Carolina Hernández-González

<https://orcid.org/0009-0000-2773-5144>

lis18111302@irapuato.tecnm.mx

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico
Superior de Irapuato
Irapuato, Guanajuato, México

Juan. G. Colli-Mull

<https://orcid.org/0000-0001-9398-5977>

juan.cm@irapuato.tecnm.mx

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico
Superior de Irapuato
Irapuato, Guanajuato, México

Alejandra Hernández-Barrera

<https://orcid.org/0000-0002-4715-8142>

alejandra.hb@irapuato.tecnm.mx

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico
Superior de Irapuato
Irapuato, Guanajuato, México

José Luis Castro-Guillén

<https://orcid.org/0000-0002-2080-2866>

jose.cg1@irapuato.tecnm.mx

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico
Superior de Irapuato
Irapuato, Guanajuato, México

Yamilet Mora-Soto

<https://orcid.org/0009-0006-9806-6826>

1132958f@umich.mx

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Morelia, Michoacán, México

Laura Valdés-Santiago

<https://orcid.org/0000-0002-2943-7754>

laura.vs@irapuato.tecnm.mx

Cátedras CONAHCYT - Tecnológico Nacional de México/ITS
de Irapuato
Irapuato, Guanajuato, México

EFECTO DE LA APLICACIÓN RADICULAR DE *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, (AISLADO 3008A), EN PEPINO (*Cucumis sativus* L.)

Effect of radicular application of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, (isolated 3008A) on cucumber (*Cucumis sativus* L.)

RESUMEN

Para mantener la gran demanda de alimentos y al mismo tiempo subsanar las pérdidas de cosechas de cultivos ocasionadas por las condiciones climáticas y edafológicas, la agricultura actual depende del uso de fertilizantes químicos. No obstante, su uso intensivo e indiscriminado, ha generado varios problemas de contaminación ambiental, afectando principalmente a los ecosistemas y ocasionando problemas de salud humana, como enfermedades neuronales y algunos tipos de cáncer. En este trabajo se describe el aislamiento e identificación morfológica de microalgas de cuerpos de agua del Bajío Mexicano y la exploración del potencial de una de ellas como biofertilizante. Se reportaron tres cepas de microalgas pertenecientes a la división Chlorophyta: *Tetrademus obliquus* (Turpin) M. J. Wynne 2016 (#MH01); *Chlamydomonas* sp. (#0806) y *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 (#3008A) y una cianobacteria, *Gloeocapsa* sp. (#0801), las cuales fueron aisladas de la laguna de "Los Azufres" y el lago de Camécuaro, Michoacán, México. Para evaluar su efecto sobre el crecimiento y el desarrollo de plántulas de pepino (*Cucumis sativus* L.), se seleccionó la cepa *C. vulgaris*, la cual, se identificó morfológica y molecularmente, a nivel de especie y se le determinó su cinética de crecimiento con una $\mu_{max} = 2,012$ h⁻¹ y un tiempo de duplicación de 0,69 días a 1.100 lux y 102 rpm. El efecto de su aplicación se evaluó sobre la inducción de la germinación y el crecimiento aéreo y radicular, evidenciando que se estimuló el crecimiento de las plántulas de pepino a nivel radicular, por lo que, se sugiere que *C. vulgaris*, puede tener potencial para ser utilizada como biofertilizante.

Palabras clave: Microalgas; Biofertilizante; Chlorophyta; Michoacán, México.

ABSTRACT

Nowadays, agriculture is highly dependent on the use of chemical fertilizers, since the high demand for food and at the same time make up for crop yield losses caused by climatic and soil conditions, need to be sustained. However, its intensive and indiscriminate use has generated several problems of environmental contamination, mainly affecting the surrounding ecosystems, as well as health problems, including neuronal problems and some types of cancer. This work describes the isolation and morphological identification of microalgae from water bodies of the Mexican Bajío and the exploration of the potential of one of them as a biofertilizer. We report three strains of microalgae *Tetrademus obliquus* (Turpin) M. J. Wynne 2016 (#MH01); *Chlamydomonas* sp. (#0806), and *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 (#3008A), and the cyanobacteria *Gloeocapsa* sp. (#0801), which were isolated from "Los Azufres" lagoon and Camécuaro lake, Michoacán, Mexico. The molecular identification of strain #3008A allowed to know the specie, *C. vulgaris*, besides, it was selected to probe its effect on development and growth of cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.) The $\mu_{max} = 2,012$ h⁻¹ growth kinetics and a doubling time of 0,69 days at 1100 lux and 102 rpm. The effect of application of *C. vulgaris* on germination, aerial and radicular growth was evaluated. This Chlorophyte stimulated cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings growth root suggesting its potential to be used as a biofertilizer.

Keywords: Microalgae; Biofertilizer; Camécuaro, Chlorophyta; Michoacán, Mexico.

Recibido: 12 de julio de 2023

Aceptado: 15 de noviembre de 2023

Publicado: 19 de diciembre de 2023

Derechos de autor 2023: Mayra Carolina Hernández-González; Juan. G. Colli-Mull; Alejandra Hernández-Barrera; José Luis Castro-Guillén; Yamilet Mora-Soto; Laura Valdés-Santiago



INTRODUCCIÓN

Las microalgas y cianobacterias comprenden un grupo de microorganismos fotoautótrofos, es decir, que poseen la capacidad de generar biomasa a través de la fijación del CO₂ y la luz, como fuente de energía. Debido a su diversidad metabólica son de gran interés ya que, la riqueza de las moléculas bioactivas que producen tiene un gran potencial en la agricultura sostenible (Alvarez et al., 2021; Hachicha, 2022).

