



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

EFFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE  
*Cocconeis* spp. EN LA PRODUCCIÓN DE *Lactuca sativa* Var.  
OREJONA EN SISTEMA RAIZ FLOTANTE

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL**

PRESENTA

JOSÉ DANIEL GRANADOS ÁLVAREZ

DIRIGIDA POR

Dr. MIGUEL ANGEL RAMOS LÓPEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental**

**EFFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE**  
*Cocconeis* spp. EN LA PRODUCCIÓN DE *Lactuca sativa* Var.  
**OREJONA EN SISTEMA RAÍZ FLOTANTE**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRIA EN CIENCIA Y TENCNOLOGÍA AMBIENTAL**

PRESENTA

**JOSÉ DANIEL GRANADOS ÁLVAREZ**

SINODALES

Dr. MIGUEL ANGEL RAMOS LÓPEZ  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

Dr. MAMADOU MUSTAPHA BAH  
SECRETARIO

\_\_\_\_\_

Dr. ANDRES CRUZ HERNÁNDEZ  
SINODAL

\_\_\_\_\_

Dr. JOSÉ ALBERTO RODRÍGUEZ MORALES  
SECRETARIO

\_\_\_\_\_

Dr. MARCO MARTÍN GONZALEZ CHÁVEZ  
SECRETARIO

\_\_\_\_\_

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Enero 2020  
México.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACyT por el apoyo económico otorgado durante este proceso.

A mis sinodales por el apoyo intelectual y material que aportaron a la investigación.

Al profesor Armando Granados Rangel por su ayuda y asesoría para la elaboración del prototipo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo económico recibido por medio del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER).

A la empresa FreshQro y a sus trabajadores Adriana Pérez y Horacio Ortiz por su apoyo durante la elaboración del experimento.

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
2.1. Producción hidropónica.....	2
2.1.1. Solución nutritiva.....	3
2.1.2. Aplicaciones foliares.....	4
2.1.3. Contaminación por agua residual de los sistemas hidropónicos.....	7
2.2. Microalgas .....	8
2.2.1. Importancia Agrícola .....	9
2.2.2. Reproducción de microalgas.....	11
2.2.3. Selección de microalgas.....	14
2.2.4. Microalgas del género <i>Cocconeis</i> spp.....	14
2.2.4.1. Taxonomía de <i>Cocconeis</i> spp.....	14
2.2.4.2. Descripción botánica .....	15
2.3. Lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> ) .....	15
2.3.1. Taxonomía .....	15
2.2.2. Descripción botánica .....	16
2.3.3. Producción mundial y en México .....	16
2.3.4. Producción de hidropónica de <i>L. sativa</i> .....	17
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>20</b>
3.1. Objetivo general .....	20
3.2. Objetivos particulares .....	20
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>23</b>

4.1. Material biológico.....	21
4.2. Producción de microalgas en sistema abierto .....	21
4.2.1. Identificación .....	21
4.2.2. Producción <i>in vitro</i> de microalgas.....	21
4.3. Elaboración de fotobioreactores.....	23
4.3.1. Cultivo de microalgas en fotobioreactor.....	25
4.3.2. Cosecha de microalgas.....	25
4.4. Obtención de extractos .....	25
4.5. Evaluación de extractos .....	26
4.5.1. Pruebas de germinación.....	26
4.6. Pruebas del desarrollo .....	26
4.6.1. Descripción del invernadero.....	26
4.6.2. Producción de plántulas .....	27
4.6.3. Aplicación foliar .....	30
4.6.4. Cosecha y medición.....	31
4.7. Análisis estadístico .....	31
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>32</b>
5.1. Reproducción <i>in vitro</i> de microalgas.....	32
5.2. Pruebas de tratamiento de aguas residuales <i>in vitro</i> .....	34
5.3. Pruebas piloto de tratamiento en fotobioreactor de panel plano.....	36
5.4. Efecto del extracto metanólico sobre la germinación de <i>L. sativa</i> .....	40
5.5. Efecto del extracto metanólico en la producción de <i>L. sativa</i> .....	43
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>47</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>

## Índice de figuras

Figura	Página
1. Estanques experimentales de la Universidad de Rice, Texas (Siemann, 2015). Estanque de pista de escala comercial (De Vree et al., 2015).....	13
2. Foto reactor tubular experimental “algaePRAC”, Wageningen University and Reserch, Países Bajos (Van Sprundel, 2012). Reactor de columna de burbuja. Fotobioreactor de panel plano (Zhang et al., 2018).....	14
3. Producción de lechuga en el 2017 de los 10 principales países productores (FAOSTAT, 2020).....	17
4. Producción de lechugas en México en el periodo 2007-2017 (SIAP, 2017).....	18
5. Cultivo <i>in vitro</i> de microalgas separado para su decantación.....	23
6. Estructura de soporte de PTR; (derecha) placa de acrílico para forrado de fotobioreactor.....	24
7. Fotobiorreactor de panel plano empleado en la experimentación.....	24
8. Extracto crudo de microalgas obtenido tras 4 h de reflujo y eliminación del solvente por medio de baño de agua. ....	26
9. Invernadero macrotunel empleado en la producción de plántulas y plantas de <i>L. sativa</i> Var. Orejona.....	27
10. Lechugas de 14 d después de emergencia.....	28
11. Placas de preparación con 225 orificios por placa, en amarillo se indican y delimitan las dimensiones de una placa empelada.....	29
12. Camas de producción con placas de unicel con una densidad de 30 lechugas m <sup>-2</sup> , en amarillo dimensiones de la placa de unicel, en naranja dimensiones de la cama de producción.....	30

13. Extractos empleados en la experimentación de germinación, crecimiento en plántulas y pruebas de desarrollo.....	31
14. Curva de crecimiento de microalgas en sistema <i>in vitro</i> . Líneas naranja, azul y gris: tratamientos con microalgas. Línea amarilla: control.....	34
15. Concentración de nitratos en las aguas residuales durante las pruebas <i>in vitro</i> . Línea azul, naranja y gris: tratamientos con microalgas <i>Cocconeis</i> spp. Línea amarilla: control. Línea negra concentración máxima permitida por la NOM-001- SEMARNAT-1996 .....	36
16. Concentración de nitratos en las aguas residuales durante las pruebas <i>in vitro</i> . Línea azul, naranja y gris: tratamientos con microalgas <i>Cocconeis</i> spp. Línea amarilla: control. Línea negra concentración máxima permitida por la NOM-001- SEMARNAT-1996.....	37
17. Fotobioreactor a los 100 días de producción.....	38
18. Curva de crecimiento poblacional de microalgas en fotobioreactor de panel plano. Línea azul tratamiento 1, línea naranja tratamiento 2.....	39
19. Consumo de nitratos en solución de biorreactores de panel plano. Línea azul tratamiento 1, línea naranja tratamiento 2. Línea negra concentración máxima permitida por la NOM-001- SEMARNAT-1996. ....	40
20. Concentración de nitritos en las aguas residuales durante las pruebas en fotobioreactor. Línea azul y naranja <i>Cocconeis</i> spp. Línea amarilla: control. Línea negra concentración máxima permitida por la NOM-001- SEMARNAT-1996.....	41
21. Efecto en el crecimiento de <i>L. sativa</i> var orejona 14 d después de la aplicación de extractos metanólicos de microalgas.....	44

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Área de producción agrícola por sistema hidropónico entre los años 2011 y 2014.....	3
2. Nutrientes necesarios en una solución nutritiva .....	4
3. Efecto de fitohormonas sobre la planta. ....	7
4. Condiciones controladas empleadas en la producción <i>in vitro</i> de algas <i>Cocconeis</i> spp., en medio artificial. ....	22
5. Contenido de nutrientes en soluciones para producción de lechuga...	29
6. Efectos en el desarrollo de semillas de <i>L. sativa</i> var orejona con la aplicación de extracto botánico de microalgas.....	42
7. Influencia en el crecimiento de plántulas de <i>Lactuca sativa</i> var orejona a los 14 días después de la germinación sometidos al tratamiento de aplicaciones por inundación de extracto metanólico de microalgas.....	46
8. Efectos en plantas de <i>Lactuca sativa</i> var orejona sometidas a 3 aplicaciones foliares de extracto metanólico de microalgas.....	47

## Resumen

La hidroponía es un sistema agrícola donde se emplea una solución nutritiva como fuente mineral, ésta va perdiendo su balance iónico convirtiéndose en el principal residuo de esta producción, aunque puede ser fitoremediada mediante la producción de microalgas, las cuales pueden a su vez ser aprovechadas como extractos para generar fertilizantes foliares, bioestimulantes e incluso como inhibidores. Es por ello que el objetivo de este estudio fue determinar la actividad del extracto metanólico de microalgas del género *Cocconeis* spp. producidas en aguas residuales en la producción de *L. sativa*. Para ello, se realizó un cultivo *in vitro* de microalgas en aguas residuales; seguido a ello, se escalonó a un fotobiorreactor de panel plano de 80 L. En ambos casos se empleó una concentración inicial de  $\text{NO}_3^-$  de 500 ppm. Los niveles de células  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  fueron monitoreados cada tercer día durante 100 días. Con la biomasa seca obtenida, se prepararon concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10 % (p/v) a partir del extracto metanólico, cuya aplicación fue evaluada en la germinación y en el desarrollo de *L. sativa*. En las pruebas *in vitro*, se obtuvo una producción en peso seco de  $1.2 \text{ g L}^{-1}$  de microalgas, 7.68 % de extracto metanólico y se logró reducir un 96.6 % del N. En el fotobiorreactor, se obtuvo  $0.75 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa, 7.23 % de extracto metanólico y una reducción del 72 % del N inicial. Con el extracto al 4 % de *Cocconeis* spp., se redujo a 47 % la germinación de *L. sativa*, mientras que con la concentración al 10 % no hubo germinación. Las plantas adultas tuvieron una reducción del 15 % del peso fresco y un 14 % del largo de la raíz con la concentración al 10 % del extracto metanólico. El extracto metanólico de *Cocconeis* mostró un efecto alelopático y un efecto inhibitorio sobre *L. sativa*. La producción *in vitro* de microalgas *Cocconeis* redujeron el contenido de N total por debajo de los niveles requeridos por la NOM-001-SEMARNAT-1996, por lo cual éstas pueden ser empleadas como un agente para el tratamiento de aguas residuales agrícolas.

Palabras clave: Fitobiorremediación, bioestimulantes, inhibidores

### DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento

## Abstract.

Hydroponics is an agricultural system where a nutrient solution it is used as a mineral source. However it loses its ionic balance, becoming the main residue of this production. This can be phytoremediated through the microalgae production. These microalgae can be used as extracts to generate foliar fertilizers, biostimulants and even as inhibitors. The objective of this study was to determine the activity of microalgae's methanolic extract of *Cocconeis*' genus produced in wastewater in the production of *L. sativa*. In vitro culture of microalgae was carried out in wastewater, and following, 80 L flat panel photobioreactor was staged. In both an initial  $\text{NO}_3^-$  concentration of 500 ppm was used. The levels of cells  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  were monitored every third day for 100 days. Methanolic aqueous solutions at concentrations of 0, 2, 4, 6, 8, 10% (p / v) were prepared, and applied to evaluate their impact on germination and development of *L. sativa*. In the *in vitro* tests, obtained production of  $1.2 \text{ g L}^{-1}$  microalgae of dry weight, 7.68 % of methanolic extract and reduction of 96.6 % of the N; with the photobioreactor were obtained  $0.75 \text{ g L}^{-1}$  of biomass, 7.23 % of methanolic extract and a reduction of 72 % of the initial N. With the 4% *Cocconeis* extract, the germination of *L. sativa* was reduced to 47 %, while with the 10 % concentration there was no germination. The adult plants had a reduction of 15% in fresh weight and 14 % in root length with the 10 % concentration of methanolic extract. The methanolic extract of *Cocconeis* showed an allelopathic effect and an inhibitory effect on *L. sativa*. *In vitro* production of *Cocconeis* microalgae reduced the total N content below the levels required by NOM-001-SEMARNAT-1996. Therefore they can be used as an agent for the treatment of agricultural wastewater.

Keywords: Phytoremediation, biostimulants, inhibitors

## 1. INTRODUCCIÓN.

La hidroponía es una técnica agrícola creada para aumentar la producción de alimentos, sin embargo, una de las principales desventajas que tiene es que genera una gran cantidad de aguas residuales con altas concentraciones de fertilizantes. Estas aguas son generalmente desechadas en canales que terminan en cuerpos de agua superficiales en los cuales ocurre una acumulación de los minerales. Esta condición afecta a los organismos acuáticos y a los organismos terrestres que dependen de él, causándoles una intoxicación aguda o crónica; también es posible generarse una bioacumulación y una biomagnificación en los organismos. El nitrógeno y fósforo son los elementos que se encuentran en mayor cantidad en estas aguas residuales. Ambos pueden causar un estado de eutrofización, favoreciendo la proliferación de microalgas y bacterias anaerobias, lo cual puede causar un cambio drástico en los niveles de pH, cantidad de luz y oxígeno disuelto.

Una opción para disminuir la contaminación por aguas residuales de invernaderos es por medio de la producción de microalgas, ya que éstas absorben nitrógeno y fósforo del medio para integrarlos en sus sistemas para desarrollarse y reproducirse. Las microalgas formadas pueden ser separadas con una simple filtración y su biomasa puede ser aprovechada de muchas formas. Una de ellas es el empleo para la elaboración de extractos acuosos o metanólicos; estos pueden tener bajas concentraciones en todos los elementos necesario para el desarrollo de la planta, como aminoácidos, vitaminas, azúcares y fitohormonas, los cuales pueden regresar al invernadero como un fertilizante foliar, estimulante o como un inhibidor, lo cual puede reducir el uso de agroquímicos sintéticos. Sus efectos pueden ser vistos fácilmente en plantas de hoja ancha debido a su alta cantidad de estomas que permiten el intercambio de sustancias.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. Producción hidropónica.

La reducción de las áreas de cultivo, la disminución de fertilidad de los suelos y la pérdida de agua de calidad son algunas de las principales problemáticas que la agricultura debe enfrentarse; a pesar de ellas, la industria agrícola debe aumentar su producción para satisfacer la demanda de una población constantemente creciente, por lo cual, debe adoptar métodos de producción más eficientes y sostenibles. Por esta razón, se han desarrollado técnicas que permitan ahorrar recursos y maximizar la producción (Beltrano y Gimenez, 2015).

