

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA

TEMA:

Síntesis de nanopartículas de plata a base de biomasa de *Azolla* spp en
plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*)

AUTORES:

Ángel Sebastián Monar Coello

Jilson Antonio Medina Piza

DIRECTOR:

MV. Vera Rodríguez José Humberto, MG.

Milagro, año 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Ángel Sebastián Monar Coello y Jilson Antonio Medina Piza** en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magister en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación generación de bioproductos de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 4 de febrero del 2024



Firmado electrónicamente por:
ANGEL SEBASTIAN
MONAR COELLO

Ing. Ángel Sebastián Monar Coello

CI.1207804871



Firmado electrónicamente por:
JILSON ANTONIO
MEDINA PIZA

Ing. Jilson Antonio Medina Piza

CI.1205430687

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Yo, **Lazo Sulca Rafael Seleyman** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **Ángel Sebastián Monar Coello y Jilson Antonio Medina Piza**, cuyo tema es **Síntesis de nanopartículas de plata a base de biomasa de Azolla spp en plántulas de cultivo de rábano (Raphanus sativus)**, que aporta a la Línea de Investigación **generación de bioproductos para la mejorar del rendimiento agrícola**, previo a la obtención del Grado Magister en biotecnología. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 04 de febrero del 2024



Lazo Sulca Rafael Seleyman, Msc.

CI.0918859687

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. MONAR COELLO ANGEL SEBASTIAN**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A BASE DE BIOMASA DE AZOLLA SPP EN PLÁNTULAS DE CULTIVO DE RÁBANO (RAPHANUS SATIVUS)", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.33
SUSTENTACIÓN	35.83
PROMEDIO	95.17
EQUIVALENTE	Muy Bueno



ING. BARZOLA GAIBOR
CESAR ANIBAL

Ing. **BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL**
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



VIVIANA LORENA
SANCHEZ VASQUEZ

Ing. **SANCHEZ VASQUEZ VIVIANA LORENA**
VOCAL



KEVIN XAVIER
HUILGAREMA ENRIQUEZ

MCMQ. **HUILGAREMA ENRIQUEZ KEVIN XAVIER**
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. MEDINA PIZA JILSON ANTONIO**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A BASE DE BIOMASA DE AZOLLA SPP EN PLÁNTULAS DE CULTIVO DE RÁBANO (RAPHANUS SATIVUS)", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.33
SUSTENTACIÓN	34.33
PROMEDIO	93.67
EQUIVALENTE	Muy Bueno



CESAR ANIBAL
BARZOLA GAIBOR

Ing. BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



VIVIANA LORENA
SANCHEZ VASQUEZ

Ing. SANCHEZ VASQUEZ VIVIANA LORENA
VOCAL



KEVIN XAVIER
HUILCAREMA ENRIQUEZ

Mcmq HUILCAREMA ENRIQUEZ KEVIN XAVIER
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

Dedico esta tesis, en primer lugar y de manera muy especial, a Dios, por darme la oportunidad de lograr una meta más en mi vida profesional.

A mi madre, María Piza, quien ha sido fundamental en mi vida diaria y profesional, mi pilar en esta maravillosa etapa, por eso y más, te dedico este trabajo en ofrenda por tu paciencia y amor, madre mía, te amo.

A la memoria de mi padre Antonio Medina, quien fue mi mayor ejemplo a seguir y quien desde el cielo me ilumina, tu recuerdo y amor estarán siempre en mí.

A mis tíos, Mariana Piza y Carlos Rodríguez considerados mis segundos padres, y a mi abuela Tomasa Silva por la crianza que me dio, por los consejos y motivaciones inculcados.

Jilson Medina

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre, por dejarme inculcado valores y enseñanzas que me han llevado y me llevarán muy lejos

A mi padre, quien me enseñado el valor del esfuerzo y la perseverancia. Su amor incondicional y apoyo constante han sido mi mayor motivación.

A mis profesores y mentores, cuyas enseñanzas han dejado una huella imborrable en mi formación académica. Gracias por su paciencia y dedicación.

A mis amigos y compañeros de estudio, por las risas compartidas, las noches de café y los momentos de desafío. Juntos hemos superado obstáculos y celebrados logros.

A mi familia extendida, por su aliento y buenos deseos a lo largo de este viaje.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que creyeron en mí y me impulsaron a alcanzar mis metas.

Sebastian Monar

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar, a Dios por los momentos dados, por su apoyo espiritual e incondicional, por darme sabiduría, gozar de buena salud y por cada una de sus bendiciones.

Agradezco a mi madre por todo lo que ha hecho por mí, por el apoyo y el amor inconmensurable a lo largo de mi carrera profesional, a mi padre que no está conmigo físicamente, pero que vive en mi corazón y mente, siempre quiso lo mejor para mí.

Agradezco a mi hermano, a mis primos Jossel Lucas y Alexis Lucas, por el apoyo moral y emocional que hemos tenido mutuamente, pues nos inculcaron los mismos valores.

Agradezco a la Universidad Estatal de Milagro y a sus docentes por la instrucción académica recibida y por habernos compartido sus conocimientos a lo largo de la carrera.

Agradezco a mi tutor el MSc. Rafael Lazo , al Msc Barzallo y a mi compañero Oscar por la orientación y dirección acertada en la ejecución de esta tesis, que ha permitido que concluya satisfactoriamente.

A mis amigos y compañeros de estudio que estuvieron presente a lo largo de esta hermosa carrera y a mis amigos más cercanos.

Se les agradece de todo corazón... gracias

Jilson Medina

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme fuerza y sabiduría, salud durante todo este proceso de esta maestría.

A mi padre, por todo el esfuerzo que ha hecho, por darnos lo mejor y ser el pilar fundamental de mi vida, ya que, sin él, no sería lo que soy hoy en día, este logro también es de el

A mi tutor Msc. Rafael Lazo y el Msc Barzallo, por su orientación, paciencia y conocimientos compartidos. Gracias por guiarme en este viaje académico.

Al compañero Oscar Chenche y los estudiantes de biotecnología Ronnie, Michael y Yesenia, por ayudarnos y acompañarnos durante el proceso experimental de nuestra tesis

A mis amigos y compañeros de clase, Jilson, Fernando, Jean Carlos con quienes he compartido desde la Universidad, gracias, por las discusiones, el trabajo en equipo y las risas. Juntos enfrentamos desafíos y celebramos éxitos.

A mi familia, a todos los que han creído en mi... gracias

Sebastian Monar

Resumen

El presente trabajo de investigación está centrado en la necesidad existente de mejorar la germinación, el crecimiento y la resistencia en las plántulas de los cultivos, utilizando métodos alternativos sostenibles y ecológicos. El objetivo de nuestro caso de estudio es producir nanopartículas de plata (AgNPs) mediante la utilización de biomasa de *Azolla* spp con el propósito de aplicarlas en plántulas de rábano y así, proporcionar una respuesta concreta y detallada sobre los beneficios que compensa la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando la biomasa de *Azolla* spp y su efecto en las plántulas de rábano (*Raphanus sativus*). Las nanopartículas de plata (AgNPs) han demostrado tener características de gran potencial que pueden mejorar el crecimiento de las plantas y la biomasa de *Azolla* spp, presenta una gran oportunidad para sintetizar nanopartículas de plata ecológicamente. Se utilizó nitrato de plata y la biomasa de la *Azolla* spp para la obtención de las nanopartículas y poder crear el nano fertilizante que se usó en las plántulas de rábano. Este estudio se realizó *in vitro* utilizando dos medios de cultivos, más nanopartículas de plata y *Azolla*. Se propuso un diseño experimental con 4 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento. Cada repetición consta de 10 plántulas de rábano. Los tratamientos experimentales fueron: T1; Agar+Azolla, T2; Agar+Agar; T3; Agar+Nanoparticulas; T4; Murashige.

Palabras clave: Nanopartículas, Nitrato de plata, *Azolla*, rábano, plántulas.

Abstract

The present research work is focused on the existing need to improve germination, growth and resistance in crop seedlings, using alternative sustainable and ecological methods. The objective of our case study is to produce silver nanoparticles (AgNPs) by using *Azolla* spp biomass with the purpose of applying them in radish seedlings and thus, provide a concrete and detailed answer about the benefits that compensates the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using *Azolla* spp biomass and its effect on radish (*Raphanus sativus*) seedlings. Silver nanoparticles (AgNPs) have been shown to have high potential characteristics that can enhance plant growth and the biomass of *Azolla* spp, presents a great opportunity to synthesize silver nanoparticles ecologically. Silver nitrate and the biomass of *Azolla* spp. were used to obtain the nanoparticles and to create the nano fertilizer that was used in radish seedlings. This study was carried out in vitro using two culture media, plus silver nanoparticles and *Azolla*. An experimental design with 4 treatments and 5 replicates per treatment was proposed. Each replicate consisted of 10 radish seedlings. The experimental treatments were: T1; Agar+*Azolla*, T2; Agar+Agar; T3; Agar+Nanoparticles; T4; Murashige.

Key words: Nanoparticles, Silver nitrate, *Azolla*, radish, seedlings.

Lista de Figuras

<i>Ilustración 1 ¿Qué es la biotecnología agrícola?</i>	8
<i>Ilustración 2 Azolla - El Fertilizante Natural</i>	13
<i>Ilustración 3 El rábano (Raphanus sativus): Propiedades y aplicaciones</i>	18
<i>Ilustración 4 Síntesis de nanopartículas de hidroxapatita y su efecto en plántulas de Raphanus sativus</i>	22
<i>Ilustración 5 Impactos y Usos de Azolla en la Agricultura</i>	27
<i>Ilustración 6 Potencial de la nanotecnología en la agricultura y los alimentos</i>	32
<i>Ilustración 7 Inserción de semillas de rábano en los cuatro tratamientos</i>	58
<i>Ilustración 8 Instrumentos a utilizar para la siembra de las semillas de rábano en los cuatro tratamientos</i>	58
<i>Ilustración 9 Esterilización de frascos para la preparación de medios de cultivo</i>	58
<i>Ilustración 10 Preparación de nitrato de plata</i>	59
<i>Ilustración 11 Síntesis de nanopartículas</i>	59
<i>Ilustración 12 Regulación de PH</i>	59
<i>Ilustración 13 Toma de temperatura de muestra a procesar</i>	60
<i>Ilustración 14 Sustrato con nanopartículas</i>	60
<i>Ilustración 15 Maceración para la obtención de sustrato de Azolla</i>	60
<i>Ilustración 16 Filtración de sustrato de Azolla</i>	61
<i>Ilustración 17 Resultado final</i>	61

Lista de Tablas

<i>Tabla 1 Descripción de los tratamientos</i>	33
<i>Tabla 2 Características y cantidad</i>	33
<i>Tabla 3 Tratamiento Agar+Azolla</i>	39
<i>Tabla 4 Tratamiento Agar +Agar</i>	40
<i>Tabla 5 Tratamiento Agar+Nanoparticulas</i>	41
<i>Tabla 6 Tratamiento agra-murashigue</i>	42
<i>Tabla 7 Tratamiento Agar+Azolla</i>	43
<i>Tabla 8 Tratamiento Agar +Agar</i>	44
<i>Tabla 9 Tratamiento Agar+Nanoparticulas</i>	45
<i>Tabla 10 Tratamiento Agra-Murashigue</i>	46
<i>Tabla 11 Índice de Desarrollo de Germinación</i>	47
<i>Tabla 12 Índice de Desarrollo de Crecimiento</i>	48

Índice / Sumario

Derechos de autor	i
Aprobación del director del Trabajo de Titulación.....	ii
Aprobación del tribunal calificado	iii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	vii
Resumen	vii
Abstract	x
Introducción	1
Capítulo I: El problema de la investigación	3
CAPÍTULO II: Marco teórico referencial	8
CAPÍTULO III: Diseño metodológico	33
3.1 Tipo y diseño de investigación	33
3.2 La población y la muestra	33
3.2.1 Características de la población	33
3.2.2 Delimitación de la población	34
3.2.3 Tipo de muestra	34
3.2.4 Tamaño de la muestra	34
3.2.5 Proceso de selección de la muestra	34
3.3 Los métodos y las técnicas	35
3.4 Procesamiento estadístico de la información	38
CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados.....	39
4.1 Análisis de los resultados.....	39
4.2 Análisis de los resultados.....	47
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones	50
5.1 Conclusiones	50
5.2 Recomendaciones	50

Introducción

Durante mucho tiempo la tecnología ha limitado el desarrollo del sector agrícola hasta cierto punto. Estas limitaciones se ven reflejadas en la producción y rendimiento de los cultivos, cada año hay más habitantes que alimentar y menos extensiones de suelo para cultivar. Es necesario buscar nuevas alternativas que garanticen: buena producción y buenos rendimientos ajustados a las nuevas exigencias para una agricultura sana y amigable con el medio ambiente.

La nanotecnología está surgiendo como una alternativa de gran capacidad y con muchas posibilidades que prometen a futuro, puesto que, involucra el conocimiento de varias disciplinas aportando desde su espacio al tema en cuestión y enfoques de aspectos puntuales y específicos. Al aplicarla en un sector de gran importancia, como lo es el sector agrícola, se aplica en diferentes casos, como; herramienta de diagnóstico para la detección de enfermedades en plantas, la liberación controlada de moléculas funcionales que facilitan el suministro de nutrientes y el mejoramiento de los empaques que garantizan una mayor duración de los alimentos.

La nanotecnología está contemplada significativamente debido a la manipulación de nanomateriales (NMs) de suma importancia en distintas áreas de gran relevancia, algunos estudios realizados la han considerado como modelo a seguir, ya que apunta a moldear el futuro. Los nanomateriales (NMs) se identifican por sus reducidas dimensiones y las nanopartículas se identifican como producto de estos nanomateriales, los cuales son reducidos a escalas nano-dimensionales, como las nanopartículas de plata (AgNPs) en nuestro caso de estudio.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han demostrado en diversos estudios tener propiedades que pueden mejorar significativamente el crecimiento de las plantas. Sin embargo, la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) a menudo implica procesos químicos que pueden ser perjudiciales para el medio ambiente. Por tal razón, existe la necesidad de explorar métodos alternativos de síntesis que sean tanto eficaces como respetuosos con el medio ambiente.

Azolla spp también conocida como Azolla Anabaena por su relación simbiótica con la cianobacteria Anabaena, la cual reside en las cavidades de las hojas del

helecho. *Azolla spp* es un helecho acuático utilizado como abono verde que mejora la fertilidad del suelo, también es conocido por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (N_2) y acumular metales pesados, su biomasa brinda una gran oportunidad para la síntesis biodegradable de nanopartículas de plata (AgNPs). Las nanopartículas de plata (AgNPs) se utilizan ampliamente en diferentes campos con diversos fines y este estudio se centra específicamente en su aplicación para mejorar el crecimiento de las plántulas de rábano.

En nuestro país se cultivan, alrededor de 15.000 ha de rábano específicamente en la sierra ecuatoriana, que corresponde a la región interandina del Ecuador. El rábano (*Raphanus sativus*) es uno de los productos hortícolas que tiene buena perspectiva, con un perfil nutricional variado que beneficia a la salud de los consumidores y un valor comercial regular.

Sin embargo, el conocimiento adecuado de la población sobre las hortalizas y sus valores nutricionales, causarían que la demanda de hortalizas aumente. La parte de la planta del cultivo de rábano que habitualmente se consume es la raíz, su contenido en nutrientes, específicamente las vitaminas y minerales, no pueden sustituirse por alimentos comunes en la dieta diaria de las personas.

Por lo expuesto anteriormente, el presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de proporcionar una respuesta clara y concisa sobre los beneficios que compensa el estudio de la síntesis de nanopartículas de plata utilizando la biomasa de *Azolla spp* y su efecto en las plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*). No obstante, aclaramos que no se ha investigado completamente la eficacia de estas nanopartículas de plata (AgNPs) a base de la biomasa de la *Azolla spp* sobre el crecimiento de plántulas de rábano.

