



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN MICROALGA-
BACTERIA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TIAMINA
Y TRIPTÓFANO POR *Chlorella sorokiniana* Y SU
EFECTO EN LA BIOSÍNTESIS DE AIA POR
Azospirillum brasilense

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

OSKAR ALEJANDRO PALACIOS LÓPEZ

La Paz, Baja California Sur, Septiembre de 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 07 del Mes de Septiembre del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Estudio de la interacción microalga-bacteria sobre la producción de tiamina y triptófano por *Chlorella sorokiniana* y su efecto en la biosíntesis de AIA por *Azospirillum brasilense*"

Presentada por el alumno:

Oskar Alejandro Palacios López

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


LUZ E. DE BASHAN
DIRECTOR DE TESIS


YOAV BASHAN
DIRECTOR DE TESIS


GRACIA ALICIA GÓMEZ ANDURO
CO-TUTOR


ANTON HARTMANN
CO-TUTOR


MICHAEL SCHMID
CO-TUTOR


DRA. NORMA YOLANDA HERNANDEZ SAAVEDRA
ENCARGADA DEL DESPACHO DE LA DIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACION DE RECURSOS HUMANOS.

Comité tutorial

Dra. Luz Estela González de Bashan (Co-director). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Dr. Yoav Bashan (Co-director). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro (Co-tutor). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Dr. Anton Hartmann (Co-tutor). Helmholtz Zentrum München
Dr. Michael Schmid (Co-tutor). Helmholtz Zentrum München

Comité revisor de tesis

Dra. Luz Estela González de Bashan
Dr. Yoav Bashan
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Anton Hartmann
Dr. Michael Schmid

Jurado de examen de grado

Dra. Luz Estela González de Bashan
Dr. Yoav Bashan
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Anton Hartmann
Dr. Michael Schmid

Suplentes

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Dr. Macario Bacilio Jiménez.

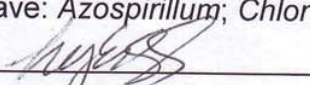
RESUMEN.

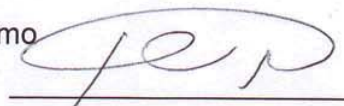
Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB – por sus siglas en inglés), son ampliamente reconocidas por desarrollar características funcionales que favorecen el desarrollo de plantas, tanto a nivel radicular, como en ambientes desfavorables. *Azospirillum brasilense* es una de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal más reconocidas a nivel mundial. Esta bacteria ha mostrado efectos de promoción de crecimiento en plantas como arroz, trigo, maíz, tomate, así como también en microalgas. El mecanismo de promoción de crecimiento más reconocido en esta bacteria es la producción de la fitohormona ácido indol-3-acético (AIA), la cual presenta efectos en plantas mayores de promoción de desarrollo de raíces, raíces secundarias y pelos radiculares. Por otro lado, *Chlorella* spp. es una microalga cosmopolita, ampliamente usada en procesos como remoción de contaminantes de aguas residuales, y producción de compuestos de interés comercial como pigmentos, vitaminas y biocombustibles. En años recientes se ha propuesto el uso de esta microalga como modelo de estudio para la interacción entre una célula eucariota y una procariota (emulando la interacción planta-bacteria que se da a nivel rizosférico).

La interacción entre *Chlorella* y *Azospirillum* en esferas de alginato ha mostrado cambios en la producción de compuestos como lípidos, carbohidratos, pigmentos fotosintéticos y cambio en el perfil de lípidos de la microalga. Estos efectos en la microalga han sido atribuidos a la producción de AIA por parte de *Azospirillum brasilense*. Sin embargo, es sabido que para que *Azospirillum* produzca esta fitohormona, se requiere de una fuente externa de triptófano.

En el presente estudio, se evaluó la capacidad de la microalga *Chlorella sorokiniana* de producir y exudar los precursores necesarios para la síntesis de AIA en *A. brasilense*, tales como triptófano y tiamina, en un medio sintético de crecimiento (MSC), así como la habilidad de esta bacteria de usar estos precursores para producir y liberar a su vez AIA. Durante la interacción de estos microorganismos fue posible observar la capacidad de ambos microorganismos de liberar la vitamina tiamina al medio de crecimiento, bajo diferentes condiciones de crecimiento, así como la capacidad de *C. sorokiniana* de liberar triptófano al medio tanto en condiciones heterotróficas como autotróficas. *Azospirillum* fue capaz de consumir el triptófano presente en exudados de la microalga, con la consecuente producción de AIA. Sin embargo esta producción de AIA solo fue posible cuando estuvo presente la tiamina en el medio de cultivo. Finalmente, este estudio demostró que durante la interacción entre *Chlorella* y *Azospirillum* se genera un intercambio de nutrientes que permite el correcto establecimiento de una interacción mutualista.

