



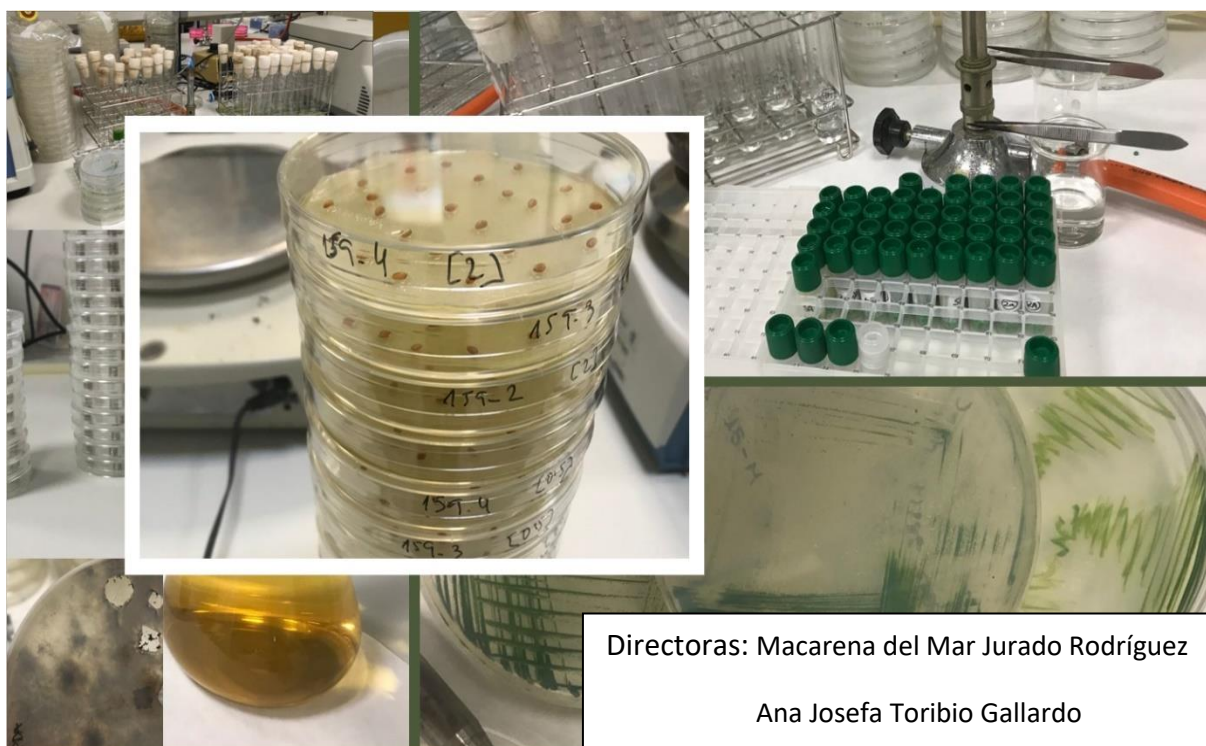
Departamento de Biología y Geología  
Área de Microbiología  
Facultad de Ciencias Experimentales  
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



# CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS AISLADAS DE SUELOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO

Trabajo Fin de Estudios, junio de 2022

Autora: AINHOA VALIDO PEÑA  
Grado en Biotecnología



Directoras: Macarena del Mar Jurado Rodríguez  
Ana Josefa Toribio Gallardo

## AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo me ha permitido conocer aspectos desconocidos para mí en el área de estudio que engloba a las cianobacterias y microalgas. La metodología experimental me ha ayudado a desenvolverme y manejar los problemas que han surgido durante la realización del proyecto en un laboratorio que, bajo mi punto de vista, es fundamental en este tipo de carreras. Además, a parte de la información aprendida con este trabajo, el Grado en Biotecnología me ha permitido aprender amplitud de conocimientos de todo tipo de áreas existentes, por lo que me siento muy contenta de poder haber finalizado este grado y que haya sido posible cursarlo en la Universidad de Almería.

Primero quisiera agradecer a Joaquín Moreno Casco, por haber sido tan excelente profesor. Me fascina la capacidad que tenía para involucrar e involucrarse a nivel educativo y personal con todos y cada uno de los alumnos que han pasado por este grado, por creer siempre en nosotros, y querer transmitirnos el máximo de conocimiento que él tenía. Desde el primer día, en Microbiología, procuró enseñarnos lo que él amaba, y no hacía falta que lo expresase con palabras, ya que solo con la pasión y el empeño que ponía en sus clases se notaba. Gracias Joaquín, allí donde estés, por haber sido el referente de tantos de nosotros.

A Francisca Suárez, por su orientación y dedicación en el Área de Microbiología. He disfrutado muchísimo y doy las gracias de haber tenido una profesora como ella, me ha enseñado bastante y es una persona que me hace sentir bien, ya que en sus clases siempre me ha transmitido seguridad y alegría. Su forma de enseñar asignaturas como Patología Vegetal me ha hecho abrir los ojos ante la Biotecnología verde, y estoy muy agradecida.

A mi cotutora Ana Toribio, por su ayuda en los diferentes ensayos que han permitido la finalización de este trabajo y por la paciencia que ha tenido conmigo. Estoy orgullosa de haberte tenido como cotutora y, más aún, por saber que has finalizado tu doctorado.

A mi tutora Macarena del Mar, por ser el principal soporte y tener la confianza en mí al escogerme para este trabajo fin de grado. Este trabajo me ha permitido romper un poco la barrera de la relación estudiante-alumno, ya que por situaciones personales me ha llevado más tiempo del esperado terminarlo, pero Macarena siempre me ha comprendido y se ha preocupado por mí. Eres una persona maravillosa, transmites felicidad y alegría allí por donde pasas, eres una persona que brilla, admiro y siempre admiraré tu capacidad para enseñar, aprender y conseguir lo que te propongas. De todo corazón Macarena, gracias por ser como eres, para mí te has convertido en un referente y en una persona muy especial.

Tengo que hacer una mención especial a todo el resto de los integrantes al Área de Microbiología, porque de una forma u otra siempre han intentado brindar sus enseñanzas y experiencias al máximo a cada uno de nosotros, porque sois fantásticos y me habéis hecho sentir como en casa. Sobre todo, a María José López, actual responsable del Grupo de Investigación, por brindar la oportunidad a los estudiantes de realizar este tipo de trabajos en el laboratorio y por mantener en pie al grupo, sin ti no sería posible.

No obstante, en este agradecimiento no quisiera dejar atrás a ningún área que haya impartido clases del Grado en Biotecnología en la universidad, porque todos ellos han aportado su granito de arena

para hacernos llegar al final y nos han aumentado el conocimiento en muchísimos campos. Además, gracias al grado me he llevado compañeros que se han convertido poco a poco en amigos y familia.

A nivel personal, quisiera agradecer a todos mis amigos que han estado a mi lado para lo bueno y para lo malo, no puedo estar más orgullosa de vosotros. A Rosa, por haber pasado juntas toda la carrera, por habernos convertido en familia más que en amigas, eres una persona luchadora y estoy muy orgullosa de ti por todo lo que estás y por todo lo que vas a conseguir a pesar de que las situaciones se te pongan en contra. A Jonathan, María, Isa, María Luisa, Ana y Patricia, por haber estado siempre ahí, gracias a todos he comprendido lo que es ser un verdadero amigo y sin vosotros no podría haber llevado tan bien algunas etapas en las que habéis estado conmigo sin esperar nada a cambio. Gracias, de todo corazón. A José Miguel, mi pareja, por haber recorrido conmigo tantos años y por ser mi principal hombro donde llorar, mi pilar, me has aguantado muchísimo y siempre me has hecho brillar, estoy muy orgullosa de ti.

En último lugar, pero no menos importante, agradecer a mi familia, por apoyarme siempre y porque sois las personas más importantes en mi vida. No sabéis lo orgullosa que me siento de tener una familia como vosotros. A mi madre, por cuidarme y aguantar tanto conmigo, a pesar de todo estás ahí para lo que haga falta. A mi padre, por la paciencia que ha tenido conmigo, por enseñarme valores tan bonitos junto mi madre y por sacar fuerzas para tirar hacia delante de donde no las había, os quiero muchísimo. A mi tate, mi tío Christian, porque he seguido sus pasos y por ser mi referente. A mis abuelos, por creer siempre en mí, por anteponerme a todo y por ser como sois, ojalá fueseis eternos.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. Importancia de los microorganismos fotosintéticos en el mantenimiento de la salud y la diversidad de los ecosistemas .....	3
1.2. Microorganismos fototrofos como fuentes de compuestos de interés económico: sustancias bioactivas.....	5
1.3. Cianobacterias y microalgas como agentes de control biológico frente a enfermedades fúngicas: <i>Botrytis cinerea</i> .....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1. Objetivo general .....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	14
3.1. Diseño experimental .....	14
3.2. Medios de cultivo .....	15
3.3. Colección de cianobacterias.....	17
3.4. Hongo fitopatógeno .....	17
3.5. Ensayo de viabilidad .....	18
3.6. Determinación cualitativa de la actividad quitinasa .....	18
3.7. Bioensayos de germinación en semillas de berro (Test de Zucconi).....	19
3.8. Bioensayo de antagonismo frente a <i>Botrytis cinerea</i> mediante el protocolo de “cultivo dual”	20
3.9. Ensayos <i>in vivo</i> .....	21
3.9.1. Efecto biopesticida frente al desarrollo de los síntomas provocados por <i>Botrytis cinerea</i> en plántulas de pepino.....	22
3.9.2. Efecto fitoestimulante sobre el crecimiento en plántulas de pepino .....	22
3.10. Análisis estadístico .....	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	22
4.1. Viabilidad de la colección de cianobacterias.....	23
4.2. Evaluación de la producción de sustancias de interés: quitinasa .....	25
4.3. Efecto fitoestimulante <i>in vitro</i> .....	27
4.4. Efecto antagonista <i>in vitro</i> frente a la enfermedad del moho gris .....	30
4.5. Evaluación del ensayo <i>in vivo</i> .....	33

4.5.1. Efecto biopesticida <i>in planta</i> por la cianobacteria seleccionada sobre <i>Botrytis cinerea</i> ....	33
4.5.2. Efecto fitoestimulante <i>in planta</i> por la cianobacteria seleccionada.....	35
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>37</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>38</b>

## RESUMEN

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos con una amplia distribución en diferentes ambientes, ya que poseen mecanismos celulares que las convierten en microorganismos muy versátiles y adaptables. Su presencia en suelos determina la composición y fertilidad de éstos, ya que se asocian con la liberación de ciertas sustancias que mejoran las características físico-químicas, incrementan la biodisponibilidad y mineralización de nutrientes, aumentan el desarrollo y crecimiento vegetal y, además, desempeñan un papel fundamental en la protección de los cultivos. De igual manera, son conocidas por producir una gran variedad de compuestos bioactivos de gran utilidad en distintos campos de la biotecnología, incrementando el interés por el aislamiento e identificación de estas especies.

Bajo esta perspectiva, el objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado fue determinar la capacidad de una colección de 10 cianobacterias aisladas de suelos de origen antropogénico, para producir compuestos de interés relacionados con la inhibición de patógenos vegetales y la estimulación del crecimiento aéreo y radicular de plántulas de pepino. Siguiendo las consideraciones precedentes, se determinó el potencial biopesticida *in vitro* de la colección de cianobacterias, mediante técnicas de enfrentamiento dual para controlar el crecimiento del agente fitopatógeno fúngico *Botrytis cinerea*. Así como por su capacidad para producir actividad quitinasa, descrita por su importancia en el control de fitopatógenos. Adicionalmente, se evaluó el carácter fitoestimulante o fitotóxico de dichas cepas sobre la germinación de semillas de berro. Para finalizar, se seleccionó la cepa que mostró las mejores capacidades en los ensayos *in vitro* para su aplicación posterior *in vivo* con objeto de evaluar su potencial como agente de control biológico en plántulas de pepino.

Los resultados obtenidos mostraron, en cuanto al efecto biopesticida, que las cepas de cianobacterias pueden actuar inhibiendo, en menor o mayor grado, el crecimiento de hongos fitopatógenos como *B. cinerea*, efecto potenciado en aquellas cepas de cianobacterias de la colección donde fue detectada la actividad quitinasa. En cuanto al efecto fitoestimulante de los extractos de cianobacterias, no mostraron un carácter fitotóxico importante sobre la germinación de las semillas de berro, incluso, algunas de ellas resultaron tener efectos fitoestimulantes. En cuanto al ensayo *in vivo*, se comprobó que la aplicación de la cianobacteria 39C, provocó efectos beneficiosos en el desarrollo aéreo y radicular de plántulas de pepino, además de paliar los daños provocados por *Botrytis cinerea*. En definitiva, se puede concluir que las cianobacterias aisladas de sustratos antropogénicos son una fuente potencial de nuevas sustancias bioactivas de carácter biopesticida y fitoestimulante, lo que justifica la relevancia de tales microorganismos desde un punto de vista agro-sanitario.

**PALABRAS CLAVE:** Cianobacterias, Quitinasa, Control biológico, Fitoestimulación

## ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic organisms with a wide distribution in different environments, since they possess cellular mechanisms that make them very versatile and adaptable microorganisms. Their presence in soils determines their composition and fertility by releasing certain substances that improve physicochemical characteristics, increase nutrient bioavailability and mineralization, enhance plant growth and development, and play a fundamental role in crop protection. Likewise, they are known to produce a great variety of bioactive compounds of great utility in different fields of biotechnology, increasing the interest in the isolation and identification of these species.

Under this perspective, the main objective of this Final Degree Project was to determine the capability of a collection of 10 cyanobacteria isolated from anthropogenic soils to produce compounds of interest related to the inhibition of plant pathogens and the stimulation of aerial and root growth of cucumber seedlings. Following the preceding considerations, the *in vitro* biopesticidal potential of the cyanobacteria collection was determined by dual confrontation techniques to control the growth of the phytopathogenic fungal, *Botrytis cinerea*. As well as for their ability to produce chitinase activity, described for its importance in the control of phytopathogens. Additionally, the phytostimulant or phytotoxic character of these strains on the germination of cress seeds was evaluated. Finally, the strain that showed the best *in vitro* assays was selected in order to subsequently being applied *in vivo* to evaluate its capacity as biological control agent of cucumber seedlings.

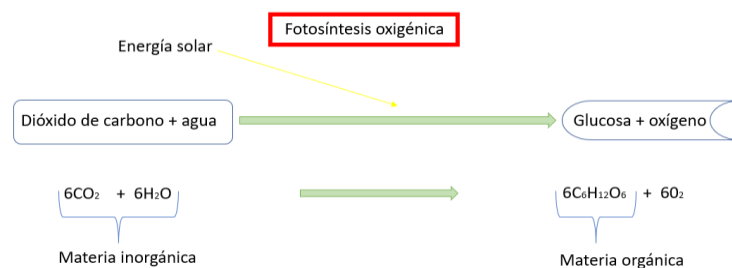
The results obtained showed, regarding the biopesticidal effect, that cyanobacterial strains can act by inhibiting, to a lesser or greater degree, the growth of phytopathogenic fungi such as *B. cinerea*, an effect enhanced in those cyanobacterial strains of the collection where chitinase activity was detected. As for the phytostimulant effect of the cyanobacterial extracts, they did not show a significant phytotoxic character on the germination of cress seeds, and some of them even proved to have phytostimulant effects. As for the *in vivo* test, it was found that the application of cyanobacteria 39C caused beneficial effects on the aerial and root development of cucumber seedlings, in addition to mitigating the damage caused by *Botrytis cinerea*. In short, it can be concluded that cyanobacteria isolated from anthropogenic substrates are a potential source of new bioactive substances of biopesticidal and phytostimulant character, which justifies the relevance of such microorganisms from an agro-sanitary point of view.

**KEYWORDS:** Cyanobacteria, Chitinases, Biological control, Phytostimulation.

# 1.INTRODUCCIÓN

## 1.1. Importancia de los microorganismos fotosintéticos en el mantenimiento de la salud y la diversidad de los ecosistemas

El proceso metabólico por el cual la energía luminosa se transforma en energía química, utilizada para la síntesis de compuestos orgánicos a partir de materia inorgánica, es conocido como fotosíntesis. Durante la sucesión de reacciones bioquímicas que ocurren intervienen distintas biomoléculas esenciales tales como el agua y el dióxido de carbono, que constituyen los elementos de partida, y como productos finales se obtienen moléculas de naturaleza orgánica (azúcares) junto con la producción de oxígeno (Figura 1). La fotosíntesis oxigénica es uno de los metabolismos más importantes que han evolucionado en la Tierra y que ha permitido la aparición de formas de vida complejas (Fischer et al., 2016). Entre los organismos fotosintéticos destacan plantas, algas y algunos tipos de bacterias.



**FIGURA 1-FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA**

Como consecuencias del desarrollo de la fotosíntesis oxigénica, varían las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono presentes en el aire. Este acontecimiento indica que la fotosíntesis es un proceso que afecta directa y continuamente a la composición de la atmósfera en la Tierra, sin embargo, la generación de este fenómeno podría ser previo. La "Gran Oxigenación" representó el origen de la fotosíntesis oxigénica y la aparición y diversificación de las vías metabólicas y biosintéticas que requieren oxígeno (Holland, 2006; Raymond y Segrè, 2006). Así, la atmósfera existente se pudo formar por el equilibrio de seres oxidantes y reductores en la superficie terrestre (Kaufman et al., 2007) donde los principales productores primarios en la biosfera, en esta transición, fueron las cianobacterias, a través de la inducción de importantes cambios en los ciclos biogeoquímicos de varios elementos básicos de la vida como carbono, oxígeno y azufre (Klatt, 2015; Soo et al., 2017). Este hecho permitió el impulso de los organismos superiores debido al desarrollo del metabolismo aerobio presente en los seres vivos y dio lugar a la vida multicelular compleja, así como permitió estimular la biodiversidad (Soo et al., 2017). Los microorganismos fotosintéticos, por tanto, fueron claves en el proceso de desarrollo de la vida y los saltos evolutivos tal y como se conocen hoy día.