La hidroponía es un sistema agrícola donde no se emplea al suelo como medio para la producción del cultivo; más bien, las plantas se desarrollan en un sustrato inerte como sostén y se nutren de una solución enriquecida (Moreno et al., 2011).

Aunque se tienen registros de sistemas hidropónicos ancestrales, tales como los jardines colgantes de Babilonia o las chinampas del imperio Mexica, se considera que la hidroponía surge en la década de los 20s del siglo pasado con los trabajos de los doctores William F. Gericke y Dennis Robert Hoagland. Gericke fue el primero en realizar estudios de producción de vegetales fuera del suelo usando únicamente agua con nutrientes y Hoagland produjo una solución nutritiva para el modelo de Gericke que proporcionaba los minerales necesarios para un desarrollo ideal de las plantas. Esta solución se sigue empleando en la actualidad como solución comercial. Durante la guerra de Corea, el ejército norteamericano cultivó los alimentos para sus tropas mediante las técnicas de Gericke, demostrando su potencial para producir alimentos en condiciones de suelo infértil y escasos de agua (Resh, 2013).

Con el paso de los años esta técnica de producción se ha ido diversificando e incrementando su uso. Se estima que el 50 % de la producción mundial de agricultura protegida se realiza en sistemas hidropónicos. Tan sólo en México, se

calcula que 22 mil ha son producidas por hidroponía, ocupando el 14° lugar en el mundo por área de producción. Los principales estados productores con sistemas hidropónicos en México son Sinaloa, Jalisco, Baja California, Estado de México, Chihuahua y Sonora, abarcando el 63.6 % de la superficie nacional. Los principales productos bajo estas técnicas son el jitomate, pepino, pimiento, berenjena, fresa y lechuga (Cuadro 1), (SIAP, 2017; SAGARPA, 2017).

Cuadro 1. Área de producción agrícola por sistema hidropónico entre los años 2011 y 2014.

<b>Estado</b>	<b>2011 al 2014</b>	
	Superficie (x1000 ha)	Porcentaje del total nacional (%)
<b>Sinaloa</b>	4.74	21.28
<b>Jalisco</b>	3.31	14.85
<b>Baja california</b>	2.68	12.09
<b>Estado de México</b>	1.517	6,8
<b>Sonora</b>	1.497	6.72
<b>Otros</b>	8.527	38.26
<b>Total</b>	22.284	

Fuente: SIAP, 2017

#### 2.1.1. Solución nutritiva.

De acuerdo a Chow et al., (2017), la solución nutritiva es el pilar de la producción hidropónica la cual debe contener a los fertilizantes en concentraciones y relaciones adecuadas para evitar problemas como efecto osmótico y antagonismo de nutrientes. La solución se aplica en un sustrato poroso y generalmente inerte o en un recipiente no adherente que mantenga la solución en contacto con la raíz de

la planta. Para la elaboración de una solución nutritiva, generalmente se parte de tres soluciones madre:

Solución A: macronutrientes, excepto calcio en medio ácido

Solución B: únicamente sales de calcio

Solución C: sales de micronutrientes y sustancias complementarias como fitohormonas o plaguicidas.

Estas soluciones suelen tener concentraciones de 100 o 1000 veces mayor que la de la solución nutritiva que se desea aplicar. Su mezcla y disolución se realiza en el sistema de tuberías dosificando las 3 soluciones, ácido, generalmente nítrico, y agua de riego. Los fertilizantes empleados para la elaboración de la solución nutritiva deben ser de alta solubilidad y no tener incompatibilidad con otros fertilizantes empleados, ya que se pueden producir precipitaciones que obstruyan el sistema de riego. Se tiene que considerar que, al agregar un fertilizante al agua, esta tendrá una modificación en su conductividad eléctrica y pH por lo cual es necesario monitorearlos para no causar una fitotoxicidad y una indisponibilidad de los nutrientes. Aunque cada cultivo requiere una cantidad diferente de nutrientes, es indispensable que contengan los trece elementos enlistados en el Cuadro 2 y éstos deben estar en la especie química capaz de ser absorbida por la planta. Previo a la elaboración de las dosis de fertilizante, se debe considerar que el agua para riego puede contener cantidades considerables de iones, siendo los principales  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 2.1.2. Aplicaciones foliares.

Aunque la principal forma de absorción de compuestos de la planta es por medio de la raíz, existe la posibilidad de suministrar sustancias por medio de las hojas con una solución asperjada, o sea, en forma de "spray". A este tipo de fertilización, se le conoce como aplicación foliar. El mecanismo de absorción por

medio del follaje aún se encuentra en debate; sin embargo, una de las formas más aceptadas es por medio de los poros llamados estomas encontrados en la cutícula del as y, mayormente en el envés de la hoja (Selvam y Kathiresan, 2014).

Cuadro 2. Nutrientes necesarios en una solución nutritiva.

Nutriente	Principal especie química de absorción por las plantas
Macronutrientes	
Nitrógeno (N)	$\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_3^-$
Fósforo (P)	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$
Potasio (K)	$\text{K}^+$
Elementos secundarios	
Magnesio (Mg)	$\text{Mg}^{2+}$
Calcio (Ca)	$\text{Ca}^{2+}$
Azufre (S)	$\text{SO}_4^{2+}$
Micronutrientes	
Cloro (Cl)	$\text{Cl}^-$
Manganeso (Mn)	$\text{Mn}^{2+}$
Hierro (Fe)	$\text{Fe}^{2+}$
Zinc (Zn)	$\text{Zn}^{2+}$
Cobre (Cu)	$\text{Cu}^{2+}$
Boro (B)	$\text{H}_3\text{BO}_3$
Molibdeno (Mo)	$\text{MoO}_4^-$

Fuente: Resh, 2013.

Las aplicaciones foliares son muy empleadas en la producción hidropónica, le permiten a la planta absorber minerales, hormonas, carbohidratos y aminoácidos que pueden generar varios beneficios si se aplican en la concentración indicada; la cual, puede variar por la especie, la etapa de la planta, las condiciones ambientales, la frecuencia de aplicación y el estado de fertilización. Los beneficios de las

aplicaciones foliares pueden ser: a) incremento en la producción, b) promover el desarrollo vegetativo, c) generar resistencia a plagas y enfermedades, d) aumento en la tolerancia a sequía y altas temperaturas, e) reducción de los efectos negativos de estrés abiótico y f) generar mayores metabolitos secundarios (Selvam y Kathiresan, 2014; Sabir y Singh, 2012).

Generalmente para las aplicaciones foliares se emplean soluciones de fertilizantes o una solución de bioestimulantes que son mezclas de compuestos químicos de origen biológico que en pequeñas cantidades pueden mejorar el crecimiento de las plantas, aumentar su producción y reducir la incidencia de plagas y enfermedades. Los bioestimulantes pueden ser clasificados en 3 clases: mezclas de aminoácidos, sustancias marinas bioactivas y sustancias húmicas (Kauffman et al., 2007).

Las sustancias marinas bioactivas son extractos de algas y microalgas, ambos presentan todos los micro y macronutrientes esenciales para las plantas, así como; auxinas, citoquininas y giberelinas, fitohormonas que estimulan el desarrollo de la planta; aminoácidos, proteínas, carotenos y carbohidratos que la planta puede absorber y emplear al instante. Las bacterias son empleadas como bioestimulantes por su alta eficiencia en producir compuestos nitrogenados, esto se debe a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico como nitrógeno molecular, en algunos casos se ha observado el aumento en producción de fitohormonas al aplicar bacterias de forma foliar o al suelo, siendo principalmente auxinas, giberelinas y etileno los compuestos producidos. Los hongos pueden ser empleados como promotores de desarrollo inoculándolos al suelo, en muchos casos realizan simbiosis con las plantas, estas le suministran minerales y azúcares, mientras que los hongos aumentan el área de absorción de agua y ayudan en la síntesis de compuestos orgánicos, de igual forma, se observa un aumento en la producción de hormonas al inocular hongos simbióticos. Los efectos de las fitohormonas se describen en el Cuadro 3 (Zaman et al., 2015; Kurepin et al., 2013, Shanab et al., 2012).

Cuadro 3. Efecto de fitohormonas sobre la planta.

Fitohormona	Efecto sobre la planta
Giberelinas	Son las responsables de promover la germinación de semillas, la expansión de hojas y la elongación de los entrenudos. Su aplicación fomenta el desarrollo de semillas en frutos. En altas dosis, puede reducir el desarrollo de las plantas.
Auxinas	Son las encargadas de promover la división celular. Regula el crecimiento del tallo y prevé la abscisión de semillas inmaduras. Incrementa la resistencia ante estrés por altas temperaturas y estimula la biosíntesis de giberelinas en los puntos n aplicados
Ácido abscísico	Suprime la germinación de semillas y la latencia de plantas. Al aplicarlo previo a estrés por calor o a estrés hídrico se aumenta la tolerancia a estos.

Fuente: Zaman et al., 2015.

En algunos casos, las aplicaciones de estos compuestos bioestimulantes llegan a tener efectos adversos, ya sea por una intoxicación por exceso o por contener una sustancia fitotóxica. Tal es el caso de extractos altos en fitohormonas, que al aplicarse en altas cantidades provocan una inhibición en el crecimiento o por la presencia de sustancias alelopáticas como terpenos, ácidos grasos y aldehídos alifáticos de cadena corta. En estos casos, pueden aplicarse a los brotes tiernos de malezas para provocar un efecto tóxico y para evitar la germinación de semillas latentes (Souza et al., 2020).

### 2.1.3. Contaminación por agua residual de los sistemas hidropónicos.

El agua residual de los invernaderos proviene casi en su totalidad por la solución nutritiva. Esta es descartada por su modificación en la concentración de elementos disueltos, ella sigue conteniendo todos los elementos necesarios para el

desarrollo de las plantas, pero se encuentra desbalanceada para un desarrollo óptimo agronómico. Los principales elementos disueltos por cantidad son el nitrógeno y fósforo, los cuales pueden acumularse en cuerpos de agua, principalmente: lagos, ríos, arroyos y embalses (Lee et al., 2018).

El alto contenido de nitrógeno y fósforo que se puede acumular en los cuerpos de agua puede provocar un alto impacto en las formas de vida acuática y en los organismos terrestres que depende de él. Los altos niveles de minerales pueden causar una intoxicación aguda o crónica, en el caso del fósforo, puede bioacumularse y biomagnificarse fácilmente en los organismos acuáticos. Además, ambos elementos pueden provocar un estado de eutrofización, o proliferación de microalgas, lo cual causa condiciones de pH bajas, menor cantidad y penetración de luz menor cantidad de oxígeno disuelto provocando una ataxia en los organismos, los niveles de oxígeno disuelto, generando hipoxia en los organismos, propagación de microorganismos como algas y bacterias anaerobias, además, se suele proliferar una cantidad pequeña especies vegetales generalmente tolerantes a salinidad, las cuales dominan fácilmente el medio. Las aguas residuales de invernaderos requieren ser tratadas para no provocar estos daños ambientales (Sinha et al., 2019; Lee et al., 2018, Wu et al., 2016;).

## 2.2. Microalgas.

Raven y Giodano (2014) definen a las algas como todos los organismos productores de oxígeno que no son plantas superiores o embriofitas. El conjunto, éstas se dividen en dos grandes grupos las macroalgas, que ocupan las zonas litorales, y el grupo de las microalgas, las cuales se pueden encontrar tanto en zonas litorales como bentónicas. Las microalgas tienen una gran biodiversidad genética y morfológica, podemos encontrarla en los reinos Monera, Plantae y Protista. Se tiene un registro de 72500 especies cuyas formas y tamaños son muy variados. Pueden ser desde pequeñas células esféricas de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro hasta organismos de talo multicelular de 60 m. Podemos encontrarlas de colores verdes (azules, rojos y

café) provocados por las cantidades de clorofila,  $\beta$ -carotenos y antoxantinas que contengan en sus células.

Las microalgas se encuentran en su gran mayoría en medios acuáticos. Sin embargo, podemos encontrar algunas especies en suelo con bastante humedad. Las microalgas absorben nutrientes del medio acuoso, extraen  $\text{CO}_2$  del aire y, con ayuda de luz solar, lo procesan en carbohidratos y  $\text{O}_2$ . Se estima que el 70 % del  $\text{O}_2$  atmosférico es producido por las algas y 1/3 del C es fijado por las microalgas (Fong, 2013).

#### 2.2.1. Importancia agrícola.

Las microalgas representan una gran problemática en los sistemas hidropónicos, estas se reproducen fácilmente en la solución nutritiva, formando colonias que pueden causar taponamientos en los sistemas de suministros y en los sistemas de desagüe; también, compiten por los nutrientes de la solución, algunas de ellas como las cianobacterias pueden presentar sustancias tóxicas o favorecer la infección de otros microorganismos como hongos o bacterias en la raíz de la oen cuello del tallo de las plantas. Además, las microalgas compiten por los nutrientes del medio, disminuyendo su concentración y dificultando la absorción de ellos por el cultivo (Nonomura et al., 2001).

En contra parte, algunas especies de microalgas han presentado un efecto positivo en los cultivos. Estas tienen un gran potencial como fertilizante de plantas superiores ya que pueden proveer de forma gradual todos los micro y macronutrientes requeridos por las plantas; además, pueden suministrar vitaminas, proteínas, aminoácidos, hormonas y otras sustancias que afectan al crecimiento, desarrollo y sanidad del cultivo (Ercan et al., 2018).

La aplicación puede ser en el sistema radical o en el tejido aéreo, en ambos casos, se puede proporcionar un cultivo microbiano ya sea en polvo o en una solución; o bien, se puede aplicar un extracto, generalmente acuoso o alcohólico,

de la materia seca, este método es más común y suele aplicarse asperjando en el follaje (Alobwede et al., 2019). Estos productos son biodegradables, poco tóxicos, no contaminantes y no son peligrosos para los humanos, animales u otros vegetales (Dhagalkar y Pereira, 2005).

El uso de extractos de microalgas tiene varios efectos en la planta, esto dependerá de los metabolitos biosintetizados y extraídos. La aplicación de estas soluciones producen modificaciones en la biomasa de la planta, al alto del tallo, el largo de la raíz, el número de hojas, el ancho y largo de ellas, el número y tamaño de frutos; además, se obtienen una diferencia en la concentración de colorantes, proteínas, minerales, clorofilas, vitaminas, entre otras sustancias; al aplicarlo de forma foliar, puede alterar el ataque de fitopatógenos o el daño por estrés abiótico (Rathore et al., 2009; Vijayanand et al., 2014; Sasikala et al., 2016).