Las microalgas representan una gran importancia biotecnológica debido a su alta flexibilidad metabólica, su rápido crecimiento y su gran adaptabilidad a diferentes condiciones y medios de cultivo, por ello, suelen ser aprovechadas en la síntesis de bioproductos agronómicos, farmacéuticos, elaboración de pigmentos, en la industria alimentaria y biorremediación (Dolganyuk et al., 2020; Sosa-Hernández et al., 2019). Sin embargo, de acuerdo con Ferraro (2022) "existen más de 30.000 especies de microalgas, de las cuales unas 200 han sido estudiadas y solo unas 20 se explotan comercialmente".

En México, especialmente en la zona Bajío, el estudio sobre la caracterización y aprovechamiento biotecnológico de microalgas procedentes de la región es sumamente escaso, por lo que, con el presente estudio se busca aislar e identificar molecularmente microalgas de esa región y explotar su potencial biotecnológico como biofertilizantes.

Chlorella vulgaris Beijerinck 1890, es una microalga unicelular eucariota, sus extractos son ricos en hormonas de crecimiento, macro y micronutrientes, vitaminas y aminoácidos (Tian et al., 2022). Se ha reportado que su aplicación estimula el crecimiento de plantas de importancia agrícola, tales como, trigo, maíz, lechuga, espinaca, pepino y tomate (Bumandalai y Tserennadmid, 2019; Ortiz-Moreno et al., 2020; Vildanova et al., 2023).

Es importante considerar que el empleo de biofertilizantes en la actualidad se está volviendo una necesidad, esto debido a los daños que está ocasionando el uso indiscriminado de agroquímicos, afectando negativamente no solo la biodiversidad del suelo, la sostenibilidad agrícola y la inocuidad de los alimentos, sino también afectando la salud humana. Recientemente se ha observado el efecto nocivo que generan estos agroquímicos en la salud de las personas, provocando cáncer, trastornos neuronales, defectos de nacimiento, anomalías reproductivas y de desarrollo, por lo que, encontrar alternativas que sean menos dañinas para el ambiente y la salud de las personas a través de microalgas propias de nuestra región resulta un tema interesante a tratar (Meena et al., 2020; Kumar et al., 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestra

Las muestras de donde se aislaron las cepas #0806, #0801, #MH01 y #3008A estudiadas en este trabajo, forman parte del banco de microalgas del laboratorio de Metabolitos Biofuncionales del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI), Guanajuato, México. La colecta se efectuó en el periodo de junio 2017 - junio 2018 en Camécuaro, Michoacán (19.907594 N/ 102.210957 W; #3008A y #MH01), y Los Azufres, Michoacán (19°49'21.4" N / 100°40' 4.7" W; #0801 y #0806). Se tomaron muestras de 1.000 mL de agua en puntos azarosos de las dos localidades y fueron trasladadas en frío. El pH de los sitios de colecta fue de 8,2 y 4,15; la temperatura 19,6 °C y 37,5 °C y el oxígeno disuelto 2,0 y 3,15 ppm, respectivamente (Cano & Mendoza, 2019).

Aislamiento de cepas monoalgales

Todas las muestras (5 mL) fueron inicialmente resembradas en Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio BBM o medio basal de Bold (Bold, 1949; Bischoff y Bold, 1963) el cual está compuesto principalmente las siguientes soluciones stock: NaNO_3 ($2,50 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,75 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), NaCl ($0,25 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), K_2HPO_4 ($0,75 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1,75 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) y $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($0,25 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), una solución de elementos traza: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($8,82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), MoO_3 ($0,71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($1,57 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,49 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), una solución H_3BO_3 ($1,14 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), una solución de EDTA-KOH: $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($5,0 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) y KOH ($3,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), una solución férrica: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($4,98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{conc}}$ (1,0 mL), adicionando por último una solución de vitaminas: B_1 (Tiamina) ($0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), Biotina ($0,025 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) y B_{12} (Cianocobalamina) ($0,015 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$ – $30 \text{ }^\circ\text{C}$) hasta que el crecimiento fue visible, aproximadamente a los 20 días.

Todas las cepas fueron aisladas mediante la técnica de diluciones seriadas y siembra en placa (Eida et al., 2018; Morando-Grijalva et al., 2020). Para las diluciones seriadas se añadió en tubos de ensayo 4,5 mL de medio BBM y 0,5 mL de inóculo hasta obtener una dilución de $1:10^4$, a continuación, se dejó en agitación a 102 rpm 1.100 lux y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 días. Para la siembra en placa se realizó un esparcido con medio de cultivo BBM y agar (1,3 %) añadiendo a cada placa 100 μL de cada una de las diluciones realizadas dejándose en condiciones ambientales, con temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y aproximadamente 1.100 lux.