Capítulo I: El problema de la investigación

1.1 Planteamiento del problema

El problema que se plantea en este estudio se centra en la necesidad de desarrollar métodos sostenibles y ecológicos para mejorar el crecimiento y la resistencia de las plantas de cultivo, en este caso, las plántulas de rábano (*Raphanus sativus*). A pesar de los avances en la agricultura, el crecimiento de las plantas puede verse afectado por diversas condiciones de estrés, lo que puede resultar en una disminución de la productividad.

En este contexto, las nanopartículas de plata han demostrado tener propiedades que pueden mejorar el crecimiento de las plantas. Sin embargo, la síntesis de nanopartículas de plata a menudo implica procesos químicos que pueden ser perjudiciales para el medio ambiente. Por lo tanto, existe la necesidad de explorar métodos alternativos de síntesis que sean tanto eficaces como ecológicos.

La biomasa de *Azolla* spp, un helecho acuático conocido por su capacidad para acumular metales pesados, presenta una oportunidad para la síntesis ecológica de nanopartículas de plata. Sin embargo, la eficacia de estas nanopartículas de plata a base de *Azolla* spp en el crecimiento de las plántulas de rábano aún no se ha estudiado a fondo.

1.2 Delimitación del problema

La delimitación del problema en este estudio se centra en la síntesis de nanopartículas de plata utilizando la biomasa de *Azolla* spp y su efecto en las plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*). El estudio se limita a estas dos especies y al proceso de síntesis de nanopartículas de plata.

El estudio no aborda otros tipos de nanopartículas ni utiliza otras especies de plantas o biomasa para las síntesis ajenas a las ya mencionadas. Además, aunque las nanopartículas de plata pueden tener una amplia gama de aplicaciones en diversos campos, este estudio se centra específicamente en su aplicación en la mejora del crecimiento de las plántulas de rábano.

El estudio se realiza en condiciones controladas de laboratorio, lo que puede no reflejar completamente las condiciones del mundo real. Por lo tanto, aunque los resultados pueden proporcionar información valiosa, su aplicabilidad puede estar limitada a condiciones similares a las del estudio.

1.3 Formulación del problema

La síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando biomasa de *Azolla* spp. para mejorar la germinación en plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) plantea un desafío crucial en la investigación agrícola contemporánea. A pesar del creciente interés en el uso de AgNPs para estimular el crecimiento de plantas, existe una carencia significativa de estudios que se centren específicamente en la aplicación de AgNPs derivadas de *Azolla* spp. en el proceso de germinación de plántulas de rábano. El problema reside en la falta de comprensión integral de los mecanismos subyacentes y los posibles efectos a nivel fisiológico y morfológico que podrían surgir como resultado de esta interacción única.

La formulación precisa de este problema busca abordar estas lagunas de conocimiento, proporcionando una base sólida para investigaciones futuras y contribuyendo al desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles y efectivas que utilicen nanotecnología para mejorar la germinación y el rendimiento de los cultivos de rábano.

1.4 Preguntas de investigación

¿Se pueden sintetizar eficazmente nanopartículas de plata a base de biomasa de *Azolla* spp y cuál es su efecto en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de rábano? Este estudio busca responder a estas preguntas a través de un diseño experimental riguroso y la aplicación de técnicas avanzadas.

1.5 Determinación del tema

La determinación del tema sobre la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) mediante el uso de biomasa de *Azolla* spp. en plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) resalta la importancia de explorar innovadoras estrategias en la agricultura para mejorar el rendimiento de los cultivos. Este enfoque específico se centra en la utilización de *Azolla* spp. como fuente de biomasa para la síntesis de

AgNPs, buscando comprender en detalle los procesos bioquímicos y las interacciones que tienen lugar en las plántulas de rábano.

La determinación de este tema se fundamenta en la necesidad de aprovechar las propiedades únicas de *Azolla* spp. y las capacidades antimicrobianas de las nanopartículas de plata para potenciar el crecimiento y desarrollo de los cultivos de rábano, abriendo así nuevas perspectivas para prácticas agrícolas más eficientes y sostenibles. Este tema promete contribuir al avance de la investigación en nanotecnología agrícola y establecer una base sólida para futuras aplicaciones beneficiosas en la producción de alimentos.

1.6 Objetivo general

- Producir nanopartículas de plata mediante la utilización de biomasa de *Azolla* spp con el propósito aplicarlas en las plántulas de rábano.

1.7 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de plata utilizando la biomasa de *Azolla* spp como agente, optimizando las condiciones de síntesis para obtener nanopartículas de alta calidad y rendimiento.

- Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de rábano, midiendo las variables planteadas.

- Comparar la eficiencia de las nanopartículas de plata a partir de azolla con otros medios de cultivo.

1.8 Hipótesis

La síntesis de nanopartículas de plata a base de biomasa de *Azolla* spp y su aplicación en plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) resultará en una mejora significativa en el crecimiento y desarrollo de las plántulas en comparación con las plántulas que no reciben este tratamiento.

1.9 Declaración de las variables (operacionalización)

La variable independiente es la aplicación de nanopartículas de plata y su variable dependiente es la velocidad de germinación y de crecimiento.

1.10 Justificación

La utilización de *Azolla spp*, un helecho acuático que se encuentra en abundancia en muchas regiones del mundo, para la síntesis de nanopartículas de plata, propone una alternativa ecológica y sostenible a los métodos químicos convencionales. Estos métodos suelen implicar el uso de reactivos tóxicos y generan residuos peligrosos, lo que puede ser perjudicial para el medio ambiente. Por lo tanto, este estudio tiene el potencial de contribuir a la protección del medio ambiente y a la promoción de la sostenibilidad.

Las nanopartículas de plata poseen propiedades antimicrobianas que pueden ser beneficiosas para el cultivo de rábano. Al incorporar estas nanopartículas en las plántulas de rábano, se podría mejorar la resistencia de las plantas a las enfermedades, lo que a su vez podría aumentar la productividad del cultivo. Esto podría tener implicaciones significativas para la agricultura, especialmente en regiones donde las enfermedades de las plantas son un problema importante.

Este estudio podría abrir nuevas vías para la investigación en el campo de la nanotecnología verde y la agricultura sostenible. Los resultados podrían proporcionar una base para futuras investigaciones en la síntesis de nanopartículas utilizando biomasa y su aplicación en la agricultura. Además, los hallazgos podrían contribuir a la comprensión científica de cómo las nanopartículas interactúan con las plantas a nivel celular y molecular.

1.11 Alcance y limitaciones

El alcance y las limitaciones del estudio sobre la síntesis de nanopartículas de plata a base de biomasa de *Azolla spp* en plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) se pueden describir de la siguiente manera:

Alcance:

- El estudio se centrará en la síntesis de nanopartículas de plata utilizando la biomasa de *Azolla* spp.
- Se investigará el efecto de estas nanopartículas en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de rábano.
- Se medirán variables como la altura de las plántulas, el número de hojas y la biomasa total de las plántulas.
- Se controlarán las condiciones de crecimiento de las plántulas de rábano, como la temperatura, la humedad, la luz y la concentración de nutrientes en el suelo.

Limitaciones:

- El estudio se limitará a las plántulas de rábano y no se extenderá a otras especies de plantas.
- La síntesis de nanopartículas se realizará utilizando solo la biomasa de *Azolla* spp, y no se explorarán otros métodos de síntesis.
- Las condiciones de crecimiento controladas pueden no reflejar las condiciones de crecimiento en el campo, lo que puede limitar la aplicabilidad de los resultados en un entorno agrícola real.
- La concentración de nanopartículas de plata en la solución de riego puede variar, lo que puede afectar los resultados del estudio.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1 Antecedentes

2.1.1 Biotecnología agrícola

Es una serie de herramientas que son científicas y están elaboradas para modernizar las plantaciones de cultivos, estas técnicas de optimización en los cultivos están siendo trabajadas hace mucho tiempo, la puesta en marcha de esta biotecnología en esta área se han consolidado en el fin del siglo XX e inicios del siglo XXI, muchos de los agricultores a nivel mundial lo han estado utilizando con más del 85% de los países que se encuentran en desarrollo, una de las mejoras que se busca tener en las comidas se priorizan el cambio del color, el sabor y la nutriz y para que se logren los objetivos dados (Randolph et al., 1988).



*Ilustración 1 ¿Qué es la biotecnología agrícola?
Fuente: (COMMUNICATIONS, 2023).*

2.2 Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1 Técnicas existentes

Al mejorar la condición de los cultivos, se debe investigar y desarrollar diferentes técnicas o herramientas de cambios. Ante las técnicas que ya existen, se subrayan procedimientos antiguos que son el empalme, la carcinogénesis, la fusión o la unión de los protoplastos; además, de la poliploidía. Las técnicas importantes de por sí son las avanzadas, la cual es la transgénesis, cambios genéticos y el ARN, por medio de estas técnicas, es importante que se confiera a las plantas que mejoren su condición para que así se fortalezcan respecto a su resistencia ante condiciones climáticas desfavorables, ante enfermedades y también la calidad del suelo.

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de plata se ha usado biomasa de la Azolla SPP en las plántulas de cultivo del rábano, llamado también por su nombre científico como *Raphanus sativus*, estos métodos ofrecen una solución nueva y sustentable para la elaboración de la misma. La biomasa de la Azolla es importante; por tanto, se comporta como un gestor reductor y que estabiliza la síntesis de las nanopartículas de plata; a su vez, las nanopartículas que se han obtenido mostraron ser óptimas en el desarrollo y crecimiento de las plántulas de rábano (A. L. Singh & Singh, 1987).

2.3 Plántulas de cultivo

2.3.1 Generalidades

Estás se manifiestan en un período primordial en el lapso de vida de los cultivos donde da su inicio al momento de su desarrollo hasta su etapa de que se madura, cuando están en su etapa de comienzo son frágiles ante condiciones climáticas que les afectan de cierto modo hasta enfermedades; por tanto, es importante protegerlas y ayudar a que se fortalezcan desde sus inicios. Esto quiere decir que los ingenieros agrónomos o agricultores deben tener en cuenta estos detalles brindando atención con un cuidado adecuado a estas plántulas maximizando la salud de ellas.

Los procedimientos al momento de que nazcan y se desarrollen las plántulas de cultivo tienen que tener una estabilidad óptima y precisa ante la temperatura, humedad y que estén a disposición nutrientes necesarios; además, ante la fase de inicio las plántulas de cultivo están creando sus raíces junto con sus foliares para así estar preparados para que sorban aguas, nutrientes del suelo y a su vez genere la fotosíntesis que es necesario para su desarrollo. Ante esta situación es importante que se garantice condiciones óptimas para el adecuado crecimiento de las plántulas de cultivo.

Es necesario y óptimo que haya un entorno favorable para las plántulas, aplicando herramientas que mejoren lo genético para así ayudar a que tengan resistencia ante los patógenos que existen, no solo esto ayuda a ello sino también a que sean resistentes a condiciones climáticas y ante plagas, ya que esto mejora la productividad para que haya una cosecha correcta (Lindenmayer, 1984).

2.3.2 Sistemas y tipos de medio de cultivo existentes

Estos integran una serie de opciones que son adaptadas a las necesidades que requieren cada una de las plantas y que están rodeados del cultivo, entre los sistemas más habituales son las perlitas, fibra de coco, entre otros, estos ofrecen que haya una base neutral, independiente y con estabilidad en el adecuado crecimiento de las raíces; por tanto, aquellos sustratos son conocidos sobre todo en cultivos que están en macetas, donde se puede tener un control con mucha precisión en los niveles de nutrientes y que además tengan disponibilidad de agua.

Al hablar de los medios de cultivo tenemos: la tierra, turba, compost que son orgánicos, la cual son usados en la agricultura de forma habitual y orgánica en virtud a su capacidad para brindar los nutrientes mejorando así el sistema del suelo. Los medios de cultivo orgánicos ayudan en la fertilidad del suelo y a la salud de las plántulas de cultivo; por ende, estos se utilizan tanto en invernaderos como en campo abierto, lo que proporciona un medio natural para el correcto crecimiento de unas series de cultivos (Amerasinghe & Kulasooriya, 1985).

2.4 Azolla spp

2.4.1 Generalidades de la especie

También llamada helecho de agua, se la define como un tipo de plantas acuáticas que forman parte de la familia Azollaceae, estas se encuentran principalmente organismos de agua dulce; a su vez, de flujo lento en lugares que son frondosos a nivel mundial; además, está caracterizada por su idoneidad en el rápido crecimiento y para producir compactas colonias en la parte superior del agua, esto facilita un aspecto diferenciador de color verde en la cubierta del agua (Mian & Stewart, 1985).

En el caso de las especies de la Azolla Spp son pequeñas planta de una estructura sencilla, que esta conformadas primordialmente por unas hojas flotantes que pueden cambiar de color, a veces verde incluso rojo, estas hojas tienen una forma como de escamas, también es nombrada por la relación vinculación con las cianobacterias del género Anabaena, que se crean en la parte interior de sus hojas (Tayeb et al., 2020).

Según Yadav et al. (2014) mencionan que: “la Azolla Spp se reproduce primordialmente de manera vegetativa, esto da a entender que su biomasa tiene que mantenerse en todo el año garantizando su reproducción continua”. Al mencionar este helecho acuático se la denomina como heterosporoso, que contiene tanto microesporocarpos como megaesporocarpos, la germinación de aquellas esporas normalmente está afectadas por algunos agentes del medio ambiente, desde otra perspectiva como lo taxonómico:

Reino: Plantae

División: Pteridophyta

Clase: Pteridopsida

Orden: Salviniales

Familia: Azollaceae / Salviniaceae

Género: Azolla

(«Azolla Utilization. Proceedings of the Workshop on Azolla Use, Fuzhou, Fujian, China, 31 March-5 April 1985», 1987).

Estas flotan de forma libre, ya que forman parte de la familia Azollaceae; por tanto, la Azolla Spp es considerada como un género de helechos de hojas primordiales, aquí su nombre va derivado del griego Azo que es secar y ollya que es matar, esto evidencia su perceptibilidad a la sequía, por eso debe estar en ámbitos húmedos y que tenga muy poco resplandor, esta aparece con un tallo ramificado reducido y con las raíces que están colgados por debajo del agua (McCowen et al., 1986).

En ocasiones la Azolla posee la suficiencia de generar un pigmento que es conocido como antocianina, ya que esta estipula un color rojizo; por tanto, esta tonalidad llega a estar ligada con la fertilización del agua, la manifestación con el exceso de la luz del solar y la contaminación; por tal motivo, es preferible que este en ambientes donde haya sombras para un crecimiento adecuado (Shi & Hall, 1988).

Para Moore (1969) menciona que: “una de las ventajas importantes de la Azolla es su facilidad de asegurar nitrógeno de la atmósfera con el apoyo de cianobacterias simbióticas”. Al realizar una práctica cotidiana con la Azolla Spp tiende a cultivarse como abono verde para luego que se incorpore al suelo, esta planta se usa de forma estratégica en la agricultura de una manera natural mejorando la fertilidad del suelo e incrementar los nutrientes; asimismo, al ser una planta acuática esta crece de forma rápida en los medios o cuerpos de agua estancadas, también de flujo lento.

Al tener la suficiencia de asegurar nitrógeno de la atmósfera en conjunto con las cianobacterias, esta le ayuda a ser una gran fuente de fertilidad orgánica para el suelo; a pesar de que han muchos años, la Azolla Spp es utilizada especialmente como abono verde en los cultivos de arroz, lo que ayuda a la fertilidad del suelo y así generando el crecimiento adecuado y óptimo para la mayoría de los cultivos (Khosravi et al., 2005).

La obtención de las hojas y las ramificaciones siguen una guía muy organizada, esto ayuda que haya una inclinación de edad que se observa en las siguientes hojas del tallo donde inicia el ápice del brote, esta se destaca por poseer la guía más organizada en la ramificación y elaboración de las hojas, lo que hace que sea aproximadamente sencillo de analizar en el número de hojas en las edades correspondiente ayudando a proporcionar información importante sobre el ciclo de vida de la planta; es decir, las cianobacterias que están presentes en el seno de las hojas de Azolla tienen un rol primordial en la simbiosis y la fijación de nitrógeno de la planta en sí (Becking & Donze, 1981).