Una de las cosas que hace tan interesantes a las cianobacterias, más allá de su capacidad para realizar la fotosíntesis oxigénica, es su ubicuidad, ya que se encuentran en muchos hábitats distintos, desde las tierras áridas hasta los glaciares y el océano abierto (Castenholz et al., 2001; Blank y Sánchez-Baracaldo, 2010). Las microalgas y las cianobacterias constituyen la base de la cadena alimentaria, especialmente en ambientes acuáticos, ya que proporcionan compuestos orgánicos reducidos y sirven



de nutrientes para otros seres vivos. Además, son responsables de aproximadamente el 50% de la producción primaria de oxígeno. Las cianobacterias, por su parte, juegan además un papel importante en la fijación global del nitrógeno atmosférico (Luna, 2007). Son conocidas por formar asociaciones simbióticas con varios tipos de organismos como plantas, hongos, esponjas, etc. Estos seres procariotas no solo tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, sino que actúan sobre la materia orgánica, transformándola y ayudando, por tanto, en la descomposición de residuos orgánicos, así como sobre aquellos que puedan resultar tóxicos o contaminantes para los ambientes; y contribuyen a la mejora del crecimiento, la nutrición y protección vegetal, produciendo sustancias bioactivas de interés y debido a su implicación en el ciclo de los nutrientes (Singh et al., 2016). En los ecosistemas terrestres, las cianobacterias desempeñan papeles importantes, ya que, gracias a su metabolismo, pueden ser utilizadas para incrementar el nitrógeno disponible para los seres presentes y, junto a las microalgas, proporcionan nutrientes esenciales para las plantas, además de mejorar las propiedades físicoquímicas del propio suelo (Gonçalves, 2021)

A pesar de la ubicuidad de las microalgas, estas se encuentran comúnmente en ambientes acuáticos y forman parte del fitoplancton, generando en torno al 90% de la producción primaria en océanos. En relación con los ecosistemas, pueden ser indicadoras de la salud de la hidrosfera, ya que se ha comprobado que son sensibles a la alteración en los parámetros físicoquímicos del hábitat como cambios frente al incremento de la temperatura superficial de los sistemas acuáticos o el aumento de polución, dando lugar a una agrupación de color característica conocida como “floración de fitoplancton” o *bloom* de cianobacterias (Lubiana, 2014) (Figura 2). Este incremento en la biomasa acumulada en el ecosistema puede tener también efectos negativos debido a la generación de situaciones anoxigénicas para los demás organismos e incluso pueden resultar tóxicas debido a la secreción de cianotoxinas (neurotoxinas, hepatotoxinas...) que causan problemas de salud grave tanto para los organismos acuáticos como para las personas (Lucena, 2008).

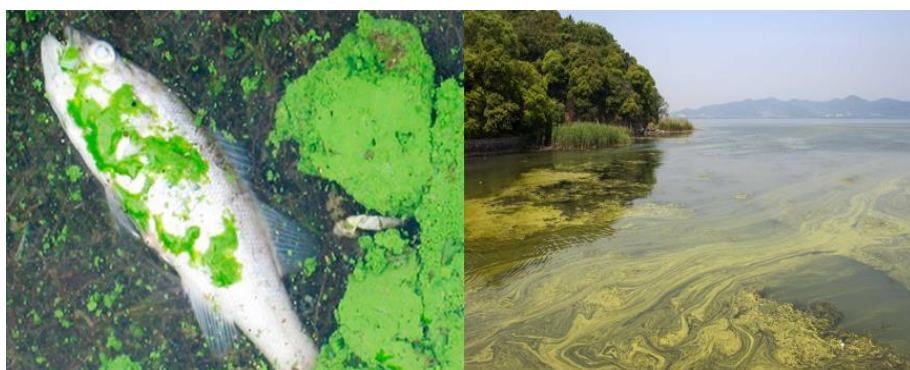
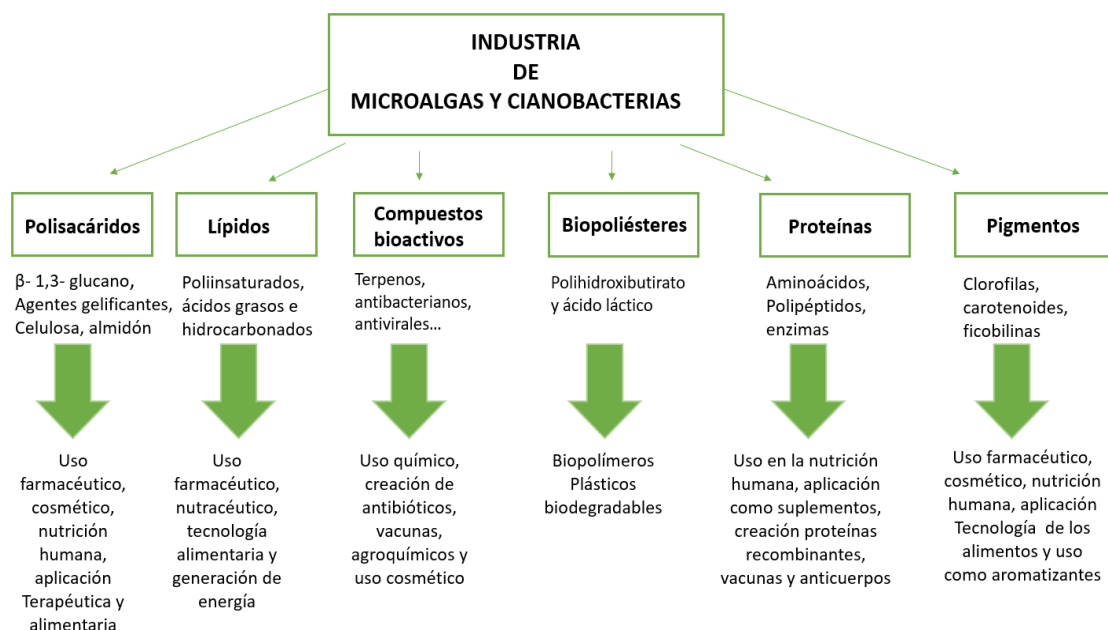


FIGURA 2- FENÓMENO DE LA FLORACIÓN DE CIANOBACTERIAS. RECUPERADO DE [HTTPS://WWW.LGSONIC.COM/ES/CIANOBACTERIAS/](https://www.lgsonic.com/es/cianobacterias/)

## 1.2. Microorganismos fototrofos como fuentes de compuestos de interés económico: sustancias bioactivas

El uso de microorganismos en distintos procesos industriales es un sector en continuo desarrollo, mediante el cual, se obtienen una gran variedad de compuestos de interés aplicables en diferentes áreas. Esta tecnología multidisciplinar se conoce como Microbiología industrial o Biotecnología Microbiana. A lo largo de los años en esta disciplina se ha usado una amplia gama de microorganismos que han demostrado ser una fuente importante de productos de elevado valor económico (Morales et al., 2013). Actualmente, ha aumentado el interés por la aplicación de microalgas y cianobacterias en procesos industriales, dando lugar a la Biotecnología de Microalgas. El uso inicial de estos microorganismos en la industria (Figura 3) estaba dirigido hacia la producción de biomasa requerida para la obtención de energías renovables (biocombustibles), así como para su utilización en la alimentación animal (acuicultura) y en la alimentación humana (como suplementos nutricionales o colorantes) (Priyadarshani y Rath, 2012; Anahas y Muralitharan, 2018).



**FIGURA 3-BATERÍA DE POTENCIALES PRODUCTOS OBTENIDOS DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS (MODIFICADO DE MATOS, 2017)**

Justamente, el conocimiento sobre la capacidad de estos microorganismos para sintetizar una extensa lista de productos despertó su interés en campos tan diversos como la industria farmacéutica, biomedicina, cosmética, el tratamiento de aguas residuales y la agricultura, entre otros (de Moraes et al., 2015; Luna, 2007). Estos compuestos pueden ser obtenidos del metabolismo primario (proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas...) o a partir del metabolismo secundario (generalmente compuestos con actividad antifúngica, antiviral, etc.). A continuación, a modo de ejemplo, se recogen varios de los productos más relevantes (Tabla 1) con una posición firme en el mercado alimentario (Borowitzka, 2013):

**TABLA 1- PRODUCTOS INDUSTRIA ALIMENTARIA MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS (ADAPTADO DE BOROWITZKA, 2013)**

<b>Productos</b>		<b>Aplicaciones</b>	<b>Microorganismo</b>
<b>Pigmentos</b>	B-caroteno	Utilizado como aditivo alimentario por su capacidad antioxidante y por ser precursor de la vitamina A	<i>Dunaliella salina</i>
	Astaxantina	Aditivo alimentario y cultivo de salmón	<i>Haematococcus pluvialis</i>
	Luteína	Tradicionalmente usado en la alimentación de aves de corral	<i>Chlorella zofingiensis</i>
	Zeaxantina	Aditivo alimentario y alimentación animal	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
<b>Lípidos, principalmente ácidos grasos insaturados</b>	Ácido docosahexanóico (DHA)	Utilizados como suplementos nutricionales gracias a sus diversas propiedades beneficiosas para la salud, así como en acuicultura	<i>Cryptocodinium cohnii</i>
	Ácido gammalinoleico (GLA)		<i>Artrospira</i>

Respecto a la industria dedicada a la producción de biocombustibles, prefiere usar microalgas y cianobacterias para este fin en lugar de otras materias primas, ya que son ideales por mostrar una alta tasa de crecimiento (cantidades elevadas de biomasa con bajo coste) y alta tasa fotosintética, generando una elevada producción de lípidos (John et al., 2011; Matos, 2017). De hecho, en la actualidad se ha conseguido obtener altos rendimientos en la producción de bioetanol, biodiésel, biohidrógeno y biogás mediante la producción en masa de varias especies, algunas de las cuales se muestran en la Tabla 2.

**TABLA 2-EJEMPLOS DE MICROALGAS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOENERGÍA**

<b>Bioenergía</b>	<b>Ejemplos microalgas y/o cianobacterias</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bioetanol</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	John et al., 2011
<i>Biodiésel</i>	<i>Nannochloropsis sp</i>	Scott et al., 2010
<i>Biohidrógeno</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Kruse y Hankamer, 2010
<i>Biogás</i>	<i>Dunaliella salina</i>	Mussnug et al., 2010

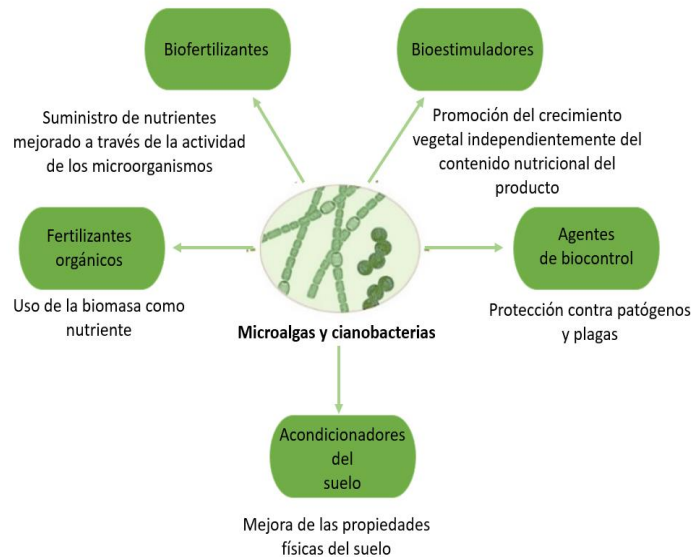
Teniendo en cuenta estas consideraciones, cabe destacar que la aplicación de estos microorganismos se ajusta al modelo de producción y consumo conocido como economía circular, donde los residuos pueden utilizarse como recursos para reingresar al sistema productivo, sobre todo por su carácter multifuncional y versátil. Del mismo modo, dentro del concepto de economía circular, cabe mencionar el uso de estos microorganismos en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas (Lian et al., 2018). Principalmente, las microalgas y cianobacterias tienen la capacidad de captar metales pesados gracias a su capacidad quelante y a la tolerancia a altas concentraciones de estos metales tóxicos (biosorción) en espacios celulares a través de varias estrategias bioquímicas (Lozano et al., 2014). Además, se ha estudiado su aplicación para mitigar el problema existente en el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico a través de la biofijación, suponiendo una reducción en el “efecto invernadero” (Herrera y Fernández, 2017).

La industria farmacéutica y biomédica están constituyendo uno de los ámbitos más prometedores en el uso de microalgas y cianobacterias por la diversidad de compuestos bioactivos generados con buenos resultados (Lozano et al., 2014). En este contexto, se han descrito actividades antimicrobianas principalmente por ácidos grasos de cadena larga, como el ácido linolénico de *Spirulina*, y actividades antivirales contra el Herpes simplex asociadas a la producción de polisacáridos por *Porphyridium* (Huheihel et al., 2002). De la misma forma, se han encontrado compuestos bioactivos con capacidad antitumoral, en su mayoría carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados, procedentes de microorganismos como *Chlorella vulgaris* y *Spirulina* que causan efectos analgésicos y antiinflamatorios (por ejemplo, extractos etanólicos de *Dunaliella salina*) (Lozano et al., 2014).

Finalmente, conviene subrayar que en la agricultura el uso de estas especies de microorganismos ha sido estudiado a lo largo de los últimos años, debido al incremento en la demanda mundial de alimentos y a los cambios ambientales acontecidos, en búsqueda de fuentes alternativas más respetuosas (Álvarez et al., 2021). Por tanto, dada la importancia de trabajar con sistemas agrícolas sostenibles, se está priorizando y promoviendo el uso de estos microorganismos, con el objetivo de mejorar el rendimiento y calidad del cultivo, con una menor demanda de recursos e impactos sobre el medio ambiente. Teniendo en cuenta el efecto beneficioso por el uso de estos microorganismos a nivel de planta, suelo y ecosistemas, a continuación, se describen algunas de las ventajas más relevantes descritas en bibliografía (Renuka et al., 2018; Álvarez et al., 2021) (Figura 4):

- A nivel de suelo: pueden mejorar las propiedades físicas del suelo como la retención de agua, facilitando así el crecimiento de las plantas. Además, gracias a su capacidad para fijar nitrógeno, pueden ser utilizadas como biofertilizantes, implicando un descenso en el uso de fertilizantes químicos. Por otro lado, su inoculación en suelos aumenta la cantidad de materia orgánica presente y promueve la mineralización y movilización de los nutrientes existentes (biomineralización). En resumen, estas características guían hacia un incremento en la calidad y fertilidad del suelo.
- A nivel de ecosistema y planta: en primer lugar, hay que destacar la implicación de estos microorganismos en los ciclos de los nutrientes, favoreciendo la solubilización de micro y macronutrientes en el suelo, incrementando así su biodisponibilidad. Por otro lado, cabe destacar que las plantas influyen en las comunidades microbianas de la rizosfera segregando diversos metabolitos a nivel radicular y, a su vez, los microorganismos influyen en el crecimiento y la salud de las plantas (Sugiyama, 2019). Estos agentes microbianos en su mayoría son considerados promotores del crecimiento vegetal, gracias a la excreción de sustancias bioactivas (aminoácidos, lípidos...) y a la producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas, etc.). El efecto fitoestimulante de diversas microalgas y cianobacterias, ha sido objeto de estudio en distintos cultivos tales como cereales, legumbres y hortalizas. De igual forma, se ha demostrado que la aplicación de consorcios entre cianobacterias y *Chlorella vulgaris* sobre el cultivo de trigo, mejora su rendimiento, la germinación de semillas y fertilidad del suelo (Shaaban, 2001). Por último, en el mismo orden de ideas, estos microorganismos son estudiados como fuentes alternativas de control biológico de enfermedades, como opción más sostenible al uso de plaguicidas y pesticidas químicos altamente perjudiciales y ofreciendo una

alternativa más ecológica para los agricultores y consumidores. Así, se ha comprobado que las microalgas y cianobacterias pueden ser usadas frente a algas, hongos parásitos y/o nemátodos a través de distintos mecanismos que van desde la inhibición del crecimiento por producción de enzimas hidrolíticas hasta la producción de diversos metabolitos secundarios como fenoles y compuestos bioactivos que les permiten actuar como agentes de control biológico.



**FIGURA 4-APLICACIÓN DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS EN AGRICULTURA. (MODIFICADO DE RENUKA ET AL., 2018)**

En definitiva, los productos encontrados a partir del estudio de microalgas y cianobacterias poseen grandes perspectivas de futuro para su aplicación, introduciéndose en el mercado por ser productos de alto valor económico.

### 1.3. Cianobacterias y microalgas como agentes de control biológico frente a enfermedades fúngicas: *Botrytis cinerea*

Los hongos, organismos eucariotas pertenecientes al reino Fungi, a lo largo de la evolución han establecido diferentes interacciones tanto beneficiosas como perjudiciales con los organismos existentes, especialmente estrechas con los vegetales. Así, encontramos especies saprófitas, que viven de la materia orgánica en descomposición; especies con un estilo de vida necrotrofo, que utilizan toxinas o enzimas para matar y, posteriormente, poder usar los vegetales como fuente de nutrientes; u hongos biotrofos, que obtienen nutrientes de tejidos vivos y, para terminar, los hongos hemibiotrofos, caracterizados por un estilo de vida resultante de la combinación de las anteriores (Dickinson, 2004).

En líneas generales, los hongos fitopatógenos son considerados los agentes causales mayoritarios de enfermedades en plantas, y suponen un problema a nivel mundial puesto que producen la pérdida masiva de cosechas en cultivos tan importantes como arroz, trigo, patata y hortalizas. Esta situación se ha ido agravando simultáneamente por el uso expandido de monocultivos y las técnicas de control convencionales (como el uso de agroquímicos), así como por la adaptación

genética de las especies fúngicas (Dickinson, 2004). Por consiguiente, este hecho ha dado lugar a una amplia variedad de enfermedades fúngicas en plantas, destacando algunas de ellas en la Tabla 3.