Identificación morfológica y molecular de los aislados

Para la identificación morfológica las cepas puras aisladas fueron observadas con un microscopio óptico marca AmScope B690B, empleando los objetivos de 10x, 40x y 100x. Las cepas que presentaban más de una morfología se identificaron utilizando literatura específica (Komárek y Anagnostidis, 1999, 2005; John, 2002), mientras que para la revisión de la nomenclatura de las especies se consultó a Guiry y Guiry (2023).

Para la identificación molecular se tomaron 10 mL de inóculo y se centrifugó a 4.500 rpm durante 20 minutos para obtener una pastilla celular de cada una de las cuatro cepas aisladas (#0806, #0801, #MHO1 y #3008A). Para llevar a cabo la extracción de ADN se utilizó el kit de mini preparación de ADN ZymoBIOMICS™ de Zymo Research® desechando el sobrenadante de la pastilla celular y tomando 300 μL de cada muestra para después seguir al pie de la letra el protocolo establecido por el mismo kit (ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit, 2022).

Consecutivamente, se llevó a cabo una PCR empleando los oligos ITS1-F (5'-3' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) e ITS4-R (5'-3' TCC GCT TAT TGA TAT GC) para amplificación de la región 18S (White et al., 1990). La amplificación del gen 18S se realizó con la Thermo Scientific PCR Master Mix [Taq DNA polimerasa ($0,05 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), MgCl_2 0,04M, 0,4 mM de cada dNTP] (ThermoFisher), en un termociclador con los siguientes ciclos: 1 ciclo $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min; 25 ciclos ($94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 50 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min); y finalmente 1 ciclo de $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min. Finalmente, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Servicio Genómicos (LabSerGen) ubicado en Irapuato Guanajuato, México para su secuenciación. Todas las secuencias fueron analizadas *in silico* empleando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Determinación de la cinética de crecimiento del aislado #3008A

Para establecer la cinética de crecimiento de la cepa seleccionada se inoculó en un Erlenmeyer de 500 mL, en condiciones de esterilidad, 50 mL de la cepa #3008A en 150 mL de medio BBM y se dejó en agitación durante 18 días a 102 rpm, temperatura de 25 °C e iluminación constante de 1.100 lux. Durante este periodo se estuvo realizando conteo celular cada tercer día en cámara de Neubauer, para conocer la cinética de crecimiento, el tiempo de incubación y la concentración a la cual se encontraba en la fase estacionaria. Se elaboró una curva de crecimiento celular empleando el programa MATLAB R2013a.

Tratamiento de plántulas de pepino (*C. sativus*) aplicando la cepa #3008A (*Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890)

Se escaló a un litro el cultivo de *Chlorella vulgaris* (#3008A) añadiendo 800 mL de medio BBM y 200 mL de inóculo, se dejó en agitación en las condiciones antes mencionadas hasta alcanzar la fase estacionaria, aproximadamente a una concentración celular de $3,4 \times 10^6$ cel.mL⁻¹. Se montó un ensayo con un total de 116 semillas orgánicas de pepino tipo americano divididas entre el tratamiento biológico, (cultivo fresco de *C. vulgaris* a una concentración de $3,4 \times 10^6$ cel.mL⁻¹) y su respectivo control de agua. Como control positivo se utilizó el fertilizante químico "Yaramila Activa®" a una concentración de 2,36 g.L⁻¹ y el medio de cultivo BBM.

Para el ensayo se utilizaron semilleros de plástico de 77, 42 y 28 celdas a los cuales se les agregó sustrato de turba húmedo dejando 1 cm por debajo del borde, se depositaron las semillas, (32 semillas para tratamiento biológico, agua y fertilizante químico y 20 semillas para el control con BBM), las cuales fueron tratadas previamente dejándolas en remojo por 10 minutos en su respectivo tratamiento y controles, y se cubrió con sustrato de vermiculita para ser rociados con suficiente agua con ayuda de un atomizador. Se cubrió el semillero con una bolsa de plástico negra durante un periodo de 3 y 4 días manteniendo siempre la humedad del sustrato. Pasado este tiempo los semilleros fueron descubiertos de la bolsa y dejados en condiciones ambientales no controladas para el crecimiento de las plántulas.

El tratamiento consistió en regar las plántulas de pepino con 5 mL de agua corriente cada 48 o 72 horas, asegurando la humedad permanente del sustrato. Los tratamientos se aplicaron una vez a la semana con 5 mL de su respectivo tratamiento o control. Finalmente, a los 22 y 32 días las plántulas fueron extraídas de los semilleros para determinar con un Vernier digital su altura (midiendo únicamente la parte aérea); su crecimiento radicular (midiendo la longitud de la raíz primaria) y el grosor del tallo. A su vez, se determinó el peso húmedo y peso seco de las plántulas cortando la raíz para evitar que los residuos de sustrato generarán algún tipo de interferencia. Para determinar el peso seco, las plántulas fueron metidas en una bolsa de papel y se dejaron secar a 80 °C por 72 h (Zhu et al., 2020; Fadaei et al., 2020).