2.4.2 Ubicación geográfica y variedades

Como son plantas flotantes están localizados normalmente en elementos de agua dulce que estancadas o en flujos lentos; por ejemplo, lagunas, ríos en las zonas tropicales, subtropicales, arroyos y estanques; a pesar de ser distribuidos globalmente, la Azolla Spp tiende a progresar en zonas climáticas cálidas y húmedas, se ha adecuado en una diversidad de condiciones, las cuales son las siguientes: aguas dulces, aguas pantanosas y sistemas de aguas saladas.

Hay muchas variedades y especies que forman parte del género *Azolla* Spp, que poseen características únicas y con adecuaciones particulares en lo que les rodea; por tanto, muchas de las variedades que son conocidas son la *Azolla filiculoides*, la *pinnata*, estas pueden posponer tamaño, coloración, prioridad del entorno y forma de las hojas. Cada una de ellas; por ejemplo, la *pinnata* está caracterizada por las hojas que son bilobuladas que tienen color verde y la *filiculoides* las hojas son más pequeñas de color rojizo en algunos entornos (A. L. Singh & Singh, 1986).

2.4.3 Importancia

Tiene una importancia en muchos medios ambientales acuáticos, tanto en la agricultura como en la investigación científica, estas plantas flotantes adecuan acogida y alimentos para una diversidad de cuerpos acuáticos, ayudando a la biodiversidad y a la armonía ecológica; además, esta puede apoyar en el mejoramiento de la calidad del agua al absorber nutrientes y purificando la misma al actuar como un filtro natural en medios de agua estancadas o de flujo lento.

En el ámbito agrícola es valorada por su idoneidad de fijar nitrógenos de la atmosfera en conjunto de la simbiótica con las cianobacterias, esto la convierte en una enorme fuente de fertilización orgánica, puede ser cultivada en cultivos de arroz mejorando la fertilidad del suelo aumentando la productividad de las plantas, gracias a su veloz crecimiento está la hace idóneo para la utilización en la producción del forraje y sirve como alimento para el ganado, donde la disposición del pasto está limitado (Kumarasinghe et al., 1986).



Ilustración 2 Azolla - El Fertilizante Natural
Fuente: (EL PRODUCTORTV, 2022).

2.5 *Raphanus sativus*

2.5.1 Generalidades de la especie

El *raphanus sativus* también denominado como rábano, es de género vegetal que pertenece a la familia brassicaceae, está reconocida por ser un cultivo de sus raíces, la cual es consumida como alimento. Se originó en Europa y Asia, debido a que se cultiva en Egipto y en la llamada Babilonia lo hacían hace unos 4.000 años. Hace muchos años atrás sobre todo en la antigua Grecia se veía como un alimento de mucha importancia para poder alimentarse, lo que generó ser uno de los pioneros en el crecimiento de este vegetal por toda Europa, ya que es un cultivo que crece anualmente en gran variedad climática y de suelo.

El cultivo del rábano es muy querido por su sabroso sabor picante y además de textura crujiente, esto lo convierte en un elemento que es popular sobre todo en las ensaladas, platillos cocidos y crudos, más que todo por su valor en el ámbito culinario, también es usado de forma tradicional en la medicina natural debido a sus propiedades curativas. Tiende a tener algunos beneficios para la salud, entre ellas son la mejora de la digestión, la salud cardiovascular y la estimulación del sistema inmunológico, actualmente es un cultivo muy conocido en la cocina de algunas culturas y es muy cultivado en todo el mundo para que su alimento sea fresco y tenga propiedades de nutrición (P & M, 1986).

El rábano es un cultivo una amplia gama de vegetales, con un aproximado de 380 géneros y con 3.000 especies; por tanto, se extiende mediante su ubicación geográfica y propiedades climáticas, tanto en climas fríos y agradables. Es primordial porque es una fuente de suma importancia de antioxidantes, ya que no solo ayuda a prevenir la oxidación en el cuerpo, sino que además se ha mostrado que llegan a tener efectos que benefician en la prevención de algunas enfermedades.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Capparales

Familia: Cruciferae

Género: *Raphanus*

Especie: *Raphanus sativus*

(«*Descripción taxonómica de hortalizas*», 2011).

Según Torres (2011) define que: “el rábano es un alimento bajo en grasas y que se encuentra primordialmente en los carbohidratos, las cuales son sus elementos principales con fuentes ricas en minerales y vitaminas, estas se localizan en multitud en gran parte de los vegetales”.

Los minerales que ayudan al rábano son el yodo y el potasio, así también el fósforo y el calcio, aunque estas dos en poca cantidad; a su vez, produce magnesio que complementa su lado nutricional con beneficios y es variado para la salud; por tanto, es rábano es importante en todos los sentidos alimenticios.

2.5.2 Ubicación geográfica y variedades

El cultivo del rábano es mencionado como uno de los principales vegetales, este cultivo fue sumergido por los españoles en el siglo XX, desde ese momento se cultiva de forma natural debido a su relevancia en la nutrición. En Ecuador existe un aproximado de 14.455 hectáreas de este cultivo sobre todo se cultiva en la provincia de Cotopaxi, Imbabura, Tungurahua y Chimborazo como las provincias primordiales del país (Nasevilla, 2010).

El rábano generalmente se distribuye prácticamente en todo el mundo, la cual se adapta en diferentes regiones y en diversas condiciones climáticas, esto permite que el cultivo este apto en gran variedad de climas, tanto en regiones tropicales, frías y agradables. Esta se expande por América, Europa, Asia y algunas partes del mundo; además, es una alternativa favorable para jardines y también para el comercio en el ámbito de la agricultura.

Por medio de *Raphanus sativus*, hay muchas variedades que se muestran en una gran diversidad de sabor y morfológica, estas ayudan en su tamaño, color de la raíz, sabor y forma, lo que facilita una elección diversa para que se adapten según las preferencias del país y las condiciones de cultivo determinadas (Gutbrod, 1986).

A pesar de las variedades que son tradicionales, hay investigaciones y mejoramiento en lo genético para la creación de recientes diversidades de rábanos con particularidades mejoradas, que tienden a tener resistencia a patógenos, mejor textura y sabor con tiempos de cultivos menores; además, estas mejoras han facilitado la diversificación de los rábanos en el comercio y ha ayudado a que la elaboración sea mucho más rentable y eficiente para los agricultores.

Este cultivo progresa en un rango detallado de temperaturas, por lo general entre 15 y 18 °C, a pesar de esto puede soportar temperaturas que sean bajas, lo que sería 4 °C y altas de 21 °C, estas plantas son sensibles a una variación que sea extrema en las temperaturas; por tanto, si se las expone a temperaturas altas o bajas en un período alargado ocasiona una variante en su normal desarrollo con comportamientos inapropiados. La importancia de que estén en un entorno estable y que sea controlado garantiza un crecimiento óptimo y uniforme (Pisco & Arenas, 2006).

Según Valdez (2015) define que: “el suelo para el cultivo de rábano tiene que ser sutil de preferencia arenoso y con gran contenido de elemento orgánico, debe poseer una adecuada suficiencia en la retención de humedad para que permita un óptimo crecimiento de las plantas”.

Con relación al PH del suelo no debe ser específicamente neutral, lo que debe estar en un rango de 5.5 y 6.8 para ayudar en la absorción de los nutrientes necesarios mediante las raíces; por ende, los suelos lisos son idóneos facilitando el procedimiento de cosecha y siembra al obtener cultivos de rábanos de tamaño uniforme y de calidad.

Para Criollo & García (2011) mencionan que: “el rábano debe requerir condiciones óptimas para su crecimiento y elaboración excelentes, la temperatura y la humedad tienen un papel esencial en el ciclo de vida de este cultivo; además, de desarrollarse en climas frescos y templados”.

En este cultivo la humedad es parte fundamental porque si hay exceso de ello puede generar inconvenientes de pudrimiento en las raíces; no obstante, es primordial que se destaque que en temperaturas altas esto puede afectar el sabor del rábano, lo que lo convierte más picante de lo normal.

2.5.3 Importancia

Tiene una importancia en los alimentos como en la agricultura, es un medio lleno de nutrientes, que incluye vitaminas, fibra y minerales, estas son fundamentales para generar una dieta igualada promoviendo la salud. El consumo seguido de este cultivo ayuda a contribuir en la prevención de muchas enfermedades mejorando la salud digestiva sobre todo por su contenido en fibra, gracias a ello se lo puede consumir tanto crudo, ensaladas, cocinado, en sopas y como guarnición, esto lo convierte en un alimento famosos en la cocina a nivel mundial.

En el entorno de la agricultura desempeña un rol primordial debido a la variación que tiene este cultivo y además de variedad en la producción de ella, esto es debido a su ciclo de corto crecimiento y su capacidad al crecer a gran escala en diferentes condiciones climática; por tanto, el cultivo de rábano se la puede cultivar de forma principal o de cobertura en diferentes partes del mundo, lo que lo hace como un cultivo de bajos recursos y muy rentable, el rábano es accesible para todos los agricultores en diversos niveles de recurso y escalas.

En lo económico, este cultivo ayuda en que sea importante en los ingresos para los agricultores contribuyendo en el crecimiento económico; además, la demanda del rábano que estén frescos y que sean de calidad es enorme, lo que ayuda a dar oportunidades en este mercado más que todo para los productores. Los procesos y el comercio de rábanos proceden a dar un valor agregado en la cadena de la elaboración y productos que son procesados para la distribución de los alimentos porque no solo es un alimento nutritivo sino también versátil (A. L. Singh, 1986).

2.5.4 Impacto económico en el mundo

Raphanus sativus también llamado como rábano tiene un gran impacto en el tema económico, es un medio importante en los ingresos para los agricultores; por lo que, es de crecimiento rápido y muy sencillo de cultivar. El crecimiento de este cultivo a corto plazo ayuda a que los agricultores o productores obtengan numerosas cosechas en una sola temporada, lo que aumenta su estabilidad y rentabilidad.

Este posee un mercado a nivel mundial que está en constante crecimiento por su popularidad tanto como alimento versátil y saludable, la demanda de este cultivo que estén frescos y de gran calidad es muy enorme a nivel nacional e internacional, brindando oportunidades para exportar sobre todo los productores, el proceso y comercio en forma de conservas, encurtidos y productos que estén procesados generan ingresos adicionales teniendo un valor agregado en una serie de suministros de alimentos.

Este cultivo también tienden a generar un impacto positivo en lo económico para crear empleos en el entorno agrícola y en las industrias que se encuentran relacionadas; por ejemplo: el empaquetado, transporte y el comercio de alimentos; por tanto, la elaboración de rábanos ayuda en la inversión de infraestructuras tecnológicas que sean innovadoras, esto impulsa al desarrollo rural y que haya mejoría de vida para las zonas agrícolas; además, este cultivo tiene ventajas para los agricultores y empresas relacionadas entre sí (Wong Fong Sang et al., 1987).



Ilustración 3 El rábano (Raphanus sativus): Propiedades y aplicaciones
Fuente: (Ciencia y salud, 2021).

2.6 Nanopartículas

2.6.1 Generalidades y síntesis

Al hablar de las nanopartículas se define como estructuras pequeñas que están ubicadas en una escala nanométrica, esto quiere decir que poseen dimensiones que están oscilando entre 1 y 100 nanómetros y esto es debido a su tamaño que son muy pequeños, tienden a tener propiedades diferentes y únicas de las partículas a gran escala. Estas llegan a ser sintetizadas a partir de una gran variedad de materiales

como: polímeros, metales, biomoléculas y compuestos orgánicos, esto ayuda a tener una enorme diversidad en sus propiedades y composiciones.

La síntesis de las nanopartículas lleva en sí la creación que esta contralada de estructuras que son a partir de materiales base, este procedimiento se lleva a cabo por medio de diferentes métodos; por ejemplo, síntesis química, disposición de vapor químico, reducción de precursores químicos, biomineralización y la irradiación con láser; por tanto, cada procedimiento de síntesis llega a producir en nanopartículas con propiedades y características concretas, esto permite que sea adaptada a una gran gama de aplicaciones de diferentes áreas (Valderrama et al., 2016).

Las nanopartículas se descubren en aplicaciones de una enorme variedad de disciplinas e industrias, tenemos la medicina, producción de alimentos, electrónica, energía, entre otras. Por ejemplo, en la medicina se usa en los vehículos de fármacos para renovar la selectividad y efectividad de los tratamientos, en la electrónica las nanopartículas son usados en la elaboración de componentes y dispositivos nanoelectrónicos de gran precisión; además, en la producción de alimentos son utilizados para la mejora en la calidad de ellas.

Los procesos físicos destacan en la reducción de sales que son precursoras por medio de radiación electromagnética UV-Vis, los procesos químicos emplean la disminución de la sal precursora AgNO_3 por medio de la adición de composición como lo es el borohidruro de sodio NaBH_4 que utiliza medios de reacción de sol-gel o también micro emulsión; en cambio, los procesos biológicos abarcan la reducción de AgNO_3 que esta contribuida por los microorganismos, extractos de plantas y hongos (P. K. Singh et al., 1987).

2.6.2 Aplicaciones de las nanopartículas en agricultura en plántulas de cultivo

Han surgido como un instrumento prometedor en la agricultura, particularmente en el cultivo de plántulas conforme a sus propiedades que son exclusivos y versátiles, una de las herramientas principales es su utilización en la mejoría en la productividad y calidad de los cultivos; a su vez, las nanopartículas actúan como nanofertilizantes, lo que suministra nutrientes de forma más optima a las plántulas y ayuda en el crecimiento y desarrollo de ellas, mejorar la suficiencia de las

plantas para soportar estrés abióticos; por ejemplo, salinidad, temperaturas altas y la sequía permitiendo progresar en condiciones climáticas desfavorables.

Otro punto importante de las nanopartículas en el ámbito de la agricultura es la utilización en la seguridad de los cultivos ante plagas y patógenos; por tanto, las nanopartículas están diseñadas para liberar pesticidas de forma comprobada, esto disminuye la cantidad de productos químicos que sean obligatorios y reduce el impacto ambiental; a su vez, los convierte en un instrumento adecuado para afrontar enfermedades del suelo (Vlek et al., 2002).

En la protección y nutrición de los cultivos, tienden también a mejorar la calidad de los productos agrícolas, pueden ser usadas para cambiar las propiedades sensoriales y físicas de las plantas, tanto en su color, textura, sabor y tamaño, lo que ayuda a incrementar su valor en el mercado comercial. Pueden ser usadas para la liberación vigilada de compuestos bioactivos y el transporte, entre ellas vitaminas y antioxidantes ayudando a mejorar la nutrición de las personas.

Brindan una gran gama de aplicaciones para el sector de la agricultura, específicamente en los cultivos de las plántulas mejorando la productividad y calidad del cultivo asegurando defensas en contra de los patógenos y las plagas, la mejora de la calidad de productos agrícolas tiene la capacidad de mejorar la manera en que se realiza el cultivo y como produce los alimentos alrededor del mundo (A. L. Singh & Singh, 1987).

2.6.3 Ensayos empleando nanopartículas sobre plántulas de cultivo

Representan algo prometedor en la agricultura actualmente, estos ensayos exploran calcular los efectos que tiene las nanopartículas en el desarrollo, crecimiento y salud de los cultivos, tanto así el impacto que tienen en la calidad y productividad del cultivo; por ende, una de las tantas áreas enfocadas en el estudio es la utilización de nanopartículas como nanofertilizantes, lo que permite la capacidad de suministrar nutrientes primordiales de forma más adecuada a las plántulas, esto llega a conducir a un incremento en la calidad y rendimiento de los cultivos.

Lo que se destaca de las nanopartículas que se la utilizan como nanofertilizantes, donde tiene la capacidad de proporcionar nutrientes fundamentales

de forma óptima a las plántulas, lo que puede generar una enorme calidad y rendimiento de los cultivos.