El efecto positivo de los extractos se atribuye principalmente al contenido de fitohormonas: citoquininas, ácido abscísico, giberelinas, auxinas y citoquininas. Debido a que estas sustancias tienen un efecto positivo en bajas condiciones, es necesario controlar las aplicaciones de los extractos, ya que una constante aplicación podría causar una inhibición en el crecimiento o el desarrollo de la planta (Kurepin et al., 2013; Battacharyya et al., 2015).

En algunos casos los extractos de microalgas pueden presentar un efecto negativo en la producción al usar inadecuadamente las concentraciones, también, son capaces de producir sustancias con efectos fitotóxicos y alelopáticos. Algunos grupos de moléculas con estos efectos son los ácidos grasos poliinsaturados, sesquiterpenos, esteroides y aldehídos poliinsaturados (Haniffa et al. 2019). Algunos compuestos encontrados en diatomeas que pueden generar un efecto alelopático tal es el caso del 2,4-heptadienal y el 2,4-octadienal, estos compuestos suelen reducir la replicación del DNA en células, reduciendo por ello, la replicación y por consecuencia la generación de material vegetal nuevo (Leflaive 2007).

Los efectos sobre *L. sativa* con extractos han sido muy variados, en el caso Souza et al., (2020) que sometieron a esta planta a extractos acuosos de *Cyperus rotundus* obteniendo una reducción en el tamaño y en el peso, en cambio Mohsen et al., (2016) obtuvieron un aumento en el tamaño y la producción.

#### 2.2.2. Reproducción de microalgas.

Las microalgas pueden crecer por medio de 3 diferentes metabolismos: a) fotoautotrofismo, usando luz solar como energía y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono; b) quimioheterotrofismo, obteniendo el CO<sub>2</sub> de moléculas orgánicas del medio y energía de reacciones químicas, y; c) mixotrofismo, en el cual obtienen fuentes de carbón tanto del CO<sub>2</sub> atmosférico como de compuestos orgánicos en el medio, dependiendo de la cantidad de energía lumínica, emplean una u otra fuente de carbón. En la producción industrial de microalgas mixotróficas el CO<sub>2</sub> es consumido en las paredes donde la incidencia de luz es alta, en cambio en el fondo y en el centro se consume el carbono orgánico disuelto en la solución. En la producción industrial se procura usar organismos mixótrofos ya que pueden aprovechar ambas fuentes de carbono en el medio (Moreno-Garcia et al., 2017; Kumar et al., 2011).

Además de carbono y energía, las microalgas requieren de macronutrientes como nitrógeno, azufre y fósforo, y micronutrientes como hierro, magnesio, calcio, sodio, potasio, cloro, boro, cobre, manganeso, zinc, molibdeno, cobalto, berilio y selenio. También requieren algunas vitaminas o aminoácidos y en la producción de diatomeas, se requiere de sílice. Estos compuestos son añadidos a los medios de cultivo como grado comercial o fertilizante. El principal elemento que afecta en el contenido de metabolitos en las microalgas es el nitrógeno, su disminución en el medio puede provocar un aumento en la generación de compuestos lipídicos (Chia et al., 2018)

Los fertilizantes y el agua son los principales consumibles que hacen complicada la producción de microalgas, debido al alto costo que tienen ambos. Es por ello que, en su producción industrial, se emplean aguas residuales industriales,

agrícolas y domésticas, ya que todas ellas son aguas ricas en nitrógeno y fósforo, elementos que son los más demandados por las microalgas. Su uso reduce los costos de operación; además, mitigan los contaminantes del agua empleada, siendo un excelente bioremediador (Arora et al., 2018).

Los métodos de cultivo industriales de microalgas pueden realizarse en sistemas abiertos y en sistemas cerrados llamados fotobioreactores. El sistema se suele elegir según el tipo de alga que se empleará, microalga o macroalga, y de las posibilidades económicas para desarrollar el sistema (Sing y Sharma, 2012).

Los sistemas de producción abierta suelen ser más económicos y fáciles de operar comparados con los sistemas cerrados. En estos sistemas se pueden producir microalgas y macroalgas, tanto de agua dulce como de agua salada. En estos sistemas es difícil controlar la composición de los iones en la solución, así como, la pérdida del agua por evaporación, los cambios de temperatura, el fotoperiodo y las afectaciones estacionales (Moreno-Garcia et al., 2019). Los sistemas abiertos empleados son los estanques o piscinas y los estanques de pista o raceways ejemplificados en la Figura 1 (Chia et al., 2018).



Figura 1. Izquierda: estanques experimentales de la Universidad de Rice, Texas (Siemann, 2015). Derecha: estanque de pista de escala comercial (De Vree et al., 2015).

Los fotobioreactores cerrados o mejor conocidos como PBRs, por sus siglas en inglés (Closed Photobioreactors), son sistemas completamente cerrados o con una exposición mínima al ambiente. Los PBRs formados por tubos, piscinas o burbujas transparentes de vidrio, policarbonato o PVC traslúcido de unos cuantos

metros cúbicos. Estos sistemas son más eficientes que los sistemas abiertos, porque llegan a tener una tasa de producción de  $0.2$  a  $3.8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , comparados con los raceways que alcanzan valores de  $0.12$  a  $0.48 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . En estos sistemas, es posible modificar las condiciones de concentración de sales y  $\text{CO}_2$ , pH, salinidad, temperatura e iluminación. En muchos casos, las condiciones se modifican para obtener un estado de estrés que provoque un aumento en un metabolito de interés. Por otro lado, los fotobiorreactores tienen un costo hasta de 100 veces mayor que los sistemas abiertos; además, su mantenimiento es laborioso, costoso y tardado (Kumar et al., 2015; Kaewkannetra et al., 2012). Los sistemas más comunes de fotobiorreactores son de tubos horizontales, columna de burbuja y panel plano, los cuales están ejemplificados en la Figura 2 (Chia et al., 2018).



Figura 2. Arriba: Foto reactor tubular experimental “algaePRAC”, Wageningen University and Reserch, Países Bajos (Van Sprundel, 2012). Abajo-derecha: Reactor de columna de burbuja; abajo-izquierda: Fotobiorreactor de panel plano (Zhang et al., 2018).

### 2.2.3. Selección de microalgas.

El principal factor para la elección de una microalga es el metabolito a obtener, en segundo lugar, se consideran las condiciones del medio y del ambiente. La temperatura, tanto ambiental como del medio, la insidencia de luz y el contenido de minerales son los principales factores que pueden modificar tanto la cantidad de biomasa producida como el porcentaje de metabolitos (Ozkan y Rorrer, 2017).

Cuando se emplean aguas residuales para la producción, este se convierte en el principal factor para elegir al microorganismo. Es necesario encontrar una microalga que pueda desarrollarse en las condiciones iniciales de este medio. Las algas del género *Cocconeis* spp (Cocconeidaceae) tienen la capacidad de resistir niveles altos de conductividad eléctrica, condición propia de las soluciones hidropónicas, además se reproducen rápidamente en medios ricos en nitrógeno, son de las primeras especies en encontrarse en estados de eutrofización o contaminados por nitrógeno, es por ello la elección de estas microalgas (Raniello et al., 2007).

### 2.2.4. Microalgas del género *Cocconeis*.

#### 2.2.4.1. Taxonomía de *Cocconeis*.

Imperio	Eukaryota
Reina	Chromista
Familia	Bacillariophyta
División	Bacilliraophytina
Clase	Bacillariophyceae
Subclase	Bacillariophycidae
Orden	Cocconeidales

Famnilia           Cocconidaceae

Género            *Cocconeis*

(Guiry et al., 2020)

#### 2.2.4.2. Descripción botánica.

*Cocconeis* es un género de microalgas perteneciente a las diatomeas o Bacillariphitas. Son organismos unicelulares que pueden encontrarse solitaria o en colonias, generalmente alargadas en forma de hilos. Su color es verde-marrón provocado por la presencia de carotenos. Su forma es ovalada, con areolas a lo largo de su pared celular, la cual esta endurecida por una capa de sílice, estas son empleadas para la identificación de especies, generalmente por la forma, posición y cantidad de areolas. Su metabolismo es mixotrófago, es decir, pueden obtener carbón tanto del dióxido de carbono atmosférico como de fuentes orgánicas de la solución (Stefano et al., 2008).

### 2.3. Lechuga (*Lactuca sativa*) L.

#### 2.3.1. Taxonomía.

Reina            Plantae  
Sibreino        Emrbiobiotionta  
Division        Magnolipphyta  
Clase            Magnoliopsida  
Subclase        Asteridae  
Orden            Asterales  
Famnilia        Asteraceae  
Genero         *Lactuca*

Especie *L.sativa*

(Kristková et al., 2008)

### 2.3.2. Descripción botánica.

La lechuga, *Lactuca sativa* (Asteraceae) es una planta anual originaria de oriente medio y Europa, cultivada para el consumo de sus hojas frescas o de los tallos tiernos. Es una planta herbácea de raíz pivotante de unos 30 a 50 cm de profundidad y un tallo erecto que puede medir de 30 a 100 cm de alto. Sus hojas tienen un arreglo en espiral y con entrenudos muy cortos, formando un tallo arrosado. Los bordes de las hojas pueden ser enteros, dentados o rizados. Presentan inflorescencias en capitulo con 7 o hasta 35 flóculos amarillos, un involucre de 10 a 15 cm de largo y cilíndrico; las brácteas son lanceoladas, de color verde claro con márgenes blancos, erectas en la etapa de madures. El fruto es un aquenio de 5 a 7 costillas setosas en cada lado, un pico y pappus blanco (Kristková et al., 2008).

La lechuga se clasifica en 4 grupos diferentes según su morfología: Rizadas, romanas, arrepollada y palmada. Las lechugas de hoja rizadas tienen hojas sueltas y arremolinadas, fueron las primeras en cultivarse a gran escala. Las lechugas romanas, llamadas así por su origen, tienen hojas alargadas y firmes formando un cogollo laxo. La arrepollada tiene un cogollo bien envuelto y compactado, es la más consumida en la actualidad. La lechuga palmada tiene hojas largas y estrechas, desarrolladas sobre tallos gruesos. De estos 4 grupos básicos de lechugas, se cultivan una numerosa cantidad de variedades alrededor del mundo (Barrios, 2004).

### 2.3.3. Producción de lechugas mundial y en México.

La lechuga es la principal hortaliza para consumo de hojas, seguido por la espinaca, acelga, col, arúgula y cilantro. El principal productor del mundo es China, en el año 2017 produjo 15.16 millones de ton, lo que equivale un 64 % de la producción mundial, le sigue Estados Unidos de América con 3.6 millones de ton y

la India con 1.2 millones de ton; México ocupa el noveno lugar con una producción con 480 808 ton en año 2019 (Figura 3) (FAOSTAT, 2020).

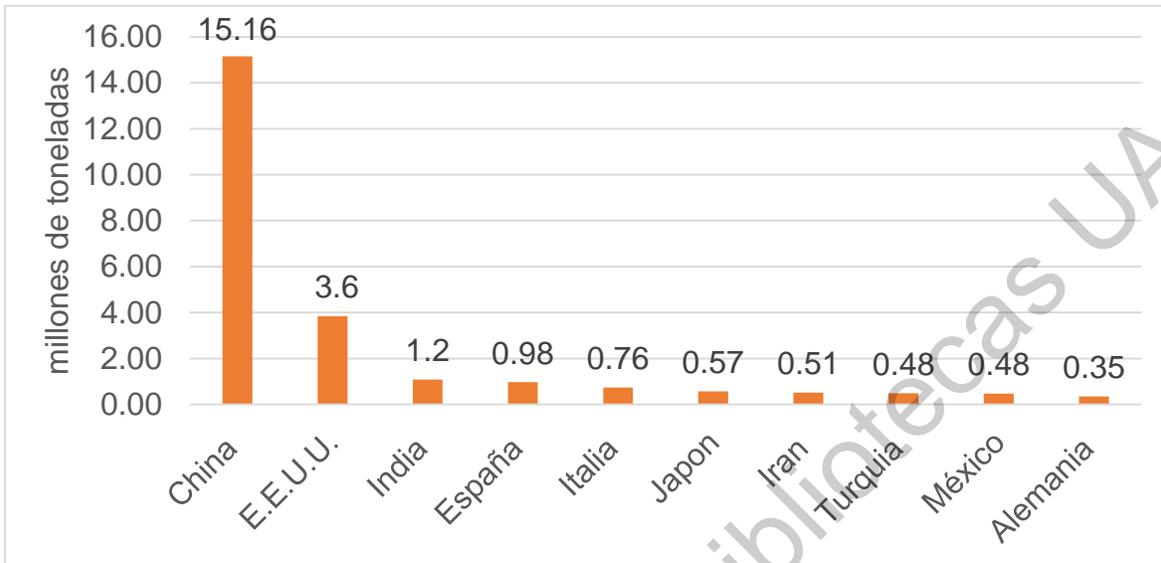


Figura 3. Producción de lechuga en el 2018 de los 10 principales países productores (FAO, 2020).

En México la producción de lechugas ha incrementado en los últimos años, como se puede observar en la Figura 4, esto se atribuye al aumento de las exportaciones de este producto a tal grado que una de cada tres lechugas producidas en el país son exportadas, principalmente a Canadá y Japón, además, el consumo de lechuga en México es habitual, con un consumo per capital anual de 2.6 kg. Durante todo el año se mantiene una producción constante, siendo febrero, marzo y abril los meses de mayor producción. El principal estado productor de lechugas en el país es Guanajuato con 108 mil Ton, le siguen Zacatecas, Puebla, Aguascalientes y Querétaro, con 82 mil, 66 mil, 48 mil y 27 mil Ton, respectivamente. Las principales variedades que se producen en México son baby leaf, escarola, orejona y romana (SIAP, 2018).