Determinación del porcentaje de germinación

Para determinar el porcentaje de germinación se empleó la técnica TP por sus siglas en inglés, Top of Paper, establecida por ISTA (2007). Inicialmente se dejaron remojando las semillas durante 10 minutos en su respectivo tratamiento y/o control (30 semillas para controles y tratamiento, en total 120 semillas). Enseguida se tomó un pedazo de papel aluminio lo suficientemente grande para que todas las semillas que fueran a ser utilizadas para cada tratamiento quedaran dentro, se instaló encima una toalla de papel del mismo tamaño y se aplicó con un atomizador suficiente agua para humedecer el papel. Después fueron colocadas cada una de las semillas de forma aleatoria y con una separación entre ellas a lo largo de todo

el papel, se colocó otra toalla de papel encima cubriendo las semillas y se humedeció con su respectivo tratamiento o control, inmediatamente, el papel fue doblado formando una especie de rollo y se introdujo de forma vertical en bolsas de plástico. En total se formaron cuatro rollitos representados por el tratamiento biológico y sus tres controles (agua, fertilizante químico “*Yaramila Activa*®” y el medio de cultivo BBM). Finalmente, los cuatro rollitos se dejaron de forma vertical sobre una caja en condiciones ambientales no controladas. Al noveno día los rollos fueron desenrollados y se determinó el porcentaje de germinación por día, a través de la emergencia de la raíz primaria.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el programa Minitab® 19. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con el método de Tukey para conocer si existía una diferencia significativa entre las medias de los distintos tratamientos respecto a la altura, crecimiento radicular, grosor del tallo, peso seco y peso húmedo de las plántulas con un valor de significancia de $\alpha = 0,05$. De igual forma se realizó un análisis estadístico descriptivo que incluye la media y la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación morfológica y molecular de las cepas

Se aislaron cuatro cepas en el medio autotrófico, las cuales, fueron caracterizadas morfológicamente como *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833 (#MH01), actualmente se nombra *Tetrademus obliquus* (Turpin) M. J. Wynne 2016 (Guiry y Guiry, 2023); *Gloeocapsa* sp. (#0801); *Chlamydomonas* sp. (#0806), y *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 (#3008A) (Figura 1). Una vez que se realizó la extracción de DNA de todos los aislados, se amplificaron las regiones ribosomales 16 y 18S, independientemente del tipo celular. En las muestras unialegales se observó la presencia de un solo producto de PCR, el cual se envió a secuenciar. La identificación de la cepa #MH01 y #3008A a nivel de especie fue confirmada por análisis molecular, mediante un análisis tipo BLAST, con un porcentaje de identidad de 99,75 % y 99,23 %; las secuencias se registraron en GeneBank, número de acceso OR536312.1 y OR534523, respectivamente. El producto de PCR de los otros aislados presentaron poca calidad y no fue posible secuenciarlos.

Condiciones de crecimiento de *Chlorella vulgaris*

Para el desarrollo de los experimentos sobre el potencial como posible fertilizante se seleccionó la cepa #3008A (*Chlorella vulgaris*) ya que fue identificada morfológica y molecularmente y, además, porque dentro de las microalgas que han demostrado ampliamente sus propiedades como promotores del desarrollo vegetal, se encuentra tanto el género *Chlorella* spp, como la especie *C. vulgaris*, evaluadas en diferentes medios de cultivo (Tian et al., 2022; Vildanova et al., 2023).

Su cinética de crecimiento arrojó que la velocidad específica de crecimiento fue de $\mu_{m\acute{a}x} = 2,012$ y un tiempo de duplicación de 0,69 días (Figura 2), valores que difieren del trabajo de Prieto y colaboradores (2020), en el que propagaron a *C. vulgaris*, donde evaluaron condiciones y medios de cultivo y determinaron diferentes valores de $\mu_{m\acute{a}x}$, siendo el valor más alto 0,761. Por su parte Csavina y colaboradores (2011) encontraron para *Oocystis* sp., otra Chlorophyta, un tiempo de duplicación de 0,333 días a 25 °C y con una intensidad de luz de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un ciclo de luz: oscuridad de 16:08, estas diferencias pueden deberse a los medios de cultivo utilizados o a las condiciones con las que fueron cultivadas.

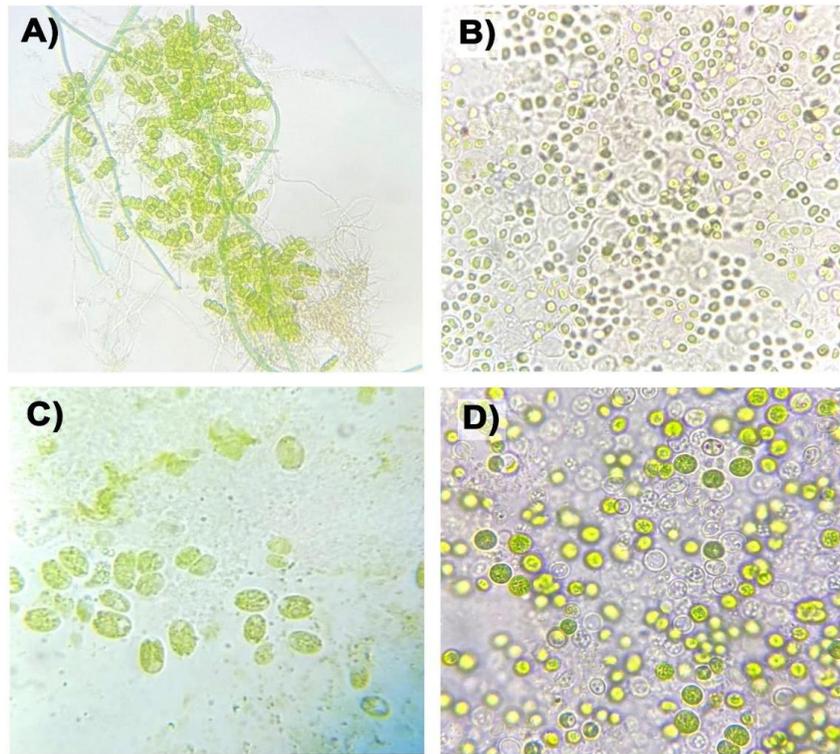


Figura 1. Imágenes de las microalgas aisladas en 100x: A) *Tretradesmus obliquus* (Turpin) M. J. Wynne 2016; B) *Gloeocapsa* sp.; C) *Chlamydomonas* sp. y D) *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, cultivadas en medio BBM.