**TABLA 3- EJEMPLOS ENFERMEDADES FÚNGICAS. (ADAPTADO DE DICKINSON, 2004).**

<b>Agente / Enfermedad</b>	<b>Sitios afectados</b>	<b>Daño causado</b>
<i>P. cinnamoni</i> / Muerte regresiva	Australia	Daño ambiental
<i>Phytophthora spp</i> / Decadencia del roble	Estados Unidos	
<i>X. oryzae</i> / Tizón hoja de arroz	India y Japón	Daños económicos
<i>Puccinia spp</i> / Roya en cereales	A nivel mundial	
<i>P.infestans</i> / Tizón patata	Europa	A nivel poblacional, causante de hambrunas
<i>Claviceps purpurea</i> / cornezuelo	Europa	

Siguiendo las consideraciones precedentes, en los últimos años han surgido alternativas al control tradicional de plagas y enfermedades. Inicialmente, a través del uso de organismos modificados genéticamente, seguido de la búsqueda de nuevos agentes de control biológico. El control biológico con microorganismos se sustenta a través de la interacción que establece el agente de control biológico con el fitopatógeno, presentando un carácter antagonista que le permite bien inhibir directamente el crecimiento del patógeno o competir por los nutrientes y/o el espacio.

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, causante de la enfermedad del moho gris, es bastante difícil de controlar, debido a su modo de acción y al elevado rango de huéspedes que afecta (Williamson et al., 2007). Además, presenta una alta tasa de reproducción y variabilidad genética (Fedele et al., 2020), lo que le permite desarrollar fácilmente resistencias contra los fungicidas existentes. Otro rasgo para tener en cuenta es su ciclo de vida corto y la capacidad de quedarse durante periodos prolongados en los cultivos gracias a la generación de esclerocios, produciendo bastantes pérdidas postcosecha. Por estas características, *Botrytis cinerea* es considerado como el segundo patógeno vegetal de mayor importancia a nivel global (Abbey et al., 2019).

*B.cinerea* destaca además por ser un hongo con estilo de vida necrotrofo, lo que se asocia con la sintomatología general de las enfermedades que produce: la podredumbre, cuyo color varía entre marrón, gris e incluso amarillo en los órganos afectados (Romanazzi y Feliziani, 2014). Tiene la capacidad de afectar a distintos órganos de las plantas que coloniza, como se observa en la Figura 5.





FIGURA 5-SÍNTOMAS BOTRYTIS CINEREA EN FRESAS (A), FRAMBUESAS (B) Y EN PÉTALOS DE ROSA (C) (WILLIAMSON ET AL., 2007)

El control biológico de *Botrytis cinerea*, mediante el empleo de microorganismos e insectos ha sido investigado en diversos tipos de cultivos sobre los que el desarrollo de la enfermedad puede llegar a provocar pérdidas económicas de gran importancia, como es el caso del tomate o la uva. Hay antecedentes del empleo de levaduras, hongos, cianobacterias y microalgas. A continuación, se describen los mecanismos de acción empleados frente a este agente fitopatógeno que incluyen antibiosis, parasitismo, producción de sideróforos y resistencia sistémica inducida, principalmente (Figura 6) (Roca-Couso et al., 2021):

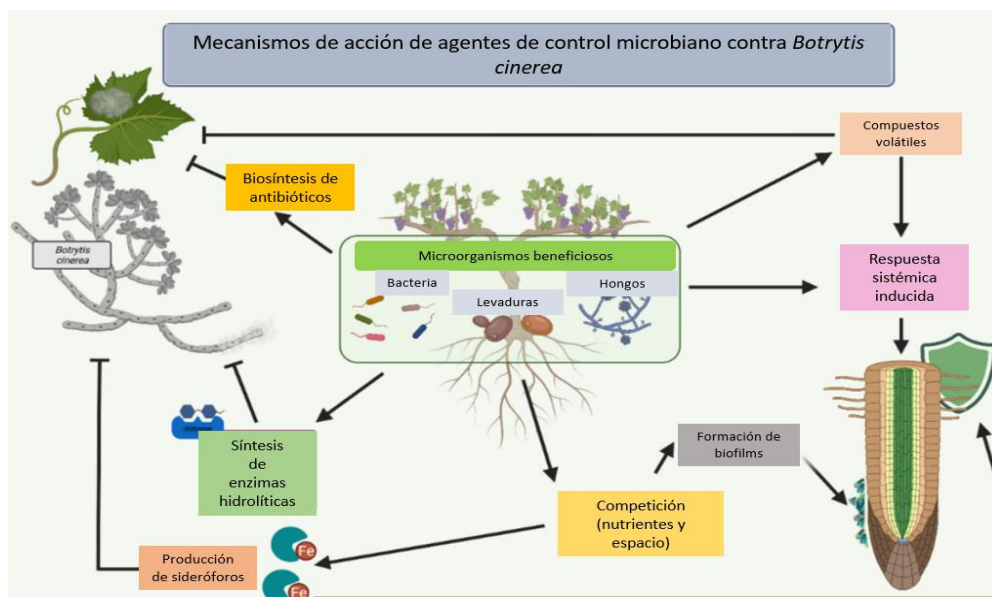


FIGURA 6-MECANISMOS DE CONTROL DE ABCS CONTRA BOTRYTIS CINEREA. (MODIFICADO DE ROCA-CAUSO ET AL., 2021)

- (I) Antibiosis: el agente de control impide la supervivencia o inhibe el desarrollo de *B. cinerea*, mediante la producción de antibióticos, de metabolitos de origen microbiano, así como de enzimas hidrolíticas, compuestos volátiles y sustancias tóxicas. A continuación, en la Tabla 4, se exponen algunos ejemplos de compuestos producidos por microorganismos que han tenido éxito en el control de *B. cinerea*:

**TABLA 4- EJEMPLOS DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *B.CINEREA***

Compuestos		Microorganismo	Referencia
Moléculas antimicrobianas	Pirrolnitrina	<i>Pseudomonas cepacia</i>	(Bautista-Baños, 2006)
	Surfactina	<i>Bacillus spp</i>	(Pedraza et al., 2020)
Enzimas hidrolíticas	Quitinasa	<i>Streptomyces lydicus</i>	(Nicot et a., 2016)
	$\beta$ – 1, 3- glucanasa	<i>Pichia anomala</i>	(Roca-Couso et al., 2021)
Compuestos volátiles	2-nonanona	<i>Bacillus subtilis</i>	(Chen et al., 2008)
	Alcohol fenélico	<i>Aureobasidium pullulans</i>	(Di Francesco et al., 2015)
Sustancias tóxicas	Killer toxin	<i>P. membranifaciens</i>	(Santos et al., 2004)
	Gliotoxina	<i>Trichoderma sp. BV1</i>	(Roca-Couso et al., 2021)

- (II) Competencia por sustrato: se incluye desde la competencia por nutrientes hasta la competencia por espacio. Por ejemplo, los hongos necrotrofos, como es el caso de *B. cinerea*, cuando inician la necrosis, otros organismos saprófitos empiezan a competir por el mismo sustrato (Köhl et al., 2019).
- (III) Parasitismo: es muy común en fitopatología la existencia de hongos parásitos de otros hongos fitopatógenos, fenómeno que se denomina como hiperparasitismo. A modo de ejemplo, se ha comprobado el éxito de *Gliocladium roseum* contra *B.cinerea* por actuar como micoparásito en las diferentes estructuras del hongo (hifas, esclerocios, etc.) (Chaves y Wang, 2004).
- (IV) Respuesta sistémica: se consigue la activación del sistema de defensa de la planta. En este mecanismo, los sistemas de señalización molecular son claves para la expresión de genes implicados en la producción de moléculas de respuesta como proteínas relacionadas con patogénesis (PR). Entre otros, destaca la producción del ácido salicílico, que induce la expresión de estas proteínas permitiendo desarrollar resistencias frente a distintos patógenos (Díaz et al., 2014). Asu vez, el ácido salicílico se ha comprobado que posee una baja capacidad quelante, pero junto a la producción de sideróforos por parte de *Pseudomonas aeruginosa*, ha propiciado el desarrollo de resistencia contra *B.cinerea* en tomate (Audenaert et al., 2002).

En esta revisión cabe destacar, que los agentes de control microbiológico comúnmente utilizados frente a *Botrytis cinerea* corresponden a bacterias, levaduras, hongos e incluso virus. Sin embargo, hay que mencionar la creciente importancia en esta área de los extractos de microalgas y cianobacterias.

Los extractos de microalgas han dado buenos resultados en la inhibición del crecimiento de hongos causantes de enfermedades de importancia agraria y económica. Estos extractos han sido tan exitosos porque en su composición están presentes sustancias activas con capacidad antifúngica como, por ejemplo, compuestos fenólicos y ácidos grasos. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios antioxidantes de microalgas y cianobacterias con un papel importante en la protección ante diversos tipos de estreses bióticos y abióticos, gracias a las propiedades antimicrobianas, fungicidas y antioxidantes de los mismos (Gonçalves, 2021). De manera similar, los ácidos grasos son



constituyentes muy importantes en estos microorganismos y les confieren la capacidad de actuar contra patógenos vegetales, de igual forma que los compuestos fenólicos. No obstante, a pesar de haber sido aplicados mayoritariamente en forma de extractos microbianos, los estudios recientes están encaminados hacia la aplicación de microalgas vivas *in situ* como agentes de control biológico. Por ejemplo, el aceite de *Chlorella protothecoides* disuelto en metanol y etanol mostró una gran inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, donde mencionaron la posible implicación que podrían tener los compuestos fenólicos en el proceso antagónico contra el fitopatógeno (Özçimen, 2018). Así mismo, se han descrito otras microalgas que consiguen reducir la infección del fitopatógeno *B.cinerea*, como es el caso de *Laminaria digitata* en cultivos de vid (Aziz et al., 2003). Otro ejemplo relacionado es el caso de la aplicación de *Scenedesmus obliquus*, que retiene el crecimiento del hongo a diferentes concentraciones (Schmid et al., 2022). También cabe señalar el trabajo descrito sobre el efecto de la aplicación de *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*, cuya aplicación conjunta reduce de forma directa la producción de esporas por parte de *Botrytis cinerea* y, con ello, al crecimiento del hongo, estableciendo un nivel cero de daño por la enfermedad en el cultivo de fresa (Kim et al., 2020).

De manera análoga, los extractos de cianobacterias presentan compuestos de interés que engloban desde compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides como  $\beta$ -caroteno, polisacáridos o fitohormonas como el ácido salicílico (Gonçalves, 2021). Todos ellos hacen posible que las cianobacterias sean consideradas agentes de control biológico, ya que su aplicación aporta efectos antifúngicos, antibacterianos, antivirales e incluso actividad antialgal. Las especies que muestran mayor actividad antifúngica pertenecen a los géneros *Anabaena* sp y *Nostoc* sp. Además de que existe un número considerado de especies de cianobacterias que inhiben o impiden el crecimiento de hongos, se ha demostrado que un mismo tipo de cianobacteria puede actuar contra diferentes fitopatógenos. En concreto, las especies *Nostoc muscorum* y *Calothrix elenkenii* son características por influir sobre todo en hongos que producen “Damping off” como *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, mientras que otras cianobacterias, como las pertenecientes a la especie *Fischerella muscicola*, erradican enfermedades fúngicas como el mildiú polvoroso, la roya parda o el tizón del arroz, causadas por un amplio rango de fitopatógenos con un similar modo de actuación a *B.cinerea* (Shingh et al., 2016).

En cuanto a *Botrytis cinerea* y el efecto biopesticida de las cianobacterias, muchas especies han mostrado la capacidad de reducir significativamente el daño o el crecimiento de este fitopatógeno, destacando la efectividad de los géneros *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Nodularia* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* spp (Kim, 2006). En la búsqueda de componentes específicos de cianobacterias, se han hecho análisis preliminares de proteínas como las ficobiliproteínas donde se ha constatado que su producción, por parte de las especies *Arthrospira platensis* y *Hydropuntia cornea*, redujo la incidencia, severidad, germinación de esporas y crecimiento del micelio del patógeno con éxito en cultivo de tomate (Righini et al., 2020). De manera similar, en el cultivo de la fresa, muy perjudicado por este patógeno, se probaron *in vitro* extractos a diferentes concentraciones de *Anabaena* sp y sus polisacáridos, dando como resultado la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* y la reducción en la incidencia de la enfermedad que produce, planteando la posibilidad de ser un agente preventivo de interés (Righini et al., 2019). De forma general, se ha podido constatar que las cianobacterias se

consideran un prometedor agente de control biológico frente a *B. cinerea*, gracias a la producción de sustancias bioactivas con un efecto biopesticida.

El estudio de microorganismos fototrofos como agentes de control biológico está teniendo un crecimiento exponencial en los últimos años. Los bioproductos basados en cianobacterias podrían ser aplicados con fines muy diversos, desde un punto de vista agrícola, dicese como biofertilizantes, fitoestimulantes y biopesticidas. El desarrollo de procesos que ayuden a obtener el máximo potencial de estos microorganismos es fundamental y prometedor, siendo las cianobacterias aún muy desconocidas en este ámbito, se plantean como una fuente importante de herramientas agrobiotecnológicas aún sin explotar.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Los sistemas agrícolas tradicionales basados en el uso de fitosanitarios y fertilizantes químicos están contribuyendo de manera notable a la contaminación y erosión de suelos y acuíferos, así como acrecentando la problemática actual de generación masiva de residuos tóxicos de difícil gestión, procedentes de dichas prácticas agrícolas. En este contexto, se planteó como objetivo general del presente Trabajo Fin de Grado la “caracterización de cianobacterias procedentes de suelos naturales y de origen antropogénico en función de su capacidad para interactuar con cultivos vegetales como agentes de control de enfermedades de plantas”.

### 2.2. Objetivos específicos

Para la consecución del objetivo principal indicado, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- i. Analizar la idoneidad de una colección de cianobacterias para crecer *in vitro* en función del tipo de medio de cultivo, sólido o líquido.
- ii. Evaluar el efecto fitoestimulante y/o fitotóxico de extractos obtenidos a partir de una colección de cianobacterias.
- iii. Estudiar la producción de sustancias bioactivas en relación con su interés para el control biológico de hongos fitopatógenos.
- iv. Determinar el efecto biopesticida de las cianobacterias frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.
- v. Comprobar el posible efecto promotor del crecimiento vegetal y biopesticida *in vivo* de la cepa seleccionada .

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Diseño experimental

Para la consecución de los objetivos planteados se desarrollaron diferentes experimentos que se ejecutaron de acuerdo con el esquema indicado en la Figura 7 a partir de la colección de cianobacterias:

- I. El primer experimento consistió en la recuperación de las cepas criopreservadas tanto en medio líquido como en sólido, para realizar un ensayo de viabilidad.
- II. En el segundo bioensayo, se examinó la producción de sustancias bioactivas por parte de estos microorganismos, concretamente la actividad quitinasa
- III. Posteriormente, se hicieron ensayos *in vitro* relacionados con el índice Germinación y el potencial antagonista frente a *Botrytis cinerea* mediante el protocolo de “cultivo dual”.
- IV. Finalmente, un ensayo *in planta* para comprobar el efecto fitoestimulante y/o fitotóxico de la colección, así como su potencial biopesticida.

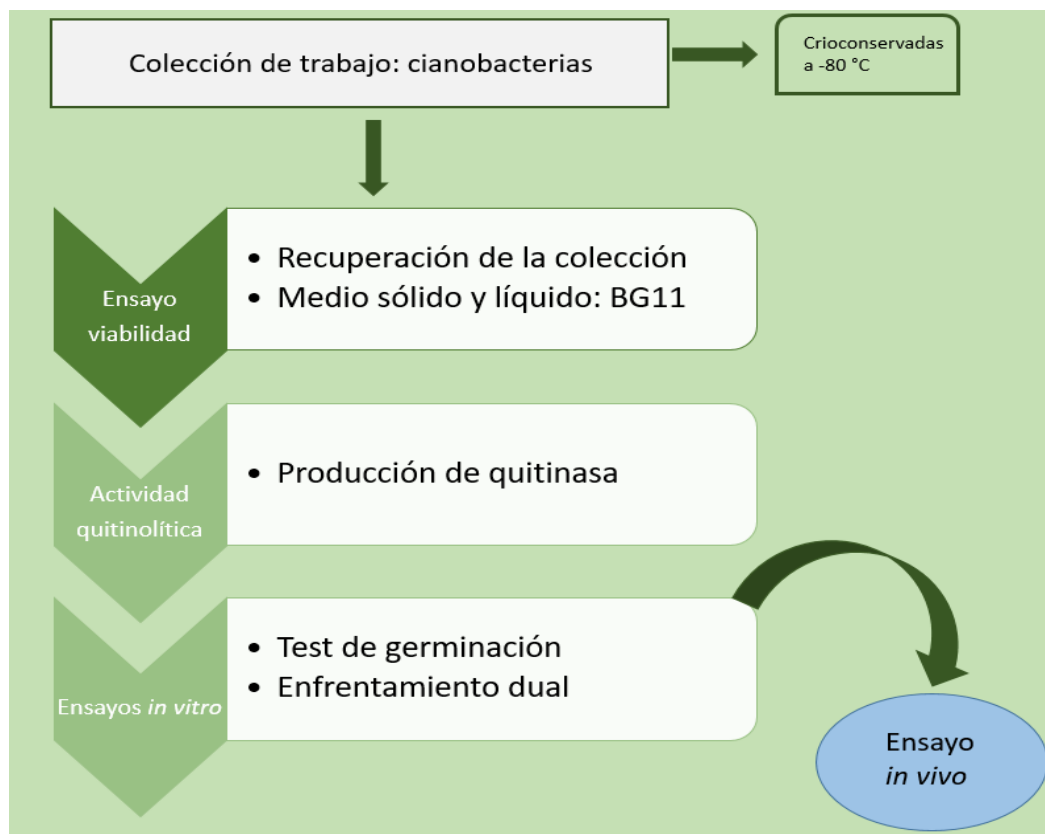


FIGURA 7- DISEÑO EXPERIMENTAL

### 3.2. Medios de cultivo

A continuación, se describen los distintos medios de cultivos utilizados para la realización de los distintos ensayos, así como su composición y preparación:

#### Medio BG-11 (Allen y Steiner, 1968):

○ NaNO <sub>3</sub> .....	<b>1,5 g/L</b>
○ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O .....	<b>0,04 g/L</b>
○ MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	<b>0,075 g/L</b>
○ CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O .....	<b>0,036 g/L</b>
○ Ácido cítrico .....	<b>0,006 g/L</b>
○ Citrato amónico férrico .....	<b>0,006 g/L</b>
○ Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	<b>0,02 g/L</b>
○ EDTA .....	<b>0,001 g/L</b>
○ Solución de oligoelementos .....	<b>1 mL</b>

Para la elaboración de este medio de cultivo se partió del preparado comercial líquido (SigmaAldrich, 73816-250 mL) a partir del cual se preparó tanto medio sólido en placas de Petri como medio líquido en tubos de ensayo. En el caso del medio sólido, se adicionaron 10 mL/L del preparado de BG-11, 1 mL/L de solución de oligoelementos y 20 g/L de agar bacteriológico (Panreac, A0949.0500-EQ) completando con 900 mL de agua destilada en un matraz aforado de 1000 mL. En el caso del medio líquido, se agregaron 5 mL de BG-11, 10 µL de la solución de oligoelementos y se completó el medio con 500 mL de agua destilada, y se repartió a razón de 10 mL de medio por tubo de ensayo. El pH se ajustó hasta 7 y los medios fueron autoclavados a 121 °C durante 20 minutos. Tras la esterilización, el medio sólido se repartió en placas de Petri de 9 cm de diámetro.