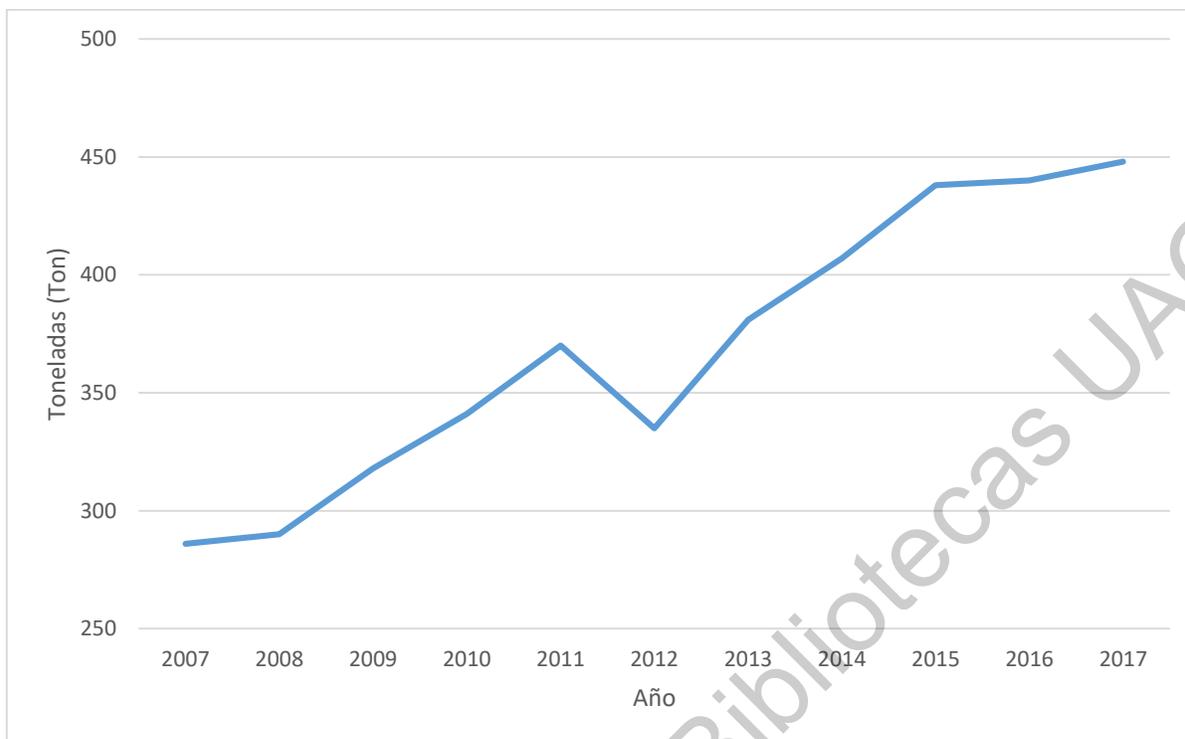


Figura 4. Producción de lechugas en México en el periodo 2007-2017 (SIAP, 2017).

#### 2.3.4. Producción hidropónica de *Lactuca sativa*.

La lechuga es uno de los principales cultivos producidos en sistemas hidropónicos, las técnicas más empleadas para este producto son el NFT y la raíz flotante, en ambos casos se recomienda tener una conductividad eléctrica entre 1.5 y 2.5 dS/m y un pH de 6 a 6.5 (Sabir y Singh 2012, Bello et al., 2018; Silva et al., 2018).

En los sistemas hidropónicos, el tiempo de producción de la lechuga puede ser de 30 a 45 días según la incidencia solar y la temperatura. Si se somete a 13 h luz y temperaturas mayores a 24 °C se puede fomentar la formación de inflorescencia y con ello un sabor amargo en las hojas (Sublett et al., 2018).

Para la producción de lechuga se emplea la solución de Hoagland, la cual ha demostrado un buen desempeño con este cultivo en sistemas aeropónicos,

hidropónicos y sobre sustrato. Como complemento a la solución nutritiva, se emplean aplicaciones foliares, algunos estudios demuestran un aumento en el ancho, largo y biomasa de raíces y del área foliar de *L. sativa* con aplicaciones tanto foliares como en solución de bioestimulantes a base de microalgas, cuatro aplicaciones de extractos de *Chlorella vulgaris* cada 14 días provocaron un aumento del 18.9 % y del 16.5 % en el peso fresco de lechugas romanas y lechugas bola respectivamente, extractos de *Ascophyllum nodosum* generaron un aumento en un 26.2 % de lechugas (Arshad et al., 2018; Silva et al., 2018; Lucini et al., 2015).

### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de aplicaciones foliares del extracto metanólico de microalgas del género *Cocconeis* spp. producidas en aguas residuales sobre la producción de *Lactuca sativa* var. orejona.

#### 3.2. Objetivos particulares.

Determinar la remoción de N de las microalgas del género *Cocconeis* spp. en condiciones *in vitro*.

Diseñar un fotobioreactor de panel plano para la reproducción de microalgas del género *Cocconeis*.

Establecer la remoción de N de las microalgas del género *Cocconeis* spp., reproducidas en un fotobioreactor de panel plano.

Comprobar los cambios anatómicos de *Lactuca sativa* var. orejona tras la aplicación de extracto metanólico de microalgas del género *Cocconeis* spp.

## 4. METODOLOGÍA.

### 4.1. Material biológico.

Las microalgas del género *Cocconeis* spp. fueron aisladas de las camas de producción de la empresa FreshQro S.A.S. ubicada en Querétaro, Querétaro, México (20°37'59.9" N 100°23'45.9" O).

Como planta modelo, se empleó *L. sativa* var. Orejona. Las semillas fueron adquiridas a "Rancho Los Molinos", Morelos, México y su producción se realizó en las instalaciones de FreshQro S.A.S.

### 4.2. Producción de microalgas en sistema abierto

#### 4.2.1. Identificación

La identificación de las microalgas se realizó con la comparación morfológica siguiendo las claves taxonómicas de Needham y Needham (2002) con un microscopio óptico (VE-S1, Velab) en el Laboratorio de Compuestos Naturales Insecticidas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

#### 4.2.2. Producción *in vitro* de microalgas.

Las microalgas fueron reproducidas siguiendo la metodología de Puglisi et al., (2020) con modificando las fuentes químicas, fue empleada la solución nutritiva descrita en el Cuadro 5.

Una muestra de 10 mL con 546 células de microalgas L<sup>-1</sup> fueron añadidos a un matraz Erlenmeyer con 1 L de solución nutritiva, al sistema se incorporó una piedra difusora que mantuvo un flujo de 140 mL min<sup>-1</sup> de aire. Esto se realizó por triplicado y con un control negativo en el cual solo se colocó 1 L de la solución nutritiva con una piedra difusora. Se empleó agua purificada la cual fue esterilizada en una autoclave (1915x, All American, Estados Unidos de América) a 20 psi y 120 °C por 15 min.

Las condiciones empleadas de la producción se detallan en el Cuadro 4. Los tratamientos se colocaron en una cámara de incubación formada con un estante y focos incandescentes que mantuvieron un fotoperiodo de luz: oscuridad de 16:8 con una humedad de 45-60 % durante 100 días. Las condiciones ambientales se monitorearon con un hidrotérmetro.

Cuadro 4: Condiciones controladas empleadas en la producción *in vitro* de algas *Cocconeis* spp., en medio artificial.

<b>Condices</b>	<b>Valor</b>
<b>pH</b>	6.1- 6.5
<b>Conductividad eléctrica</b>	8.2 ± 0.6 mS
<b>Temperatura ambiental</b>	32 ± 6.4 ° C
<b>Temperatura del medio</b>	28.4 ± 5.1 °C
<b>Porcentaje de humedad del ambiental</b>	45-60 %
<b>Fotoperiodo</b>	16:8 (luz: oscuridad)

Cada tercer día se midió el contenido de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pH y conteo celular con un fotómetro selectivo de nitritos (HI96786, HANNA, Estados Unidos de América), un medidor selectivo de nitratos (LAQUAtwin-NO3-11, Horiba, Estados Unidos de América) un pHmetro portátil (HI98103, HANNA, Estados Unidos de América) y una cámara de Neubauer, respectivamente.

Al observarse una tendencia de crecimiento de población constante de la de las microalgas, se detuvo la oxigenación 24 h previas a la cosecha para permitir la precipitación de las colonias. En la Figura 5 se observa un tratamiento previo a la recolección. El líquido sobrenadante se vació a un segundo matraz el cual se aforo a 1L con la solución nutritiva, el sedimento se trasladó a una charola de aluminio con peso constante la cual se colocó en un desecador solar por 72 h. Una vez deshidratadas, se midió el peso seco de la biomasa, la cual se pulverizó con un

molino eléctrico (M20, IKA, Estados Unidos de América) y se almaceno a 4 °C hasta su uso.



Figura 5. Cultivo *in vitro* de microalgas separado para su decantación.

#### 4.3. Elaboración de fotobioreactores.

Siguiendo la descripción de Leite et al., (2019) se construyó un fotobioreactor de panel plano de 80 L de capacidad.

Se inició contruyendo una estructura de soporte de ángulo de PTR de 6 mm de forma rectangular prismática de 60 cm de ancho, 70 cm de alto y 15 cm de profundidad, el cual se ilustra a la izquierda de la Figura 6. La estructura de soporte se forró con una placa de acrílico transparente de 6 mm siguiendo la forma del esqueleto, la base se realizó con una forma de “V” para concentrar las colonias en la parte central-inferior, el ángulo con el que se forma la inclinación puede ser observada a la derecha de la Figura 6. En el punto de acumulación se colocó una salida modulada por una llave de esfera de 1.5 pulgadas de diámetro, la cual se abrió solo para extraer muestras para el análisis y para la cosecha.



Figura 6.(izquierda) Estructura de soporte de PTR; (derecha) placa de acrílico para forrado de fotobioreactor.



Figura 7. Fotobiorreactor de panel plano empleado en la experimentación.

Se colocó un sistema de aireación formado por una manguera de 1/8 de pulgada conectada a 4 piedras difusoras, las cuales se alimentaron con una bomba de aireación con un flujo de  $140 \text{ mL min}^{-1}$ . En la Figura 7 se puede observar el fotobiorreactor con el sistema de oxigenación activo.

#### 4.3.1. Cultivo de microalgas en fotobiorreactor.

En el fotobiorreactor se colocaron 80 L de la solución de producción descrita en el Cuadro 5., se empleó un inóculo de 250 mL, mientras que, en el fotobiorreactor 2 se añadieron 500 mL, la concentración de dicha solución fue de  $4\ 550$  células  $L^{-1}$ . Diariamente se programó el sistema de aireación por 15 min cada hora iniciando a las 8:00 y finalizando a las 18:00 h. Previo a la inoculación se tomaron 50 mL de muestrax para realizar las mediciones de pH,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  y conteo celular.

Cada tercer día se tomaron 3 muestras de 10 mL para hacer determinaciones de pH,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  y conteo celular, esto durante 100 días.

#### 4.3.2. Cosecha de microalgas.

24 h previas a la recolección, el sistema de aireación se paró para promover la precipitación de las colonias de mayor densidad. Éstas fueron extraídas por la válvula de desagüe. El líquido obtenido fue filtrado al vacío usando papel Whatman No. 1. El filtrado fue desprendido del papel filtro, colocándolo en una charola de aluminio de 15 cm x 15 cm x 3 cm para ser secados en una estufa eléctrica a  $80^\circ C$ .

#### 4.4. Obtención de extractos.

Los extractos se elaboraron siguiendo la metodología empleada por Vijayanand et al. (2014).

Se pesaron 10 g de microalgas secas y molidas en un matraz bola de 250 mL los cuales se sumergieron en 100 mL de metanol. La mezcla se calentó en reflujo por 4 h. Una vez temperada, se filtró con papel Whatman no.1, el solvente fue eliminado con un evaporador rotatorio hasta obtener el extracto crudo como el que se muestra en la Figura 8; este fue disuelto en 100 mL de agua, a partir de él se prepararon 200 mL de soluciones de concentraciones 0, 2, 4, 6, 8 y 10 % (v/v). Tanto el extracto concentrado como las diluciones se prepararon con un día de anticipación a la aplicación.



Figura 8. Extracto crudo de microalgas obtenido tras 4 h de refluxo y eliminación del solvente por medio de baño de agua.

#### 4.5. Evaluación de extractos.

##### 4.5.1. Pruebas de germinación.

Se prepararon 200 mL de diluciones del extracto en una concentración de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 % (w/v), cada una se colocó en una charola de aluminio de 15 cm x 15 cm x 5 cm. En cada charola se colocaron 15 horticubos con un orificio de 1 cm de profundidad, en cada uno se plantó una semilla de *L. sativa* var. Orejona los cuales después se colocaron en una cámara de germinación hasta su emergencia.

A los 7 d después de la siembra (dds) se cuantificaron las plantas que emergieron para obtener el porcentaje de germinación, a los 14 dds se cuantificó el número de plantas que sobrevivieron, el número de hojas, el largo y ancho de las hojas, el tallo y la raíz.

#### 4.6. Pruebas de desarrollo.

##### 4.6.1. Descripción del invernadero.

La producción de lechuga se realizó en la empresa FreshQro SAS. Se trabajó en un invernadero tipo macrotúnel de 11 m de ancho x 29 m de largo y 5 m de alto, este es mostrado en la Figura 9.

Las tinas de producción en sistema de raíz flotante tenían una estructura de 2.10 m x 24 m x 0.3 m. La oxigenación se realizó con un compresor de 2 HP (930, Goni, Estados Unidos de América) al cual se le conectó un tubín de 10 mm de diámetro, la tubería se sumergió a lo largo de la tina y cada metro se realizó una perforación con una aguja de disección.



Figura 9. Invernadero macrotunel empleado en la producción de plántulas y plantas de *L. sativa*. Var. Orejona.

#### 4.6.2. Producción de plántulas.

Las plántulas se produjeron en horticubos de 2.1 cm x 2.0 cm x 3.6 cm. Se colocó una semilla en cada cavidad de los horticubos. Las placas se pondrán en una charola de germinación de 60 cm x 40 cm x 7 cm adicionándole un litro de agua corriente. Las charolas se colocaron en una cámara de germinación con una temperatura de 30 °C y 40 % de humedad.

Una vez germinadas, las plántulas se trasladaron dentro del área de desarrollo del invernadero, con una exposición mínima de luz de 12 h d<sup>-1</sup>. El riego continuó realizándose con agua corriente cada cuatro días, se añadían de 50 mL. Tras la aparición de las primeras hojas verdaderas, el riego se realizó con 100 mL por placa de la solución nutritiva descrita en el Cuadro 5.

Las plántulas de lechugas a los 14 dds, mostradas en la Figura 10, se separaron de la placa para colocarlas en una canastilla hidropónica de 5 cm de diámetro y 4 cm de profundidad, estas a la vez se colocaron en una placas de unigel de 60 cm x 150 cm x 5 cm. Cada placa se perforó con 250 orificios de doble diámetro, el primero era de 5.2 cm con una profundidad de 2 cm y el resto se angostaba a un diámetro de 3.5 cm.