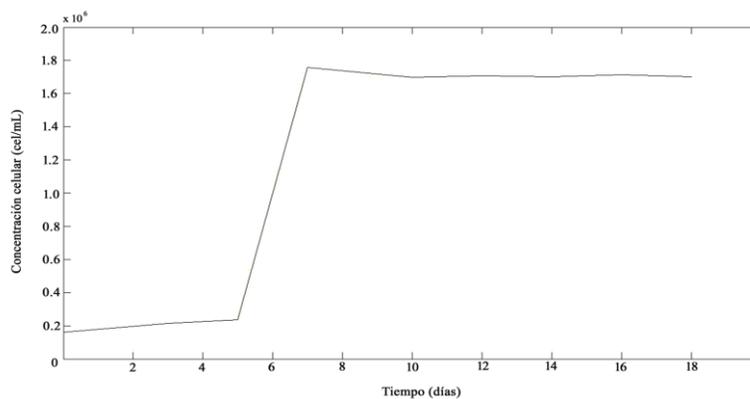


Figura 2. Curva de crecimiento celular de la cepa #3008A (*Chlorella vulgaris*) cultivada en medio BBM, por 18 días a 25 °C, 1.100 lux y agitación de 102 rpm.

Efecto de la aplicación de cultivos frescos en fase estacionaria de la cepa #3008A (*C. vulgaris*) sobre la germinación y crecimiento de pepino (*C. sativus*)

En condiciones experimentales, los resultados muestran que la aplicación de *C. vulgaris* no afectó la altura, así como tampoco hubo diferencias en el grosor del tallo, ni el crecimiento medido en peso seco y húmedo, ni la germinación en pepino. En cuanto al crecimiento radicular, el análisis de varianza mostro diferencias significativas entre el tratamiento con la cepa # 3008A (*C. vulgaris*) y los demás tratamientos (ANOVA con confianza del 95%, $\alpha = 0.05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la evaluación del efecto de los diferentes tratamientos sobre el desarrollo de *C. sativus*.

Tratamiento / Variable	Agua	BBM	Fertilizante comercial	Microalga <i>C. vulgaris</i>
Altura	7,0 (+/- 2,4)	9,2 (+/- 1,2)	7,7 (+/- 1,6)	7,0 (+/- 2,0)
Grosor del tallo	1,8 (+/- 0,6)	2,4 (+/- 0,3)	1,4 (+/- 0,3)	2,2 (+/- 0,4)
Peso húmedo	0,6 (+/- 0,4)	1,3 (+/- 0,1)	0,8 (+/- 0,4)	0,7 (+/- 0,3)
Peso seco	0,05 (+/- 0,03)	0,06 (+/- 0,03)	0,05 (+/- 0,02)	0,06 (+/- 0,02)
% Germinación	83	63	73	77
Crecimiento radicular	5,0 (+/- 1,5)	6,2 (+/- 1,1)	5,3 (+/- 2,1)	7,9 (+/- 1,7)

En la Figura 3 se ilustra la respuesta a los diferentes tratamientos. En cuanto al grosor del tallo, el mayor valor se presentó para el medio de cultivo, seguido de la microalga, en contraste, el fertilizante químico estimuló en menor medida esta variable (Figura 3A). No se encontraron diferencias con respecto al crecimiento medido por peso húmedo y peso seco (Figura 3B). Finalmente, en cuanto al porcentaje de germinación, el análisis estadístico indicó que no hubo diferencias entre los tratamientos (Figura 3C).