La solución de oligoelementos y su preparación es la descrita según (Pochon y Tardieux, 1962):

○ Ácido nitrilotriacético al 99 % .....	<b>1,5 g/L</b>
○ MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O .....	<b>0,5 g/L</b>
○ MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O.....	<b>3,0 g/L</b>
○ NaCl .....	<b>0,1 g/L</b>
○ CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O .....	<b>0,1 g/L</b>
○ ZnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O .....	<b>0,1 g/L</b>
○ CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O .....	<b>0,1 g/L</b>
○ AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O .....	<b>0,1 g/L</b>
○ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	<b>0,1 g/L</b>
○ Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O .....	<b>0,1 g/L</b>

Su preparación consistió en la disolución del ácido en 100 mL de agua destilada, para lo que se ajustó el pH a 6,5 utilizando como base KOH saturado. Tras ello, se añadió cada componente indicado en la lista con 300 mL de agua destilada y, finalmente, se enrasó hasta 1 L en el matraz aforado con agua destilada.

### **Solución Salina (SS, 0,9%):**

- Cloruro sódico (NaCl) ..... **9,0 g/L**

La solución salina se utilizó varias veces para resuspender los cultivos puros de las cepas de cianobacterias y para llevar a cabo diluciones de los microorganismos. Para elaborarla, se disolvieron 9 gramos de cloruro sódico (NaCl) en 1000 mL de agua destilada y, tras ello, se vertieron en frascos de 250 mL que fueron autoclavados a 121 °C durante 20 minutos.

### **Medio BG11 suplementado con Quitina coloidal:**

- BG11 comercial..... **10 mL/L**
- Agar Bacteriológico ..... **20,0 g/L**
- Quitina coloidal ..... **5 g/L**
- Elementos traza ..... **1 mL/L**

Este medio se preparó en un matraz aforado de 1000 mL, al cual se adicionó quitina coloidal 5g/L, 10 mL BG11 comercial y 990 mL de agua destilada y, tras ello, el pH de esta solución se ajustó hasta 7. Posteriormente, se esterilizó el medio a 121 °C durante 20 minutos. Se vertió en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Este medio se utilizó para comprobar la producción de actividad quitinasa por parte de las cianobacterias.

### **Agar Agua (AA):**

- Agar bacteriológico..... **10,0 g/L**

El medio agar agua se preparó utilizando agua destilada (1000mL) con 10 gramos de agar bacteriológico y se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos. Seguidamente, se vertió en placas de Petri de 9 cm. Este medio se empleó como medio base en los ensayos de enfrentamiento *in vitro*.

### **Agar Patata Dextrosa (PDA):**

- Agar bacteriológico ..... **15,0 g/L**
- Glucosa..... **20,0 g/L**
- Peptona de patata ..... **4,0 g/L**

Para elaborar PDA se disolvieron 19,5 gramos de un preparado comercial (PanReac AppliChem, 413758.1210) más 2,5 gramos de agar bacteriológico en un matraz aforado con 500 mL de agua destilada que se autoclavaron a 121 °C durante 20 minutos.

### 3.3. Colección de cianobacterias

Para la realización de este Trabajo Fin de Grado se utilizaron 10 cepas de cianobacterias procedentes de una colección perteneciente al grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería, previamente aisladas de suelos naturales y de origen antropogénico, cuyo código y género se indican en la Tabla 5. Dichas cepas se recuperaron tanto en placas Petri con medio de cultivo sólido BG11, como en tubos de ensayo con 50mL de medio BG11 en formato líquido, a partir de crioviales conservados a -80 °C. Los cultivos se incubaron en un fitotrón (Equitec) a 25 °C y 60% de humedad durante 15 días con un fotoperiodo 12/12.

**TABLA 5- COLECCIÓN DE CEPAS EVALUADAS DURANTE EL PRESENTE TRABAJO**

Código	Género
37C	<i>Oscillatoria</i>
38C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>
39C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>
40C	<i>Trichormus</i>
41C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>
42C	<i>Nodosilinea</i>
43C	<i>Leptolyngbya</i>
44C	<i>Characiochloris</i>
45C	<i>Trichormus</i>
46C	<i>Klebsormidium</i>

### 3.4. Hongo fitopatígeno

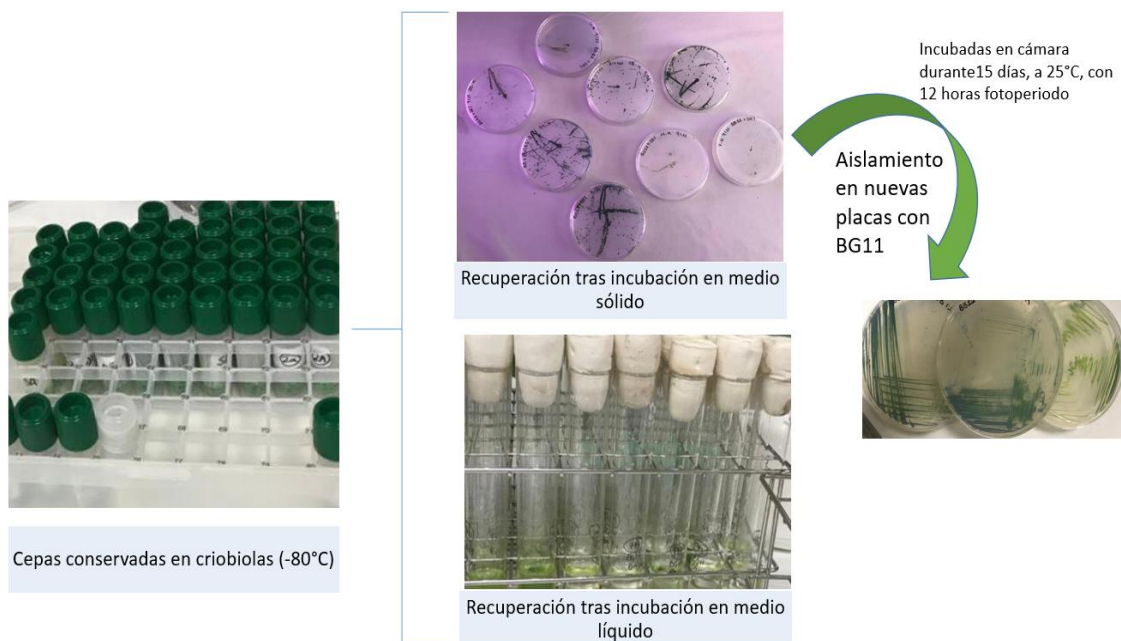
En este trabajo se empleó *Botrytis cinerea* como agente fitopatógeno de interés. Se trata de un hongo causante de la enfermedad del “moho gris”. Dicho hongo fue suministrado en formato liofilizado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, referencia 20973). Durante el desarrollo de los diversos ensayos, el hongo fitopatígeno se mantuvo en cultivo activo en placas de agar patata dextrosado (PDA), las cuales fueron mantenidas a 4 °C en oscuridad y sometidas a resiembras mensuales (Figura 8). La temperatura de incubación requerida por este hongo para los ensayos *in vitro* fue de 25 °C.



**FIGURA 8- CULTIVO EN PDA DE *B. CINEREA***

### 3.5. Ensayo de viabilidad

Entre los métodos de conservación a largo plazo, la congelación proporciona una mayor estabilidad genética, ya que evita que aparezcan nuevas generaciones en el cultivo y se mantenga lo más similar posible al aislamiento original. Esta metodología propicia mayor viabilidad celular y permite mayores tiempos de supervivencia al reducir el metabolismo microbiano. Para comprobar que esto es así, se llevó a cabo la recuperación de la colección de cianobacterias crioconservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en tubos de ensayo que contenían medio BG11 líquido y en el mismo tipo de medio BG11, pero en su formato sólido en placas de Petri. Posteriormente, los cultivos fueron incubados en el fitotrón (Equitec) a  $25^{\circ}\text{C}$  y 60% de humedad durante 15 días con un fotoperiodo 12/12. Tras este tiempo, las cepas crecidas en el medio sólido fueron aisladas en nuevas placas de Petri con medio BG11. El resumen del proceso se representa en la Figura 9.



**FIGURA 9- ENSAYO VIABILIDAD**

### 3.6. Determinación cualitativa de la actividad quitinasa

En este apartado, se describe la determinación cualitativa de la actividad enzimática quitinasa por parte de la colección de cianobacterias utilizadas en el presente trabajo.

El procedimiento consistió en adicionar 3 gotas de  $10\ \mu\text{L}$  del extracto de cada una de las cianobacterias recuperadas en medio BG11 líquido, sobre las placas de BG11 suplementadas con quitina coloidal. En el caso de las cianobacterias recuperadas en medio BG11 sólido, una pequeña cantidad de su biomasa se resuspendió con ayuda de un asa de platino en tubos eppendorfs con  $500\ \mu\text{L}$  de solución salina estéril y, posteriormente, se adicionaron 3 gotas de  $10\ \mu\text{L}$  de cada una de ellas al medio de BG11 suplementado con quitina coloidal. Las placas se incubaron durante 7 días en el fitotrón (Equitec) a  $25^{\circ}\text{C}$  y 60 % de humedad, con un fotoperiodo de 12/12.



### 3.7. Bioensayos de germinación en semillas de berro (Test de Zucconi)

Con la finalidad de comprobar el posible efecto fitotóxico y/o fitoestimulante de la colección de cianobacterias recuperada, se procedió a la realización de bioensayos de germinación en semillas de berro (*Lepidium sativum*), mediante la técnica descrita por Zucconi et al. (1981).

Para realizar esta prueba se partió de 20 mL de cultivo líquido de cada cepa de cianobacteria, el cual se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en 20 mL de agua destilada estéril. Posteriormente, se separaron por un lado 10 mL de la suspensión (tratamiento directo) y por otro, 2,5 mL a los que se les añadió 7,5 mL de agua destilada estéril (dilución ¼) del cultivo. Todas las muestras, directas o diluidas, fueron sometidas a un proceso de rotura celular mediante sonicación (Sonicador Branson 150, Amplitud 40%, 3 minutos).

A continuación, se incorporó un papel de filtro estéril en cada placa de Petri empleada para el ensayo que se humectó con 2 mL del extracto correspondiente en cada caso (directo y diluido para cada cianobacteria probada). Seguidamente, sobre el papel de filtro se colocaron con ayuda de pinzas de acero estéril 25 semillas de berro por placa. El efecto de cada extracto se ensayó en un total de 100 semillas por cianobacteria ensayada. Finalmente, estas placas se incubaron en condiciones de oscuridad durante 48 horas a una temperatura de 25 °C. Simultáneamente, se realizó el mismo procedimiento sustituyendo el extracto de cianobacteria por agua destilada estéril para obtener el control del ensayo. El procedimiento se representa de forma esquemática en la Figura 10.

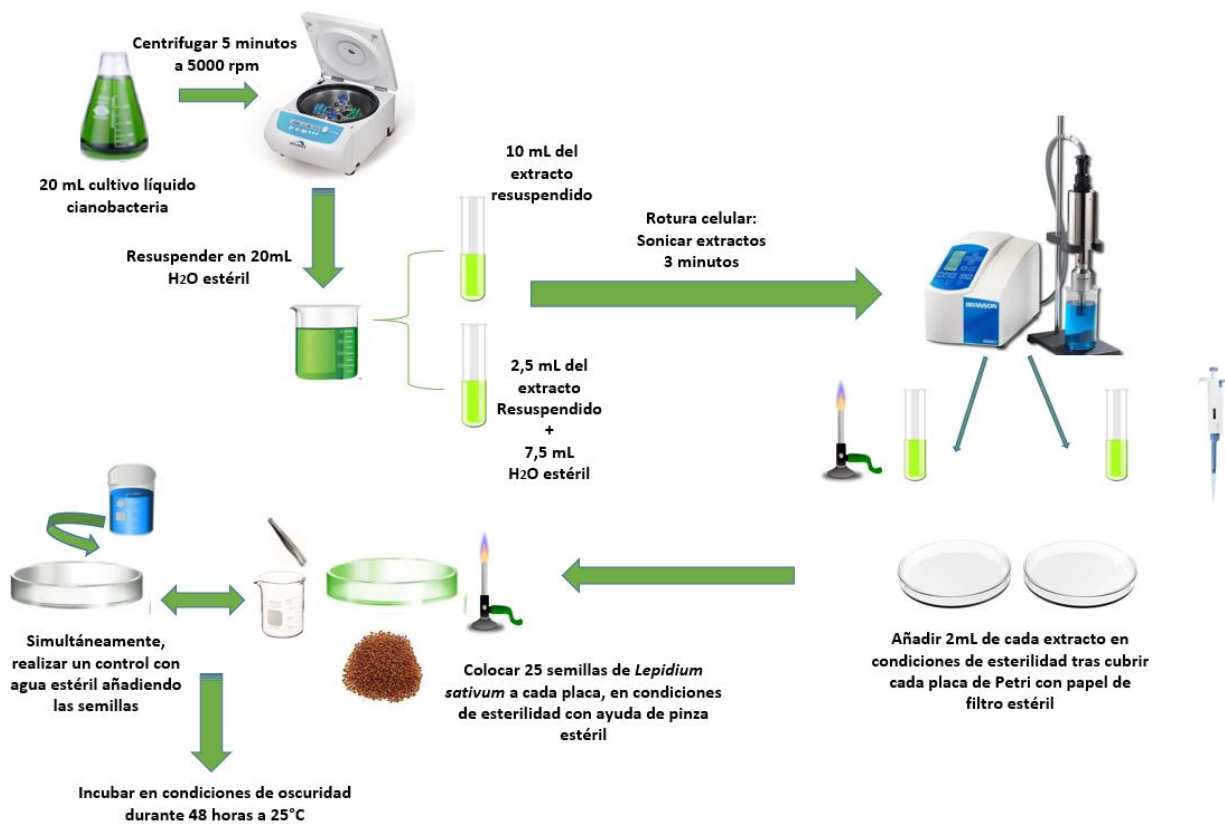


FIGURA 10- BIOENSAYO DE GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE BERRO



Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a calcular el Índice de Germinación, teniendo en cuenta el porcentaje de semillas germinadas y la elongación de la radícula (mm), aplicando la siguiente fórmula:

$$IG = \left( \frac{\%G \times \%L}{\%Gc \times \%Lc} \right) \times 100$$

Donde:

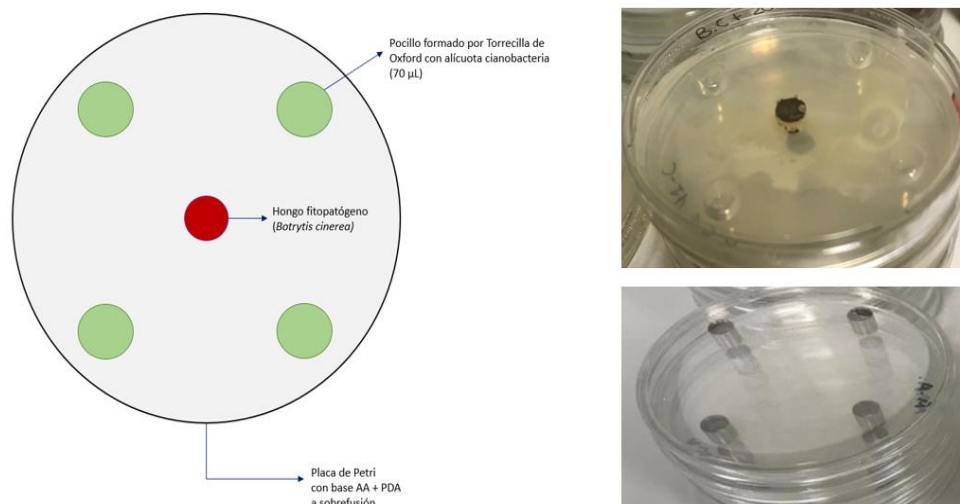
%G y %Gc: Porcentaje de semillas germinadas en las muestras y en la placa control, respectivamente

%L y %Lc: Porcentaje de crecimiento de las raíces, en mm, de las muestras y en la placa control, respectivamente

### 3.8. Bioensayo de antagonismo frente a *Botrytis cinerea* mediante el protocolo de “cultivo dual”

En primer lugar, como paso previo al ensayo, se resuspendió biomasa de las cianobacterias crecidas en medio sólido durante 15 días, en solución salina estéril al 0.9%.