Palabras clave: *Azospirillum*; *Chlorella*; Mutualismo


Vo. Bo. Dra. Luz E. de-Bashan


Vo. Bo. Dr. Yoav Bashan

ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are widely recognized for favoring development of plants. The mainly effects of PGPB on plants has been reported at the root level and facilitating the growth of plants in unfavorable environments. *Azospirillum brasilense* is one of the most studied PGPB. This bacterium has promoted growth of rice, wheat, corn, tomatoes, and microalgae. The most recognized mechanisms for promoting plant growth by *Azospirillum* is the production of the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA). This phytohormone promotes development of roots, secondary roots, and root hairs. *Chlorella* spp. are cosmopolitan microalgae widely used in several biotechnology processes for removing contaminants from wastewater, and producing pigments, vitamins, and biofuels. In recent years, microalgae have been used as a study model for eukaryotic–prokaryotic cell interaction, emulating plant–bacteria interaction occurring at the rhizospheric level.

The interaction between *Chlorella* and *Azospirillum* has led to increases in lipids, carbohydrates, and pigments in the microalgae. These effects have been attributed to IAA production by *A. brasilense*. However, it *A. brasilense* requires exogenous tryptophan to produce the phytohormone IAA.

In this study, we measured the ability of microalgae *Chlorella sorokiniana* to produce and release the precursors needed for producing IAA by *A. brasilense*, including tryptophan and thiamine growing in a synthetic growth medium. We also measured the ability of *A. brasilense* to use tryptophan and thiamine present in exudates of *C. sorokiniana* to produce and release IAA. During the interaction between these two microorganisms, we found that both have the ability to release thiamine to the medium under different growing conditions. Also, we found that *C. sorokiniana* releases tryptophan to the growing medium under autotrophic and heterotrophic conditions. *Azospirillum* consumed the tryptophan present in exudates of *C. sorokiniana*, leading to IAA production. Nevertheless, IAA production by *A. brasilense* was only possible when thiamine was present in the medium. Finally this study demonstrates that, during the interaction between *Chlorella* and *Azospirillum*, an exchange of nutrients occurs. These exchanges allow establishment of this mutualistic interaction.

Key words: *Azospirillum*; *Chlorella*; Mutualism.



Vo. Bo. Dra. Luz E. de-Bashan



Vo. Bo. Dr. Yoav Bashan

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a Dios por bendecirme cada día de mi vida permitiéndome llegar con bien a mis objetivos. A mis padres, por su amor incondicional, el cual me han dado las fuerzas para llegar hasta estas instancias en mi vida académica. Mis hermanas Yesica y Leticia que con sus palabras de apoyo y carrilla siempre me aligeraron la carga. Mi sobrino Brandon, en quien siempre veo que aún ante cualquier adversidad queda espacio para risas y travesuras, te quiero Brandon. A mis hijos Eduardo y Diego en quienes siempre encontré lugar para olvidar mis problemas y enfocarme en las bendiciones que tengo. A mi esposa Claudia, quien siempre me apoya en mis decisiones y me orienta cuando estoy a punto de equivocarme, sin ti mi vida no tendría sentido alguno, GRACIAS por estar a mi lado. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al CIBNOR por partirme llevar a cabo la presente tesis de doctorado.

Al posgrado del CIBNOR y su personal, por todo su apoyo incondicional durante el desarrollo de mis estudios, así como por las facilidades que me otorgaron para la asistencia a congreso internacional.

A CONACyt por la beca de nivel doctorado (321134) otorgada para la realización de mis estudios.

Al laboratorio de Bioquímica del CIBNOR, por su apoyo para el uso del equipo de HPLC.

Al laboratorio de Microalgas Nocivas (Francisco Hernández) del CIBNOR por su apoyo con el uso del equipo de HPLC (cuando tuve problemas técnicos con el HPLC del laboratorio de Bioquímica), así como los tips para el montaje de técnicas en dicho equipo.