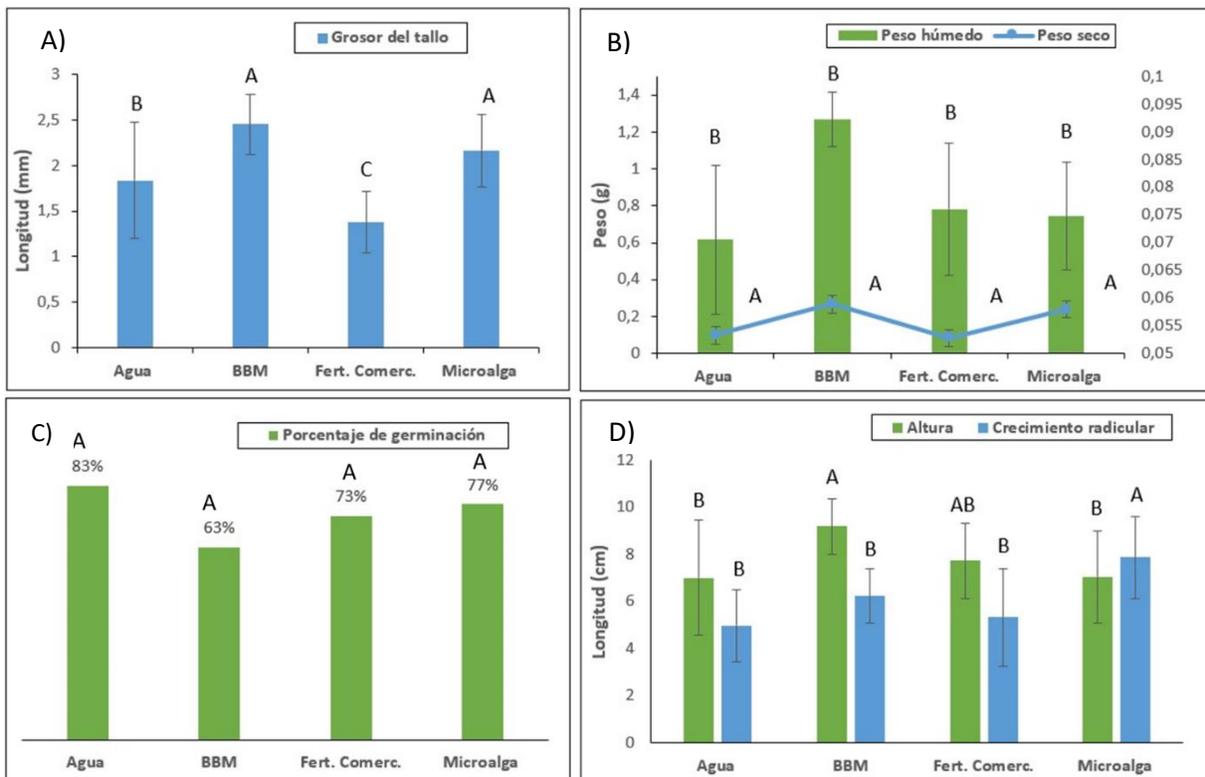


Figura 3. Efecto de *Chlorella vulgaris* #3008A sobre el desarrollo de *C. sativus*. Efecto evaluado a los 32 días sobre la: A) grosor del tallo, B) peso húmedo y peso seco (valores de peso seco asociados al eje secundario de la derecha), C) porcentaje de germinación y D) altura y crecimiento radicular. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas según la prueba de ANOVA de una vía (A y C) y de una vía (B y D). Prueba Post-hoc: Tukey. $P < 0.05$.

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento radicular fue la variable que presentó la mayor diferencia en cuanto a su desarrollo como respuesta a la aplicación del tratamiento biológico con *C. vulgaris* (Tabla 1, Figura 3D barras azules), seguida por el tratamiento con el medio de cultivo, el fertilizante comercial en tercer lugar y finalmente el agua. Lo anterior demuestra que la aplicación de *C. sativus* a nivel radicular, tuvo un efecto estimulante en pepino favoreciendo su crecimiento y generando una mayor área radicular (ANOVA con confianza del 95%, $\alpha = 0.05$) (Figura 3D y Figura 4).

Estos resultados de crecimiento aéreo y germinación, donde la aplicación de la *C. vulgaris* no muestra diferencias significativas con respecto a todos los controles, contradicen lo reportado en cultivos de *Capsicum annuum*, donde un extracto de *Chlorella* spp. aumentó significativamente la altura de las plántulas, el diámetro del tallo y el área foliar (Tian et al., 2022), lo cual puede deberse a diferencias en el sistema de cultivo, al modo de aplicación y a las capacidades metabólicas de cada cepa.

Sin embargo, para el caso del desarrollo radicular, los resultados (Tabla 1, Figura 3D y 4) concuerdan con lo reportado por Bumandalai y Tserennadmid (2019), quienes reportaron que el crecimiento de la raíz y de los brotes en semillas de pepino y tomate fue mayor en semillas tratadas con *Chlorella vulgaris* a 0,17 y 0,25 g.L⁻¹. Por el contrario, Vildanova y colaboradores (2021) al evaluar la aplicación de una suspensión de *C. vulgaris* en cultivos hidropónicos de pepino, encontraron que se afectó negativamente el crecimiento de los brotes y raíces, mientras que se incrementó el peso de la raíz.



Figura 4. Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos en el crecimiento radicular de *C. sativus*, A) agua. B) medio BBM. C) fertilizante comercial y D) tratamiento con #3008A *Chlorella vulgaris* a los 32 días.

Estudios previos han establecido que el crecimiento y desarrollo radicular se ve influido por factores internos y externos entre los cuales están el suministro de moléculas activas como hormonas y carbohidratos, la liberación de compuestos orgánicos, así como de las características fisicoquímicas y biológicas del suelo. Se sabe también, que la disponibilidad de N y P afecta la arquitectura de la raíz y que las raíces laterales se ven estimuladas por la presencia de auxinas como el ácido 3-indol-acético (AIA) (Lynch et al., 2012). El efecto de los biofertilizantes a base de *Chlorella vulgaris* podría estar relacionado con la capacidad de este género de sintetizar AIA, de acuerdo con lo reportado por Khasin, et al. (2018), *Chlorella sorokiniana* presentó AIA intra y extracelular y su genoma contiene los genes ortólogos involucrados en la síntesis, transporte y señalización de AIA.