El enfrentamiento dual entre el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y las cepas de cianobacterias se realizó en placas de Petri con pocillos. Para ello, se añadió en cada placa Petri una fina capa de medio agar agua (AA) y una vez solidificada, se colocaron cuatro Torrecillas de Oxford de acero inoxidable previamente esterilizadas. Luego, se vertió medio PDA a sobrefusión y una vez solidificado, se retiraron las Torrecillas con ayuda de pinzas en condiciones de asepsia, generándose cuatro pocillos equidistantes en la placa. Para el enfrentamiento, se añadieron 70 µL de cada extracto de cianobacteria en los cuatro pocillos (Figura 11) y en el centro se dispuso con ayuda de un sacabocados, un disco de *Botrytis cinerea* cultivado y crecido con anterioridad en PDA en condiciones de esterilidad. De la misma forma, se preparó una placa control del hongo fitopatógeno en ausencia de extracto de las cepas antagonistas.



**FIGURA 11- ENFRENTAMIENTO DUAL: ESQUEMA DISPOSICIÓN DE PLACA DE PETRI**

Seguidamente, se incubaron las placas en condiciones de oscuridad a 25 °C durante 7 días, tras lo cual se midió el crecimiento del hongo obtenido con la media de los dos diámetros de crecimiento del hongo en presencia y ausencia del agente antagonista. Para determinar el grado de inhibición de las cepas antagonistas frente al hongo, se utilizó una variación del protocolo descrito por Landa et al. (1997), aplicando la siguiente fórmula:

$$I = \left[ \frac{C - T}{C} \right] \times 100$$

Donde:

I: índice de inhibición (%)

C: crecimiento del agente fitopatógeno en ausencia de la cepa antagonista (mm)

T: crecimiento del agente fitopatógeno en presencia de la cepa antagonista (mm)

### 3.9. Ensayos *in vivo*

Se preparó inicialmente una mezcla de sustrato estéril compuesta de sustrato orgánico y vermiculita en proporción 3:1 (v:v). El sustrato se repartió en bandejas de semillero de 77 alveolos y se humedeció. En cada alveolo se sembró una semilla de pepino (*Cucumis sativus*) variedad Ashley (Batlle) y se procedió a su germinación en oscuridad durante 4 días a 25 °C, con una humedad entorno al 60%. Una vez germinadas las semillas, las bandejas se expusieron a fotoperiodo (12/12) y se mantuvieron tres semanas, hasta que alcanzaron el tamaño adecuado (al menos con una hoja verdadera), para la aplicación de los tratamientos. Se analizaron 30 plantas por tratamiento.

### 3.9.1. Efecto biopesticida frente al desarrollo de los síntomas provocados por *Botrytis cinerea* en plántulas de pepino

Para llevar a cabo este ensayo, se inocularon las plántulas con extractos de cianobacterias a nivel de sustrato. Paralelamente, se preparó una suspensión de esporas de *B. cinerea* a partir de un cultivo fresco del hongo en medio PDA, crecido durante 7-10 días. La suspensión del hongo se obtuvo recogiendo las esporas presentes en el cultivo en placa, en 10 mL de solución salina estéril. Seguidamente se eliminó el micelio fúngico mediante filtración con muselina estéril, y la suspensión de esporas fue cuantificada en cámara de Neubauer, ajustando la densidad de inóculo a  $10^5$  ufc/mL. Finalmente, se procedió a la infección de las plantas vía foliar, aplicando tres pulverizaciones por planta. El ensayo se completó con un bloque de plantas control, germinadas en ausencia de tratamientos. Transcurridas 3 semanas desde la infección con *B. cinerea*, se evaluó el nivel de afección de las plantas infectadas. Para ello, se consideró la utilización de una escala de daño estableciéndose el valor de 1 para las plantas más sanas, 2 para las plantas afectadas y 3 para las plantas muertas.

### 3.9.2. Efecto fitoestimulante sobre el crecimiento en plántulas de pepino

Con objeto de evaluar el efecto de la aplicación de la cianobacteria en plántulas de pepino, se llevó a cabo la evaluación de parámetros relacionados con la estimulación del crecimiento aéreo y radicular a partir de los bloques de plantas infectadas y no infectadas con *Botrytis cinerea*. Tales como número de hojas verdaderas, longitud del tallo (cm), longitud de la raíz (cm), diámetro del tallo (mm), peso fresco (g), peso seco (g).

### 3.10. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010, para la elaboración de las tablas y figuras descriptivas de los datos obtenidos. Además, se llevó a cabo un análisis estadístico a través del programa Statgraphics Centurion XVIII, en concreto, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial a un intervalo de confianza del 95%. Además, se empleó el Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) mediante el cual se pudo identificar qué niveles dentro de cada factor fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

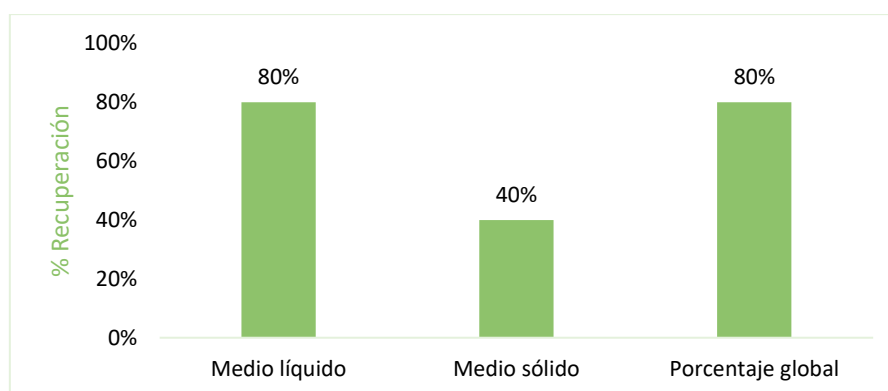
En este apartado se recogen los resultados conseguidos tras la ejecución de la metodología experimental planteada en el apartado anterior (Figura 7), permitiendo completar los objetivos planteados en el presente TFG.

#### 4.1. Viabilidad de la colección de cianobacterias

A continuación, en la Tabla 6 y en la Figura 12 se recogen los resultados de las cianobacterias de la colección que pudieron ser recuperadas en cada tipo de formato (sólido y líquido) para el medio de cultivo BG11, tras el proceso de criopreservación a -80 °C durante un periodo de 1 año.

**TABLA 6- CIANOBACTERIAS RECUPERADAS EN CADA TIPO DE FORMATO, SÓLIDO Y LÍQUIDO, EN MEDIO BG11**

<b>Código</b>	<b>Cianobacteria</b>	<b>Crecimiento en medio líquido</b>	<b>Crecimiento en medio sólido</b>
37C	<i>Oscillatoria</i>	SÍ	SÍ
38C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	SÍ	SÍ
39C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	SÍ	SÍ
40C	<i>Trichormus</i>	SÍ	NO
41C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	SÍ	SÍ
42C	<i>Nodosilinea</i>	SÍ	NO
43C	<i>Leptolyngbya</i>	SÍ	NO
44C	<i>Characiochloris</i>	NO	NO
45C	<i>Trichormus</i>	NO	NO
46C	<i>Klebsormidium</i>	SÍ	NO



**FIGURA 12- PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LA COLECCIÓN DE CIANOBACTERIAS TRAS EL PERIODO DE CRIOPRESERVACIÓN**

Como se observa en la Figura 12, el porcentaje de recuperación global fue del 80%, ya que, de un total de 10 cepas estudiadas, sólo 2, 44C y 45C, no se pudieron recuperar ni en medio sólido ni en medio líquido. En el caso del medio líquido, el porcentaje de éxito fue mayor, pudiéndose recuperar un mayor número de cepas (8), respecto a la viabilidad observada a partir de medio sólido (4). Con esta información, se puede deducir que el medio de crecimiento escogido, BG11, es indicado para el crecimiento de las cianobacterias, ya que aquellas que se recuperaron crecieron sin impedimentos, sin embargo, el formato líquido es más apto para la recuperación de las cepas tras un periodo prologando de conservación a bajas temperaturas. Además, dada la viabilidad de la colección tras su

crioconservación a largo plazo, el método de conservación escogido se presente conveniente para las cianobacterias.

El creciente uso de microorganismos con propósitos biotecnológicos, ha hecho necesario la conservación de distintos tipos de cepas de referencias (Acosta-Ovallos, 2019). Por tanto, los métodos de conservación de microorganismos son herramientas fundamentales en el trabajo de laboratorio, para lo cual se debe de llevar a cabo la búsqueda de diferentes técnicas de mantenimiento de los cultivos microbianos que permitan conservar al máximo las características de interés, afectando en la menor medida posible a su estabilidad. De esta forma, los principales criterios para escoger un método de conservación adecuado son la conservación de su posterior viabilidad, el coste del proceso, la frecuencia de uso, la pureza y la cantidad de cultivo mínima necesaria (Huertas et al., 2006). Estos criterios tienen el objetivo de asegurar fundamentalmente la estabilidad bioquímica, fisiológica y genética de los organismos que van a ser conservados (Acosta-Ovallos, 2019).

La crioconservación es un método de conservación a largo plazo, fundamentado en la congelación a bajas temperaturas (desde -70 °C a -196 °C) de los microorganismos con ayuda de crioprotectores. En este caso, las cianobacterias de la colección se conservaron en crioviales. Este método de conservación es uno de los más utilizados, por permitir la conservación en periodos largos de tiempo y mostrar una recuperación de los microorganismos entre el 50 y 100% de sobrevivencia (Zuberer, 1987). No obstante, la viabilidad y estabilidad de los microorganismos se ve influenciada fundamentalmente por cinco factores (Arrebola et al., 2008): fase y tiempo de crecimiento del microorganismo, para observar el momento idóneo de conservación; empleo de crioprotectores, ya que existen diferentes compuestos pero se debe de elegir el adecuado según el microorganismo a conservar; temperatura de almacenamiento, mejor cuanto más baja sea la temperatura; formato de almacenamiento, que facilite el uso de cada cepa conservada sin necesidad de alterar al resto de miembros de la colección; y, finalmente, velocidad de congelación y descongelación.

A pesar de que la conservación mediante congelación está estandarizada para distintos microorganismos, no todos pueden ser conservados con la totalidad de los métodos existentes. En el caso de microalgas y cianobacterias, comúnmente se ha utilizado el método de conservación a corto plazo a temperaturas de refrigeración, en torno a 4 y 15 °C. Sin embargo, este método, tanto con las cianobacterias como con otros microorganismos, presenta el inconveniente de que las cepas son más susceptibles a la contaminación y a la alteración tanto genética como fisiológica, además de que es un método que exige bastante mano de obra, ya que requiera de resiembras periódicas (Rastoll et al., 2013). Por ende, numerosos estudios empezaron a utilizar métodos de conservación alternativos, llegando a la conclusión de que la congelación es una de las mejores técnicas de conservación con menor índice de alteraciones (fisiológicas, genéticas, etc.) de las cepas iniciales de cianobacterias. Esteves-Ferreira et al. (2013) evaluaron diferentes métodos de conservación de cianobacterias, donde los resultados de mayor viabilidad (78-98%) se presentaron tras la crioconservación. Torres (2015) desarrolló e implementó un protocolo de crioconservación con cianobacterias nativas de Jalisco, donde obtuvo un porcentaje de viabilidad mayor al 70% y, además, aseguró la estabilidad fisiológica tras un año y medio de conservación a -80 °C, observando el mantenimiento de la capacidad para acumular compuestos de interés comercial. Rastoll et al. (2013), por su parte, evaluaron la

crioconservación con ayuda de dos crioprotectores, empleando 111 cepas de cianobacterias. El porcentaje de viabilidad alcanzado superó el 90%, incluso tras 15 días desde la descongelación de los cultivos. Así mismo, demostraron que la mejor sustancia protectora fue el dimetilsulfóxido. A pesar de lo estandarizado que se encuentra este método de conservación siguen siendo pocos los protocolos disponibles para el caso específico de las cianobacterias.

En cuanto al medio de cultivo empleado en este trabajo, los resultados obtenidos indican que se trata de un medio adecuado para la recuperación de cianobacterias. De manera general, un medio de cultivo mineral bajo condiciones controladas y adecuadas de luz y temperatura es adecuado para el cultivo de cianobacterias y el único factor de crecimiento usualmente requerido por distintas especies suele ser la vitamina B12. De esta forma, aunque se han estudiado varios medios de cultivo sólidos y líquidos, el medio BG11 es uno de los que proporcionan un mejor crecimiento, aislamiento y purificación de un amplio número de cianobacterias. De hecho, varios medios de cultivo utilizados para este grupo microbiano son modificaciones de la fórmula original de BG11 (Rippka et al., 1981).

#### 4.2. Evaluación de la producción de sustancias de interés: quitinasa

La quitina es un polisacárido cuya estructura consta de monómeros unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 de unidades de N-acetil-D-glucosamina (NAG), los cuales le otorgan soporte, estabilidad y gran resistencia (Sastoque-Cala, 2005). La quitina es considerada el segundo polímero de mayor abundancia en la naturaleza, ya que está ampliamente distribuido y se encuentra principalmente en organismos como crustáceos e insectos. (Lucas-Bautista et al., 2019). Así pues, este biopolímero es sintetizado por una gran diversidad de organismos desde hongos, bacterias, levaduras y plantas hasta artrópodos y humanos (Kumar et al., 2018). A pesar de la estabilidad que le confiere la estructura al polímero frente a la temperatura y deterioro por razones químicas, la quitina es susceptible a las enzimas de tipo glucósido-hidrolasas denominadas quitinolíticas, que actúan hidrolizando los enlaces  $\beta$ -1,4 de las unidades de N-acetil-D-glucosamina. En términos de patología vegetal, estas enzimas son importantes porque suponen un mecanismo de defensa para los cultivos frente a una infección invasora de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* (Lucas-Bautista et al., 2019). Por este motivo, la búsqueda de organismos productores de este tipo de enzimas hidrolíticas es interesante en la agricultura, para ayudar a combatir tanto plagas de insectos como complejos fúngicos de forma más sostenible en comparación con los fungicidas y fitosanitarios químicos existentes.

La evaluación de la actividad quitinasa se llevó a cabo con la finalidad de cumplir el segundo objetivo específico del trabajo, permitiendo dar el primer paso en el reconocimiento de las posibles cepas de la colección que pudieran inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *B. cinerea* a través de la actividad enzimática evaluada. En la Tabla 7 se muestra la ausencia o presencia de la actividad quitinasa en la colección de trabajo, representadas con el número cero y uno, respectivamente. En la Figura 13 se muestran fotos de las cianobacterias que presentaron actividad quitinolítica positiva.

TABLA 7- RESULTADO DETERMINACIÓN ACTIVIDAD QUITINASA

Código	Cianobacteria	Actividad quitinolítica
37C	<i>Oscillatoria</i>	0
38C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	0
39C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	1
40C	<i>Trichormus</i>	0
41C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	1
42C	<i>Nodosilinea</i>	0
43C	<i>Leptolyngbya</i>	0
44C	<i>Characiochloris</i>	0
45C	<i>Trichormus</i>	0
46C	<i>Klebsormidium</i>	1

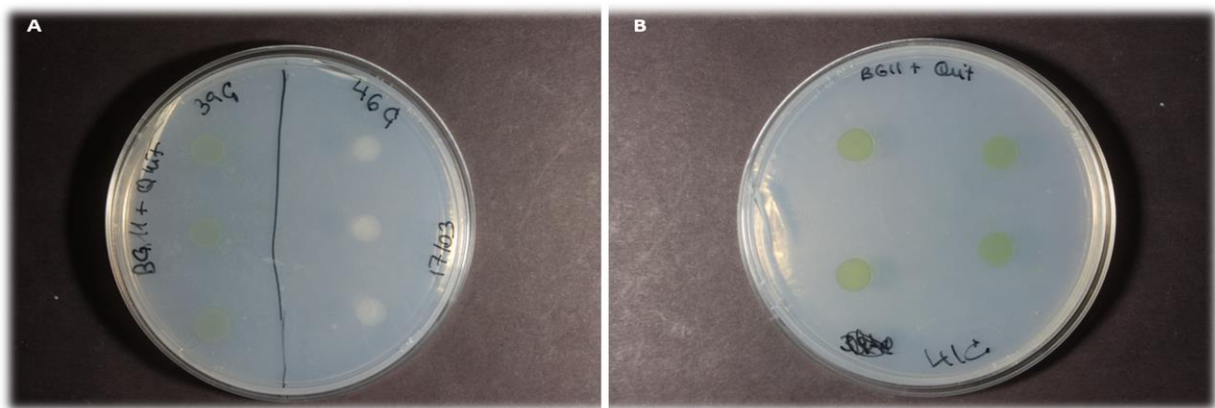


FIGURA 13- A: ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA CIANOBACTERIAS 39C Y 46C. B: ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA DE LA CIANOBACTERIA 41C

En este trabajo, mostraron actividad quitinasa las cepas bajo la denominación 39C, 41C y 46C, de las cuales sólo está identificado el género de la cianobacteria 46C (*Klebsormidium*), mientras que la 39C y 41C no han podido ser caracterizadas.

El estudio de la actividad quitinasa en términos de control biológico ha sido ampliamente estudiado. De esta forma, se han encontrado diversos microorganismos con bastante potencial en la producción de estas enzimas hidrolíticas, bacterias como *Bacillus pumilus*, hongos como *Aspergillus flavus* y actinomicetos como *Streptomyces pratensis* (Kumar et al., 2018). A pesar de que las cianobacterias son tan interesantes por ser, junto a las microalgas, buenas fuentes de compuestos bioactivos en diferentes ámbitos, las propiedades antifúngicas de sus metabolitos han sido poco estudiadas, sin embargo, se conoce que las enzimas hidrolíticas pueden jugar un papel fundamental para el control biológico de patógenos (Gupta et al., 2013).