Al grupo de Microbiología Ambiental del CIBNOR, por adoptarme durante estos 4 años de estudio, sus consejos, frases motivacionales y enriquecimiento intelectual que me brindaron, pero sobre todo por esas mañanas de café llenas de risas, que sirvieron más que cualquier tratamiento desestresante.

A la Bashan Foundation por el apoyo incondicional y gratificaciones proporcionadas

A la Dra. Luz de-Bashan y el Dr. Yoav Bashan, por permitirme formarme en un ambiente de profesionalismo, disciplina y honestidad en el trabajo e investigación, inculcándome siempre buenas prácticas de investigación y proporcionándome siempre consejos para llevar a cabo una vida de investigador plena.

A mis compañeros y amigos de laboratorio (Manuel del club de motociclistas de GMA, Blanquita, Juan, Luisito, Choix, Cristina, Edisa, Edgar y Paulina) por sus acertados consejos durante la realización de mi tesis, la enseñanza brindada, así como los buenos momentos que pasamos durante estos 4 años.

A los doctores Anton Hartmann y Michael Schmid, por sus valiosos consejos en el desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. Gracia Gómez, por acceder a participar en mi comité tutorial, otorgándome siempre palabras de aliento en situaciones adversas, así como sus valiosísimos tips para realizar los presentes experimentos.

CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
Dedicatoria	
Agradecimientos	
Contenido	
Lista de figuras	
Lista de tablas	
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Bacterias promotoras de crecimiento de plantas	3
2.1.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	3
2.1.2 Ácido indol-3-acético (AIA)	4
2.2 Microalgas	5
2.2.1 <i>Chlorella</i> spp.	6
2.2.1.1 <i>Chlorella sorokiniana</i>	7
2.2.1.2 Tiamina	8
2.3 Inmovilización	9
2.3.1 Alginato	10
2.4 Interacción <i>Chlorella</i> – <i>Azospirillum</i>	11
2.4.1 Interacción física dentro de la esfera	14
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	18
6. Materiales y métodos	19
6.1 Optimización de una técnica analítica basada en HPLC para la determinación cualitativa y cuantitativa de tiamina en exudados de <i>Chlorella sorokiniana</i>	19
6.1.1 Equipo de cromatografía líquida	19
6.1.2 Reactivos y estándares para HPLC	19
6.1.3 Preparación de estándares HPLC	20
6.1.4 Obtención de exudados producidos por <i>Chlorella sorokiniana</i>	20
6.1.5 Determinación de tiamina por HPLC absorbancia	20
6.1.5.1 Método de elución en gradiente (Li y Chen, 2001)	20
6.1.5.2 Modificación del método de elución en gradiente descrito por Li y Chen (2001)	21
6.1.6 Determinación de tiamina por HPLC fluorescencia	22
6.1.6.1 Oxidación de tiamina	23
6.1.6.2 Preparación de la muestra	23
6.1.6.3 Efecto del pH en la separación de la tiamina y riboflavina	23
6.2 Microorganismos y condiciones de crecimiento iniciales	23
6.3 Inmovilización de los microorganismos	24
6.4 Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> sobre la producción de tiamina en <i>Chlorella sorokiniana</i> durante la relación	