Esto da a entender que los nanofertilizantes ayudan a mejorar la resistencia de las plantas ante el estrés biótico y abiótico, actualmente se están usando ensayos que faciliten la evaluación de como las nanopartículas apoyan a que las plántulas tengan resistencia en las condiciones climáticas que son desfavorables; como por ejemplo, sequía, temperaturas altas y salinidad, para que así se protejan de las plagas y enfermedades; por ende, son primordiales para la elaboración de estrategias en el manejo sostenible que faciliten a los agricultores a confrontar el cambio climático para proteger a los cultivos (Nordiah et al., 2012).

Los ensayos con nanopartículas en los cultivos son debido al cambio de las propiedades químicas y físicas del suelo mejorando la estructura de la misma, para así aumentar la suficiencia en la retención de nutrientes y agua promoviendo la actividad microbiológica para su beneficio, el objetivo es ayudar a que mejore la productividad de los cultivos a largo tiempo aportando lo razonable de la agricultura (Ruschel et al., 1987).

2.7 Interacción planta-nanopartículas

Esto debate como los nanomateriales puede afectar a los medios biológicos vegetales, lo que es importante para entender el creciente interés en la utilización de las nanopartículas tanto en la biotecnología como en la agricultura; por lo que, lo convierte en un área de estudio que toma relevancia.

Al ser importante esta se focaliza en como las nanopartículas están siendo absorbidas por las plantas y como se reparten en el interior de los tejidos; por tanto, se muestra que las mismas entran en las plantas mediante muchas vías, entre ellas tenemos: estomas en las hojas, superficies corticales y pelos radiculares con una distribución heterogénea en distintos fragmentos de la planta.

Otro punto a tomar en cuenta de la interacción planta-nanopartícula es entender de cómo afectan en la fisiología y metabolismo de las plantas, se ha visto que llegan a influenciar en los procedimientos que son importantes tanto como: la fotosíntesis, absorción de nutrientes, respiración y la elaboración de fitohormonas. Estos resultados llegan a tener ventajas como desventajas para las plantas precisando de consecuencias; por ejemplo, concentración, composición química de las nanopartículas y el tamaño (Akinbile et al., 2016).

Debido a su enorme impacto que va con la fisiología y metabolismo de las plantas, las nanopartículas tienden a originar respuestas de defensas en las plántulas y esto activa medios de expresión génica y señalización que permiten combatir el estrés abióticos y biótico, si se comprende los mecanismos a estas respuestas de defensa entonces se va a comprender lo muy importante que son las nanopartículas en los cultivos.

Esto es un campo pluridisciplinario que tienden a tener aspectos sobre la biología vegetal, ecología y la nanotecnología. Al entender como las nanopartículas influyen a los cultivos, esto toma relevancia al aumentar las ventajas y disminuir los riesgos relacionados con su utilización en diversas aplicaciones ambientales y agrícolas (Becking, 1987).

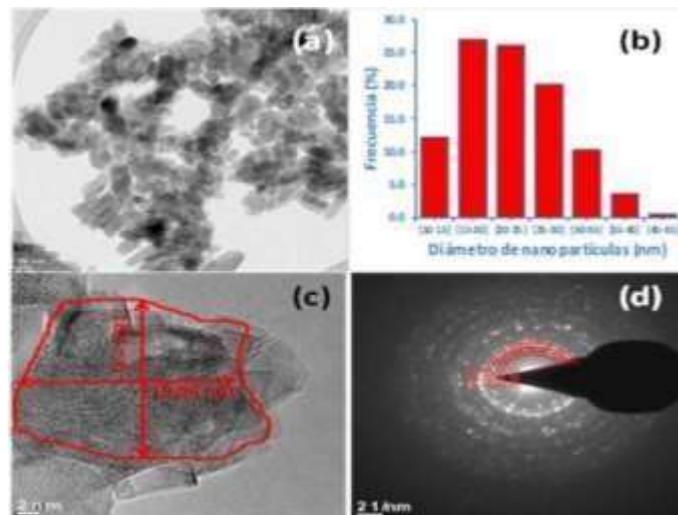


Ilustración 4 Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita y su efecto en plántulas de *Raphanus sativus*
Fuente: (Flores y otros, 2021).

2.8 Biomasa de *Azolla spp* como agente reductor

La biomasa de *Azolla Spp* ha surgido como un medio prometedor de agente reductor en la síntesis de nanopartículas, la cual ha sido objeto de atención a lo largo de los años debido a su crecimiento rápido y capacidad de asegurar nitrógeno; por ende, posee agregados bioactivos que actúan como agentes reductores ante reacciones químicas. En estos agregados se localizan los polisacáridos, compuestos fenólicos y las proteínas que permiten donar electrones y a su vez disminuir metálicos en solución.

Ante la capacidad reductora que tiene la biomasa es la explotación de grandes estudios para la síntesis de nanopartículas de plata, un procedimiento que involucra la disminución de las sales de plata en disposición de la misma biomasa como agente reductor, este procedimiento es conocido también como síntesis verde de nanopartículas, lo cual es muy deseado por su pequeño impacto en el medio ambiente en semejanza con los medios químicos tradicionales y a su sostenibilidad; por tanto, es sencillo y se puede cultivar en condiciones que estén controladas garantizando su uniformidad y calidad (Wet et al., 1990).

Se ha mostrado que la biomasa de *Azolla Spp* no solo actúa como agente reductor, sino que además influye en el tamaño, morfología y estabilidad de las nanopartículas que den como resultados. La presencia de diversos medios en la biomasa es: los compuestos fenólicos y los polisacáridos, que estos pueden adaptar las condiciones en que reaccionan y afectan la cinética de creación de las nanopartículas. Esto en sí no solo proporciona los electrones que se necesitan para la disminución de iones metálicos, sino que además tienen un rol en el crecimiento de las mismas.

Representa un medio valioso de agentes reductores, dando una posibilidad que sea sostenible y amigable a los métodos químicos tradicionales. Su suficiencia de influenciar en las propiedades y la cinética de elaboración de las nanopartículas da nuevas oportunidades para las aplicaciones en diferentes áreas; por ejemplo, medicina, agricultura y la biotecnología (Zimmerman, 1985).

2.9 Efectos de las nanopartículas en plántulas de rábano

Son importantes para entender como estas pequeñas estructuras llegan afectar el desarrollo, crecimiento y salud de las plantas, la aplicación de las nanopartículas se da en diferentes zonas de la agricultura, esto es primordial para la evaluación en el impacto de los organismos vivos; por ejemplo, en las plántulas de rábano, ya que son cultivos alimenticios debido a que influye en diversos aspectos como la morfología y fisiología del cultivo.

La capacidad de alterar la asimilación de nutrientes y el metabolismo vegetal, trae como consecuencias relevantes para el rendimiento y crecimiento de las plántulas de rábano, tanto así que llegan a influir en la nutrición del cultivo. Se ha mostrado que esto puede llevar a la producción de especies reactivas de oxígeno ROS y provocar mecanismos de protección antioxidantes en las plantas; por tanto, esto llega a influir el equilibrio redox en las células vegetales y ocasionar estrés de agente oxidante, lo que afecta de forma negativa al desarrollo y crecimiento del cultivo del rábano.

El impacto de las nanopartículas en el desarrollo y morfología de las plántulas de rábano afectan la germinación, elongación del tallo, formación de las hojas, crecimiento de las raíces y la floración del cultivo, lo que da como resultado cambios en la síntesis de las proteínas, expresión génica y la interacción de forma directa a las estructuras celulares de las plantas (Subudhi & Singh, 1979).

2.10 Metabolismo de la Azolla Spp

Según Hall et al. (1995) el metabolismo de la Azolla Spp es: “un procedimiento fotosintético natural que aprovecha el crecimiento de energía alternativa; en el caso de, las cianobacterias son eficaces al ser usados en las tecnologías para la conversión de la energía del sol”.

El metabolismo de la Azolla Spp además de ser un procedimiento fotosintético natural, se lo denomina como un proceso biológico enorme que tiene diversos medios metabólicos para la reproducción, crecimiento y de adaptación para el ámbito acuático.

La incorporación de la clorofila se ve con mucha intensidad en los heterocistos en semejanza con las células vegetativas, estos presentan una importante concentración de ficocianina; por el contrario, la fluorescencia de la clorofila es igual o menor que de las células vegetativas (Becking & Donze, 1981).

2.11 Fijación de nitrógeno

De acuerdo con Sanjay-Swami & Singh (2020), mencionan que: “la Azolla Spp posee la capacidad en la fijación de nitrógeno de la atmosfera debido a su simbiosis con la cianobacteria Anabaena, lo que ayuda en el desarrollo de la Azolla Spp con efectos firmes en la fertilidad del suelo”.

Según Esiobu & Van Hove (1992), comentan que: “la escasez de nitrógeno representa un problema para el desarrollo y crecimiento adecuado de los cultivos, los nutrientes tienen un rol esencial en mejorar el área, diámetro, volumen y longitud de las raíces así como la elaboración de biomasa seca”.

Además, se ha revelado que los nutrientes impactan de forma radical en la absorción, producción y equilibrio de biomasa seca. Esto ha incrementado el carbono orgánico en el suelo dando como resultado de la aplicación de prácticas en el correcto manejo que repercute en la inoculación de Azolla Spp.

Otro punto importante es que el alga Azolla posee la capacidad de suprimir de forma eficaz una gran variedad de contaminación del agua, lo que incluye metales pesados, nitrógeno y nutrientes como el fósforo; además, de los compuestos orgánicos dañinos. Esta suficiencia de eliminación la hace un instrumento que es primordial para purificar aguas residuales y reformación de los ecosistemas acuáticos que son degradados, lo que mejora la calidad del agua, disminuye los contaminantes en cuerpos de agua que son afectadas por las personas (Jayasundara, 2022).

2.12 Metales pesados

2.12.1 Capacidad de acumulación

Ante la presencia de metales pesados en el área de la agricultura revela que hay un problema en el medio ambiental importante debido a sus probables efectos desfavorables en la salud de las personas, contaminantes al agua y a la calidad del suelo; por tanto, la Azolla Spp ha mostrado de que es capaz de retener y almacenar

metales pesados, lo que la transforma en una planta de importancia para la Fito extracción de la contaminación en zonas acuáticas.

La disminución en el contenido de clorofila propone que tanto la actividad de la clorofilasa y el sistema de síntesis de clorofila se ven perjudicados por la presencia de metales pesados; por tanto, la reducción en el contenido de proteínas muestran que el sistema de ellas se ven afectadas por las consecuencias de los contaminantes que generan (Kaur et al., 2021).

En áreas que se encuentran en contaminación, se detectan diferentes metales pesados; por ejemplo, arsénico, cobre, cadmio, plomo, cromo, níquel, mercurio y zinc. La sola presencia de ellos suele variar según el medio contaminante en diversas áreas específicas, la absorción en exceso de metales de parte de las plantas resulta en tóxicos para las personas, lo que genera enfermedades crónicas y agudas (Anawar et al., 2008).

2.12.2 Azolla Spp en tratamientos de agua

Según Issayeva et al. (2022) define que: “las hidromacrófitas tienen importancia en la acumulación de metales pesados en el ámbito acuático, estas llegan a ser uno de los indicadores relevantes para calcular el nivel de contaminación del agua por medio de bioindicadores”.

La contaminación de metales pesados en los medios acuáticos se presenta en grandes niveles; a su vez, la acumulación de los sedimentos y plantas acuáticas tienen la capacidad de almacenar y absorber estos metales que se encuentran presentes en los ecosistemas acuáticos. Estos enormes niveles que posee de metales llegan a generar consecuencias desfavorables en la salud de los cuerpos acuáticos y en la calidad del medio ambiente; de forma que, es de relevancia controlar y manejar de manera adecuada los contaminantes que generan estos metales pesados en los organismos (Rai, 2008).

Por tanto, se ha examinado que hay una acumulación relevante de cadmio, uranio y cobre de forma interna de la fracción de la pared celular desde la raíz y el brote de la Azolla Spp; por ende, se recomienda que su potencial utilización en la fitoextracción de los contaminantes sea en áreas acuáticas (Sela et al., 1990).



Ilustración 5 Impactos y Usos de Azolla en la Agricultura
Fuente: (Ferreira, 2024).

2.13 Agricultura sustentable

Esta representa como una perspectiva integral en los cultivos, que busca la necesidad de aumentar la producción de los alimentos para complacer el crecimiento gradual de la demanda mundial con la preservación de los medios naturales y la protección del medio ambiente. Esta perspectiva ayuda a promover las prácticas agrícolas de forma justa, económicas y ambientalmente adecuadas mediante la implementación de herramientas como el manejo integrado de plagas, rotación de cultivos y la utilización eficaz de medios como los nutrientes del suelo y el agua.

Debido a que hay un crecimiento de forma continua de la demanda, los agricultores están indagando aumentar la producción de los cultivos, esto compromete a optimizar la productividad en las tierras específicas y a la expansión de la superficie en determinados terrenos dedicados a la agricultura por medio del uso de herramientas de fertilización artificial. Este enfoque ayuda aumentar la producción sin implicar la calidad del suelo ni la sostenibilidad en un período a largo tiempo garantizando que se adapten a las necesidades que son cambiantes en el mercado y con calidad en los alimentos (Khan et al., 2019).

2.13.1 Rentabilidad del cultivo de Azolla

Según Brouwer et al. (2016) comentan que: “a pesar que *Azolla* spp es una de las especies más reducidas. Es especial debido a su crecimiento rápido, ya que puede reproducirse entre 5 a 10 días convirtiéndola en una alternativa eficaz en diferentes aplicaciones ambientales y agrícolas”.

Para Esiobu & Van Hove (1992) mencionan que: “Azolla Spp posee la suficiencia de diluir minerales, entre ellas se tiene: zinc, manganeso y hierro, esto ayuda en el crecimiento del arroz liberando vitaminas beneficiando su desarrollo, este procedimiento muestra el potencial mejorando la calidad del suelo y productividad”.

Es importante que se considere lo eficiente que es la Azolla Spp en diferentes sistemas ecológicos que puedan variar mediante diversos factores como lo son: el tipo de cultivo, prácticas agrícolas aplicadas y condiciones climáticas. Estos medios vegetales se localizan considerablemente disponibles con el potencial de ser sorbentes de bajos costo y además de ayudar al medio ambiente (Elmachli et al., 2011).

2.14 Fitorremediación

2.14.1 Principios de la fitorremediación

Para los autores Ranjitha et al. (2016) definen que: “es la capacidad para acumular, neutralizar y degradar la contaminación del suelo, agua y aire, lo cual se lo como fitorremediación”.

En su mayoría los contaminantes y metales pesados que son liberados de las plantas industriales casualmente logran llegar a los ecosistemas acuáticos, como lo son: estanques, ríos y lagos; por tanto, la presencia de los metales pesados es de contaminación en los cuerpos de agua, lo que revela que son un peligro para la salud de las personas, así como para los ecosistemas.

Para Rai (2009) da entender que: “los metales pesados y contaminantes presentes en las plantas industriales tienden a llegar y contaminar los ecosistemas acuáticos a lo largo del tiempo. Solo la presencia de estos agentes contaminantes genera un riesgo importante para lo mencionado”.

Es de importancia saber que la contaminación por metales tiene muchos efectos que son devastadores en la vida del agua, lo que genera alteraciones en los ciclos biogeoquímicos afectando de forma negativa la fauna y flora que están presentes; asimismo, es de suma relevancia que se tomen en cuenta este problema de manera urgente.

De acuerdo con los autores Akinbile et al. (2016) la fitorremediación: “es un elemento primordial de la biorremediación, esta se basa en el uso de plantas para

tratar problemas del medio ambiente, esto da como resultado a que las plantas ayudan a prever la lixiviación y erosión”.

Esta se apoya en la utilización de plantas seleccionadas que tienen la habilidad de almacenar diferentes metales pesados, entre ellos tenemos: plomo, cromo, arsénico, cadmio, entre otros, además de sus distintos radioisótopos, con el fin de que no haya contaminación en los suelos y aguas que son afectadas estos elementos. Esta herramienta es conocida por ser una de las más eficaces y con rápido progreso en el entorno tecnológico al destacarse por su efectividad en la recuperación de áreas contaminadas y por su rentabilidad (Ranjitha et al., 2016).