Figura 10. Lechugas de 14 d después de emergencia.

Las placas de unigel de 225 orificios se colocaron en las tinas de preparación; las cuales pueden observarse en la Figura 11, consistían en pilas de madera de 2.1 m x 3 m x 0.3 m forradas con geomembrana de 0.05 mm, estas contenían una solución nutritiva con una concentración indicada en el Cuadro 5. Las lechugas permanecieron en la tina de preparación por 7 días.

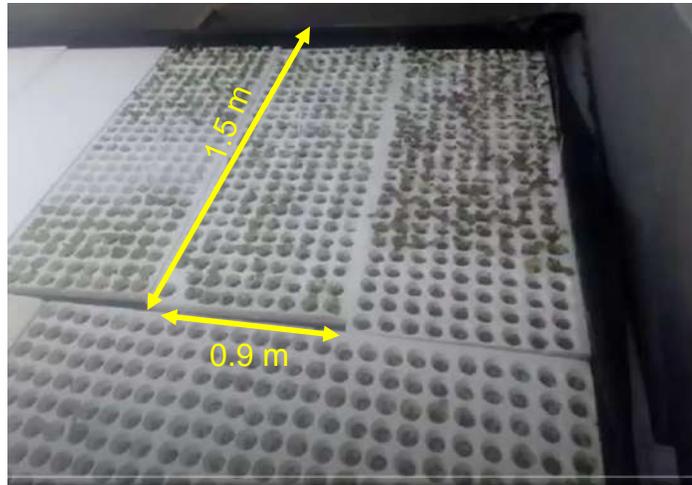


Figura 11. Placas de preparación con 225 orificios por placa, en amarillo se indican y delimitan las dimensiones de una placa empelada.

Pasadas los 14 días de preparación, cada lechuga se trasplantó a las placas de producción, estas tenían la misma profundidad que las placas de preparación, pero con solo 30 orificios por placa para mantener una relación de 35 lechugas  $m^{-2}$ . Las placas se colocaron en las tinas de producción las cuales tienen una dimensión de 2.1 m x 24 m x 0.3 m. Las tinas contenían una solución nutritiva con formulación descrita en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Contenido de nutrientes en soluciones para producción de lechuga.

Solución nutritiva	Concentración del elemento ( $mg L^{-1}$ )										
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Mn	Mo	Zn
Producción de plántula/ producción <i>in vitro</i>	102.5	25	105	95	15	19.5	1.5	0.03	0.25	0.005	0.04
Preparación y producción	205	50	210	190	30	39	3	0.06	0.5	0.01	0.08



Figura 12. Camas de producción con placas de unicel con una densidad de 30 lechugas  $m^{-2}$ , en amarillo dimensiones de la placa de unicel, en naranja dimensiones de la cama de producción.

#### 4.6.3. Aplicación foliar.

Se prepararon los extractos de microalgas de 2, 4, 6, 8 y 10 % (v/v) a partir de la solución concentrada del extracto crudo y DIX al 1 % v/v. Se empleó un blanco negativo el cual solo contenía DIX al 1 % y un blanco positivo el cual contenía AgriAlgae al 5 % v/v y DIX® al 1 %.



Figura 13. Extractos empleados en la experimentación de germinación, crecimiento en plántulas y pruebas de desarrollo.

Las aplicaciones se realizaron con una bomba manual de 15 L con una boquilla de cono hueco empleándose un volumen de 46 mL m<sup>-2</sup> el equivalente a 2.86 mL para cada lechuga. La aplicación se realizó a los 7, 14, 21 d después del trasplante.

#### 4.6.4. Cosecha y medición.

Las lechugas fueron cosechadas 28 d después del trasplante, estas fueron pesadas en fresco, además, se midió el largo, el ancho y el número de hojas, seguido a esto fueron secadas a la sombra por 7 días, se tomó el peso seco y se calculó el porcentaje de humedad.

#### 4.7. Análisis estadístico.

Para las pruebas de germinación y supervivencia, se empleó un diseño experimental completamente al azar, donde fue evaluada la concentración del extracto metanólico (6 niveles: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 % y un blanco positivo de AgriAlgae al 5 %) con una variedad de *L. sativa* var. Orejona, las variables de respuesta fueron % de germinación, % de supervivencia, número de hojas, el largo y ancho de la hoja, largo y ancho tanto de tallo como de la raíz a los días 7 y 14 después de la siembra, los análisis estadísticos se realizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) comparando las medias con el método de Tukey con una  $\alpha=0.05$ , empleando el software estadístico Minitab 18.

Para las pruebas de producción se empleó un diseño experimental completamente al azar, donde fue evaluada la concentración del extracto metanólico (6 niveles: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 % y un blanco positivo de AlgaEnergy al 5 %) con una variedad de *L. sativa* var. Orejona, las variables de respuesta fueron número de hojas, el largo y ancho de la hoja, largo del tallo y de la raíz, el peso fresco y el peso seco, los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) comparando las medias con el método de Tukey con una  $\alpha=0.05$ , empleando el software estadístico Minitab 18.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Reproducción *in vitro* de microalgas.

Con el sistema *in vitro* se logró una producción base seca de 1.2 g L<sup>-1</sup> y un porcentaje de extracto metanólico de 7.68 %, por otra parte, en los fotobioreactores se obtuvo una masa seca de 0.75 g L<sup>-1</sup> y un porcentaje de extracto de 7.23 %. Esta diferencia pudo deberse a las condiciones controladas que se presentaban en el sistema *in vitro*, debido a que el contenido de oxígeno fue mayor al del fotobioreactor, esta condición es una de las más determinantes para el crecimiento de microalgas, una deficiencia de oxígeno limita algunas reacciones metabólicas, en cambio un exceso produce especies reactivas de oxígeno que pueden oxidar los componentes de la pared celular y con ello provocar una lisis celular (Kim et al., 2019)

Raniello et al. (2007) evaluaron el crecimiento de *Cocconeis neothumensis* (Cocconeidaceae) en cajas de Petri y con un fotobioreactor tubular, reportando rendimientos de 0.044 g L<sup>-1</sup> de biomasa secas en las cajas de Petri con medio f/2 y 17 % del extracto con dietil-éter, mientras que en el fotobioreactor se alcanzó 0.44 g L<sup>-1</sup> y 24 % de extracto, la baja producción de estos autores respecto a lo obtenido, se atribuye a la falta de un sistema de aireación. Por otro lado, la diferencia con este autor respecto al porcentaje de extracción se puede deberse al solvente empleado, mientras que en éste experimento se empleó metanol con la finalidad de extraer fitohormonas y minerales, en el otro se usó un solvente apolar, dietil-éter, el cual tiene mayor afinidad a lípidos, carotenos y terpenos; es común obtener un mayor rendimiento de extracción con un solvente polar comparado con la extracción de un solvente apolar. A diferencia de lo obtenido en este experimento, ellos obtuvieron una mayor producción en su fotobioreactor comparado a su sistema *in vitro*, se atribuye al uso de perlas de polimetilmetacrilato en las cuales, las microalgas se adhieren y pueden reproducirse con menor gasto energético y por ello mayor eficiencia (De Vree et al., 2015).

En Figura 14 se observa la curva de reproducción obtenida para las microalgas *Cocconeis* spp., en ella se observan 3 puntos de estancamiento, a los 30, 65 y 95 d, en ellos el contenido de células  $L^{-1}$  fue de 550, 1 030 y 540 mil respectivamente. Su desarrollo tuvo un comportamiento típico de reproducción, es decir, un crecimiento acelerado, un estancamiento y un futuro decaimiento. Fue necesario conocer el punto de estancamiento para determinar la cosecha de la biomasa producida y hacer un relleno con nuevo medio, esta adición proporcionó más nutrientes disueltos, modificó el pH, la CE, el contenido de N y la turbidez, haciendo nuevamente favorables las condiciones para la reproducción exponencial de las microalgas, el aumento del N en la solución, facilita la síntesis de sustancias orgánicas nitrogenadas; los niveles altos de CE provocan un gradiente de y presión osmótica alta en las células, generando la muerte por lisis celular (Baldisserotto et al., 2019; Cointet et al., 2019).



Figura 14: Curva de crecimiento de microalgas en sistema *in vitro*. Líneas naranja, azul y gris: tratamientos con microalgas. Línea amarilla: control.

Durante los días de estancamiento se observó una reducción del contenido de N, el cual pudo ser insuficiente para los organismos. En algunos casos, el contenido reducido de N no es una limitante para la reproducción de las microalgas, tal es el caso para la especie *Scenedesmus* sp. (Scenedesmaceae), la cual no presentó diferencias significativas en la producción de la biomasa entre las concentraciones 247, 123.5, 61.75, 30.87 y 14.43 mgN L<sup>-1</sup>, obteniendo una producción de biomasa de 550, 590, 560, 550 y 500 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, pero si presentaron una disminución del 8% de lípidos, 20 % de carbohidratos y un aumento del 20% de proteína comparado con el control (Pancha et al., 2014), encambio, al emplear *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) y reducir el contenido inicial de N, se observó una reducción en la producción de biomasa, se obtuvo una producción de 1800, 1500, 1100 y 600 mg L<sup>-1</sup> de biomasa a las concentraciones de 165, 85,42 y 20 mg L<sup>-1</sup> N-NO<sub>3</sub> respectivamente (Qi et al., 2016).

#### 5.2. Pruebas de tratamiento de aguas residuales *in vitro*.

En la Figura 15, se observa el comportamiento del N en forma de nitrato contra el tiempo en las pruebas *in vitro*. Durante los primeros días se observó una caída de 300 ppm en el contenido de nitratos, según Leite et al. (2019) solo con la oxigenación es posible eliminar 200 ppm de N en forma de amoniaco, el cual se encuentra en equilibrio con las demás formas de N disuelto, por tanto, esta disminución pudo ser causa para recuperar el equilibrio químico entre amoniaco y las otras formas de iones nitrogenadas. Esta reducción se ve favorecida cuando los microorganismos se encuentran inmobilizados, se ha observado que *Scenedesmus obliquus* (Scenedesmaceae) llega a tener una disminución del 96.6 % de N amoniacal con las microalgas inmobilizadas, comparado con una remoción del 72.0% empleando los microorganismos en solución. Al encontrarse en solución, las microalgas muertas continuarán interfiriendo en el paso de energía lumínica por lo cual se reduce la capacidad fotosintética, con ello, la absorción de elementos es menor. Además, los organismos vivos se desarrollan en la parte superficial de la capa, dejando los organismos muertos en el interior de la capa formada, permitiendo

que los organismos vivos estén siempre en contacto con la solución (Liu et al., 2019).

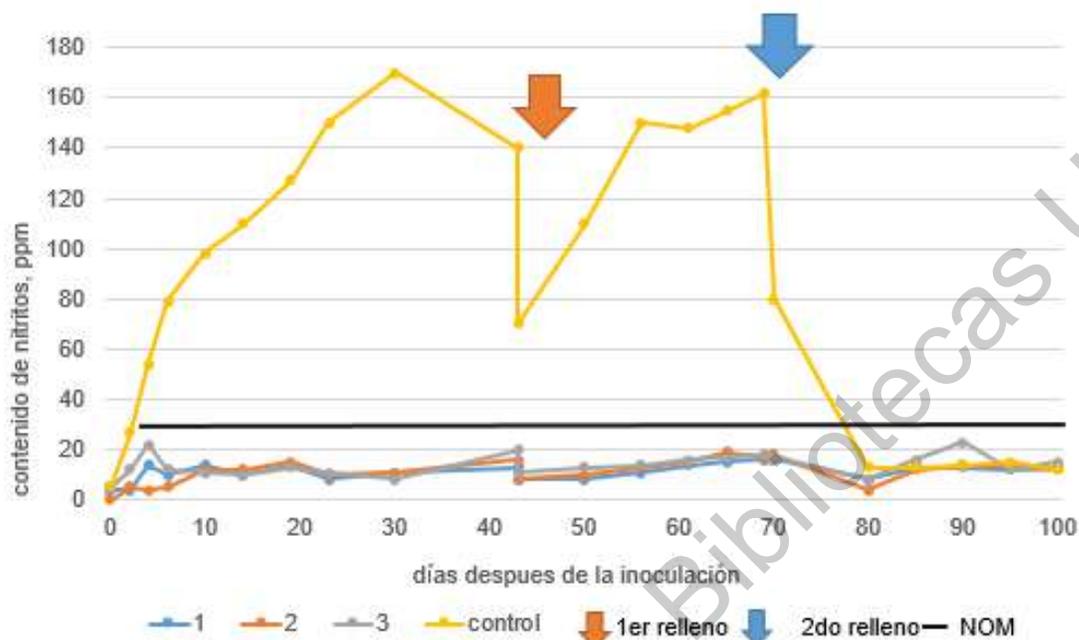


Figura 15. Concentración de nitritos en las aguas residuales durante las pruebas *in vitro*. Línea azul, naranja y gris: tratamientos con microalgas *Cocconeis* spp. Línea amarilla: control. Línea negra concentración máxima permitida por la NOM-001-SEMARNAT-1996.

La concentración de nitritos se ve rápidamente elevada en el control como se observa en la Figura 16, en cambio, en las muestras con microalgas se observaron concentraciones bajas de este anión, el control llegó a tener concentraciones hasta las 170 ppm, en cambio los tratamientos solo obtuvieron valores inferiores a 25 ppm, este nivel se encuentra por debajo de los niveles de N total que indican la NOM-001-SEMARNAT-1996. Las microalgas son capaces de transformar el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) disuelto en la solución empleando nitrato/nitrito reductasa con NADH y ferroxodin para poderlos absorber e introducir a su sistema, este comportamiento es observado principalmente en los organismos mixotróficos (Mujtaba et al., 2015). En el día 70 se presentó una contaminación de microalgas en el control de las pruebas

*in vitro*, lo cual se vio acompañado con una reducción del contenido de nitrato, un aumento en el nitrato y del crecimiento poblacional del microalgas.