mutualista	27
6.4.1 Condiciones de cultivo experimentales	27
6.4.2 Métodos analíticos	28
6.4.2.1 Determinación de tiamina	28
6.4.2.2 Conteo de microorganismos	28
6.4.3 Diseño experimental y análisis estadísticos	28
6.5 Efecto de tiamina y triptófano producidos por <i>Chlorella sorokiniana</i> en la producción de ácido indol-3-acético por <i>Azospirillum brasilense</i> durante una relación mutualista	29
6.5.1 Condiciones de cultivo experimentales – Heterotrófico	29
6.5.1.1 Métodos analíticos	31
6.5.1.1.1 Determinación de triptófano y AIA en exudados	31
6.5.1.1.2 Análisis de HPLC	31
6.5.1.1.3 Condiciones de cromatografía	31
6.5.1.1.4 Conteo de microorganismos	32
6.5.1.2 Diseño de experimentos y análisis estadísticos	32
6.5.2 Condiciones de cultivo experimentales – Autotrófico	33
6.5.2.1 Métodos analíticos	33
6.5.2.1.1 Determinación de triptófano en exudados de <i>Chlorella sorokiniana</i> crecida en suspensión	33
6.5.2.1.2 Determinación de triptófano y AIA en experimentos de los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados	34
6.5.2.1.3 Actividad enzimática de indol piruvato descarboxilasa (IPDC)	34
6.5.2.1.4 Actividad enzimática de triptófano sintasa cadena β	35
6.5.2.2 Diseño de experimentos y análisis estadísticos	36
6.6 Efecto de la relación mutualista entre <i>Chlorella sorokiniana</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> , sobre la expresión del gen <i>ipdC</i> en <i>Azospirillum brasilense</i>	36
6.6.1 Condiciones de cultivo experimentales	36
6.6.2 Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y cuantificación por PCR de tiempo real (qRT-PCR)	37
6.6.3 Diseño de experimentos y análisis estadísticos	39
7. Resultados	40
7.1 Optimización de una técnica analítica basada en HPLC para la determinación cualitativa y cuantitativa de tiamina en exudados de <i>Chlorella sorokiniana</i>	40
7.1.1 Determinación de tiamina por HPLC de absorbancia	40
7.1.2 Determinación de tiamina por HPLC de fluorescencia	48
7.2 Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> sobre la producción de tiamina en <i>Chlorella sorokiniana</i> durante una relación mutualista	53
7.2.1 Efecto del pH del medio de crecimiento sobre	

la liberación de tiamina	53
7.2.2 Efecto de la intensidad de la luz sobre la liberación de tiamina	57
7.2.3 Efecto del ayuno de nitrógeno sobre la liberación de tiamina	60
7.3 Efecto de tiamina y triptófano producidos por <i>Chlorella sorokiniana</i> en la producción de ácido indol-3-acético por <i>Azospirillum brasilense</i> durante la relación mutualista	62
7.3.1 Condiciones heterotróficas	62
7.3.1.1 Producción de triptófano por <i>C. sorokiniana</i> co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i>	62
7.3.1.2 Producción de AIA por <i>A. brasilense</i> co-inmovilizada con <i>C. sorokiniana</i>	65
7.3.1.3 Crecimiento de ambos microorganismos bajo condiciones heterotróficas	66
7.3.2 Condiciones autotróficas	70
7.3.2.1 Liberación de triptófano en cultivos en suspensión de <i>C. sorokiniana</i>	70
7.3.2.2 Consumo de triptófano y producción de AIA por <i>A. brasilense</i>	71
7.3.2.3 Actividad de la enzima triptófano sintasa	73
7.3.2.4 Actividad de la enzima indol piruvato decarboxilasa (IPDC)	74
7.4 Definición de la actividad de IPDC encontrada a las 72 y 120 h de incubación, mediante la evaluación de la expresión del gen <i>ipdC</i> en <i>Azospirillum brasilense</i> .	76
8. Discusión	78
9. Conclusiones	93
10. Literatura citada	94
11. Anexos	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de vitamina B ₁ (Tiamina) (Roje <i>et al.</i> , 2007).	8
Figura 2. Cavidad interna (c) de una esfera de alginato (Al) del co-inmovilizado de <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) y <i>Chlorella sorokiniana</i> (Ch) (Lebsky <i>et al.</i> , 2001).	12
Figura 3. Modelo conceptual de la inmovilización de <i>Chlorella sorokiniana</i> – <i>Azospirillum brasilense</i> en esferas de alginato (de-Bashan y Bashan, 2008).	13
Figura 4. Conexión entre <i>Azospirillum brasilense</i> y <i>Chlorella sorokiniana</i> mediante material denso desconocido, durante la co-inmovilización de estos organismos en esferas de alginato (de-Bashan <i>et al.</i> , 2011).	14
Figura 5. Proceso de inmovilización de microalgas y bacterias en esferas de alginato de calcio (www.bashanfoundation.org).	26
Figura 6. Cromatograma del estándar de tiamina 300 nM inyectando 30 µL. Método Bendryshev y colaboradores (2010).	40
Figura 7. Cromatograma del estándar de riboflavina 50 µM inyectado 30 µL. Método Bendryshev y colaboradores (2010).	41
Figura 8. Cromatograma de exudados producidos por <i>Chlorella sorokiniana</i> crecida durante 14 días en medio C30. Método Bendryshev y colaboradores (2010).	42
Figura 9. Cromatograma del medio de cultivo “C30” sin inocular, usado para el cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> . Método Bendryshev y colaboradores (2010).	42
Figura 10. Cromatograma de la solución madre de nitrato de potasio. Método Bendryshev y colaboradores (2010).	43
Figura 11. Cromatograma del medio sintético de crecimiento (MSC). Método Bendryshev y colaboradores (2010).	44
Figura 12. Cromatograma del medio sintético de crecimiento (MSC). Método de Li y Chen (2001).	44