La fitorremediación es conocida por ser un instrumento que se lleva bien con el medio ambiente, lo que beneficia para que no haya contaminación en entornos afectados, esto implica que la absorción de contaminantes sea mediante las raíces de las plantas, consecutivo en la acumulación en los tejidos vegetales. La estrategia presentada es como una posibilidad sostenible y eficaz para compensar medios contaminados, brindando una solución óptima de que no solo elimine los agentes contaminantes, sino que además ayude al restablecimiento del medio ambiente (Ansari et al., 2020).

2.14.2 Capacidad de Acumulación

La capacidad de acumulación de los contaminantes es específicamente destacada al absorber una diversa variedad de metales pesados mediante las raíces y tejidos vegetales, que actúan como un sorbente natural alcanzando los metales pesados y acumulando en las estructuras, lo que ayuda en la limpieza y que no haya contaminación de los sistemas de agua que están siendo afectados por la presencia de estos contaminantes que son tóxicos (Carlozzi & Padovani, 2016).

También tiene características esenciales que mejoran la eficiencia ante la remoción de metales pesado; además, su veloz crecimiento y una tasa de reproducción alta concede una rápida expansión de biomasa incrementando su suficiencia en la absorción y almacenamiento de los contaminantes de los sistemas del agua.

La Azolla Spp ante su aporte en la remoción de metales pesados, esta ofrece ventajas adicionales para los sistemas de agua y la biodiversidad; por tanto, al

momento de que hay una limpieza en el agua de contaminantes, la planta permite una mejora en la calidad del entorno para la vida acuática ayudando el restablecimiento de los invertebrados, peces, entre otras especies; a su vez, la suficiencia para absorber nutrientes resalta la importancia de la conservación del medio ambiente (Da Silva et al., 2022).

2.15 Biofertilizantes

Son productos orgánicos resultantes de componentes biológicos, entre ellos tenemos: residuos agrícolas, compost, microorganismos y de estiércol animal; por tanto, estos tienen una gran variedad de nutrientes que son importantes para las plantas, lo que incluye nitrógeno, potasio, micronutrientes y fósforo. Los biofertilizantes al ser aplicados al suelo o en los cultivos fomentan un desarrollo óptimo y robusto de las plantas mejorando la actividad microbiana y estructura del suelo en el ámbito agrícola.

Entre muchos de los beneficios primordiales de los biofertilizantes es la capacidad para mejorar la fertilidad del suelo de forma sostenible en el medio ambiente; además, a diferencia de los fertilizantes químicos tradicionales, estos no tienen elementos sintéticos que dañan o causan contaminación del suelo y del agua. Proporcionan un medio natural de nutrientes que se sueltan poco a poco y que ayuda al hábitat en un período de tiempo largo (Prasad & Singh, 2011).

Debido a la creciente inquietud por la preservación del hábitat y la necesidad urgente de tomar medidas prácticas que sean sustentables en diversas áreas en las actividades de las personas, el incorporar la *Azolla Spp* en los cultivos como un medio natural de nitrógeno es fundamental para brindar importantes ventajas pensando a futuro. Esta estrategia no solo muestra una opción sostenible para el sector agrícola, sino que además atribuye en la preservación de los recursos y disminución de desconciertos ambientales negativos que están relacionados con la utilización de fertilizantes químicos (Wagner, 1997).

2.15.1 Efectos negativos de los fertilizantes químicos

Los fertilizantes químicos normalmente son utilizados en la agricultura con el fin de aumentar la productividad de los cultivos, aunque su utilización genera algunas desventajas y consecuencias negativas, entre ellas la presencia de sustancias tóxicas en unos cuantos fertilizantes y en la contaminación enorme que se encuentran en los alimentos cultivados (Kleiman & Cogliatti, 1998).

Según Wagner (1997) define que: “la elaboración de los fertilizantes en conjunto con los gastos de transporte dan como resultado que sea caro, la utilización excesiva de los fertilizantes nitrogenados en la agricultura genera desconcierto de forma significativa al medio ambiente”.

2.15.2 Azolla como base para nanofertilizantes

Para Jayasundara (2022), la Azolla Spp brinda: “una gran variedad de diversas aplicaciones que son ventajosas en diferentes campos, se usa como biofertilizante en el cultivo de arroz, brindando nutrientes importantes para el desarrollo de las plantas, al servir como abono para beneficiar el suelo y calidad”.

En el restablecimiento de los suelos salinos, la Azolla Spp tiene un rol primordial al apoyar a que se restaure la fertilidad del suelo; además, esta planta se ha examinado como un elemento de la cocina exclusiva y como repelente de mosquitos. Esta se usa en la elaboración de biogás y control de malezas, mostrando su adaptabilidad y valor en diferentes aplicaciones prácticas.

Al hablar de la Azolla pinnata en simbiosis con Anabaena Azollae, tiene la suficiencia singular de asegurar el nitrógeno de la atmosfera, está la convierte en una opción factible al fertilizante de urea, ya que es uno de los fertilizantes inerte más usado por los agricultores; por tanto, su utilización como reemplazo de la urea no solo brinda ventajas agrícolas, sino que además tiende a considerarse una estrategia de disminución al cambio climático, lo que disminuye la relación de los fertilizantes químicos y ayuda a promover prácticas agrícolas sustentables (Simarmata et al., 2021).

El nitrógeno es universal y tiene un rol importante como elemento primordial de los aminoácidos, siendo de mucha importancia para el desarrollo y crecimiento de las plantas; por tanto, al acoger biofertilizantes como la simbiosis entre *Azolla* Spp y *Anabaena* en vez de la fertilización química con nitrógeno, brinda beneficios tanto en eficacia económica como en términos de conservación ambiental (Cheng et al., 2015).

2.16 Nano partículas de plata y Azolla

Las nano partículas cada vez están siendo investigadas por su capacidad para ayudar en la mejor eficiente de los sistemas agrícolas, aunque son diminutas estructuras brindan características únicas que llegan a ser aprovechadas para tratar diferentes desafíos en la elaboración y producción de alimentos. Todo esto debido a la liberación que es controlada de nutrientes hasta la defensa de los cultivos ante patógenos y plagas.

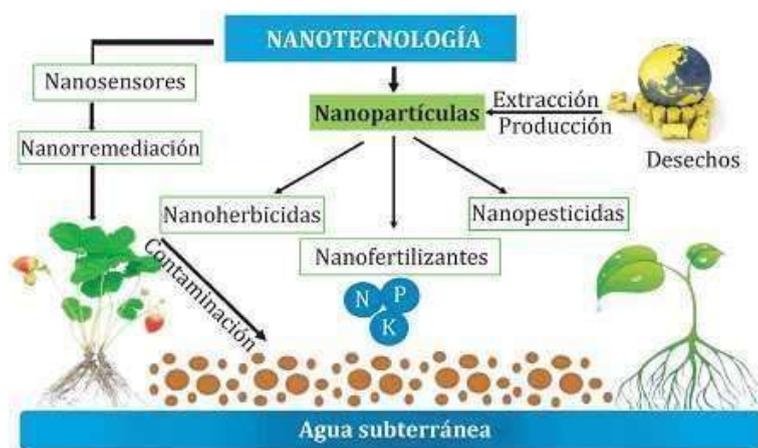


Ilustración 6 Potencial de la nanotecnología en la agricultura y los alimentos

Fuente: (Lira, Bulmaro, Vera, & De Los Santos, 2018).

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1 Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación se realizó es de tipo experimental, ya que se realizaron ensayos en el laboratorio de UNEMI en el cual se usó nitrato de plata y la biomasa de la *Azolla Spp* para la obtención de las nanopartículas y poder crear el nano fertilizante que se usaron en las plántulas del cultivo de rábano.

El diseño experimental que se utilizó fue el DCA (diseño completamente aleatorio) que consta de 4 tratamientos y de 20 repeticiones.

<u>Cultivo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Repeticiones</u>	<u>Producto</u>	<u>Dosis</u>
Rábano	T1	5	Agar-Azolla	30 ml
	T2	5	Agar-Agar	30ml
	T3	5	Agar-Nanopartículas	30ml
	T4	5	Murashige	30ml

Tabla 1 Descripción de los tratamientos
Elaborado por: Autores.

3.2 La población y la muestra

3.2.1 Características de la población

<u>Características</u>	<u>Cantidad</u>
Numero de tratamientos	4
Numero semillas por frasco	10
Numero de repeticiones por tratamiento	5
Numero de plántulas por tratamiento	50
Número total de plantas	200

Tabla 2 Características y cantidad
Elaborado por: Autores.

3.2.2 Delimitación de la población

La población delimitada para este estudio comprende las plántulas de rábano (*Raphanus sativus*) cultivadas en condiciones controladas de laboratorio. Estas plántulas son tratadas con nanopartículas de plata sintetizadas a partir de la biomasa de *Azolla* spp. La elección de esta población se basa en la relevancia agrícola del rábano. Además, la biomasa de *Azolla* spp se selecciona debido a su capacidad para acumular metales pesados y su disponibilidad en abundancia como recurso renovable.

3.2.3 Tipo de muestra

En el estudio de la síntesis de nanopartículas de plata, se utilizó la biomasa de *Azolla* spp. Este proceso aprovecha las propiedades bioquímicas de *Azolla* spp, una especie de helecho acuático conocida por su capacidad para acumular metales pesados. Las nanopartículas de plata resultantes se aplicaron en plántulas de rábano (*Raphanus sativus*). Los resultados preliminares indican que las nanopartículas de plata basadas en *Azolla* spp pueden mejorar el crecimiento y la resistencia de las plántulas de rábano a diversas condiciones de estrés, lo que sugiere un potencial significativo para futuras aplicaciones en la agricultura y la biotecnología.

3.2.4 Tamaño de la muestra

Para el estudio de la síntesis de nanopartículas de plata a base de biomasa de *Azolla* spp en plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*), se propone un diseño experimental con 4 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento. Cada repetición consta de 10 plántulas, lo que resulta en un total de 50 plántulas por tratamiento. Por lo tanto, el tamaño total de la muestra para este estudio sería de 200 plántulas.

3.2.5 Proceso de selección de la muestra

El proceso de selección de la muestra para el estudio de la síntesis de nanopartículas de plata a base de biomasa de *Azolla* spp en plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) se realiza de la siguiente manera:

Se cultivan un gran número de plántulas de rábano en condiciones controladas. Una vez que las semillas germinan se procede a tomar datos de las muestras cada 12 horas, hasta llegar a las 72 horas.

Para cada uno de los 4 tratamientos, se analizan 5 repeticiones, cada uno con 10 plantas, resultando en un total de 50 plántulas por tratamiento. Este proceso se repite para cada tratamiento, asegurando que cada plántula tenga la misma probabilidad de ser analizada para cualquier tratamiento.

Es importante destacar que el análisis cada 12 horas es fundamental para garantizar la validez de los resultados del experimento. Al estar bajo observación constante y tomar datos de las plántulas de cada tratamiento, se minimiza el sesgo y se asegura que cualquier diferencia observada en los resultados sea debido a los tratamientos y no a otras variables no controladas.

3.3 Los métodos y las técnicas

PRIMER PROCEDIMIENTO

- Preparación de la solución de nitrato de plata.

Se trabajó a una concentración de 1 mM (milimolar), que de acuerdo a la fórmula $M = \frac{(g \text{ soluto})}{(pm \text{ soluto})} / \text{solución}$ el resultado fue de 0,084 gramos de nitrato de plata. Esta cantidad se aforó en 500 ml de agua destilada.

- Extracto de Azolla.

Se pesaron 5 g de Azolla (solo las hojas, las raíces se descartaron). Luego se molieron en un mortero y se colocaron en un balón de aforo de 100 ml para someterlo a baño maría (80° por 20 min). Después se filtró al vacío por aproximadamente 6 a 7 veces para eliminar cualquier residuo; además, el filtrado se colocó en un recipiente de vidrio y se rotuló.

- Microondas.

Se colocó 74,5 ml de nitrato de plata a 1 mM con 500 uL de extracto de Azolla. Esto se colocó en un frasco y se llevó al microondas por 7 min a una potencia de P-H1.

AJUSTE PROCEDIMIENTO

- Preparación de la solución de nitrato de plata.

Se trabajó a una concentración de 9 mM (milimolar), que de acuerdo a la fórmula $M = ((g \text{ soluto}) / (pm \text{ soluto})) / \text{solución}$ el resultado fue de 0,764 gramos de nitrato de plata. Esta cantidad se aforó en 500 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO

- Uso de agitador magnético en vez del microondas.

Se trabajó con nitrato de plata a 9 mM. Entonces se colocó en un matraz 74,5 ml de nitrato de plata a 1 mM con 500 uL de extracto de Azolla. La solución debía estar 10 min en el agitador magnético a 70-80°C y luego se agregó 1 gota de NaOH para aumentar el pH (idealmente dejarlo a un valor neutro ya que hay más presencia de nanopartículas). Después de colocar el NaOH se envasó la solución en un nuevo recipiente y se dejó reposar hasta el día siguiente.

AJUSTE DE PROTOCOLO

- 150 ml de solución de nitrato de plata + 1 ml del extracto (Azolla o trichoderma).

Se puso en un matraz de 1 L durante 10 min hasta punto de ebullición, tapado con papel aluminio.

Luego se midió el pH con el pH metro y arrojaba valores de 5.58, entonces se ajustó el pH con hidróxido de sodio hasta dejarlo neutro, es decir, cercano a 7. En este caso se usó 90 uL de hidróxido de sodio. El NaOH es importante porque permite obtener mayor cantidad de nanopartículas.

Tratamientos

Agua destilada + agar + 1 ml de Azolla.

Agua destilada + agar.

Agua destilada + agar + nanopartículas.

Agua destilada + MS + agar.

El agar se utilizó al 1%, es decir por cada 100 ml se usaron 1 g de agar. De MS se usó 0,984 g por cada 200 ml de agua destilada.

NANOPARTÍCULAS

Se tomaron muestras de la solución de nitrato de plata con extracto de Azolla cuyo valor de pH se ajustó a 7 y se dejó en reposo. Esto se llevó a la centrifuga a 5500 rpm por 20 min.

Después de este proceso se vaciaron los recipientes centrifugados (descartar el sobrenadante) y se recolectó el pellet o sedimento en un tubo Eppendorf. De esta manera se obtuvo 0,2 g de nanopartículas (200 uL) que se suspendieron en 0,2 ml de agua destilada (200 uL). Entonces para el tratamiento 3 con nanopartículas se colocaron 80 uL de esta solución de nanopartículas en cada réplica (5 réplicas con 80 uL de nanopartículas cada una).

MEDIOS DE CULTIVO

Preparación del agar.

Se prepararon 200 ml de agua destilada + 2 g agar.

Se prepararon 400 ml de agua destilada + 4 g agar.

Se prepararon 200 ml de agua destilada + 2 g agar + 0,908 g MS.

Cada preparación se dispensó directamente en los frascos (previamente esterilizados) de cada tratamiento y se llevó a esterilizar, de esta manera, la cocción se realizaría en la autoclave (121°C por 15 min).

Luego del proceso de esterilización, se llevaron los medios a una cámara de flujo laminar. En esta se realizó la siembra de las semillas y colocación de los tratamientos.

En el caso del extracto de Azolla (T1) se colocó 1 ml de extracto de Azolla con una micropipeta en cada réplica.

En el caso de las nanopartículas (T3) se agregaron 80 uL de nanopartículas en cada réplica.

SIEMBRA

En cada réplica se colocaron 10 semillas de forma capilar distribuidas por todo el medio. Luego, los frascos se taparon con papel aluminio y con film para evitar contaminaciones.