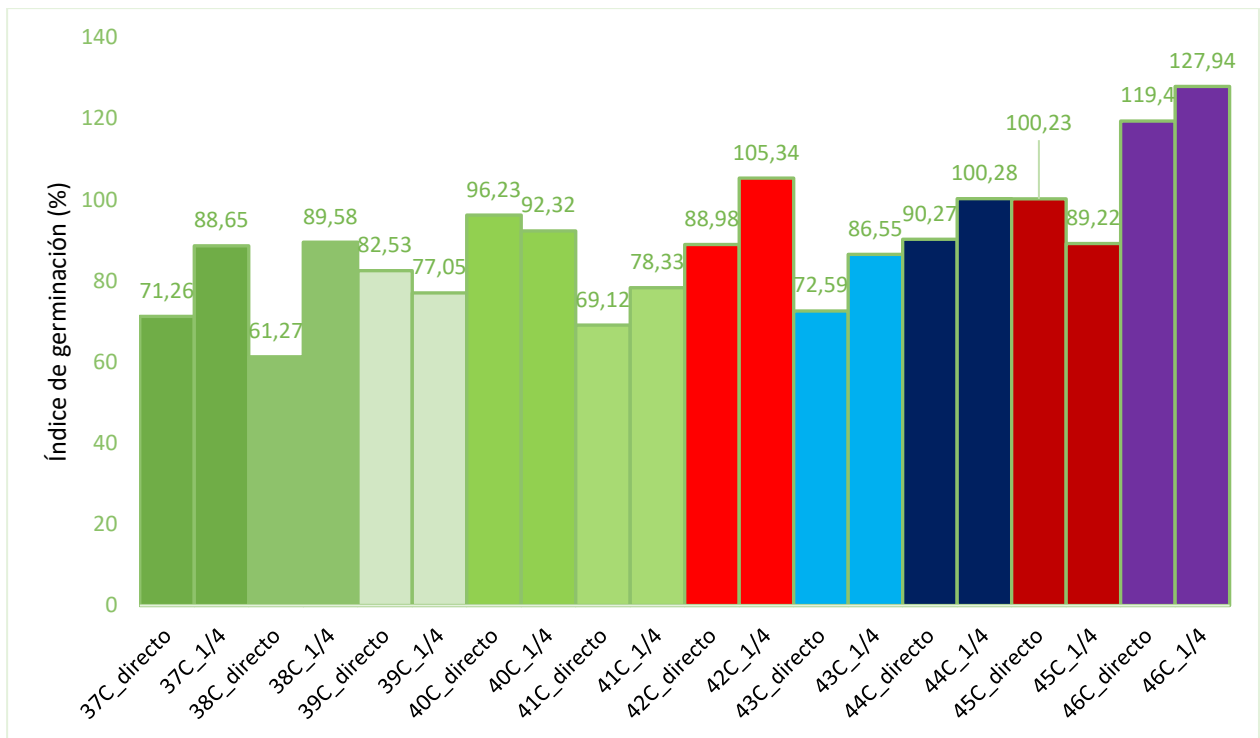
En la línea de investigación de enzimas hidrolíticas secretadas por cianobacterias en relación a la inhibición de patógenos vegetales, encontramos trabajos como el desarrollado por Prasanna et al. (2008) donde se evaluaron los efectos inhibitorios frente a diferentes hongos fitopatógenos a partir de extractos de cianobacterias pertenecientes al género *Anabaena*. En dicho trabajo se determinó el potencial de varias cepas en este sentido, encontrando homólogos de la quitinasa que funcionaron frente a varios patógenos. Así mismo, en el artículo elaborado por Prasanna et al. (2013) encontraron una gran actividad quitinolítica por parte de *Anabaena laxa* y *Anabaena variabilis* responsable de la inhibición mostrada frente a *Fusarium moniliforme* y *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. En estudios anteriores de los mismos autores, y relacionado con lo indicado por Gupta et al. (2010), se determinó la posible relación directa entre la producción de enzimas hidrolíticas, como los homólogos de quitinasas, y la inhibición de hongos fitopatógenos por parte de la cianobacteria *Calothrix* sp.

En definitiva, a pesar de lo poco explorado que está el papel de las enzimas hidrolíticas relacionadas con la quitina por parte de las cianobacterias, no cabe duda de la necesidad de continuar investigando esta propiedad, por su mayor interés para la aplicación en la agricultura como agentes inhibidores de hongos fitopatógenos importantes como *Botrytis cinerea*, además de actuar como compuestos que pueden reforzar la inmunidad de las plantas (Kumar et al., 2018).

#### 4.3. Efecto fitoestimulante *in vitro*

Uno de los objetivos específicos del presente trabajo consistió en determinar la capacidad fitoestimulante o fitotóxica de la colección de trabajo mediante un ensayo de germinación. Para ello, la metodología empleada fue el test de Zucchini (Zucchini et al., 1981), usado para la evaluación de la germinación y el crecimiento de la radícula en semillas de referencia (berro) y, en este caso, probando el posible potencial fitoestimulante de la colección. Las cianobacterias fueron aplicadas a través de un tratamiento directo, sin dilución, e indirecto, con una dilución  $\frac{1}{4}$ . En la Figura 14 se representan los efectos recogidos por los distintos extractos sonicados de cada una de las cianobacterias en función del tratamiento.





**FIGURA 14- EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE LAS CIANOBACTERIAS DE TRABAJO, EN TRATAMIENTO DIRECTO Y DILUIDO, SOBRE LA GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE BERRO**

La adaptación del ensayo de Zucchini a diferentes extractos y objetos de estudio, como en este caso, extractos de cianobacterias sobre semillas de berro, ha hecho que se determinen unos valores de índice de germinación de referencia para considerar al microorganismo estudiado como fitotóxico, fitoestimulante o que no presentan efectos tóxicos ni estimulantes sobre la planta estudiada. Así, valores de índice de germinación por encima del 80% se consideran ausentes de fototoxicidad, aunque tampoco especialmente fitoestimulantes. Valores por debajo del 80%, expresan una posible fitotoxicidad por parte del elemento estudiado. Por el contrario, un índice de germinación que se sitúe por encima del 100% permite considerar a la cianobacteria como promotora del crecimiento vegetal (fitoestimulante) (Zucchini et al., 1981).

En vista de los resultados representados en la Figura 14, de manera global se puede decir que las cianobacterias, tanto en tratamiento directo como indirecto (dilución 1/4), presentaron valores entre el 60 y 97%, salvo algunas excepciones. Esto indica que la mayoría de los extractos de cianobacterias, no son considerados excesivamente fitotóxicos, pero también se descarta la consideración del efecto fitoestimulante. Además, el índice de germinación obtenido en las cepas 37\_C directo (71,26%), 41C\_1/4 (78,33%) y 44C diluidas, en la (%) y 42C\_directo (72,59%) mostraron los valores más bajos, por lo que se consideró que su aplicación ejercía un efecto fitotóxico sobre las semillas de referencia, destacando la cianobacteria 38C\_directo, por presentar el mayor efecto fitotóxico al mostrar el menor índice de germinación (61,27%).

Por el contrario, las excepciones fueron 42C\_1/4, 44C\_1/4, 45C\_directo, y 46C en sus dos tratamientos, las cuales mostraron índices de germinación entre los valores del 100 y 128%, por lo que

quedó comprobado su capacidad de fitoestimulación *in vitro*. De ellas, se destaca que los mayores índices de germinación presentados fueron asociados a la cianobacteria 46C, ya que en el tratamiento directo alcanzó un valor de IG de 119% y, en el caso del tratamiento diluido, este fue casi del 128%.

En cuanto al tipo de tratamiento, no es evidente la existencia de una correlación entre la aplicación del extracto directo o del extracto diluido, de forma que el efecto provocado por la cianobacteria parece ser resultado de la propia cepa analizada. Esto se puede argumentar observando cada cepa y tratamiento, por ejemplo, en el caso de las cianobacterias 37C, 41C, 42C, 43C, 44C y 46C presentaron índices de germinación mayores en el tratamiento diluido, lo que puede sugerir que, al ser diluidas, el compuesto o los compuestos que pueden ejercer efecto negativo sobre el crecimiento de las semillas se encuentra en menor concentración y, por tanto, los índices son mayores respecto al extracto directo. Por el contrario, en el caso de las cianobacterias 39C, 40C y 45C, los valores de germinación mayores fueron obtenidos con el tratamiento directo, lo que plantea la hipótesis anterior de forma invertida, ya que, al diluir los componentes con el tratamiento diluido ¼, estos se encuentran en menor proporción y, por ende, el efecto estimulante se ve perjudicado.

Debido a las características inherentes de las cianobacterias, estas se pueden utilizar en la rama de la biotecnología que busca el reemplazo a las tecnologías contaminantes existentes por tecnologías menos dañinas, y el objetivo de uso de este tipo de microorganismos busca mejorar la producción sostenible de alimentos, metabolitos y fuentes de energías renovables (Singh et al., 2017). Esto ha hecho que las cianobacterias sean calificadas como microorganismos altamente beneficiosos y ampliamente reportados en diferentes tipos de suelo y situaciones ecológicas adversas (Garlapati et al., 2019).

Las cianobacterias se han utilizado como biofertilizantes y agentes promotores del crecimiento vegetal en diferentes cultivos como arroz, garbanzo, maíz y trigo (Maylan et al., 2020) gracias a diferentes compuestos de interés sintetizados por las mismas. En un estudio llevado a cabo por Shariatmadari et al. (2011) con diferentes extractos de cianobacterias, comprobaron que la aplicación de *Anabaena vaginicola* y *Nostoc calcicola* sobre cultivo de tomate, pepino y calabacín mostraban efectos positivos en la germinación y crecimiento de los mismos. Saadatnia y Riahi (2009) trabajaron con diferentes especies de *Anabaena* (*A. spiroides*, *A. variabilis*, *A. torulosa* y *A. osillarioides*) las cuales fomentaron una germinación más rápida de los cultivos respecto al control y, además, se incrementaron significativamente diferentes parámetros de crecimiento (peso de la planta, longitud de raíz, peso fresco y seco, etc.) sobre el cultivo de arroz. En el mismo orden de ideas, Jäger et al., (2010) investigaron el potencial de cepas de cianobacterias y microalgas secretoras de hormonas, basándose en la actividad y contenido de citoquininas y auxinas, llegando a la conclusión de que existía una correlación de estas hormonas con la mejora en el crecimiento sobre el cultivo de maíz. Por otro lado, surgen investigaciones centradas en los compuestos que pueden aportar beneficios a los cultivos haciendo de las cianobacterias agentes promotores del crecimiento vegetal y, a su vez, como biofertilizantes. Por ejemplo, Singh (2014) hizo una revisión sobre la producción de varios metabolitos por parte de las cianobacterias, concluyendo que la aplicación de extractos de cianobacterias mejoró las condiciones físico-químicas en suelos salinos y, con ello, el crecimiento de los cultivos. A la vista de los resultados obtenidos en el trabajo y la información aportada por la literatura científica, se puede

concluir el futuro prometedor de las cianobacterias en la agricultura como agentes promotores del crecimiento vegetal. Esto es debido a que presentan propiedades multifuncionales a nivel agronómico como facilitar la absorción de nutrientes o mejorar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, a pesar de las múltiples funciones que pueden ejercer en los sistemas agrícolas, el área de estudio sobre cianobacterias es limitado, por lo que no debe cesar la investigación sobre las mismas.

#### 4.4. Efecto antagonista in vitro frente a la enfermedad del moho gris

El presente ensayo *in vitro* consistió en comprobar el efecto antagonista por parte de la colección de cianobacterias frente a *Botrytis cinerea*, a través del protocolo de enfrentamiento dual. En este caso, la interpretación de los resultados consistió en la observación del efecto biopesticida a través de la aparición de los halos de inhibición en las placas y, para la cianobacteria bajo la denominación 39C, que se determinó como una cepa de interés, se realizó la medida del diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia de la cianobacteria respecto a la placa control que contenía a *B.cinerea*. Los resultados del ensayo se recogen en la Tabla 8.

**TABLA 3- RESULTADOS DEL ENSAYO DE ANTAGONISMO IN VITRO FRENTE A B.CINEREA**

<b>Código</b>	<b>Cianobacteria</b>	<b>Inhibición</b>
37C	<i>Oscillatoria</i>	Ausencia
38C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	Ausencia
39C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	Detectada
40C	<i>Trichormus</i>	Ausencia
41C	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	Detectada
42C	<i>Nodosilinea</i>	Ausencia
43C	<i>Leptolyngbya</i>	Ausencia
44C	<i>Characiochloris</i>	Ausencia
45C	<i>Trichormus</i>	Ausencia
46C	<i>Klebsormidium</i>	Detectada

Las cianobacterias en las que se detectó capacidad supresiva frente al hongo fitopatógeno fueron las mismas que presentaron actividad quitinolítica (Tabla 7), denominadas bajo los códigos 39C, 41C y 46C. En la Figura 15 se muestran las fotos correspondientes al carácter antagonista presentado.

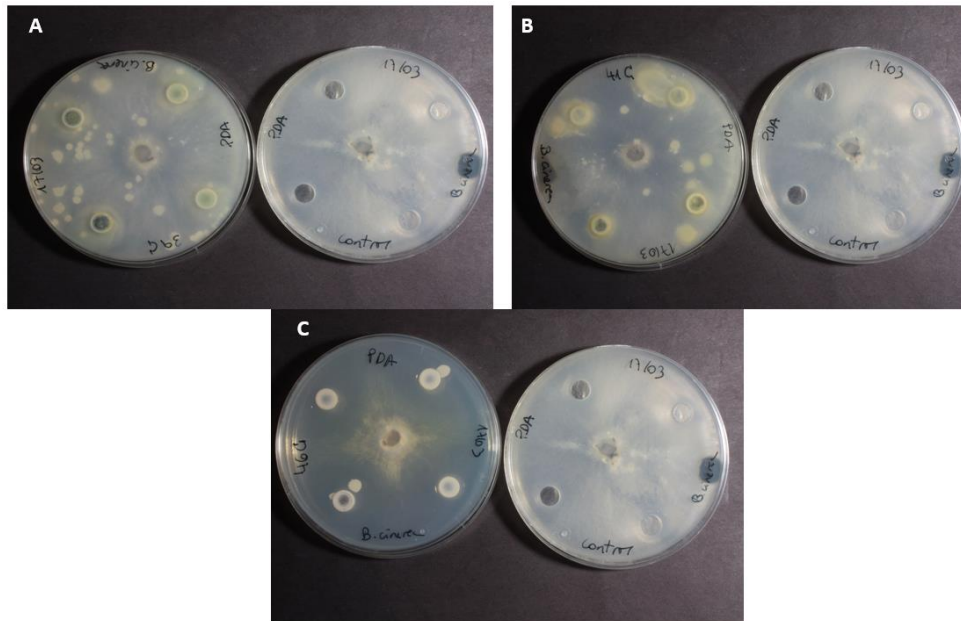


FIGURA 15- ENFRENTAMIENTO DUAL *IN VITRO* FRENTE *B. CINEREA*. A: 39C ; B: 41C ; C: 46C

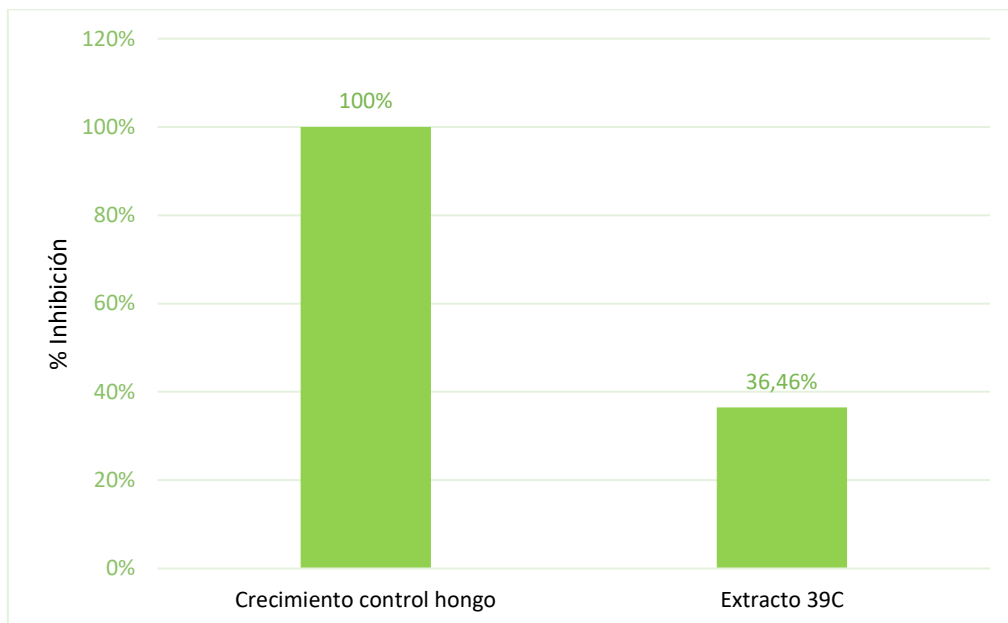


FIGURA 16- INHIBICIÓN DE LA CIANOBACTERIA 39C EN COMPARACIÓN CON EL CONTROL DEL HONGO *BOTRYTIS CINEREA*

En la Figura 16 se representa el porcentaje de inhibición exhibido en el enfrentamiento dual *in vitro* por parte de la cianobacteria 39C. Como se puede observar, el crecimiento del hongo fitopatógeno es total en ausencia de la cianobacteria antagonica, lo que denota la inhibición debida al microorganismo ensayado. Se considera que por encima del 20% de inhibición un microorganismo es antagonico y, en este caso, el extracto de la cianobacteria 39C mostró un porcentaje de inhibición del 36%, comprobando así el efecto biopesticida de la cianobacteria sobre *Botrytis cinerea*. Además, la verificación de la actividad de inhibición se realizó sobre la 39C por ser una cianobacteria cuyo género

no ha podido ser identificado a pesar de haber sido estudiado, por lo que pareció interesante trabajar con ella para el ensayo *in vivo*, puesto que abre la posibilidad de seguir investigando en su caracterización.

El uso de microorganismos como agentes de control biológico (ACBs) está siendo una alternativa prometedora hacia un futuro encaminado a la eliminación de los pesticidas químicos, así como de los fertilizantes, ya que muchos de los microorganismos considerados ACBs, también actúan como promotores del crecimiento vegetal. Los biopesticidas pueden actuar mediante diferentes mecanismos, entre los que destacan la competencia por sustratos y espacio y la producción de sustancias con efecto antagónico sobre el agente patógeno (Kumar, 2018). A pesar de los diversos estudios publicados acerca de las interacciones dadas entre las plantas y los microorganismos, es cierto que no se conoce el mecanismo que desencadena la protección frente al estrés biótico inducido por hongos fitopatógenos por parte de las cianobacterias (Heil y Bostock, 2002). De hecho, surge la hipótesis de que la aplicación de cianobacterias parece elevar la producción de enzimas y compuestos relacionados con la defensa en las plantas (Prasanna et al., 2013).