Figura 13. Cromatograma del estándar de tiamina. Método de Li y Chen (2001).	45
Figura 14. Cromatograma del estándar de riboflavina. Método de Li y Chen (2001).	45
Figura 15. Cromatograma del estándar de tiamina. Método modificado de Li y Chen (2001).	46
Figura 16. Cromatograma de estándar de riboflavina. Método modificado de Li y Chen (2001).	46
Figura 17. Cromatograma del medio sintético de crecimiento (SGM). Método modificado de Li y Chen (2001).	47
Figura 18. Cromatograma de exudados de <i>Chlorella sorokiniana</i> , cultivo de 7 días en medio sintético de crecimiento. Exudados analizados por el método de Li y Chen (2001) Modificado.	48
Figura 19. Cromatograma de estándar de tiamina por fluorescencia, fase móvil pH 7.87.	49
Figura 20. Cromatograma de estándar de riboflavina por fluorescencia, fase móvil pH 7.87.	49
Figura 21. Cromatograma de estándar tiamina, fase móvil pH 6.47, método fluorescencia.	50
Figura 22. Cromatograma de estándar riboflavina, fase móvil pH 6.47, método fluorescencia.	51
Figura 23. Cromatograma de la determinación de riboflavina en exudados producidos por <i>Chlorella sorokiniana</i> , cultivo de 10 días. Método fluorescencia, fase móvil pH 6.47.	52
Figura 24. Cromatograma de la determinación de tiamina en exudados producidos por <i>Chlorella sorokiniana</i> , cultivo de 10 días. Método fluorescencia, fase móvil pH 6.47.	53
Figura 25. Tiamina en exudados a pH 6 (a), 7 (b), y 8 (c) producida y liberada por <i>Chlorella sorokiniana</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> inmovilizados por separado o co-inmovilizados juntos en esferas de alginato, así como el crecimiento de estos microorganismos en estos cultivo (d, e, f, g, h, i).	55

- Figura 26. Comparación de la liberación de tiamina por *Chlorella sorokiniana* y *Azospirillum brasilense* a diferente pH del medio cuando fueron inmovilizados por separado o co-inmovilizados juntos en esferas de alginato (a, b, c), así como el crecimiento de estos microorganismos en estos medios de cultivo (d, e, f). 56
- Figura 27. Comparación del contenido de tiamina en exudados bajo diferentes intensidades de luz de 30, 60, 300 y 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ liberada por *Chlorella sorokiniana* y *Azospirillum brasilense* inmovilizados por separado y co-inmovilizados juntos en esferas de alginato (a, b, c), así como el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *Azospirillum brasilense* en estos cultivos (e, f, g, h). 58
- Figura 28. Comparación del contenido de tiamina en exudados bajo diferentes intensidades de luz liberada por *Chlorella sorokiniana* (a), *Azospirillum brasilense* (b) inmovilizados solos y co-inmovilizados (c), y comparación del crecimiento de estos microorganismos en estos cultivos (d, e, f). 59
- Figura 29. Comparación del contenido de tiamina en exudados liberados por *Chlorella sorokiniana* y *Azospirillum brasilense* inmovilizados por separado y co-inmovilizados juntos en esferas de alginato bajo condiciones de ayuno de nitrógeno durante todo el experimento o ayuno parcial de nitrógeno (a, b), y crecimiento de *C. sorokiniana* (c, d) y *A. brasilense* (e, f) bajo estas condiciones. 61
- Figura 30. Producción de triptófano por *Chlorella sorokiniana* inmovilizada sola o co-inmovilizada con diferentes cepas de *Azospirillum* en esferas de alginato bajo condiciones con nitrógeno (a) y condiciones de ayuno de nitrógeno (b), usando D-glucosa como fuente de carbono. 64
- Figura 31. Relación entre triptófano generado (círculo) por *Chlorella sorokiniana* y producción de AIA (triángulo) por *Azospirillum* cuando fueron co-inmovilizadas en esferas de alginato bajo condiciones con nitrógeno (a, b, c) y de ayuno de nitrógeno (d, e, f), usando D-glucosa como fuente de carbono. 67