3.4 Procesamiento estadístico de la información.

El procesamiento estadístico de la información en este estudio se realiza utilizando técnicas de análisis de varianza (ANOVA). Dado que el diseño experimental incluye 4 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento, se utiliza un ANOVA de una vía para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Cada tratamiento consta de 10 plantas, y se miden varias variables de respuesta, que son la velocidad de germinación y velocidad de crecimiento. Estas mediciones se promedian para cada repetición y luego se utilizan en el ANOVA.

Si el ANOVA indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos, se realizan pruebas post-hoc (como la prueba de Tukey) para determinar qué tratamientos son significativamente diferentes entre sí.

Todos los análisis estadísticos se realizan utilizando software SPSS, y los resultados se presentan en forma de tablas y gráficos para facilitar su interpretación.

Es importante recordar que todas las conclusiones se basan en el nivel de significancia estadística predefinido (generalmente 0.05), y que los resultados deben interpretarse en el contexto del experimento y no extrapolarse sin precaución a otras situaciones o especies de plantas.

CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

4.1 Análisis de los resultados

Velocidad de Germinación

Tratamiento Agar+Azolla

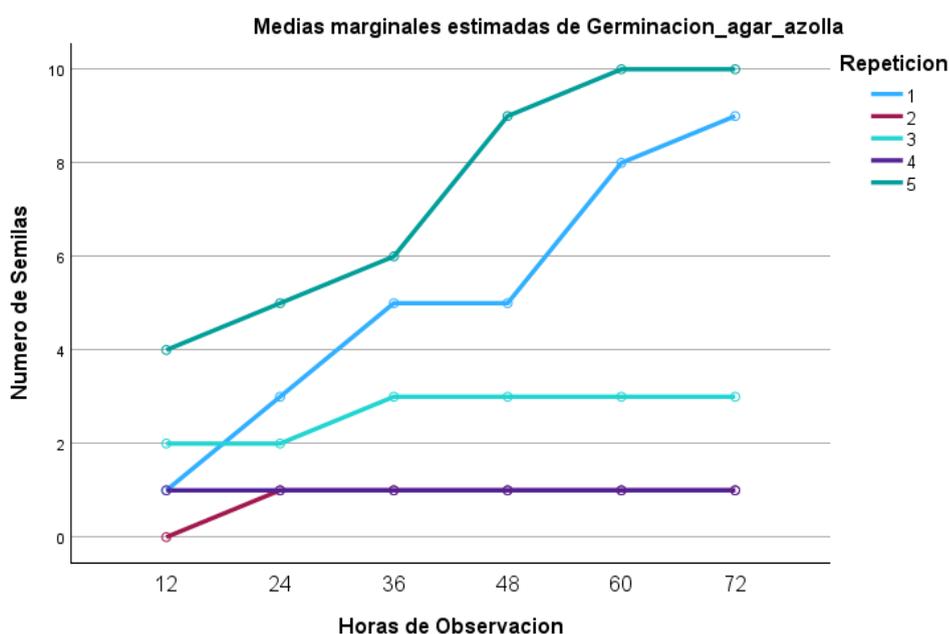


Tabla 3 Tratamiento Agar+Azolla
Elaborado por: Autores.

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la prueba de Tratamiento Agar+Azolla, demostrando un efecto considerable ($F(4)=21.893$, $p<.001$, $\eta^2 =.814$, $\beta-1=1$). Es crucial resaltar que las puntuaciones del Número de Semillas Germinadas en la prueba R1 ($M=5.17$, $DE=2.994$) superaron significativamente a las puntuaciones en la prueba R2 ($M=0.83$, $DE=0.408$). Además, las puntuaciones en la prueba R3 ($M=2.67$, $DE=0.516$) excedieron a las de la prueba R4 ($M=1.00$, $DE=0.00$). Por otro lado, las puntuaciones en la prueba R5 ($M=7.33$, $DE=2.658$) sobresalieron como las más altas de todas las pruebas. Estas discrepancias reflejan una variación sustancial en la germinación de semillas bajo distintas condiciones de tratamiento.

Tratamiento Agar +Agar

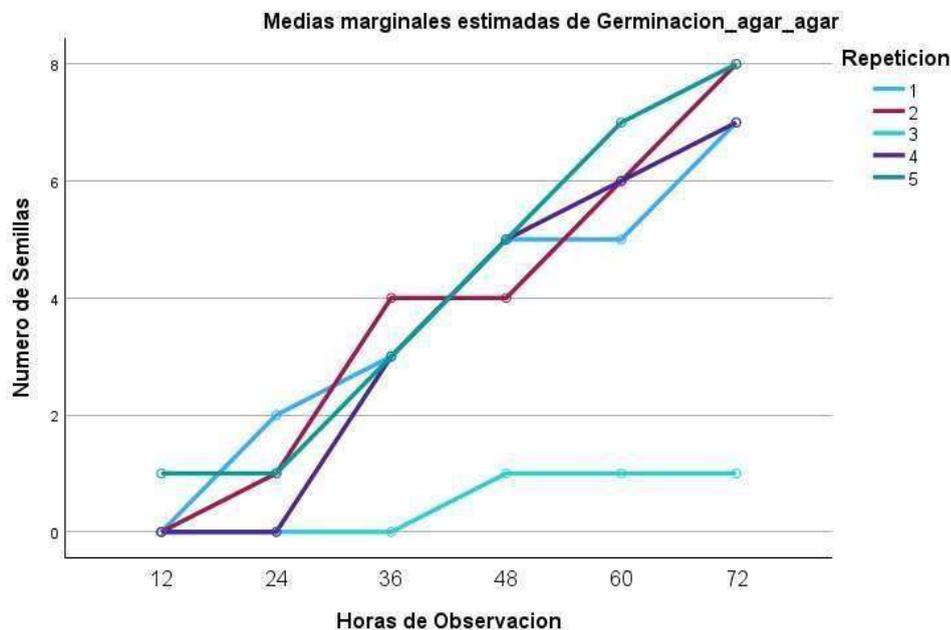


Tabla 4 Tratamiento Agar +Agar
Elaborado por: Autores.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la germinación de semillas entre las diferentes repeticiones (R1 a R5), con un efecto grande ($F(4)=53.467$, $p<.001$ $\eta^2 =.655$, $\beta-1=1$).

Las puntuaciones del número de semillas germinadas en la repetición R5 ($M=4.17$, $DE=2.994$) fueron significativamente mayores que las de las repeticiones R1 ($M=3.67$, $DE=2.503$), R2 ($M=3.83$, $DE=2.994$), R3 ($M=0.50$, $DE=0.548$) y R4 ($M=3.50$, $DE=3.017$).

No se encontraron diferencias significativas entre las repeticiones R1, R2 y R4. Las puntuaciones en la repetición R3 fueron las más bajas de todas las repeticiones. Estas diferencias señalan una variación significativa en la germinación de semillas entre las diferentes repeticiones del experimento. Es importante destacar que estos resultados son específicos para las condiciones de este experimento y pueden no ser generalizables a otras situaciones.

Tratamiento Agar+Nanopartículas

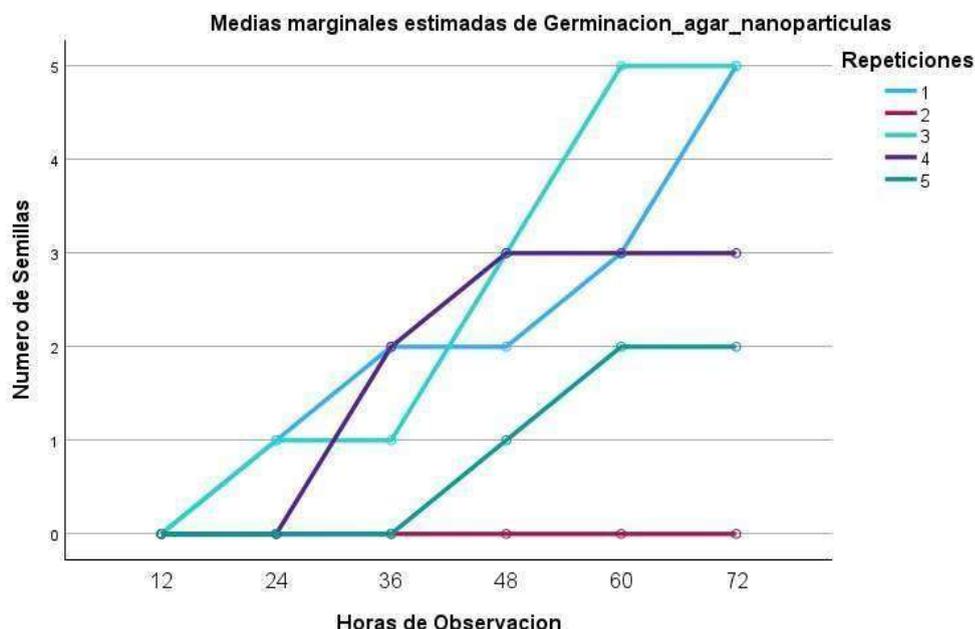


Tabla 5 Tratamiento Agar+Nanopartículas
Elaborado por: Autores.

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la prueba de Tratamiento Agar+Nanopartículas, evidenciando un efecto considerable ($F(4)=25.467$, $p<.001$, $\eta^2 =.980$, $\beta-1=0.980$). Es relevante resaltar que las puntuaciones del Número de Semillas Germinadas en la prueba R1 ($M=2.17$, $DE=2.722$) fueron significativamente superiores a las puntuaciones en la prueba R2 ($M=0.00$, $DE=0.00$).

Además, las puntuaciones en la prueba R3 ($M=2.50$, $DE=2.168$) excedieron a las de la prueba R4 ($M=1.83$, $DE=1.472$), mientras que las puntuaciones en la prueba R5 ($M=0.83$, $DE=0.983$) fueron menores que las de las pruebas R1 y R3. Estas discrepancias indican una variación significativa en la germinación de semillas bajo diversas condiciones de tratamiento.

Tratamiento agra-murashigue

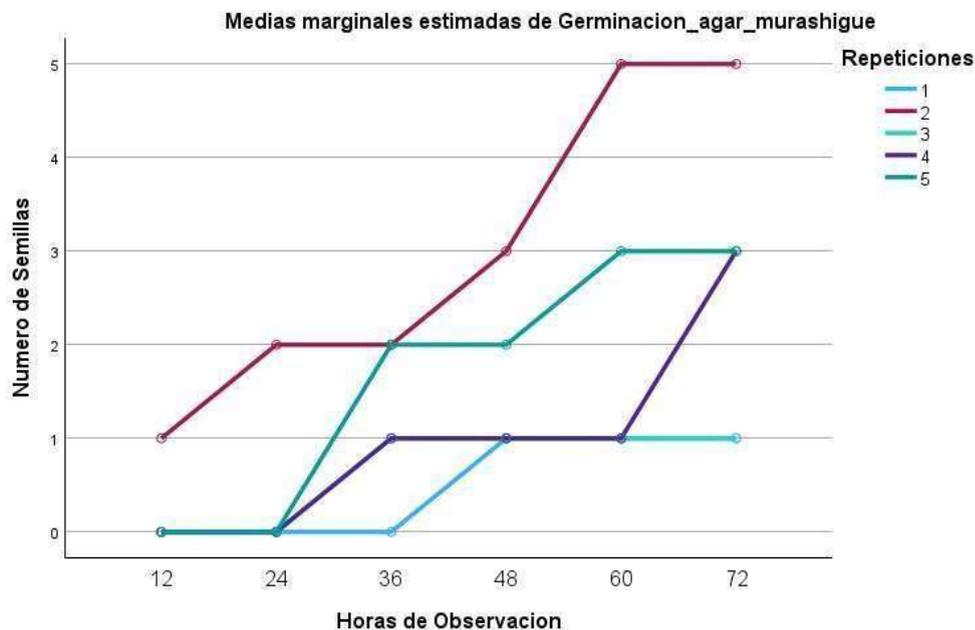


Tabla 6 Tratamiento agra-murashigue
Elaborado por: Autores.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la prueba de Tratamiento Agar+Murashigue, con un efecto grande ($F(4)=24.800$, $p<.001$, $\eta^2 =.729$, $\beta-1=1$). $2\eta=$. Es importante destacar que las puntuaciones del Número de Semillas Germinadas en la prueba R1 ($M=0.50$, $DE=0.548$) fueron significativamente menores que las puntuaciones en la prueba R2 ($M=3.00$, $DE=1.673$).

Además, las puntuaciones en la prueba R3 ($M=0.67$, $DE=0.516$) fueron menores que las de la prueba R4 ($M=1.00$, $DE=1.095$), mientras que las puntuaciones en la prueba R5 ($M=1.67$, $DE=1.366$) fueron menores que las de las pruebas R2 y R4. Estas discrepancias señalan una variación significativa en la germinación de semillas bajo diversas condiciones de tratamiento.

Velocidad de Crecimiento

Tratamiento Agar+Azolla

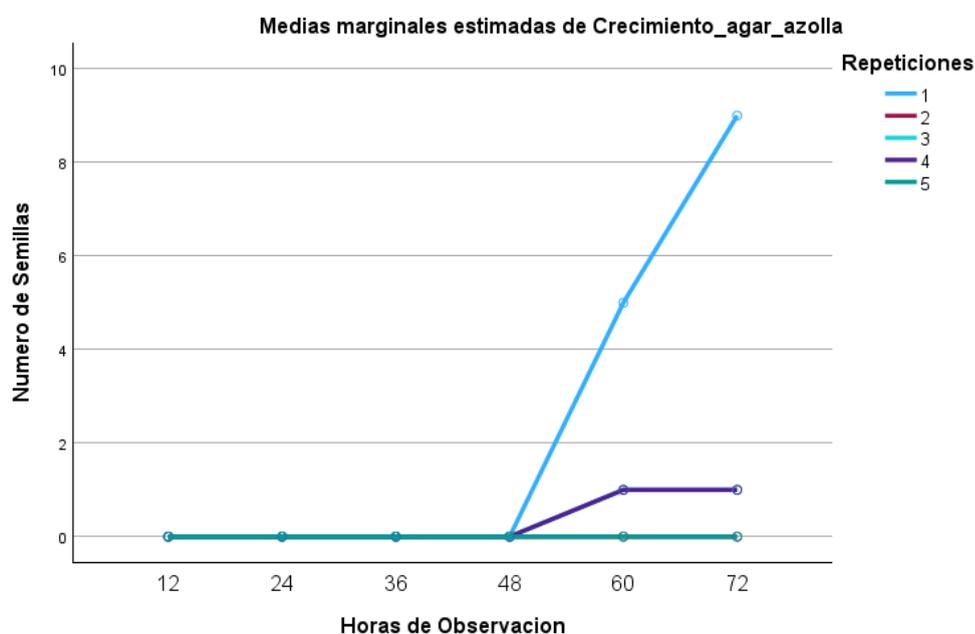


Tabla 7 Tratamiento Agar+Azolla
Elaborado por: Autores.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la prueba de Tratamiento Agar+Azolla, con un efecto grande ($F(4)=23.200$, $p<.001$, $\eta^2=.305$, $\beta-1=0.539$). Es importante destacar que las puntuaciones del Número de Semillas Germinadas en la prueba R1 ($M=2.33$, $DE=3.830$) fueron significativamente mayores que las puntuaciones en la prueba R2 ($M=0.00$, $DE=0.00$).

Asimismo, las puntuaciones en la prueba R3 ($M=0.33$, $DE=0.516$) fueron menores que las de la prueba R4 ($M=0.33$, $DE=0.516$), mientras que las puntuaciones en la prueba R5 ($M=0.00$, $DE=0.00$) fueron menores que las de las pruebas R2 y R4. Estas discrepancias señalan una variación significativa en la germinación de semillas bajo diversas condiciones de tratamiento.