En lo referente a los compuestos bioactivos de las cianobacterias, se han descrito diferentes capacidades antimicrobianas, antivirales, antibacterianas e incluso anticancerígenas. En términos de agricultura, la más interesante y con mayor auge en los últimos años es la antifúngica. Esto es así porque existe una diversidad de hongos fitopatógenos que causan la pérdida masiva de diferentes cultivos vegetales, hongos del suelo como *Sclerotinia sclerotiorum*, especies de *Fusarium* y *Pythium*; patógenos foliares, como es el caso de los agentes causantes del oídio; y hongos que causan la pudrición, incluso postcosecha, como *Botrytis cinerea* o las especies de *Colletotrichum* que causan la antracnosis (Righini y Roberti, 2019).

Como se mencionó anteriormente, las cianobacterias han sido menos explotadas que otros microorganismos en este ámbito. No obstante, se han empezado a utilizar diferentes extractos de cianobacterias que han mostrado una inhibición significativa, al menos de forma preliminar, *in vitro*, frente a hongos fitopatógenos de importancia. Así, encontramos que las especies más estudiadas pertenecen a los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria* y *Microcystis* (Righini y Roberti, 2019). Extractos de *Anabaena laxa* funcionaron contra distintos hongos y levaduras como *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* (Frankmölle et al., 1992). Así mismo, el extracto etanólico de *Microcystis aureginosa* exhibió capacidad antifúngica frente a ocho hongos saprófitos e, incluso, hongos que afectan a personas (Khalid et al., 2010). En la investigación llevada a cabo por Prasanna et al. (2008), los autores utilizaron cepas de *Anabaena* encontrando actividad antifúngica contra *Fusarium moniliforme* y *Alternaria solani* por parte de 23 y 17 cepas, respectivamente. En el mismo orden de ideas, se encontró que varias cepas de *Anabaena* y *Calothrix* inhibían el crecimiento de especies de hongos como *Fusarium* y *Rizhooctonia* (Righini y Roberti, 2019). En cuanto a *Botrytis cinerea*, existen precedentes de trabajos *in vitro* como el desarrollado por Plascencia-Tenorio et al. (2012) que trabajaron con el cultivo de la fresa y con cepas de bacterias, determinando que nueve cepas mostraron potencial biopesticida sobre el patógeno y, aún más, como agente preventivo de la enfermedad, ya que hicieron el muestreo tanto antes de la cosecha como post-cosecha. En el cultivo de mora, Calvo-Araya et al. (2012) trabajaron *in vitro* con 35 hongos filamentosos como posibles

antagonistas contra la enfermedad del moho gris, determinando que seis cepas de *Trichoderma* presentaron la mayor inhibición y, por tanto, fueron seleccionadas como potenciales agentes de control biológico contra *Botrytis cinerea*. En la misma línea de trabajo con hongos antagonistas del fitopatógeno, Memenza-Zegarra (2009) demostraron la capacidad de cepas de *Trichoderma viride* para inhibir a *B.cinerea* a través del micoparasitismo. Se ha de destacar que existen diversos estudios de agentes antagonistas frente a *B.cinerea*, sin embargo, las cianobacterias han sido relativamente poco usadas e investigadas.

En definitiva, teniendo en cuenta los estudios previamente descritos sobre el papel de las cianobacterias y su actividad antifúngica, se puede confirmar que hasta el momento los trabajos a este respecto han estado centrados fundamentalmente en géneros determinados y poco a poco se han ido descubriendo posibles compuestos implicados, como es el caso de enzimas hidrolíticas mencionadas en el apartado 4.2 (quitinasas), compuestos fenólicos, terpenoides, como noscomin de *Nostoc commune* que presentó inhibición incluso frente a bacterias, ácidos grasos, como el ácido hexadecanoico, y proteínas como las ficobiliproteínas, entre otros. Por lo tanto, queda mucha caracterización aún por realizar y trabajo posterior a la fase de laboratorio para corroborar el potencial que se intuye sobre este grupo microbiano.

#### 4.5. Evaluación del ensayo *in vivo*

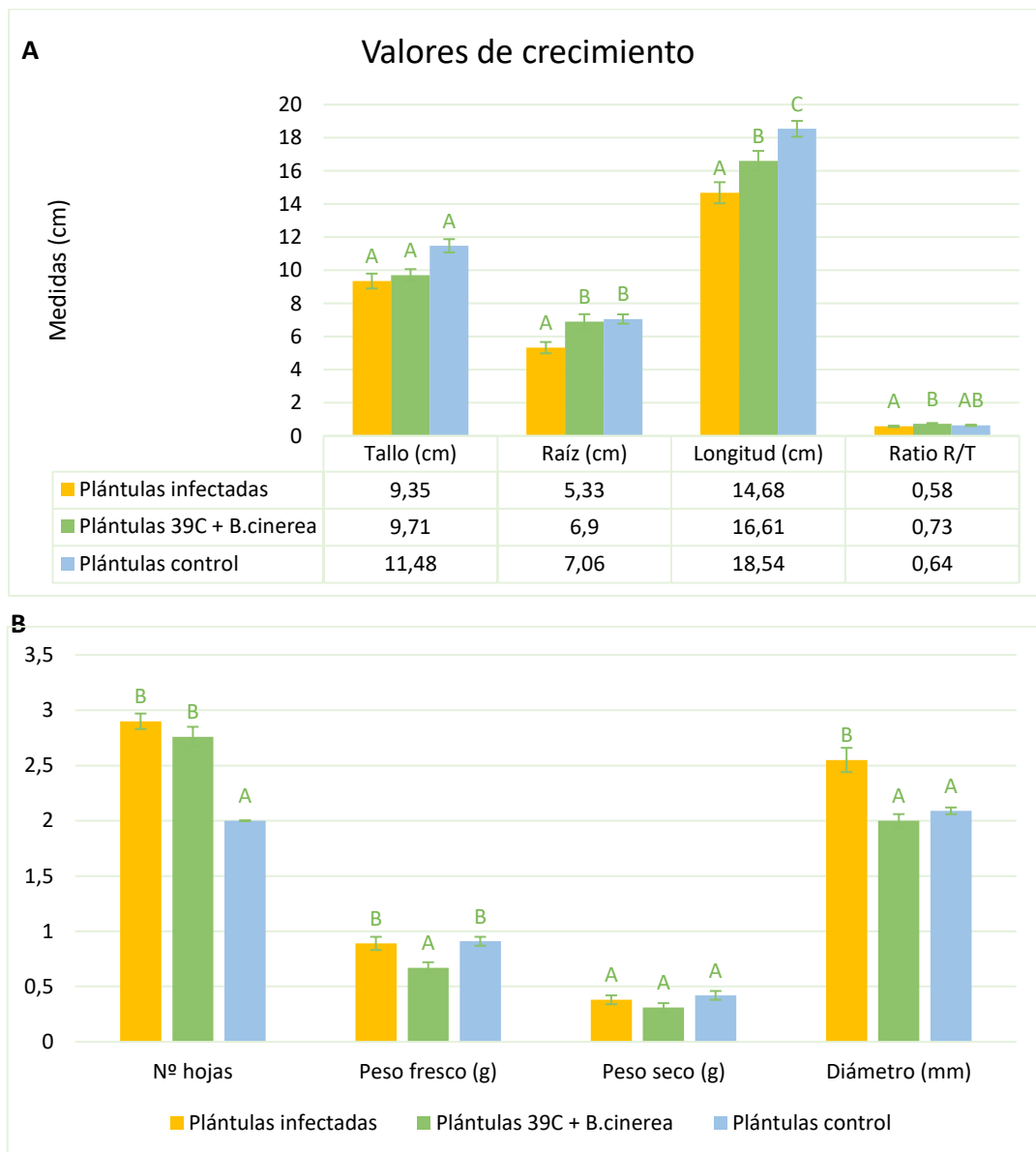
Como se viene desgranando, las cianobacterias juegan un papel fundamental como agentes promotores del crecimiento vegetal y son buenas candidatas para prevenir y/o remediar enfermedades fúngicas. Por ello, se hace evidente la necesidad de extrapolar los ensayos *in vitro* con buenos resultados a ensayos *in vivo* para aprovechar al máximo los papeles desarrollados por las cianobacterias, ya que suponen una gran alternativa para los sistemas agrícola sostenibles. Por tanto, en el presente trabajo se decidió realizar un ensayo *in vivo* para complementar el último objetivo específico y, de esta forma, finalizar el objetivo general.

A partir de los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se llegó a la conclusión de la importancia de la cianobacteria denominada bajo el código 39C, que mostró la capacidad de crecer tanto en medio sólido como líquido, presentó un índice de germinación del 87% en el tratamiento directo y, aún más, presentó actividad quitinasa positiva, así como antagonista frente a *B. cinerea* en condiciones *in vitro*. Por tanto, para determinar la posibilidad de que dicha cepa sea considerada como un potencial agente de control biológico y/o un agente con efectos bioestimulantes, se llevaron a cabo dos ensayos *in vivo* sobre cultivo de pepino (*Cucumis sativus*).

##### 4.5.1. Efecto biopesticida *in planta* por la cianobacteria seleccionada sobre *Botrytis cinerea*

En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* sobre plántulas de pepino que fueron previamente inoculadas con el extracto de la cianobacteria 39C y, posteriormente, pulverizadas con esporas del agente fitopatógeno. Además, se recogen los resultados de plantas que no se inocularon con la cianobacteria de interés, pero sí fueron infectadas con *Botrytis cinerea* y plantas control que fueron crecidas sin extracto de cianobacteria y sin *Botrytis cinerea* (Figura 17).

En este ensayo se evaluaron los parámetros de crecimiento en los vegetales (longitud de raíz, tallo, número de hojas, peso seco y fresco, diámetro y relación tallo/raíz) cuando alcanzaron el estadio de plántula, es decir, tras la aparición de las primeras hojas verdaderas, tanto en las plantas control como en las plantas infectadas y en las plantas crecidas con extracto de la cianobacteria e infectadas con *Botrytis cinerea*, para cada una de las cuales se ha utilizado el promedio de los parámetros medidos de las 30 plántulas cultivadas bajo los diferentes tratamientos.



**FIGURA 17- REPRESENTACIÓN GRÁFICA VALORES DE CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS INFECTADAS CON BOTRYTIS, TRATADAS CON 39C MÁS B. CINEREA Y PLÁNTULAS CONTROL. A: LONGITUD TOTAL, TALLO, RAÍZ, Y RATIO R/T . B: DIÁMETRO, PESO SECO, PESO FRESCO Y NÚMERO DE HOJAS.**

Como se puede observar en la Figura 17A, los resultados son los esperados, ya que todos los parámetros evaluados son mayores en las plantas sin ningún tipo de tratamiento (control) y, además,

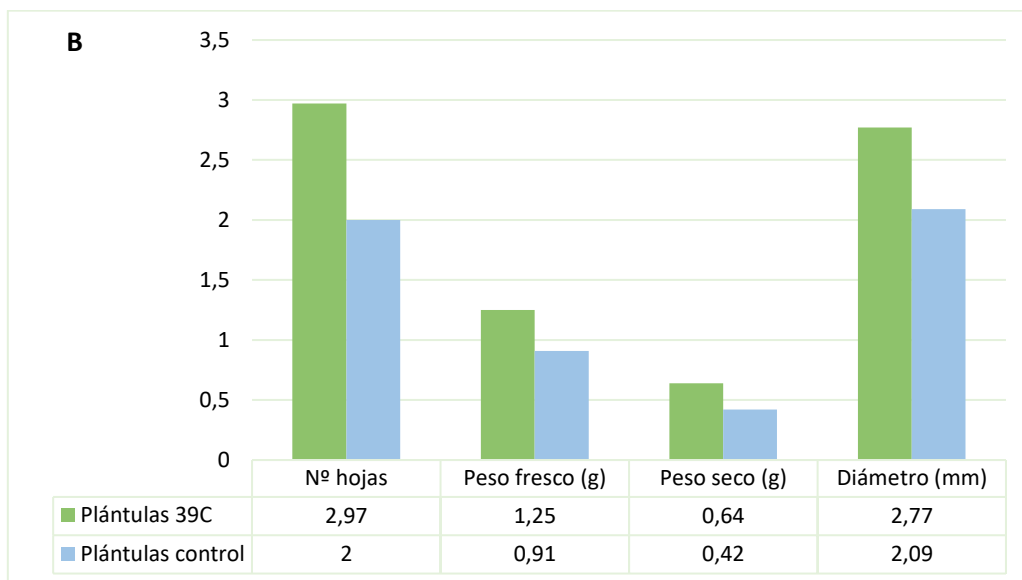
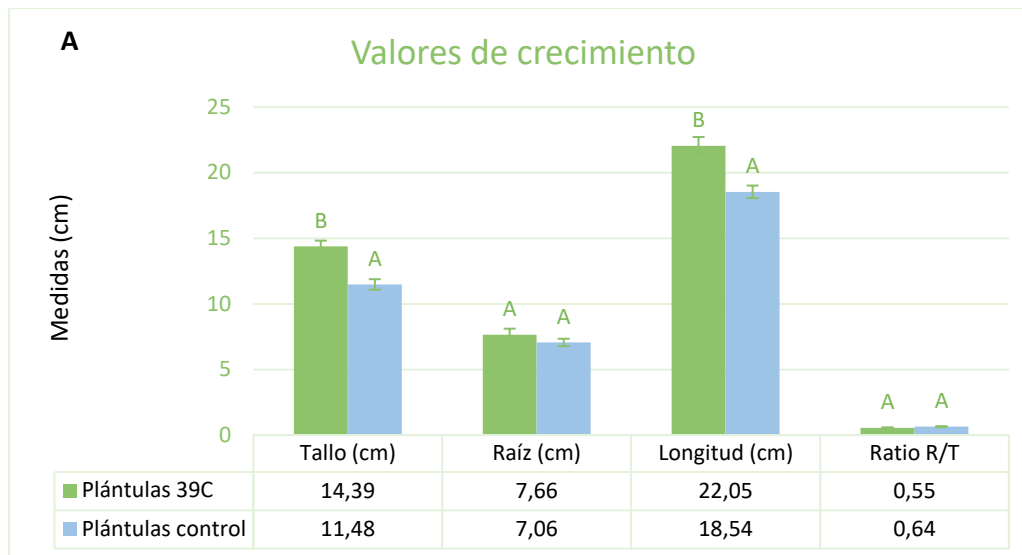
las plantas tratadas con la cianobacteria e infectadas con *Botrytis cinerea* poseen mayores medidas en comparación con las plantas tratadas solo con *Botrytis cinerea*, lo que sugiere en primera instancia, que la cianobacteria tiene efectos fitoestimulantes sobre el cultivo y/o efectos biopesticidas contra el agente fitopatógeno. Por el contrario, los resultados representados en la Figura 17B muestran mayores parámetros de diámetro de tallo y número de hojas en las plántulas infectadas con *Botrytis cinerea* en comparación con las demás plantas. Respecto al peso fresco y al peso seco, las diferencias no fueron significativas entre los tres tipos de plantas, incluso, aquellas tratadas con la cianobacteria e infectada con el hongo, presentaron menor peso. A pesar de los resultados, no se puede descartar que la cianobacteria seleccionada no deba seguir siendo estudiada para su caracterización y poder encontrar el compuesto que conlleva a la inhibición de *B. cinerea*

En los últimos años se han desarrollado numerosas formulaciones basadas en el empleo de agentes de control biológico de todo tipo frente a la enfermedad que causa *Botrytis cinerea*, debido a las dificultades asociadas al uso del control químico y a la gran demanda para la reducción del uso de pesticidas (Nico et al., 2016). Algunos de los productos basados en microorganismos utilizados a este respecto a nivel comercial son Botector®, contiene como compuesto activo la levadura *Aureobasidium pullulans*; Serenade®Max, contiene una cepa de *Bacillus subtilis* que, además, inhibe la infección de *Botrytis* en diferentes cultivos como fresa, kiwi, tomate, pepino y pimiento, gracias al repertorio de compuestos antifúngicos que posee como es el caso de diferentes clases de lípidos que causan el colapso de la membrana de los hongos, permitiendo la eliminación del patógeno; Actinovate®, es un compuesto comercial basado en el actinomiceto *Streptomyces lydicus*, actúa mediante competición de sustrato, parasitismo directo y secreción de compuestos antifúngicos como enzimas hidrolíticas del tipo quitinasas, peroxidasas y glucanasas (Nico et al., 2016). Sin embargo, el mundo de las cianobacterias no está tan desarrollado de forma general, ya no solo contra este hongo fitopatógeno, sino como antagonistas de otros patógenos vegetales. Algunos ejemplos ya han sido mencionados en anteriores apartados, destacando que las especies de *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Calothrix* y *Nostoc* han sido probadas como posibles agentes de control biológico contra *Botrytis cinerea* por presentar un carácter antagónico. A pesar de que este grupo de microorganismos no haya sido tan estudiado, no debe de cesar la investigación en ellos, ya que se han reportado como microorganismos multifuncionales en el sector de la agricultura y, lo más interesante, es que representan una alternativa biológica sostenible al reemplazo de las prácticas existentes.

#### 4.5.2. Efecto fitoestimulante *in planta* por la cianobacteria seleccionada

Para finalizar el ensayo *in vivo*, era interesante comprobar el posible efecto fitoestimulante del extracto de la cianobacteria de interés, 39C, por lo que se midieron los mismos parámetros que en el caso anterior, pero sin ningún tipo de infección por patógenos. Así pues, los resultados recogidos para este apartado pertenecen a las plantas control y a plantas solamente tratadas con el extracto de la cianobacteria (Figura 18).