- Figura 32. Crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con diferentes cepas de *Azospirillum* bajo condiciones con nitrógeno (a), y bajo ayuno de nitrógeno (b). 68
- Figura 33. Densidad celular de las diferentes cepas de *Azospirillum brasilense*, creciendo sola o co-inmovilizada con *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones repletas de nitrógeno (a), y bajo condiciones de ayuno de nitrógeno. 69
- Figura 34. Producción de triptófano por *Chlorella sorokiniana* creciendo sola en medio sintético de crecimiento (MSC). 70
- Figura 35. (a) Producción de ácido indol-3-acético (cuadro) y consumo de triptófano (triángulo) por *A. brasilense* Cd creciendo en exudados producidos por *C. sorokiniana* (negro), en medio sintético de crecimiento (MSC) enriquecido con triptófano (círculo negro), así como MSC enriquecido con triptófano y tiamina (círculo y triángulo blanco). (b) Crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd en MSC. (c) Crecimiento de *A. brasilense* Cd bajo diferentes condiciones. 72
- Figura 36. Actividad de la enzima triptófano sintasa en *C. sorokiniana* inmovilizada sola (Círculo) y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd (triángulo), así como en *A. brasilense* (cuadro). 73
- Figura 37. Actividad de la enzima indol piruvato descarboxilasa (IPDC) a diferentes condiciones de cultivo. 75
- Figura 38. Expresión del gen *ipdC* a dos tiempos (48 h – a; y 96 h – b de incubación) en *A. brasilense* co-inmovilizada con *C. sorokiniana*, e inmovilizada sola a diferentes condiciones de crecimiento. 77

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Concentración de vitaminas en diversas especies de <i>Chlorella</i> bajo condiciones autotróficas (Pratt y Johnson, 1965).	7
Tabla II. Condiciones de HPLC absorbancia descritas por Li y Chen (2001).	21
Tabla III. Condiciones de HPLC fluorescencia descritas por Sánchez-Machado y colaboradores (2004).	22
Tabla IV. Secuencias de primers del gen objetivo y genes constitutivos.	38
Tabla V. Tiempo de retención, linealidad y límite de detección de tiamina y riboflavina bajo el método modificado de Li y Chen (2001), por HPLC absorbancia.	47
Tabla VI. Efecto de pH de la fase móvil, sobre el perfil de elución de tiamina y riboflavina.	50
Tabla VII. Tiempo de retención, linealidad y límite de detección de tiamina y riboflavina bajo el método de Sánchez-Machado y colaboradores (2004), pH 6.47.	51

1. INTRODUCCIÓN.

En recientes años, el uso de microorganismos como microalgas ha sido propuesto para entender mejor los mecanismos que se desarrollan durante las interacciones entre plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB – por sus siglas en inglés). La inmovilización de estos microorganismos en esferas de alginato se ha usado para potenciar la remoción de contaminantes inorgánicos como fósforo y nitrógeno durante el tratamiento de aguas residuales; sin embargo, durante esta interacción artificial se observó un favorecimiento en el crecimiento de la microalga *Chlorella*. A partir de esta observación, se propuso esta interacción como modelo para el estudio de la interacción entre una célula eucariota y una procariota, inmovilizadas en esferas de alginato (Gonzalez y Bashan, 2000).

El uso de microalgas como modelo de estudio de plantas, es considerado debido a que las microalgas tienen una similitud genética y fisiológica de 70 a 98 % con plantas superiores (Bhattacharya y Medlin, 1998). También, estos microorganismos tienen un rápido y fácil crecimiento comparado con las plantas superiores. Por otro lado, la PGPB *Azospirillum brasilense* ha sido usada en cultivos de maíz, arroz y trigo con el objetivo de obtener mejores producciones de estos cultivos (Vande y Vanderleyden, 1995; Bashan *et al.* 2004). Durante la interacción entre la bacteria *A. brasilense* y la microalga *Chlorella sorokiniana* (antes *Chlorella vulgaris*, de-Bashan *et al.*, 2015) se han observado algunos efectos sobre la microalga como un significativo incremento en la población de *Chlorella*. Debido a esto *A. brasilense* fue reconocida como bacteria promotora de crecimiento de microalgas (Gonzalez y Bashan, 2000). Otros efectos que se han observado en la microalga durante su interacción con *Azospirillum* son: 1) una mayor acumulación de carbohidratos (principalmente almidón) creciendo tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas, efecto que indica un incremento en el metabolismo de carbohidratos, principalmente en la fijación de CO₂ por parte de *Chlorella* (Choix *et al.*, 2012a, b); 2) alteraciones en el