Tratamiento Agar +Agar

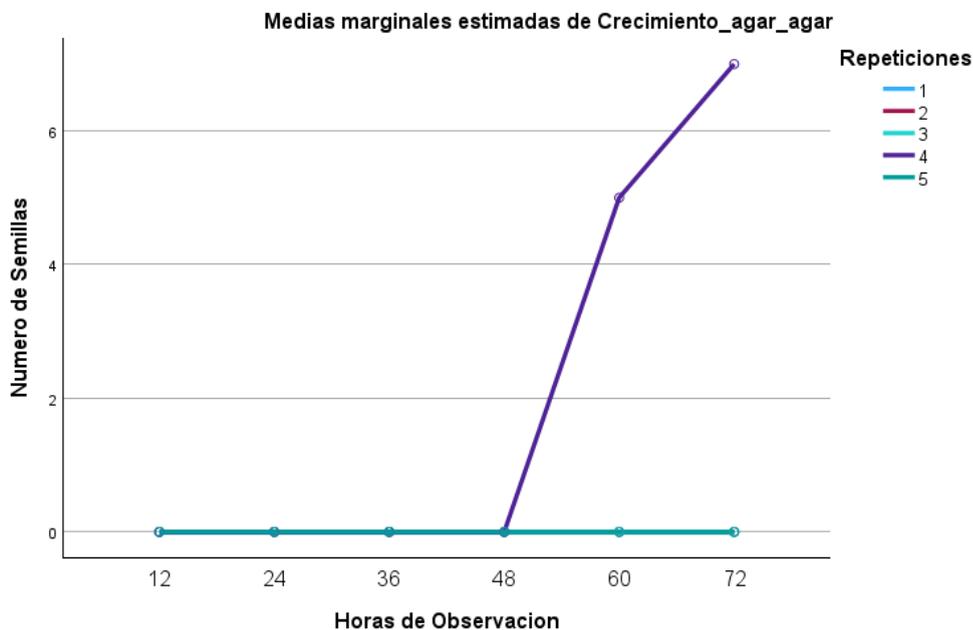


Tabla 8 Tratamiento Agar +Agar
Elaborado por: Autores.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la prueba de Tratamiento Agar+Agar, con un efecto grande ($F(4)=19.200$, $p<.001$, $\eta^2=.324$, $\beta-1=0.581$). Es importante destacar que las puntuaciones del Número de Semillas Germinadas en la prueba R1 ($M=0.00$, $DE=0.00$) fueron significativamente menores que las puntuaciones en la prueba R2 ($M=0.00$, $DE=0.00$).

A su vez, las puntuaciones en la prueba R3 ($M=0.00$, $DE=0.00$) fueron menores que las de la prueba R4 ($M=2.00$, $DE=3.162$), mientras que las puntuaciones en la prueba R5 ($M=0.00$, $DE=0.00$) fueron menores que las de las pruebas R2 y R4. Estas discrepancias señalan una variación significativa en la germinación de semillas bajo diversas condiciones de tratamiento.

Tratamiento Agar+Nanoparticulas

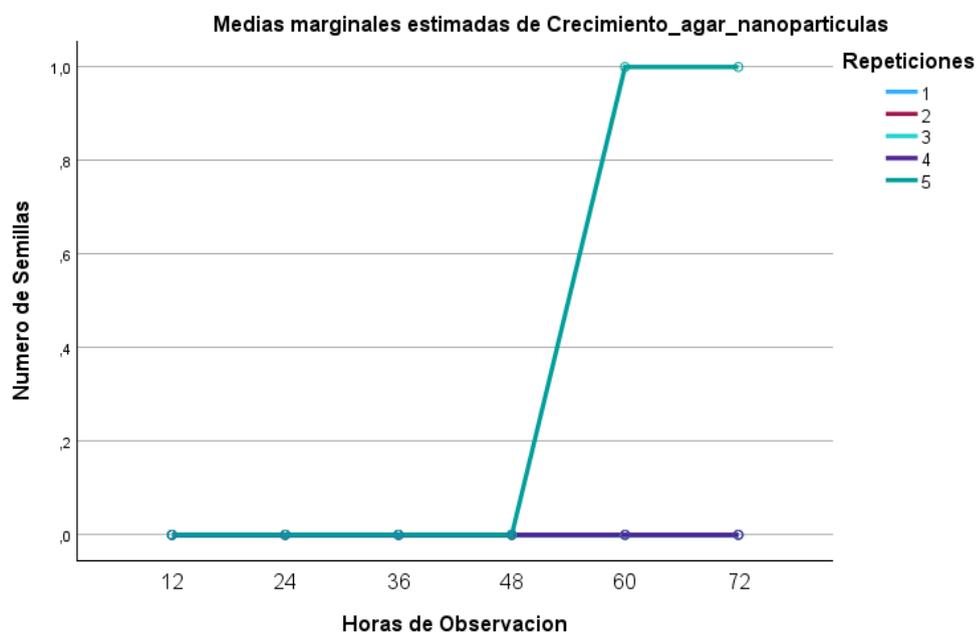


Tabla 9 Tratamiento Agar+Nanoparticulas
Elaborado por: Autores.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la prueba de Tratamiento Agar+Nanoparticulas, con un efecto grande ($F(4) = 0.533$, $p < .001$, $\eta^2 = .333$, $\beta-1 = 0.601$). Es importante destacar que las puntuaciones del Número de Semillas Germinadas en la prueba R1 ($M = 0.00$, $DE = 0.00$) fueron significativamente menores que las puntuaciones en la prueba R2 ($M = 0.00$, $DE = 0.00$).

Las puntuaciones en la prueba R3 ($M = 0.00$, $DE = 0.00$) fueron menores que las de la prueba R4 ($M = 0.00$, $DE = 0.00$), mientras que las puntuaciones en la prueba R5 ($M = 0.33$, $DE = 0.516$) fueron mayores que las de las pruebas R1, R2, R3 y R4. Estas discrepancias señalan una variación significativa en la germinación de semillas bajo diversas condiciones de tratamiento.

Tratamiento Agra-Murashigue

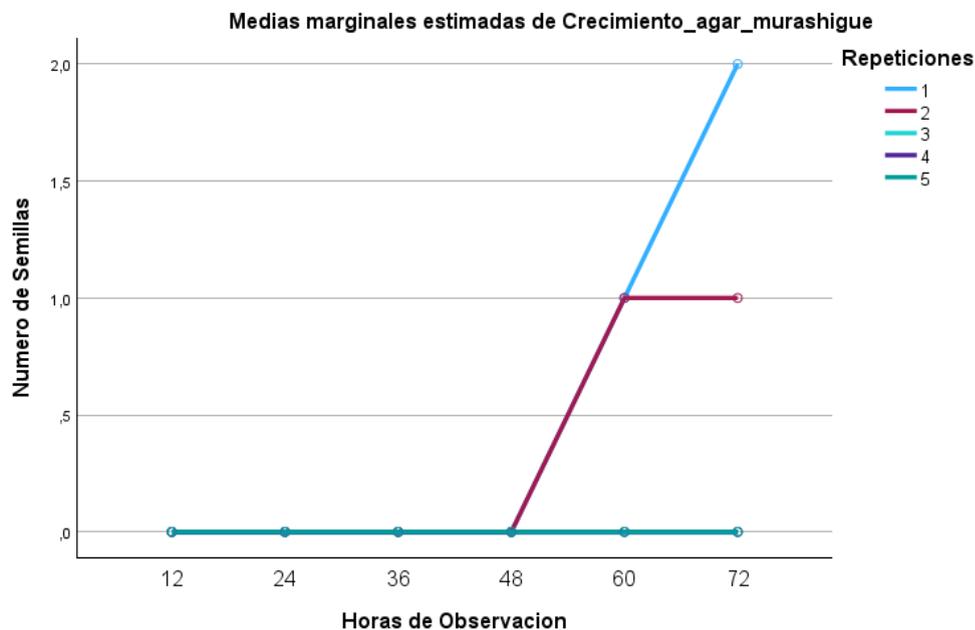


Tabla 10 Tratamiento Agra-Murashigue
Elaborado por: Autores.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la prueba de Tratamiento Agar+Murashigue, con un efecto grande ($F(4) = 1.333$, $p < .001$, $\eta^2 = .303$, $\beta-1 = 0.534$). Es importante destacar que las puntuaciones del Número de Semillas Germinadas en la prueba R1 ($M = 0.50$, $DE = 0.837$) fueron significativamente mayores que las puntuaciones en la prueba R2 ($M = 0.33$, $DE = 0.516$).

Las puntuaciones en la prueba R3 ($M = 0.00$, $DE = 0.00$) fueron menores que las de la prueba R4 ($M = 0.00$, $DE = 0.00$), mientras que las puntuaciones en la prueba R5 ($M = 0.00$, $DE = 0.00$) fueron mayores que las de las pruebas R1 y R2. Estas discrepancias señalan una variación significativa en la germinación de semillas bajo diversas condiciones de tratamiento.

4.2 Análisis de los resultados

Conclusión de Índice de Desarrollo de Germinación en base a los diferentes tratamientos

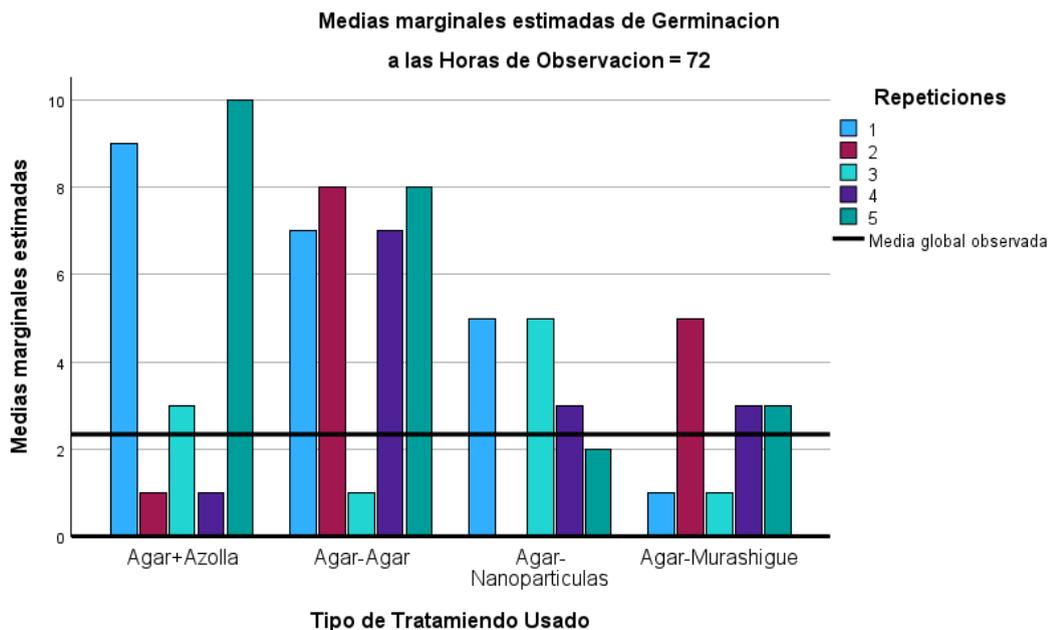


Tabla 11 Índice de Desarrollo de Germinación
Elaborado por: Autores.

Basándonos en los análisis de los diferentes tratamientos en la velocidad de germinación, podemos extraer algunas conclusiones:

Tratamiento Agar+Azolla: Se observaron diferencias significativas en la velocidad de germinación entre las diferentes repeticiones. Las puntuaciones en la repetición R5 fueron las más altas. Este tratamiento mostró un efecto considerable en la germinación de semillas.

Tratamiento Agar+Agar: Se detectaron diferencias significativas en la germinación de semillas entre las repeticiones. Las puntuaciones en la repetición R5 fueron mayores que en las otras repeticiones. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las repeticiones R1, R2 y R4.

Tratamiento Agar+Nanoparticulas: Se observaron diferencias significativas en la germinación de semillas entre las diferentes repeticiones. Las puntuaciones en la repetición R1 fueron significativamente superiores. Sin embargo, las puntuaciones en la repetición R5 fueron menores que en las repeticiones R1 y R3.

Tratamiento Agar+Murashigue: Se detectaron diferencias significativas en la germinación de semillas entre las diferentes repeticiones. Las puntuaciones en la repetición R2 fueron las más altas. Sin embargo, las puntuaciones en la repetición R1 fueron significativamente menores.

Considerando los resultados, el **tratamiento Agar+Azolla** parece ser el más efectivo en términos de velocidad de germinación, ya que las puntuaciones en la repetición R5 fueron consistentemente altas y no hubo discrepancias significativas entre las repeticiones. Este tratamiento podría ser considerado como el más prometedor para promover la germinación de semillas de forma rápida y consistente.

Conclusión de Índice de Desarrollo de Crecimiento en base a los diferentes tratamientos

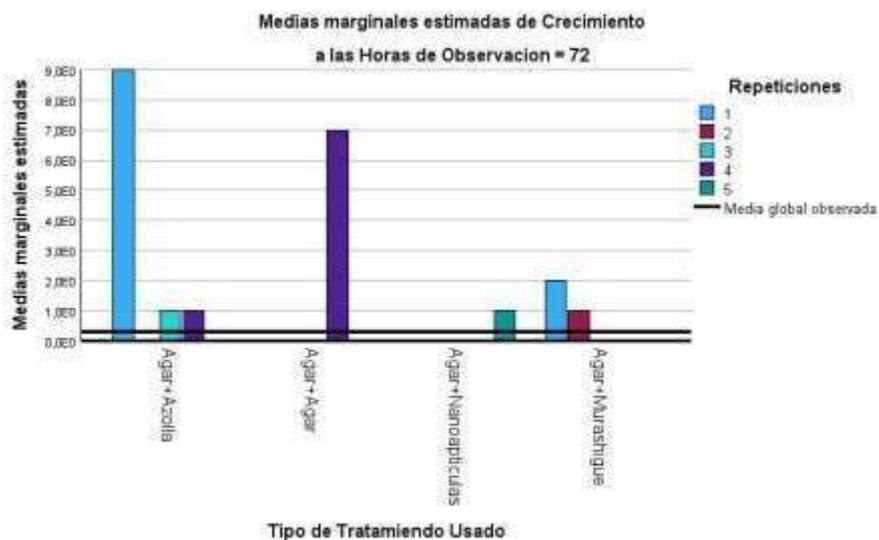


Tabla 12 Índice de Desarrollo de Crecimiento
Elaborado por: Autores.

Basándonos en los análisis de los diferentes tratamientos en la velocidad de crecimiento, podemos extraer algunas conclusiones:

Tratamiento Agar+Azolla: Se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre las diferentes repeticiones. Las puntuaciones en la repetición R1 fueron significativamente mayores que en otras repeticiones. Sin embargo, las puntuaciones en la repetición R5 fueron menores que en las repeticiones R3 y R4.

Tratamiento Agar+Agar: Se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre las diferentes repeticiones. Las puntuaciones en la repetición R4 fueron significativamente mayores que en otras repeticiones. Sin embargo, no hubo crecimiento en las repeticiones R1, R2, R3 y R5.

Tratamiento Agar+Nanopartículas: Se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre las diferentes repeticiones. Las puntuaciones en la repetición R5 fueron mayores que en las repeticiones anteriores, mientras que no hubo crecimiento en las repeticiones R1, R2, R3 y R4.

Tratamiento Agar+Murashigue: Se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre las diferentes repeticiones. Las puntuaciones en la repetición R1 fue mayores que en las repeticiones R2, mientras que no hubo crecimiento en las repeticiones R3, R4 y R5.

Considerando los resultados, el tratamiento con Agar+Agar no parece ser efectivo en términos de promover el crecimiento, ya que no hubo crecimiento en la mayoría de las repeticiones. El tratamiento con **Agar+Azolla** muestra cierta promesa, con un crecimiento significativo en la repetición R1, aunque presenta algunas fluctuaciones en otras repeticiones. El tratamiento con **Agar+Murashigue** también muestran variabilidad en la efectividad del crecimiento.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

- La utilización de la biomasa de *Azolla* spp como agente reductor para sintetizar nanopartículas de plata ofrece ventajas significativas. En primer lugar, desde una perspectiva ambiental, esta técnica es sostenible y reduce la dependencia de productos químicos sintéticos.