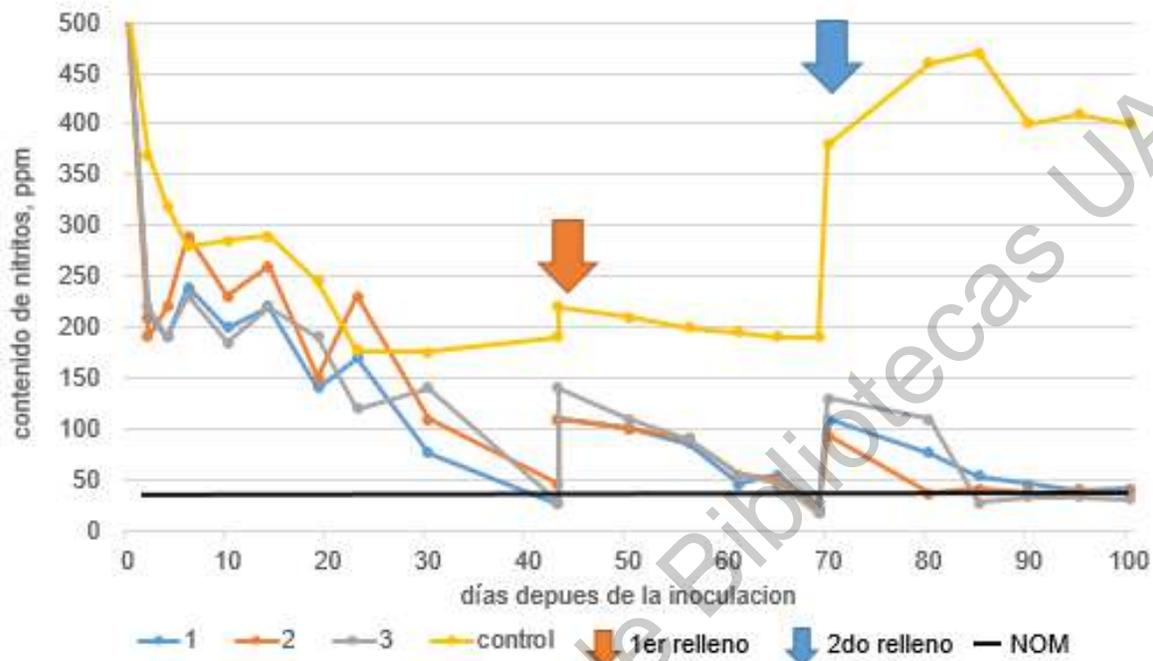


Figura 16. Concentración de nitratos en las aguas residuales durante las pruebas *in vitro*. Línea azul, naranja y gris: tratamientos con microalgas *Cocconeis* spp. Línea amarilla: control. Línea negra concentración máxima permitida por la NOM-001-SEMARNAT-1996.

El uso de microalgas como agentes biológicos de tratamiento de aguas ha sido desarrollada por su alta capacidad de extracción de compuestos del medio donde se reproducen. Estos microorganismos extraen en mayor medida carbón, oxígeno, nitrógeno y fósforo. Estos elementos pueden ser estructurales o funcionales. Los emplean para la síntesis de pared celular, aminoácidos, proteínas, DNA, clorofila, entre muchos otros compuestos (Moreno-García et al., 2017).

### 5.3. Pruebas piloto de tratamiento en fotobioreactor de panel plano.

La producción en el fotobioreactor de panel plano fue de 0.75 g L<sup>-1</sup> por cada cosecha y una remoción de N de 75 %. Estos sistemas permitieron realizar un pretratamiento de aguas residuales mediante la producción de biomasa de

microalgas. La modificación en forma de “V” realizada al modelo de Leite et al., (2019) permitió que la cosecha se realizara de forma rápida y concentrada. En la Figura 17 se muestra el fotobioreactor a los 100 días de tratamiento, en ella se observa que en la parte inferior de la “V” se concentran mayor cantidad de microalgas aprovechando la poca flotabilidad de estos organismos y la forma del fondo.



Figura 17. Fotobioreactor a los 100 días de producción.

En la fondo., se observa el crecimiento de la población de las microalgas. La línea azul representa el crecimiento poblacional del reactor 1, a este se le inoculó con una concentración de 56 células  $\text{mL}^{-1}$  comparado con el reactor 2 que inició con un inoculo de 560 células  $\text{mL}^{-1}$ , por ello el primero tuvo un crecimiento poblacional más lento, mostrándose un crecimiento exponencial para el día 15, hasta llegar a una saturación al igual que el reactor 2, en el día 51. Fue necearía la determinación de los días en los que se llega a esta saturación para poder hacer la extracción de la biomasa generado en el biorreactor y hacer una recarga de aguas residuales, esta saturación pudo ser causada por la producción de metabolitos secundarios nocivos para controlar la población, escases de alimento, exceso de oxígeno o deficiencia fotosintética provocada por el exceso de población (Khadim et al., 2018).

Al igual que el desarrollo *in vitro*, se observó un estancamiento en el desarrollo poblacional de las microalgas en el fotobioreactor, este estancamiento se vio a los 38 d para el tratamiento 1 y a los 32 d para el tratamiento 2, el primero al tener una menor carga microbiana inicial requirió mayor tiempo para llegar a un estado inadecuado para la reproducción.

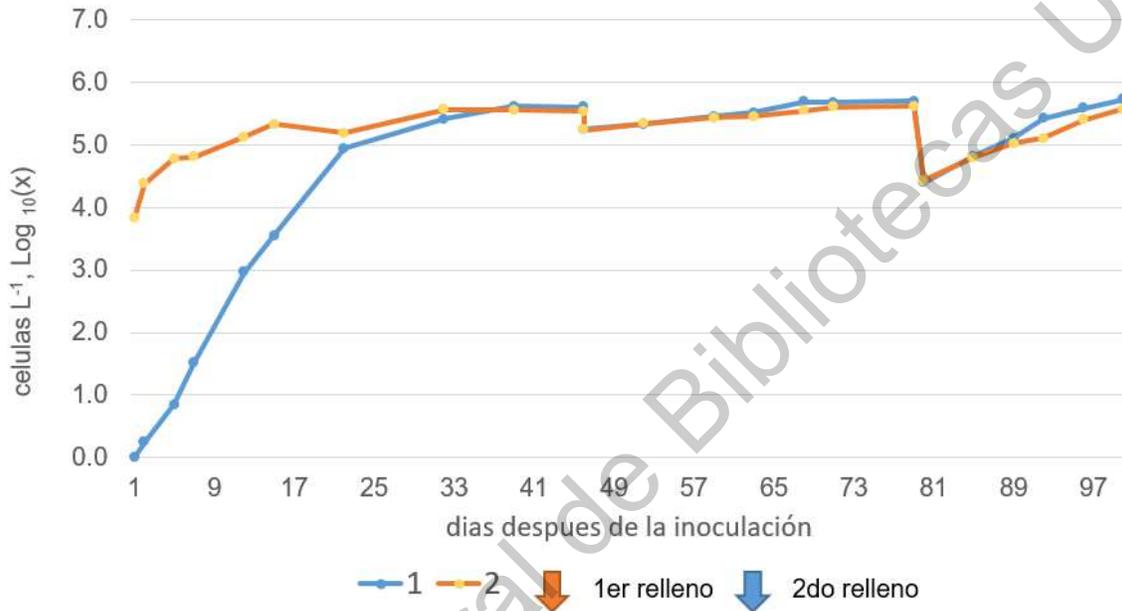


Figura 18. Curva de crecimiento poblacional de microalgas en fotobioreactor de panel plano. Línea azul tratamiento 1, línea naranja tratamiento 2.

Al comparar las gráficas de desarrollo de las microalgas contra el contenido de nitratos, Figura 19, se observó una relación inversamente proporcional. El contenido de nitratos fue reducido por parte de las microalgas para el desarrollo celular, estas absorben el N de la solución en forma de amoníaco y nitrato para integrarlos en la síntesis de aminoácidos, proteínas, enzimas, DNA y otras moléculas orgánicas (Yu et al., 2018). El estancamiento de crecimiento poblacional se le atribuye a la deficiencia de luz que llega a la solución nutritiva, al aumentar la población, las mismas microalgas no permiten que el rayo luminoso penetre al interior del fotobioreactor, la falta de luz modifica considerablemente la fotosíntesis de las microalgas, esto puede causar un cambio en la síntesis de biomoléculas

hasta llegar incluso modificar el contenido de lípidos y carbohidratos en la microalgas (Baldisserotto et al., 2019).

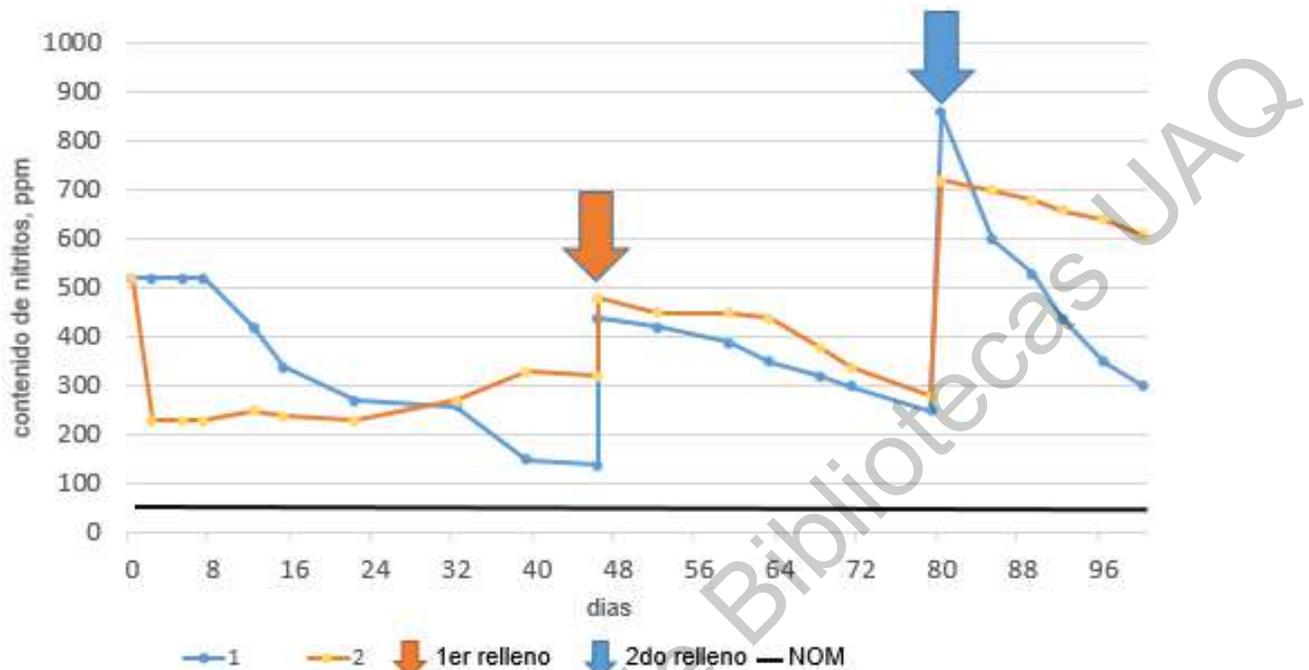


Figura 19. Consumo de nitratos en solución de biorreactores de panel plano. Línea azul tratamiento 1, línea naranja tratamiento 2. Línea negra concentración máxima permitida por la NOM-001- SEMARNAT-1996.

Al igual que en las pruebas *in vitro*, los niveles de nitritos en el fotobiorreactor, mostrados en la Figura 20, se mantuvieron en niveles por debajo de 40 ppm. Este fenómeno pudo deberse a la constante oxidación de las diferentes formas de nitrógeno por parte de las microalgas para favorecer los niveles de nitrato, cuyo ión de N es el de mayor asimilación por estos microorganismos (Mujtaba et al., 2015). No se satisfizo el contenido de N total estipulado por la NOM-001-SEMARNAT-1996, que determina que el nivel de nitrógeno total debe estar situado por debajo de las 40 ppm. Sin embargo, estos no se alejaron mucho de dicho nivel. Ji et al., (2019) obtuvieron una reducción del 95% en la concentración de nitrógeno total a los 10 d, sin embargo, ellos iniciaron en una concentración de 18 ppm, acompañado a esto, emplearon la inmovilización de microalgas, al mantenerlas en un soporte

sólido, la solución no se satura por material vegetal, permitiendo que la difusión lumínica sea más eficiente.



Figura 20. Concentración de nitritos en las aguas residuales durante las pruebas en fotobioreactor. Línea azul y naranja *Cocconeis* spp. Línea amarilla: control. Línea negra concentración máxima permitida por la NOM-001- SEMARNAT-1996.

#### 5.4. Efecto del extracto metanólico en el porcentaje de germinación de *Lactuca sativa*.

Los efectos del tratamiento de semillas son mostrados en el Cuadro 6, se observa una disminución en el porcentaje de germinación a los 4 dds a partir de la concentración al 4 % la cual genero una disminución del 60% en el porcentaje de germinación a los 14 dds. Al incrementar la concentración del extracto metanólico, la germinación de *L. sativa* se redujo hasta 0 % con la concentración de 10 %. De forma complementaria, se midió la supervivencia de las mismas semillas a los 14 dds, con el fin de observar si el extracto podía producir la muerte de organismos que lograron emerger al tiempo adecuado. En los tratamientos incluyendo al control positivo, hubo un descenso de las semillas que lograron emerger, en cambio, en control negativo se obtuvo una germinación de 100 % a los 14 dds.

Cuadro 6. Efectos en el desarrollo de semillas de *L. sativa* var orejona con la aplicación de extracto botánico de microalgas.