CONCLUSIONES

Las cepas *Tretradesmus obliquus* (Turpin) MJ Wynne (#MH01); *Gloeocapsa* sp. (#0801); *Chlamydomonas* sp. (#0806), y *Chlorella vulgaris*, Beijerinck, 1890 (#3008A), recolectadas de cuerpos de agua del Bajío Mexicano lograron ser aisladas e identificadas morfológicamente. La cepa #3008A identificada a nivel molecular como *C. vulgaris* estimuló el crecimiento radicular en las plántulas de *C. sativus*. Considerando la importancia biológica de las raíces como el órgano de la planta encargado de proveer agua y nutrientes, así como mantener la planta firme en el sustrato, es claro que la longitud de la raíz primaria y de las raíces secundarias es una característica de fundamental importancia para el buen desarrollo de la planta y que influirá sobre el crecimiento aéreo, por lo que, probar diferentes aislados de *C. vulgaris* para su uso como promotores del desarrollo radicular en diferentes especies vegetales es un área que debe explorarse.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto institucional: Construcción de un prototipo para conservación de un banco de microalgas aisladas de cuerpos de agua del Bajío Mexicano y creación de un sitio Web para su difusión a cargo de la Dra. Laura Valdés Santiago (Laboratorio de Metabolitos Biofuncionales del ITESI). Se agradece al MSc. Alberto Ayala Islas por proporcionar las muestras utilizadas en esta investigación. JGCM, AHB, JLCG y LVS son miembros del Sistema Nacional de Investigadores (SNI), México.

LITERATURA CITADA

- Alvarez, A.L., Weyers, S. L., Goemann, H. M., Peyton, B. M. y Gardner, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research* 54: 102200. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102200>
- Bischoff, H. W. y Bold, H. C. (1963). Phycological Studies IV. Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Species. *University of Texas, Austin*, 6318:1–95.
- Bold, H. C. 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. *Bull. Torrey Bot. Club.* 76:101–8.
- Bumandalai, O. y Tserennadmid, R. (2019). Effect of *Chlorella vulgaris* as biofertilizer on germination of tomato and cucumber seeds. *International Journal of Aquatic Biology*, 7:95-99.
- Cano, I. y Mendoza, T. *Bioprospección de microalgas nativas de la cordillera Neovolcánica*. [Tesis inédita]. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
- Csavina, J., Estuardo, B. J., Guy Riefler, R. y Vis, M. L. (2011). Growth optimization of algae for biodiesel production, *Journal of Applied Microbiology*, 11(2), 312-318. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05064.x
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N. y Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*, 10(8), 1-24. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>

- Eida, M., Darwesh, O. M. y Matter, I. A. (2018). Cultivation of Oleaginous Microalgae *Scenedesmus obliquus* on Secondary Treated Municipal Wastewater as Growth Medium for Biodiesel Production. *Journal of Ecological Engineering*, 19(5), 38-51. <https://doi.org/10.12911/22998993/9127>
- Fadaei, S., Vaziriyeganeh, M., Young, M., Sherr, I. y Zwiacek, J. J. (2020). Ericoid mycorrhizal fungi enhance salt tolerance in ericaceous plants. *Mycorrhiza*, 30, 419–429. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00958-8>
- Ferraro, G. (2022). Microalgas y biorremediación. En búsqueda de microalgas autóctonas para la remoción de metales. Experiencias en la Patagonia. Desde la Patagonia difundiendo saberes 19(33): 50-55. <https://desdelapatagonia.uncoma.edu.ar/index.php/microalgas-y-biorremediacion/>
- Guiry, M. D. y Guiry, G. M. 2017. AlgaeBase. Word-wide electronic publication, Univerity of Ireland, Galway. Disponible en la web: <http://www.algaebase.org> Ultimo acceso: 11 de noviembre de 2023.
- Hachicha, R., Elleuch, F., Ben Hlima, H., Dubessay, P., de Baynast, H., Delattre, C., Pierre, G., Hachicha, R., Delgado, A., Michaud, P. y Fendri, I. (2022). Biomolecules from Microalgae and Cyanobacteria: Applications and Market Survey. *Appl. Sci.* 2022, 12(4) 1924. <https://doi.org/10.3390/app12041924>
- ISTA - The International Seed Testing Association (2007). International Rules for Seed Testing. Edition 2007. Bassersdorf, CH Swiezerland.
- John, M. D., Whitton, B. A. y Brook, A. J. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae.* Cambridge University Press. 702 p.
- Khasin, M., Cahoon, R. R., Nickerson, K. W. y Riekhof, W. R. (2018). Molecular machinery of auxin synthesis, secretion, and perception in the unicellular chlorophyte alga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230. *PLOS ONE* 13(12): e0205227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205227>
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. 1999. *Cyanoprokaryota 1: Chroococcales.* Vol. 19/1. Gustav Fischer Jena Stuttgart Lübeck Ulm. 548 pp.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. 2005. *Cyanoprokaryota 2: Oscillatoriales.* Vol. 19/2. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 759 pp.
- Kumar, B. S., Rahman, S., Kobir, S. M. A., Ferdous, T. y Banu, N. A. (2014). A review on Impact of Agrochemicals on Human Health and Enviroment: Bangladesh Perspective. *Plant Environment Development*, 3(2), 31-35.
- Lynch, J., Marschner, P. y Rengel, Z. (2012). Chapter 13 - Effect of Internal and External Factors on Root Growth and Development. *Elsevier eBooks* (pp. 331-346) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00013-3>
- MATLAB R2013a. Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.
- Meena, R. S., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., Sharma, M. P., Yadav, G. S., Jharina, M. K., Jangir, C. K., Pathan, S. I., Dokulilova, T., Pecina, V. y Marfo, T. D. (2020). Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. *Land*, 9(2), 34. <https://doi.org/10.3390/land9020034>