- Las plántulas tratadas con nanopartículas demostraron un buen índice de germinación sin embargo fueron superadas por el extracto de *Azolla*, las nanopartículas de plata pueden tener efectos tanto estimulantes como tóxicos en las plántulas de rábano. A bajas concentraciones, pueden mejorar el crecimiento al estimular procesos metabólicos y la absorción de nutrientes. Sin embargo, a concentraciones más altas, pueden causar daño celular y afectar negativamente el desarrollo.

- La biomasa de *Azolla* spp ha demostrado ser un agente eficiente para la síntesis de nanopartículas de plata, Sin embargo, el extracto de *Azolla* resulto ser un tratamiento mucho más eficiente en cuanto a velocidad de crecimiento se refiere, a pesar de que en todos los tratamientos germinaron plántulas.

5.2 Recomendaciones

- Se debe profundizar en la caracterización de las nanopartículas de plata obtenidas utilizando la biomasa de *Azolla* spp. Esto incluye analizar su morfología, tamaño, estabilidad y propiedades ópticas. El factor tiempo, no permitió realizar un análisis profundo de la obtención de nanopartículas.

- Es fundamental determinar la dosis óptima de nanopartículas de plata para maximizar los beneficios sin causar toxicidad. Se deben realizar estudios de dosis-respuesta para establecer límites seguros, además se debe de evaluar la aplicación de dosis durante todo el ciclo del cultivo.

- Realizar estudios específicos que comparen la eficiencia los tratamientos con otros medios en condiciones de campo, esto incluye evaluar la aplicación de las nanopartículas en diferentes etapas del cultivo para poder determinar las técnicas adecuadas para su aplicación.

Bibliografía

- Akinbile, C. O., Ogunrinde, T. A., Che bt Man, H., & Aziz, H. A. (2016a). 63 Phytoremediation of domestic wastewaters in free water surface constructed wetlands using *Azolla pinnata*. *International Journal of Phytoremediation*, 18(1), 54-61. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1058330>
- Akinbile, C. O., Ogunrinde, T. A., Che bt Man, H., & Aziz, H. A. (2016b). Phytoremediation of domestic wastewaters in free water surface constructed wetlands using *Azolla pinnata*. *International Journal of Phytoremediation*, 18(1), 54-61. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1058330>
- Amerasinghe, F. P., & Kulasooriya, S. A. (1985). 105 *Azolla* vs mosquitoes: Some experiments with *Culex quinquefasciatus*. *Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1(4), 355-363. <https://doi.org/10.1007/BF01553420>
- Anawar, H. M., Garcia-Sanchez, A., Tari Kul Alam, M., & Majibur Rahman, M. (2008). Phytofiltration of water polluted with arsenic and heavy metals. *International Journal of Environment and Pollution*, 33(2-3), 292-312. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2008.019400>
- Ansari, A. A., Naeem, M., Gill, S. S., & AlZuaibr, F. M. (2020). Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(4), 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.03.002>
- Azolla* utilization. Proceedings of the workshop on *azolla* use, Fuzhou, Fujian, China, 31 March-5 April 1985. (1987). En *Azolla utilization. Proceedings of the workshop on azolla use, Fuzhou, Fujian, China, 31 March-5 April 1985*. International Rice Research Institute, Manila. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85040878862&partnerID=40&md5=fbc97a84cee9ae4f83675e3b282d043a>
- Becking, J. H. (1987). 166 Endophyte transmission and activity in the *Anabaena-Azolla* association. *Plant and Soil*, 100(1-3), 183-212. <https://doi.org/10.1007/BF02370941>

- Becking, J. H., & Donze, M. (1981). Pigment distribution and nitrogen fixation in *Anabaena azollae*. *Plant and Soil*, 61(1-2), 203-226. <https://doi.org/10.1007/BF02277375>
- Brouwer, P., van der Werf, A., Schluemann, H., Reichart, G.-J., & Nierop, K. G. J. (2016). Lipid Yield and Composition of *Azolla filiculoides* and the Implications for Biodiesel Production. *Bioenergy Research*, 9(1), 369-377. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9665-3>
- Carlozzi, P., & Padovani, G. (2016). 57 The aquatic fern *Azolla* as a natural plant-factory for ammonia removal from fish-breeding fresh wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8749-8755. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6120-8>
- Cheng, W., Okamoto, Y., Takei, M., Tawaraya, K., & Yasuda, H. (2015). Combined use of *Azolla* and loach suppressed weed *Monochoria vaginalis* and increased rice yield without agrochemicals. *Organic Agriculture*, 5(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13165-015-0097-3>
- da Silva, M. E. J., Mathe, L. O. J., van Rooyen, I. L., Brink, H. G., & Nicol, W. (2022). 1129 Optimal Growth Conditions for *Azolla pinnata* R. Brown: Impacts of Light Intensity, Nitrogen Addition, pH Control, and Humidity. *Plants*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/plants11081048>
- de Wet, L. P. D., Schoonbee, H. J., Pretorius, J., & Bezuidenhout, L. M. (1990). 259 Bioaccumulation of selected heavy metals by the water fern *Azolla filiculoides* Lam. In a wetland ecosystem affected by sewage, mine and industrial pollution. *Water SA*, 16(4), 281-286.
- Elmachliy, S., Chefetz, B., Tel-Or, E., Vidal, L., Canals, A., & Gedanken, A. (2011). Removal of silver and lead ions from water wastes using *Azolla filiculoides*, an aquatic plant, which adsorbs and reduces the ions into the corresponding metallic nanoparticles under microwave radiation in 5 min. *Water, Air, and Soil Pollution*, 218(1-4), 365-370. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0650-3>
- Esiobu, N., & Van Hove, C. (1992). The sustenance of tropical agriculture with multipurpose *Azolla*. En M. K (Ed.), *Biological nitrogen fixation and sustainability of tropical agriculture. Proc. 4th conference, African Association*

for *Biological Nitrogen Fixation, Ibadan, 1990*. Wiley/Sayce/IITA/AABNF.
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0027101353&partnerID=40&md5=893192214b245c613b052bfac92da2d0>

- Fatima, F., Hashim, A., & Anees, S. (2021). Efficacy of nanoparticles as nanofertilizer production: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(2), 1292-1303. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11218-9>
- Gutbrod, K. G. (1986). 138 Effect of Azolla on Irrigated Rice in Brazil. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 156(1), 37-44. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1986.tb00005.x>
- Hall, D. O., Markov, S. A., Watanabe, Y., & Krishna Rao, K. (1995). The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynthesis Research*, 46(1-2), 159-167. <https://doi.org/10.1007/BF00020426>
- Issayeva, A., Myrzabayeva, Z., Kidirbayeva, K., Ibragimov, T., Baitasheva, G., & Tleukeyeva, A. (2022). Reaction of Aquatic Plants of Small Rivers of the Turkestan Region of Kazakhstan to Heavy Metal Ions. *Journal of Ecological Engineering*, 23(6), 43-49. <https://doi.org/10.12911/22998993/147838>
- Jayasundara, P. (2022). Wastewater Treatment by Azolla: A review. *Diyala Agricultural Sciences Journal*, 14(1), 40-46. <https://doi.org/10.52951/dasj.22140105>
- Kaur, M., Sahoo, P. C., Kumar, M., Sachdeva, S., & Puri, S. K. (2021). Effect of metal nanoparticles on microbial community shift and syntrophic metabolism during anaerobic digestion of Azolla microphylla. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105841>
- Khan, M. N., Ijaz, M., Ali, Q., Ul-Allah, S., Sattar, A., & Ahmad, S. (2019). Biological nitrogen fixation in nutrient management. En *Agronomic Crops: Volume 2: Management Practices*. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9783-8_8
- Khosravi, M., Taghi Ganji, M., & Rakhshae, R. (2005). Toxic effect of Pb, Cd, Ni and Zn on Azolla filiculoides in the International Anzali Wetland. *International*

- Journal of Environmental Science and Technology*, 2(1), 35-40.
<https://doi.org/10.1007/BF03325855>
- Kleiman, I. D., & Cogliatti, D. H. (1998). Chromium Removal from Aqueous Solutions by Different Plant Species. *Environmental Technology*, 19(11), 1127-1132.
<https://doi.org/10.1080/09593331908616771>
- Kumarasinghe, K. S., Zapata, F., Kovacs, G., Eskew, D. L., & Danso, S. K. A. (1986). 132 Evaluation of the availability of Azolla-N and urea-N to rice using ¹⁵N. *Plant and Soil*, 90(1-3), 293-299. <https://doi.org/10.1007/BF02277404>
- Lindenmayer, A. (1984). 103 Models for plant tissue development with cell division orientation regulated by preprophase bands of microtubules. *Differentiation*, 26(1-3), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1984.tb01366.x>
- McCowen, S. M., MacArthur, L., & Gates, J. E. (1986). 125 Azolla fern lectins that specifically recognize endosymbiotic cyanobacteria. *Current Microbiology*, 14(6), 329-333. <https://doi.org/10.1007/BF01568699>
- Mian, M. H., & Stewart, W. D. P. (1985). 107 A ¹⁵N tracer study to compare nitrogen supply by Azolla and ammonium sulphate to IR8 rice plants grown under flooded conditions. *Plant and Soil*, 83(3), 371-379.
<https://doi.org/10.1007/BF02184449>
- Nordiah, B., Muta Harah, Z., Japar Sidik, B., & Wan Hazma, W. N. (2012). 43 Azolla pinnata growth performance in different water sources. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(13), 621-628.
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.621.628>
- P, A., & M, G. C. (1986). 136 Aspetti ultrastrutturali della simbiosi azolla–Anabaena azollae. *Giornale Botanico Italiano*, 120, 95.
<https://doi.org/10.1080/11263508609429348>
- Prasad, S. M., & Singh, A. (2011). 40 Metabolic responses of Azolla pinnata to cadmium stress: Photosynthesis, antioxidative system and phytoremediation. *Chemistry and Ecology*, 27(6), 543-555.
<https://doi.org/10.1080/02757540.2011.600695>

- Rai, P. K. (2008). Phytoremediation of Hg and Cd from industrial effluents using an aquatic free floating macrophyte *Azolla pinnata*. *International Journal of Phytoremediation*, 10(5), 430-439. <https://doi.org/10.1080/15226510802100606>
- Rai, P. K. (2009). Heavy Metal Phytoremediation from Aquatic Ecosystems with Special Reference to Macrophytes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(9), 697-753. <https://doi.org/10.1080/10643380801910058>
- Randolph, R. H., Keown, C. F., & Giovannini, P. (1988). 192 Scientists' judgements of the prospects for biological nitrogen fixation research. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 4(2), 183-192. <https://doi.org/10.1007/BF01301946>
- Ranjitha, J., Raj, A., Kashyap, R., Vijayalakshmi, S., & Donatus, M. (2016). Removal of heavy metals from industrial effluent using *salvinia molesta*. *International Journal of ChemTech Research*, 9(5), 608-613.
- Ruschel, A. P., de Freitas, J. R., & da Silva, P. M. (1987). 164 Hydrogen uptake by *Azolla-Anabaena*. *Plant and Soil*, 97(1), 79-83. <https://doi.org/10.1007/BF02149826>
- Sanjay-Swami, & Singh, S. (2020). 1063 Effect of nitrogen application through urea and *Azolla* on yield, nutrient uptake of rice and soil acidity indices in acidic soil of Meghalaya. *Journal of Environmental Biology*, 41(1), 139-146. <https://doi.org/10.22438/jeb/41/1/MRN-1133>
- Sela, M., Fritz, E., Huttermann, A., & Tel-Or, E. (1990). Studies on cadmium localization in the water fern *Azolla*. *Physiologia Plantarum*, 79(3), 547-553. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb02116.x>
- Simarmata, T., Prayoga, M. K., Setiawati, M. R., Adinata, K., & Stöber, S. (2021). Improving the climate resilience of rice farming in flood-prone areas through *azolla* biofertilizer and saline-tolerant varieties. *Sustainability (Switzerland)*, 13(21). <https://doi.org/10.3390/su132112308>

- Singh, A. L. (1986). 142 Comparative studies on different methods of Azolla utilization in rice culture. *The Journal of Agricultural Science*, 107(2), 273-278. <https://doi.org/10.1017/S0021859600087074>
- Singh, A. L., & Singh, P. K. (1986). 128 Comparative effects of Azolla and blue-green algae in combination with chemical N fertilizer on rice crop. *Proceedings: Plant Sciences*, 96(2), 147-152. <https://doi.org/10.1007/BF03053331>
- Singh, A. L., & Singh, P. K. (1987). 162 Influence of Azolla management on the growth, yield of rice and soil fertility—I. Azolla growth, N₂-fixation, and growth and yield of rice. *Plant and Soil*, 102(1), 41-47. <https://doi.org/10.1007/BF02370898>
- Singh, P. K., Singh, D. P., & Pandey, K. D. (1987). 158 The influence of fertilizers on sporocarp formation in Azolla pinnata. *Proceedings: Plant Sciences*, 97(3), 223-226. <https://doi.org/10.1007/BF03053346>
- Subudhi, B. P. R., & Singh, P. K. (1979). 36 Effect of phosphorus and nitrogen on growth, chlorophyll, amino nitrogen, soluble sugar contents and algal heterocysts of water fern Azolla pinnata. *Biologia Plantarum*, 21(6), 401-406. <https://doi.org/10.1007/BF02889476>
- Tayeb, N., Hadj, B., Zahra, A., Djamila, A., Brahim, M. M., & Abderezek, B. (2020). 135 Growth and biochemical response of azolla caroliniana willd to soluble npk fertilizers. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii*, 30(4), 193-199.
- Valderrama, A., Carvajal, D. E., Peñailillo, P., & Tapia, J. (2016). 59 Accumulation capacity of cadmium and copper and their effects on photosynthetic performance in Azolla filiculoides lam. Under induced rhizofiltration [Capacidad de acumulación de cadmio y cobre, y sus efectos en el desempeño fotosintético en Azolla filiculoides Lam. Bajo rizofiltración aumentada]. *Gayana - Botanica*, 73(2), 283-291. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432016000200283>
- Vlek, P. L. G., Eberhardt, U., & Mie Aung, M. (2002). 24 The role of Azolla in lowering the pH of simulated floodwater. *Journal of Applied Botany*, 76(1-2), 1-7.
- Wagner, G. M. (1997). Azolla: A Review of Its Biology and Utilization. *Botanical Review*, 63(1), 1-26. <https://doi.org/10.1007/BF02857915>

- Wong Fong Sang, H. W., van Vu, V., Kijne, J. W., Tam, V. T., & Planque, K. (1987). 156 Use of Azolla as a test organism in a growth chamber of simple design. *Plant and Soil*, 99(2-3), 219-230. <https://doi.org/10.1007/BF02370869>
- Yadav, R. K., Abraham, G., Singh, Y. V., & Singh, P. K. (2014). Advancements in the utilization of Azolla-Anabaena system in relation to sustainable agricultural practices. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(2), 301-316. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55108>
- Zimmerman, W. J. (1985). 119 Biomass and pigment production in three isolates of Azolla II. Response to light and temperature stress. *Annals of Botany*, 56(5), 701-709. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087059>
- Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N. A., & Munné-Bosch, S. (2019). Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations. *Plant Science*, 289, 110270. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110270>

Anexos

Procedimiento para la elaboración de la síntesis de nanopartículas de plata a base de biomasa de *Azolla* spp en plántulas de cultivo de rábano (*Raphanus sativus*).



Ilustración 7 Inserción de semillas de rábano en los cuatro tratamientos.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 8 Instrumentos a utilizar para la siembra de las semillas de rábano en los cuatro tratamientos.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 9 Esterilización de frascos para la preparación de medios de cultivo.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 10 Preparación de nitrato de plata.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 11 Síntesis de nanopartículas.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 12 Regulación de PH.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 13 Toma de temperatura de muestra a procesar.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 14 Sustrato con nanopartículas.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 15 Maceración para la obtención de sustrato de Azolla.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 16 Filtración de sustrato de Azolla.
Elaborado por: Autores.



Ilustración 17 Resultado final.
Elaborado por: Autores.

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