Concentración (%)	Porcentaje de germinación a 4 dds	Porcentaje de supervivencia a los 14 dds
0	86.60 ± 11.5 <sup>AB</sup>	100 ± 0 <sup>A</sup>
2	100.0 ± 0 <sup>A</sup>	87 ± 11.53 <sup>A</sup>
4	53.30 ± 11.5 <sup>CD</sup>	40 ± 20 <sup>B</sup>
6	40.00 ± 0 <sup>DE</sup>	7 ± 11.55 <sup>BC</sup>
8	20.00 ± 0 <sup>EF</sup>	7 ± 11.55 <sup>BC</sup>
10	0 <sup>F</sup>	0 ± 0 <sup>C</sup>
Control +	73.3 ± 11.5 <sup>ABC</sup>	33.3 ± 23.1 <sup>BC</sup>

Control +: AgriAlgae

El efecto de la exposición de las semillas en extractos metanólicos de microalgas sobre su germinación puede ser muy variado ya que estas son muy sensibles a ciertos minerales, terpenos, compuestos fenólicos, hormonas u otros metabolitos secundarios. Mendoza-Morales et al., (2019) evaluaron la germinación de *Lans esculenta* (Fabaceae) sometidos a cuatro extractos acuosos de algas, la cual presentó una reducción del porcentaje de germinación con los extractos de *Ulva fasciata* (Ulvaceae) reduciéndose del 100% de germinación del control negativo, a 83, 17 y 16 % de germinación con las concentraciones de 10, 20 y 30 %, mientras que, con los extractos *Sargassum vulgare* (Sargassaceae) a las concentraciones de 5, 10, 20 y 30 %, se redujo a 51, 49, 44 y 40 % respectivamente. En cambio, los extractos de *Sargassum liebmannii* (Sargassaceae) y *Gracilaria debilis* (Gracilariaceae) a la misma concentración no tuvieron efecto fitotóxico. Zeghada et al., (2019) evaluaron extractos acuosos de *Tetarackubus articulata* (Cupressaceae), a las concentraciones de 0.25, 0.5, 0,75 y 1 % (p/v), los cuales, presentaron un efecto alelopático en *L. sativa*, reduciendo el porcentaje de germinación a 65, 38, 15 y 18 % respectivamente, comparada con el control que obtuvo un porcentaje de germinación del 90 %.

La información obtenida indica la presencia de compuestos bioactivos con actividad alelopática. Esta actividad mostrada por los extractos, permitieron considerar al extracto metanólico de microalgas del género *Cocconeis* spp., como un candidato para uso como herbicida natural. Será necesario realizar pruebas con otras plantas para observar su comportamiento con otras especies, será necesario probarlo con plantas que sean identificadas como malezas (Souza et al. 2020).

La exposición al extracto metanólico afectó al crecimiento y desarrollo de las plántulas de *L. sativa*, observando que las aplicaciones provocan una disminución en el crecimiento de la plántula a partir de la concentración al 2%, a partir de la cual se reduce 17 % el largo y 23 % el ancho de la hoja. En las concentraciones mayores al 8 % el efecto en el número de hojas es estadísticamente diferente al control negativo, esta disminución afecta la producción ya que al reducir la cantidad de hojas se reduce directamente la cantidad de fotosistemas, reduciendo así los fotoasimilados, incluyendo los carbohidratos estructurales que permitirán desarrollar más biomasa (Kazbar et al., 2019).

En la Figura 21 se aprecian los cambios en la morfología de las plántulas de *L. sativa*, el tamaño de estas se ve reducido por la presencia del extracto metanólico y control positivo. Al contrario, Mohsen et al., (2016) observaron que al aplicar una solución de extractos acuosos de *Anabaena oryzae* (Nostocaceae) al 7.5 % (v/v) sobre plántulas de *L. sativa*, existió un aumento del 16% en el largo y ancho de la raíz. En cambio, Puglisi et al., (2020), evaluaron los periodos de aplicación de solución de Hougland con extractos acuosos de *Scenedesmus quadricauda* (Scenedesmaceae) a una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> sobre plántulas de *L. sativa*, cuyo mejor tratamiento fue la aplicación cada séptimo día, el cual promovió un aumento del 12 % en el peso seco, pero no provocó otras modificaciones morfológicas, pero si se alteraron algunas composiciones químicas, el contenido de proteínas aumento un 38 % en cambio el contenido de clorofila aumento un 26 %.



Figura 21. Efecto en el crecimiento de *L. sativa* var orejona 14 d después de la aplicación de extractos metanólicos de microalgas.

#### 5.5. Efecto en la producción.

La modificación de los rasgos morfológicos de *L. sativa* var orejona sometidas al extracto metanólico de *Cocconeis* spp., se describen en el Cuadro 8. El número de hojas, el peso seco, largo del tallo, largo y ancho de la hoja no tuvieron una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, el control positivo y el control negativo. Las variables que reflejaron un efecto fueron el largo de la raíz y el peso fresco, a partir de la concentración al 10 % ambas variables se vieron desfavorecidas, el largo de la raíz se redujo en un 14.6 % comparado con el control negativo, esta reducción en el tamaño desfavoreció en un 15.3 % en el peso fresco de la lechuga. De forma similar, Kmar et al., (2019) emplearon extractos acuosos al 30, 20 y 10 % de *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae), y *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) en el follaje de *L. sativa*, lo cual produjo una inhibición del 47.46% y 31.26% en el desarrollo de la raíz de plantas adultas, además, se observaron una disminución en el contenido de clorofila A y B del 13 y del 14 % respectivamente con extractos de *C. sempervirens*; en cambio con *J. phoenicea* hubo una disminución de 27 y 24%. Ferrerira et al., (2019) obtuvieron un aumento del 50% en la productividad de *L. sativa* al hacer aplicaciones foliares del extracto

FertiGarden al 10%, sin embargo, a dosis mayores, el efecto se volvió fitotóxico, atribuido a una fotoinhibición provocada por mismo pigmento del extracto.

Se observó un ligero aumento en las diferentes variables, sin embargo, no son significativas como para recomendar este extracto como un bioestimulante a estas concentraciones, sin embargo, podrían realizarse pruebas con concentraciones más altas para determinar el efecto en la producción. Mola et al., (2019) compararon 3 bioestimulantes, derivados de fabáceas, extracto de plantas tropicales y extracto de algas *Ecklonia máxima* (Lessoniaceae) sobre la *L. sativa*, este último provocó un aumento en el rendimiento del 14 % con la concentración de 10%, se atribuyen el aumento en el tamaño y el rendimiento a la presencia de aminoácidos solubles, azúcares simples, minerales y fitohormonas que son extraídas del citosol de las microalgas.

Cuadro 7: Influencia en el crecimiento de plántulas de *Lactuca sativa* var orejona a los 14 días después de la germinación sometidos al tratamiento de aplicaciones por inundación de extracto metanólico de microalgas.

Concentración	Número de hojas	Largo de la hoja				Promedio (mm)	Largo de raíz (mm)
		1ra hoja, mm	2da hoja, mm	3ra hoja, mm			
0	3.47±0.5 <sup>a</sup>	73.45±9.32 <sup>a</sup>	61.11±9.39 <sup>a</sup>	35.98±9.66 <sup>a</sup>	56.85± <sup>a</sup>	16.81±2.42 <sup>ab</sup>	
2	3.07±0.49 <sup>ab</sup>	58.95±12.3 <sup>b</sup>	44.50±10.05 <sup>b</sup>	37.20±12.49 <sup>a</sup>	46.93± <sup>b</sup>	14.08±1.96 <sup>c</sup>	
4	3.0±0.632 <sup>ab</sup>	44.4±17.33 <sup>b</sup>	36.63±10.03 <sup>ab</sup>	29.18±9.2 <sup>a</sup>	36.61± <sup>b</sup>	15.12±3.25 <sup>abc</sup>	
6	3.0±0.0 <sup>abc</sup>	42.06±0.0 <sup>abc</sup>	44.36±0.0 <sup>b</sup>	23.36±0.0 <sup>a</sup>	26.59± <sup>abc</sup>	9.76±0.0 <sup>bc</sup>	
8	2.0±0.0 <sup>bc</sup>	40.89±0.0 <sup>abc</sup>	22.17±0.0 <sup>c</sup>	*	31.53± <sup>abc</sup>	8.48±0.0 <sup>c</sup>	
10	0 <sup>d</sup>	*	*	*	*	*	
Control +	2.0±0.0 <sup>c</sup>	10.74±4.83 <sup>c</sup>	8.75±1.973 <sup>c</sup>	*	9.18± <sup>c</sup>	18.11±1.78 <sup>a</sup>	

Concentración	Ancho de la hoja			Promedio	Largo de tallo (mm)	Ancho del tallo (mm)
	1ra hoja, mm	2da hoja, mm	3ra hoja, mm			
0	24.18±5.12 <sup>a</sup>	19.13±2.68 <sup>a</sup>	12.62±1.78 <sup>a</sup>	18.64±2.72 <sup>a</sup>	30.53±3.67 <sup>a</sup>	1.48±0.21 <sup>a</sup>
2	16.89±3.075 <sup>abc</sup>	14.51±3.53 <sup>b</sup>	11.18±2.35 <sup>ab</sup>	14.19±2.70 <sup>b</sup>	32.32±6.42 <sup>a</sup>	1.04±0.25 <sup>b</sup>
4	13.91±4.62 <sup>b</sup>	12.03±4.88 <sup>abc</sup>	8.52±2.04 <sup>ab</sup>	13.41±3.81 <sup>bc</sup>	21.81±3.01 <sup>ab</sup>	0.95±0.16 <sup>b</sup>
6	17.39±0.0 <sup>abc</sup>	13.4±0.0 <sup>b</sup>	9.44±0.0 <sup>b</sup>	11.83± <sup>abc</sup>	25.32±0.0 <sup>b</sup>	0.92±0.0 <sup>b</sup>
8	15.88±0.0 <sup>bc</sup>	7.78±0.0 <sup>bc</sup>	*	11.36± <sup>abc</sup>	22.43±0.0 <sup>ab</sup>	0.85±0.0 <sup>ab</sup>
10	*	*	*	*	*	*
+	4.86±1.64 <sup>c</sup>	5.17±0.59 <sup>c</sup>	*	4.7± <sup>c</sup>	22.98±2.32 <sup>b</sup>	0.98±0.21 <sup>ab</sup>

Cuadro 8: Efectos en plantas de *L. sativa* var orejona sometidas a 3 aplicaciones foliares de extracto metanólico de microalgas.

Concentración	número de hojas	peso fresco, g	peso seco, g	% de humedad	largo tallo, mm	largo de raíz, mm
0	12.66 ± 2.60 <sup>a</sup>	65.0 ± 5.24 <sup>ab</sup>	3 ± 0.00 <sup>a</sup>	95.59 ± 0.06 <sup>a</sup>	288.22 ± 9.16 <sup>a</sup>	150.56 ± 10.84 <sup>ab</sup>
2	11.22 ± 0.38 <sup>a</sup>	78.27 ± 3.09 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.38 <sup>a</sup>	96.26 ± 0.63 <sup>a</sup>	291.77 ± 11.71 <sup>a</sup>	163.83 ± 12.49 <sup>a</sup>
4	11.66 ± 1.33 <sup>a</sup>	72.22 ± 6.05 <sup>a</sup>	3.11 ± 0.38 <sup>a</sup>	95.7 ± 0.34 <sup>a</sup>	293.0 ± 6.11 <sup>a</sup>	170.67 ± 10.74 <sup>a</sup>
6	11 ± 1.0 <sup>a</sup>	69.28 ± 11.94 <sup>ab</sup>	2.89 ± 0.51 <sup>a</sup>	95.72 ± 1.19 <sup>a</sup>	276.11 ± 11.03 <sup>a</sup>	151.33 ± 11.85 <sup>ab</sup>
8	10.28 ± 1.08 <sup>a</sup>	65.66 ± 4.48 <sup>ab</sup>	3.33 ± 0.33 <sup>a</sup>	94.88 ± 0.87 <sup>a</sup>	286.11 ± 12.96 <sup>a</sup>	142.39 ± 13.36 <sup>ab</sup>
10	10.27 ± 3.17 <sup>a</sup>	57.89 ± 2.41 <sup>b</sup>	3.33 ± 0.88 <sup>a</sup>	94.83 ± 0.96 <sup>a</sup>	286.94 ± 9.04 <sup>a</sup>	131.39 ± 9.45 <sup>b</sup>
Control +	9.0 ± 3.12 <sup>a</sup>	55.67 ± 6.08 <sup>b</sup>	2.33 ± 1.15 <sup>a</sup>	96.32 ± 1.25 <sup>a</sup>	264.61 ± 26.43 <sup>a</sup>	128.44 ± 25.01 <sup>b</sup>

Concentración	Largo de la hoja			Ancho de la hoja		
	1ra hoja, mm	2da hoja, mm	3ra hoja, mm	1ra hoja, mm	2da hoja, mm	3ra hoja, mm
0	218 ± 10.07 <sup>a</sup>	214.88 ± 9.48 <sup>a</sup>	207.11 ± 9.1 <sup>a</sup>	113.55 ± 7.43 <sup>a</sup>	92.88 ± 9.34 <sup>a</sup>	89.44 ± 7.6 <sup>a</sup>
2	225.77 ± 12.86 <sup>a</sup>	217.66 ± 10.69 <sup>a</sup>	213.77 ± 12.86 <sup>a</sup>	102.22 ± 16.36 <sup>a</sup>	99.11 ± 16.12 <sup>a</sup>	94.77 ± 14.11 <sup>a</sup>
4	223.55 ± 5.35 <sup>a</sup>	217.77 ± 9.76 <sup>a</sup>	211.77 ± 9.34 <sup>a</sup>	102.0 ± 9.17 <sup>a</sup>	96.22 ± 6.05 <sup>a</sup>	93.55 ± 14.11 <sup>a</sup>
6	221.55 ± 12.01 <sup>a</sup>	215.33 ± 8.08 <sup>a</sup>	210.22 ± 11.36 <sup>a</sup>	67.33 ± 58.31 <sup>a</sup>	97.11 ± 5.98 <sup>a</sup>	94.88 ± 6.01 <sup>a</sup>
8	216.88 ± 14.08 <sup>a</sup>	213.22 ± 14.18 <sup>a</sup>	206.55 ± 12.5 <sup>a</sup>	99.11 ± 10.18 <sup>a</sup>	95.77 ± 8.7 <sup>a</sup>	91.77 ± 8.06 <sup>a</sup>
10	213.0 ± 10.27 <sup>a</sup>	208.89 ± 9.44 <sup>a</sup>	206.33 ± 10.17 <sup>a</sup>	99.0 ± 8.45 <sup>a</sup>	93.44 ± 8.66 <sup>a</sup>	90.33 ± 8.09 <sup>a</sup>
+	208.77 ± 30.15 <sup>a</sup>	202.0 ± 26.91 <sup>a</sup>	186.11 ± 25.14 <sup>a</sup>	98.33 ± 30.92 <sup>a</sup>	91.55 ± 26.92 <sup>a</sup>	80.66 ± 17.21 <sup>a</sup>

## 6. CONCLUSIONES

Las pruebas *in vitro* del tratamiento de aguas residuales de invernadero removieron el contenido de N total por debajo de 40 ppm, lo cual cumple lo estipulado por la NOM-001-SEMARNAT-1996 para la descarga de aguas residuales en bienes nacionales para uso agrícola, lo que permite considerar a *Cocconeis* spp., como un organismo apto para el tratamiento de aguas residuales de invernadero para la remoción de N.