Minitab® 19 Statistical Software. <https://www.minitab.com>

Morando-Grijalva, C. A., Vázquez-Larios, A. L., Alcántara-Hernández, R. J., Ortega-Clemente, L. A. y Robledo-Narváez, P. N. (2020). Isolation of a freshwater microalgae and its application for the treatment of wastewater and obtaining fatty acids from tilapia cultivation. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 28575–28584. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08308-z>

Ortiz-Moreno, M. L., Sandoval-Parra, K. X. y Solarte-Murillo, L. V. (2020). *Chlorella*, ¿un potencial biofertilizante? *Orinoquia*, 23: 71-78.

Prieto, I., González, C. y Brindley, A. (2020). *Estudio del crecimiento de la microalga Chlorella vulgaris y su capacidad de depuración de agua residual* [Tesis de pregrado]. Universidad de Almería, España.

Sosa- Hernández, J. E., Romero-Castillo, K. D., Parra-Arroyo, L., Aguilar-Aguila-Isaías, M. A., García-Reyes, I. E., Ahmed, I., Parra-Saldivar, R., Bilal, M. y Iqbal, H. M. N. (2019). Mexican Microalgae Biodiversity and State-Of-The-Art Extraction Strategies to Meet Sustainable Circular Economy Challenges: High-Value Compounds and Their Applied Perspectives. *Marine Drugs*, 17(3): 174. <https://doi.org/10.3390/md17030174>

Tian, S. L., Khan, A., Zheng, W. N., Song, L., Liu J. H., Wang, X. L. y Li, L. (2022). Effects of *Chlorella* extracts on growth of *Capsicum annuum* L. seedlings. *Sci Rep* 12(1), 15455. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19846-6>

Vildanova, G. I., Allaguvatova, R. Z., Kunsbaeva, D. F., Sukhanova, N. V. y Gaysina, L. A. (2023). Application of *Chlorella vulgaris* Beijerinck as a Biostimulant for Growing Cucumber Seedlings in Hydroponics. *BioTech* 2023, 12, 42. <https://doi.org/10.3390/biotech12020042>

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315–322.

Zhu, Y., Wang, H., Lv, X., Zhang, Y. y Wang, W. (2020). Effects of biochar and biofertilizer on cadmium-contaminated cotton growth and the antioxidative defense system. *Sci Rep* 10, 20112. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77142-7>

ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit. (2022). Zymo Research de https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4300t_d4300_d4304_zymbiomics_dna_miniprep_kit.pdf

BIODATA

Mayra Carolina Hernández-González: Pasante de Ingeniería Bioquímica, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México.

Juan. G. Colli-Mull: Profesor Titular A. Dr. en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México. Publicaciones recientes: Villanueva-Alonzo et al., 2022. <https://doi.org/10.3390/app12115329>, Torres-Sebastián et al., 2022. <https://doi.org/10.1080/17597269.2021.2016105>, Valdés-Santiago L. et al., 2021. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02341-4>

Alejandra Hernández-Barrera: Profesor de Asignatura "B" de la Lic. En Biología. Doctora en Ciencias con especialidad en Bioquímica y Biotecnología Vegetal, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México. Publicaciones recientes: Carrillo-Landell, et al., 2023: <https://doi.org/10.32854/agrop.v16i9.2620>

José Luis Castro-Guillén: Profesor de Asignatura "B". Ingeniería Bioquímica. Doctor en Ciencias en la especialidad de biotecnología de Plantas, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México. Publicaciones recientes: Valdés-Santiago, et al., 2021: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2021v31n1/Valdes>, Roldán-Padrón, et al., 2022: <https://doi.org/10.3390/biology11050661>, Torres-Arteaga, et al., 2023: <https://doi.org/10.1007/s10719-022-10091-7>, Dena-Beltrán, et al., 2023: <https://doi.org/10.3390/ph16020290>, Pérez-Rodríguez, et al., 2023: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103792>, Valdés-Santiago, et al., 2023: <https://doi.org/10.25518/1780-4507.20492>

Yamilet Mora-Soto: Lic. en Biología, Facultad de Biología/Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico.

Laura Valdés-Santiago: Dra. en Ciencias en la especialidad de biotecnología de Plantas. Cátedras CONAHCYT - Tecnológico Nacional de México//Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Mexico. Publicaciones recientes: Valdés-Santiago, et al., 2021: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02341-4>, Valdés-Santiago, et al., 2021: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2021v31n1/Valdes>, Pérez-Rodríguez, et al., 2023: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103792>, Manríquez-Zúñiga, et al., 2023: <https://doi.org/10.3390/su152416616>, Valdés-Santiago, et al., 2023: <https://doi.org/10.25518/1780-4507.20492>