**FIGURA 18- REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS VALORES DE CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS CONTROL (SIN TRATAMIENTO) Y PLÁNTULAS TRATADAS CON EL EXTRACTO DE CIANOBACTERIA 39C. A: LONGITUD TOTAL, TALLO, RAÍZ Y RATIO R/T. B: DIÁMETRO, NÚMERO DE HOJAS, PESO SECO Y PESO FRESCO.**

A pesar de que la cianobacteria de interés (39C) presentó un índice de germinación en el ensayo de Zucconi del 82%, valor que no indica un efecto fitoestimulante, pero tampoco fitotóxico, los datos representados en la Figura 14 resultaron ser bastante positivos. Como se puede observar, todos los parámetros analizados (excepto el ratio R/T) fueron mayores en las plántulas tratadas con el extracto de la cianobacteria que en las plántulas control, sugiriendo así que la cianobacteria utilizada para el ensayo *in vivo* puede tener efectos fitoestimulantes en el crecimiento del cultivo de pepino empleado. No obstante, como se ha mencionado en apartados anteriores, la cianobacteria de interés no se ha podido identificar y, este motivo, da pie a seguir trabajando e investigando acerca de este microorganismo y sus propiedades o compuestos que hacen que resulte beneficiosa para la planta.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede confirmar que las cianobacterias pueden formar parte del grupo de microorganismos considerados agentes promotores del crecimiento de plantas por ser organismos multifuncionales a nivel agronómico. El impedimento para su posible

aplicación en agricultura resurge del conocimiento limitado acerca del tipo de interacción o mecanismos que presentan. Sin embargo, dada la importancia que están adquiriendo los microorganismos bioestimulantes en la agricultura, los investigadores están tratando de descubrir algunos de los componentes implicados en la fitoestimulación. Por ejemplo, Hussain y Hasnain (2011) estudiaron la secreción de hormonas, centrándose en un sistema de citoquininas y auxinas para observar el crecimiento en condiciones de campo, determinando una correlación positiva entre las hormonas segregadas procedentes de las cianobacterias y los parámetros de crecimiento de las plantas. Osman et al. (2010) estudiaron el potencial de *Nostoc etophyllum* y *Oscillatoria augustissima* como biofertilizantes, revelando que la inoculación sobre guisante aumentó el valor nutricional y el ahorro del 50% en fertilizantes químicos. Además, Singh y Datta (2007) inocularon *Anabaena variabilis* en arroz, observando que la cianobacteria fijadora de nitrógeno mejoró el crecimiento y el rendimiento del cultivo. Jäger et al., (2010) demostró que la inoculación de biomasa de cianobacterias y microalgas mejoró la respuesta en estudios de regeneración de maíz. Hormonas de crecimiento secretadas por la cianobacteria *Phormidium foveolarum* mejoraron el crecimiento y la germinación de las plántulas de arroz (Gupta y Lata, 1964).

En definitiva, las cianobacterias, y los numerosos hábitats que son capaces de colonizar, son una fuente de bioprospección interesante desde el punto de vista agrobiotecnológico, ya que se postulan como potenciales agentes de control biológico con capacidad fitoestimulante y biopesticida frente a fitopatógenos de gran repercusión económica, lo cual podrá además trascender en aplicaciones mucho más sostenibles a nivel ambiental.

## 5. CONCLUSIONES

A continuación, se recogen las principales conclusiones extraídas tras la realización de este trabajo:

- I. Las cepas de cianobacterias muestran un nivel de viabilidad alto en medio BG11 tras una conservación a largo plazo mediante congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , siendo el formato líquido el que mejor porcentaje de recuperación de cepas permite.
- II. Las cianobacterias ensayadas en el presente trabajo no presentan, en general, efecto fitotóxico para su aplicación en semillas. Además, la concentración de extracto aplicado, en este caso, es irrelevante, ya que el tratamiento diluido y concentrado no presentaron diferencias significativas.
- III. La actividad quitinasa encontrada en la colección de cepas fue escasa, no obstante, existe una relación entre las cepas con potencial quitinolítico y aquellas que mostraron carácter supresivo *in vitro* frente al hongo fitopatógeno ensayado.
- IV. El ensayo *in vivo* demostró el potencial de la cianobacteria 39C como agente de control biológico frente al agente causal del moho gris, *Botrytis cinerea*, así como promotor del crecimiento vegetal, según los parámetros de crecimiento y producción vegetal estudiados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, L., Asiedu, S. K., Prithiviraj, B., & Schilder, A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol science and technology*, 29(3), 207-228.
- Acosta Ovallos, A. K. (2019). Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander. (tesis de grado). Universidad de Santander
- Allen, M. M., & Stanier, R. Y. (1968). Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *Microbiology*, 51(2), 203-209.
- Alvarez, A. L., Weyers, S. L., Goemann, H. M., Peyton, B. M., & Gardner, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: a critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research*, 54, 102200.
- Anahas, A.M.P.; Muralitharan, G. (2018). Characterization of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production based on fatty acid content analysis and hydrocarbon production. *Energy Conversion and Management*, 157, 423–43
- Arrebola, D. F. A., & Fernández, L. A. R. (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos Autores: Daniel Francisco Arencibia Arrebola<sup>1</sup>, Luis Alfredo Rosario Fernández<sup>2</sup>, Rafael Gámez Menéndez<sup>1</sup>. Instituciones: Centro de Productos Naturales (CPN, CNIC), Centro de Química Farmacéutica (CQF) 2. *Instituciones: Centro de Productos Naturales (CPN, CNIC), Centro de Química Farmacéutica (CQF), 2.*
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., & Höfte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11), 1147-1156
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., ... & Pugin, A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1118-1128.
- Bautista-Baños, S. (2006). El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 8(1), 1-6.
- Blank, C. E., & Sanchez-Baracaldo, P. (2010). Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria—a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology*, 8(1), 1-23.
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of applied phycology*, 25(3), 743-756.

- Calvo-Araya, J. A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S., & Orozco-Rodríguez, R. (2012). Isolation and in vitro evaluation of antagonists to *Botrytis cinerea* in blackberry. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 225-231.
- Castenholz, R. W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J. B., Itegan, I., & Hoffmann, L. (2001). Phylum BX. cyanobacteria. En: *Bergey's manual® of systematic bacteriology*. Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (eds). Springer, New York, NY,
- Chaves, N., & Wang, A. (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía costarricense*, 28(2), 73-85.
- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., & Yu, Z. (2008). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnology letters*, 30(5), 919-923.
- De Morais, M. G., Vaz, B. D. S., de Morais, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed research international*, 2015.
- Díaz, B., Susan, V. R., & Castiel, A. F. (2014). Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. En: *Biotecnología y medioambiente* (pp. 291-306). Editorial Ephemera.
- Dickinson, M. (2004). *Molecular plant pathology*. Garland Science.
- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., & Mari, M. (2015). Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*, 81, 8-14.
- Esteves-Ferreira, A. A., Corrêa, D. M., Carneiro, A. P., Rosa, R. M., Loterio, R., & Araújo, W. L. (2013). Comparative evaluation of different preservation methods for cyanobacterial strains. *Journal of applied phycology*, 25(4), 919-929.
- Fedele, G., González-Domínguez, E., & Rossi, V. (2020). Influence of environment on the biocontrol of *Botrytis cinerea*: A systematic literature review. *How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases*, 61-82.
- Fillinger, S., & Elad, Y. (Eds.). (2016). *Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 189-216). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Fischer, W. W., Hemp, J., & Johnson, J. E. (2016). Evolution of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 44, 647-683
- Frankmölle, W. P., Larsen, L. K., Caplan, F. R., Patterson, G. M., KNÜBEL, G., Levine, I. A., & Moore, R. E. (1992). Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa* I. Isolation and biological properties. *The Journal of antibiotics*, 45(9), 1451-1457.
- Garlapati, D., Chandrasekaran, M., Devanesan, A., Mathimani, T., & Pugazhendhi, A. (2019). Role of cyanobacteria in agricultural and industrial sectors: an outlook on economically important byproducts. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(12), 4709-4721.

- Gonçalves, A. L. (2021). The use of microalgae and cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: a review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. *Applied Sciences*, *11*(2), 871.
- Gupta, A. B., & Lata, K. (1964). Effect of algal growth hormones on the germination of paddy seeds. *Hydrobiologia*, *24*(1), 430-434.
- Gupta, V., Prasanna, R., Natarajan, C., Srivastava, A. K., & Sharma, J. (2010). Identification, characterization, and regulation of a novel antifungal chitosanase gene (cho) in *Anabaena* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(9), 2769-2777.
- Gupta, V., Ratha, S. K., Sood, A., Chaudhary, V., & Prasanna, R. (2013). New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—prospects and challenges. *Algal research*, *2*(2), 79-97.
- Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of botany*, *89*(5), 503-512.
- Herrera, J. S., & Fernández, D. R. (2017). Uso potencial de microalgas para mitigar los efectos de las emisiones de dióxido de carbono. *Revista de investigación*, *10*(2), 153-164.
- Holland, H. D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *361*(1470), 903-915.
- Huertas, S. L. P., Casas, M. M. P., Morales, M. B., Moreno, Z. S., & Castaño, D. M. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova*, *4*(5), 39-49.
- Huheihe, M., Ishanu, V., Tal, J., & Arad, S. M. (2002). Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *Journal of biochemical and biophysical methods*, *50*(2-3), 189-200.
- Hussain, A., & Hasnain, S. (2011). Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(1), 85-92.
- Jäger, K., Bartók, T., Ördög, V., & Barnabás, B. (2010). Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. *South African Journal of Botany*, *76*(3), 511-516.
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource technology*, *102*(1), 186-193.
- Kaufman, A. J., Johnston, D. T., Farquhar, J., Masterson, A. L., Lyons, T. W., Bates, S., Anbar, D.A., Arnold, G.L., Garvin, J., & Buick, R. (2007). Late Archean biospheric oxygenation and atmospheric evolution. *Science*, *317*(5846), 1900-1903.

- Khalid, M. N., Shameel, M., Ahmad, V. U., Shahzad, S., & Leghari, S. M. (2010). Studies on the bioactivity and phycochemistry of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophycota) from Sindh. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2635-2646.
- Kim, M. J., Shim, C. K., Ko, B. G., & Kim, J. (2020). Effect of the Microalga *Chlorella fusca* CHK0059 on Strawberry PGPR and Biological Control of Fusarium Wilt Disease in Non-Pesticide Hydroponic Strawberry Cultivation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28;30(5), 708-716.
- Kim, J. D. (2006). Screening of cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy soil for antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 34(3), 138-142.
- Klatt, J. (2015). Photosynthesis and sulfur oxidation in microbial mats: Unravelling the role of versatile cyanobacteria in ancient ocean analogues (tesis doctora), Universität Bremen.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 845.
- Kruse, O., & Hankamer, B. (2010). Microalgal hydrogen production. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 238-243.
- Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2018). Chitinases—potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. *Agriculture*, 8(7), 88.
- Kumar, V.V. (2018). Biofertilizers and biopesticides in sustainable agricultura. In: Meena, V.S. (Ed.), *Role of rhizospheric microbes in soil*, Volume 1: Stress management and agricultural sustainability, Springer, Singapore, pp. 377– 398
- Landa, B. B., Hervás, A., Bettiol, W. y Jiménez-Díaz, R. M. (1997). Antagonistic activity of Bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25(4), 305-318
- Lian, J., Wijffels, R.H., Smidt, H., Sipkema, D. (2018). The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae, *Microbial of Biotechnology*, 11(5), 806–818.
- Lozano, E. F., Lobato, C. V., & Piqueres, J. M. V. (2014). *Bioteconología de microalgas*. CEPISA y Autores.
- Lubiana, K. M. F. (2014). Microalgas: ecología, biodiversidade e importância. *IV Botânica no Inverno*, n.
- Lucas-Bautista, J. A., Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., & Gómez-Ramírez, M. (2019). Determinación de quitina en hongos postcosecha y de quitinasas en frutos de papaya “Maradol”. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37, 1-7.
- Lucena, E. (2008). Aspectos sanitarios de las cianotoxinas. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 8, 291-302.
- Luna, L. M. G. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista cubana de química*, 19(2), 3-20.

- Nicot, P. C., Stewart, A., Bardin, M., & Elad, Y. (2016). Biological control and biopesticide suppression of Botrytis-incited diseases. En: *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 165-187). Springer, Cham.
- Matos, Â. P. (2017). The impact of microalgae in food science and technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(11), 1333-1350.
- Malyan, S. K., Singh, S., Bachheti, A., Chahar, M., Sah, M. K., Narender, Yavad, N.A., Kumar, A., & Kumar, S. S. (2020). Cyanobacteria: a perspective paradigm for agriculture and environment. En: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 215-224). Elsevier.
- Memenza-Zegarra, M. E. (2009). Control biológico in vitro de Botrytis cinerea (Pers) mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (*Vitis vinifera*).
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., & Arévalo, A. (2013). Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34(1-2), 129-149.
- Mussnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology*, 150(1), 51-56.
- Osman, M. E. H., El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., & Gheda, S. F. (2010). Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biology and fertility of soils*, 46(8), 861-875.
- Özçimen, D. (2018). Chlorella protothecoides mikroalg yağının Botrytis cinerea ve Aspergillus niger küflerine karşı antifungal etkisinin incelenmesi. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 15(2), 45-52.
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Velez, D. (2020). Mechanisms of action of Bacillus spp.(Bacillaceae) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 112-125.
- Plascencia-Tenorio, R. I., Olalde-Portugal, V., Mena-Violante, H. G., Ceja-Torres, L. F., Venegas-González, J., Oyoque-Salcedo, G., & Angoa-Pérez, M. V. (2012). Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs Botrytis cinerea y Rhizopus stolonifer. *Ra Ximhai*, 8(3), 103-110
- Pochon, J., y Tardieux, P. (1962). *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Editions de la Tourelle, Saint Mandé, Francia
- Prasanna, R., Nain, L., Tripathi, R., Gupta, V., Chaudhary, V., Middha, S., Joshi, M., Ancha, R., & Kaushik, B. D. (2008). Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria—possible role of hydrolytic enzymes. *Journal of basic microbiology*, 48(3), 186-194.



- Prasanna, R., Chaudhary, V., Gupta, V., Babu, S., Kumar, A., Singh, R., ... & Nain, L. (2013). Cyanobacteria mediated plant growth promotion and bioprotection against Fusarium wilt in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, *136*(2), 337-353.
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, *3*(4), 89-100.
- Rastoll, M. J., Ouahid, Y., Martín-Gordillo, F., Ramos, V., Vasconcelos, V., & Del Campo, F. F. (2013). The development of a cryopreservation method suitable for a large cyanobacteria collection. *Journal of applied phycology*, *25*(5), 1483-1493.
- Raymond, J., & Segrè, D. (2006). The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science*, *311*(5768), 1764-1767.
- Renuka, N., Guldhe, A., Prasanna, R., Singh, P., & Bux, F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnology advances*, *36*(4), 1255-1273.
- Righini, H., & Roberti, R. (2019). Algae and cyanobacteria as biocontrol agents of fungal plant pathogens. En: *Plant Microbe Interface* (pp. 219-238). Springer, Cham.
- Righini, H., Baraldi, E., García Fernández, Y., Martel Quintana, A., & Roberti, R. (2019). Different Antifungal Activity of *Anabaena* sp., *Ecklonia* sp., and *Jania* sp. against *Botrytis cinerea*. *Marine drugs*, *17*(5), 299.
- Righini, H., Francioso, O., Di Foggia, M., Quintana, A. M., & Roberti, R. (2020). Preliminary Study on the Activity of Phycobiliproteins against *Botrytis cinerea*. *Marine drugs*, *18*(12), 600.
- Rippka, R., Waterbury, J. B., & Stanier, R. Y. (1981). Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles. En *The prokaryotes* (pp. 212-220). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Mechanisms of Action of Microbial Biocontrol Agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, *7*(12), 1045.
- Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (gray mold). En: *Postharvest decay* (pp. 131-146). Academic Press.
- Saadatnia, H., & Riahi, H. (2009). Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. *Plant, Soil and Environment*, *55*(5), 207-212.
- Santos, A., Sánchez, A., & Marquina, D. (2004). Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, *159*(4), 331-338.
- Sastoque-Cala, E. L. (2005). *Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador* (trabajo de grado). Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá.
- Schmid, B., Coelho, L., Schulze, P. S., Pereira, H., Santos, T., Maia, I. B., Reis, M., & Varela, J. (2022). Antifungal Properties of Aqueous Microalgal Extracts. *Disponibile en SSRN 4060858*.

- Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current opinion in biotechnology*, 21(3), 277-286.
- Shaaban, M. M. (2001). Green microalgae water extract as foliar feeding to wheat plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(6), 628-632.
- Shariatmadari, Z., Riahi, H., & Shokravi, S. (2011). Study of soil blue-green algae and their effect on seed germination and plant growth of vegetable crops. *Rostaniha* 12(2), 101-110.
- Singh, J. S. (2014). Cyanobacteria: a vital bio-agent in eco-restoration of degraded lands and sustainable agriculture. *Climate Change and Environmental Sustainability*, 2(2), 133-137.
- Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., & Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in microbiology*, 7, 529.
- Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., & Prasad, S. M. (2017). Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. *Frontiers in microbiology*, 8, 515.
- Singh, S., & Datta, P. (2007). Outdoor evaluation of herbicide resistant strains of *Anabaena variabilis* as biofertilizer for rice plants. *Plant and soil*, 296(1), 95-102.
- Soo, R. M., Hemp, J., Parks, D. H., Fischer, W. W., & Hugenholtz, P. (2017). On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria. *Science*, 355(6332), 1436-1440.
- Sugiyama, A. (2019). The soybean rhizosphere: Metabolites, microbes, and beyond—A review. *Journal of Advanced Research*, 19, 67– 73.
- Torres, J. (2015). Criopreservación de microalgas y cianobacterias nativas de Jalisco, influencia del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad y la estabilidad. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería. D.F. México, México.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.
- Zuberer, D. A. (1987). Collection, isolation, cultivation, and maintenance of associative N<sub>2</sub>-fixing bacteria. *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*, 95-125.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., Bertoldi, M. (1981). Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle* 22, 54-57.