El diseño del fotobioreactor propuesto permitió una producción tipo *batch* de microalgas por 3 ciclos facilitando su cosecha por su forma en "V".

La reducción de N con el fotobioreactor de panel plano fue del 80 %. Sin embargo, esta reducción no eliminó el N necesario para satisfacer el nivel máximo permitido por la NOM-001-SEMARNAT-1996.

Los extractos metanólicos de *Cocconeis* spp. presentaron un efecto alelopático sobre las semillas de *L. sativa* var. Orejona, así mismo, la aplicación de estos extractos sobre plantas de 28 d de *L. sativa* no mostraron alteraciones morfológicas.

## 7. PERSPECTIVAS.

El efecto alelopático del extracto metanólico de *Cocconeis* spp, sugiere, su estudio como herbicida natural contra maleza agrícolas, por lo cual, se realizarán pruebas de germinación con otras especies vegetales de interés agrícola.

La efectividad de las pruebas *in vitro* señala que la efectividad de la remoción depende de una buena oxigenación, por ello, la producción de microalgas en el fotobioreactor será evaluada diferentes niveles de inyección de oxígeno.

La remoción de N satisfizo la norma mexicana para descargas de aguas residuales, por lo cual, será evaluada la capacidad de remoción de P y K debido a que son los elementos que se encuentran en mayor cantidad en las soluciones nutritivas, después de N.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

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

Arora N, Patel A, Pruthi P, Mohan K. **2018**. Utilization of stagnat non-potable pond water for cultivating oleaginous mucrialga *Chlorella minutissima* for biodiesel production. *Renewable Energy*. 126: 30-38.

Arshad M, Nawaz R, Ahwaz R, Ahmad S, Qayyum M, Ali Z, Faiz F, Manzoor H. **2018**. Morpho-nutritional response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to organic easte extracts grown under hydroponic condition. *Applied Ecology and Eviromental Reserch*. 63 (3): 3637-3648.

Baldisserotto, C., Sabia, A., Ferroni, L., & Pancaldi, S. **2019**. Biological aspects and biotechnological potential of marine diatoms in relation to different light regimens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35 (2), 35-44.

Barrios N. **2004**. Evaluación del cultivo de la lechuga, *Lactuca sativa* L. bajo condiciones hidropónicas en Pachalí, San juan Sacatépec, Guatemala (Tesis doctoral). Universidad de San Carlos de Guatemala. 16-18

Battacharyya D, Zamani M, Rathor P, Prithviraj B. **2015**. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 196: 39-48.

Bello A, Tawabini B, Khalil J. **2018**. Phytoremediation of cadmium-, lead- and nickel-contaminated water by *Phragmites australis* in hydroponic systems. *Ecological Engineering*. 120; 126-133.

Beltrano, J, Gimenez D. **2015**. Introducción al cultivo hidropónico. *Eduulp*. 1ra edición. Argentina. 11-15.

Chia S, Ong H, Wayne K, Loke P, Phang S, Ling T, Nagarajan D, Lee D, Chang J. **2018**. Sustainable approaches for algae utilization in bioenergy production. *Renewable Energy*. 129: 838-852.

Chow Y, Lee K, Zakaria, Foo Y. **2017**. New Emerging Hydroponic System. *Sic*, 2: 1–4.

Cointet E, Wielgosz-Collin G, Méléder V, Gonçalves O. **2019**. Lipids in benthic diatoms: A new suitable screening procedure. *Algal Research*, 39: 1-14.

De Vree J, Bosma R, Janssen M, Barbosa M, Wijffels R. **2015**. Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology Biofuels*. 8: 215-227.

Dhagalkar V, Pereira N. **2005**. Seaweed: promising plant of the millennium V. *Science and Culture*. 71 (2): 60-66.

Ercan E, Yaldirim P, Hacisa M, Metin C, Bahrioglu E. **2018**. Algae uses for organic life. *New Knowledge*. 7 (2): 141-148.

FAOSTAT. Organización mundial de las naciones unidas para la alimentacion y la agriculutra. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>; consultado el 14 octubre del 2020

Guiry M. Guiry G. **2020**. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; consultado el 14 October 2020.

Haniffa H, Ranjith D, Mohammad M, Choudhary M. **2019**. Allelopathic activity of some Sri Lankan seaweed extracts and the isolation of a new brominated nonaromatic isolarene type sesquiterpene from red alga *Laurencia heteroclada harvey* Allelopathic activity of some Sri Lankan seaweed extracts and the isolation of a new brominated nonaromatic isolarene type sesquiterpene from red alga *Laurencia heteroclada harvey*. *Natural Product Research*. 33: 1-8.

Ji L, Song W, Wei D, Jiang D, Cai L, Wang Y, Guo J. **2019**. Modified mussel shell powder for microalgae immobilization to remove N and P from eutrophic wastewater. *Bioresource Technology*. 284 (03): 36-42.

Kaewkannetra P, Enmak P, Chiu T. **2012**. The effect of CO<sub>2</sub> and Salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for Biodiesel Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17: 591-597.

Kauffman III, Gordon, Kneivel P, Watschke T. **2007**. Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass. *Crop Science*. 47 (1): 261–267.

Kazbar A, Cogne G, Urbain B, Marec H, Le-Gouic B, Tallec J, Takache H, Ismail A. Pruvost J. **2019**. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research*, 39: 1-11.

Khadim S, Singh P, Sinng A, Tiwari A, Mohanta A, Asthana R. **2018**. Mass cultivation of *Dunaliella salina* in a flat plate photobioreactor and its effective harvesting. *Bioresource Technology*. 270: 20-29.

Khan F, Kurklu A, Ghafoor A, Ali Q, Umair M. **2018**. A review on hydroponic greenhouse cultivation for sustainable agriculture. *International Journal of Agriculture, Environment and food sciences*. 2 (2): 56-66.

Kmar M, Zribi I, Ullah J, Haouala R. **2019**. *Scientia Horticulturae* The mode of action of allelochemicals aqueous leaf extracts of some Cupressaceae species on lettuce. *Scientia Horticulturae*, 252, 29–37.

Kristková E, Dolezalová I. Lebeda A, Vinter V, Novotna A. **2008**. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Horticulture Science*. 35 (3): 113-129.

Kumar K, Mishra S, Shrivastav A, Park M, Yang J. **2015** Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 52: 875-885.

Kumar K, Dasgupta C, Nayak B, Lindblad P, Das D. **2011**. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresources Technology*. 102:4945–53

Kurepin L, Zaman M, Pharis R. **2013**. Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. *Journal of Science Food and Agriculture*. 94: 1715-1722.

Lee J, Rahman A, Behrens J, Brennan C, Ham B, Kim H, Nho C, Yun S, Azam H, Kwon M. **2018**. Nutrient removal from hydroponic wastewater by a microbial consortium and a culture of *paracercomonas saepenatans*. *New Biotechnology*. 41:15-24.

Mohsen A, Salama A, El-saadony F. **2016**. The Effect of Foliar Spray with Cyanobacterial Extracts on Growth, Yield and Quality of Lettuce Plants (*Lactuca sativa* L.). *Middle East Journal of Agriculture Research*. 5 (1): 90-96.

Mola I, Di Cozzolino E, Ottaiano L, Giordano M. **2019**. Effect of Vegetal and Seaweed Extract-Based Biostimulants on Agronomical and Leaf Quality Traits of Plastic Tunnel-Grown Baby Lettuce under Four Regimes of Nitrogen Fertilization. *Agronomy*. 9 (10): 571-583

Moreno A, Aguilar J, Luévano A. **2011**. Características de la agricultura protegida y su entorno en México. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 5 (29): 763-774.

Moreno-Garcia L, Gariépy Y, Bourdeau N, Barnabé S, Raghavan V. **2019**. Optimization of the proportions of four wastewaters in a blend for the cultivation of microalgae using a mixture design. *Bioresource Technology*, 283: 168–173.

Moreno-Garcia L, Adjallé K, Barnabé S, Raghavan G. **2017**. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews Journal*. 76, 493-506.

Mujtaba G, Rizwan M, Lee K. **2015**. Simultaneous removal of inorganic nutrients and organic carbon by symbiotic Simultaneous Removal of Inorganic Nutrients and Organic Carbon by Symbiotic Co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 20: 1114-1122

Leflaive J, Ten-hage L. **2007**. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*, 52, 199–214.

Li Q, Li X, Tang B, Gu M. **2018**. Growth Responses and root characteristics of lettuce grown in aeroponics, hydroponics and substrate culture. *Horticulturae*. 4: 2-9.

Liu, T., Wang, J., Hu, Q., Cheng, P., Ji, B., Liu, J., Chen Y, Zhang W, Chen X, Chen L, Gao L, Ji C, Wang H. **2013**. Attached cultivation technology of microalgae for efficient biomass feedstock production. *Bioresource Technology*, 127, 216–222.

Lucini L, Roupheal Y, Cardarelli M, Canaguier R, Kumar P, Colla G. **2015**. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae*, 182: 124-133.

Needham J, Needham P. **1987**. Los seres vivos de las aguas dulces guía para el estudio. Reverte. España.1978.

Nonomura T, Matsuda Y, Bingo M, Onishi M, Onishi M, Mtsida K, Harada S, Toyoda H. **2001**. Algicidal efecto of 3-(3-indolyl) butanoic acid, a control agent of the bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum*. *Crop protection*, 20: 935-939.

Puglisi I, Bella E, La Rovetto E, Roberta A, Piero L. **2020**. Biostimulant Effect and Biochemical Response in Lettuce Seedlings Treated with A *Scenedesmus quadricauda* Extract. *Plants*. 9 (1): 123-132.

Rathore S, Chaudhary D, Boricha G, Ghosh A, Bratt B, Zodape S, Patolia J. **2009**. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South Africa Journal of Botany*. 75: 351-355.

Raven J, Giordano M. **2014**. Algae. *Current Biology*. 24 (13):590-595.

Resh H. **2013**. A Definitive Guidebook for the Advanced Home Gardener A Definitive Guidebook for the Advanced Home Gardener (7 ma). Estados Unidos de América: CRC Press.1-2.

Sabir N, Singh B. **2012**. Protected cultivation of vegetable in global area: A review. *Indian Journal of Agricultura Sciences*. 83 (2):123-135

Sasikala M, Indumathi E, Radhika S, Sasireka R. **2016**. Effect of seaweed extract (*Sargassum tenerrimum*) on seed germination and growth of tomato plant (*Solanum lycopersicum*). *International Journal of ChemTech Research*. 9(9), 285–293.

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). **2017**. Superficie Agrícola Protegida. Consultado el 02-10-2019. Disponible: [http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/superficie\\_agricola\\_protegida.aspx](http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/superficie_agricola_protegida.aspx).

Selvam G, Kathiresan S. **2014**. Influence of seaweed extract as an organic fertilizer on the growth and yield of *A rachis hypogea* L. and their elemental composition using SEM – Energy Dispersive Spectroscopic analysis. *Asian Pacific Journal of Reproduction Journal*. 3 (1): 14–19.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Atlas Agroalimentario 2017. Disponible: <http://online.pubhtml5.com/clsi/ibhs/#p=11>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). **2018**. *Lactuca sativa* L: tipos y variedades que se producen en México. Consultado el 06-10-2019. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/articulos/lactuca-sativa-l-tipos-y-variedades-que-se-producen-en-mexico?idiom=es>

Shanab S, Mostafa S, Shalaby A, Mahmoud I. **2012**. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*. 2 (8), 608–615.

Silva J, Silva V, Miler T, Fernandez W, Pereira J. **2018**. Production of lettuce with brackish water in NFT hydroponic system. *Semina: ciencias Agrarias*. 39 (3): 947-961.

Singh R, Sharma S. **2012**. Development of suitable photobioreactor for algae production- A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16: 2347-2353.

Sinha E, Michalak A, Calvin K, Lawrence P. **2019**. Societal decision about climate mitigation will have dramatic impacts on eutrophication in the 21<sup>st</sup> century. *Nature Communications*. 10,

Souza O, Agustini R, Romero G, Rueda P, Galati C. **2020**. Potencial alelopático do extrato aquoso de tubérculos de tiririca no crescimento e desenvolvimento de alface Allelopathic potential aqueous extract of tubers of tiririca in the growth and development of lettuce. *Scientific Electronic Archives*. 13(4), 65–70.

Stefano M, Romero O, Totti C. A. **2008**. A comparative study of *Cocconeis scutellum* Ehrenberg and its varieties (Bacillariophyta). *Botanica Marina*. 51 (6): 506-536.

Sublett W, Barickman C, Sams C. **2018**. The effect of environment and nutrients on hydroponic lettuce yield, quality, and phytonutrients. *Horticulturae*. 4: 1-48.

Ozkan A, Rorrer G. **2017**. Effects of light intensity on the selectivity of lipid and chitin nanofiber production during photobioreactor cultivation of the marine diatom *Cyclotella* sp. *Algal Research*. 25: 216-227.

Qi F, Pei H, Ma G, Zhang S, Mu R. **2016**. Improving productivity and quality of biodiesel from *Chlorella vulgaris* SDEC-3M through customized process designs. *Energy Conversion and Management*, 129, 100–107.

Vijayanand N, Sivasangari S, Rathinavel S. **2014**. Potential of liquid extracts of *Sargassum wightii* on growth, biochemical and yield parameters of cluster bean plant. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 3 (2): 150-155.

Wu Q, Li S, Peng S, Zhao H. **2016**. Microbial mechanisms of using enhanced ecological floating beds for eutrophic water improvement. *Bioresource Technology*. 211. 451-456.

Zaman M, Kurepin L, Catto W, Pharis R. Eval. **2015**. Evaluating the use of plant hormones and biostimulators in forage pastures to enhance shoot dry biomass production by perennial ryegrass. *Journal Science Food and Agriculture*. 96: 715-726.

Zhang L, Zhang B, Zhu X, Cha, Eang H.g H, Ou S. **2018**. Role of bioreactors in microbial biomass and energy. Green Energy and technology. 1ra edición. *Springer*: 39-78.

Zeghada F, Benamar H, Bennaceur M, Marouf A. **2019**. Allelopathic effect of *Tetraclinis articulata* (vahl) mast (from Algeria) on germination and growth of *Lactuca sativa* L. *Bioscience Research*. 16(1):493-499

Dirección General de Bibliotecas UAQ