metabolismo de lípidos y cambio en el perfil de ácidos grasos (Leyva *et al.*, 2014; 2015); 3) incremento en la asimilación de nitrógeno y fosfato (Meza *et al.*, 2015a,b); 4) así como un incremento en la producción de pigmentos fotosintéticos (de-Bashan *et al.*, 2015).

Diversos estudios mencionan que el principal mecanismo por el cual *Azospirillum* genera efectos benéficos tanto en plantas como en microalgas es por vía hormonal (Bottini *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 2008; Crozier *et al.*, 1988; de-Bashan *et al.*, 2008; Dobbelaere *et al.*, 1999; Martínez-Morales *et al.*, 2003). Se ha reportado que el principal precursor para la síntesis de ácido-3-indol acético (AIA) es el aminoácido triptófano (Carreño-López *et al.*, 2000; Zakharova *et al.*, 1999), mismo que se ha propuesto es proporcionado por las plantas en forma de exudados durante su interacción con la bacteria (Idris *et al.*, 2007; Kamilova *et al.*, 2006). La vitamina tiamina ha sido reconocida como cofactor en la síntesis de AIA (Koga *et al.*, 1992). Por otro lado, *Chlorella* spp son microalgas unicelulares, las cuales puede producir y exudar diversos compuestos como carbohidratos, proteínas, aminoácidos y vitaminas al medio de cultivo (Watanabe *et al.*, 2006; Aaronson *et al.*, 1977; Nishijima *et al.*, 1979).

La interacción mutualista entre *Chlorella* y *Azospirillum* esta basada en el intercambio de recursos que beneficia a ambos microorganismos. Para entender como funciona esta interacción mutualista, el propósito de este trabajo de tesis fue determinar la capacidad de *C. sorokiniana* de producir compuestos como tiamina y triptófano al medio, mismos que podrían ser usados por *Azospirillum* para la producción de la fitohormona AIA. Y de igual modo, demostrar que *A. brasilense* tiene la habilidad de usar los exudados producidos por *Chlorella*, para producir la fitohormona AIA, la cual a su vez será usada por *Chlorella* para favorecer su crecimiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 Bacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPB, por sus siglas en inglés).

Las bacterias capaces de favorecer el crecimiento de plantas, por mecanismos directos e indirectos, son también conocidas como bacterias promotoras de crecimiento de plantas. Los mecanismos por los cuales estos microorganismos favorecen el desarrollo y crecimiento de plantas son diversos e incluyen la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, producción de fitohormonas, síntesis de sideróforos, el aumento en la absorción de minerales, la protección a la planta de infecciones por bacterias patógenas por medio de competencia (Bashan y Holguin, 2002; Ahmad *et al.*, 2008).

2.1.1 *Azospirillum brasilense*.

Azospirillum brasilense es una bacteria gram negativa, rizosférica y una de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas más estudiadas (Bashan y de-Bashan, 2010). Entre los principales efectos que se han visto en plantas que han sido inoculadas por esta bacteria se encuentran la promoción de la elongación de la raíz (Levanony y Bashan, 1989), desarrollo de raíces adventicias y laterales (Creus *et al.*, 2005), así como una mayor ramificación de raíces (Okon y Kapulnik, 1986). Debido a estos efectos benéficos en el desarrollo de las plantas, se ha estudiado en el favorecimiento de cultivos de maíz, arroz y trigo (Vande Broek y Vanderleyden, 1995; Bashan *et al.*, 2004), sin embargo, se propone no como una bacteria promotora de crecimiento de sólo cereales, sino de plantas en general (Bashan *et al.*, 2004).

Entre los diversos mecanismos de promoción de crecimiento que puede llevar a cabo esta bacteria, se encuentran la producción de fitohormonas como auxinas y

giberelinas, las cuales alteran el metabolismo de plantas facilitando la absorción de minerales y agua (Bashan y de-Bashan, 2010), la fijación de nitrógeno, misma que fue originalmente propuesta como el principal mecanismo de acción de *A. brasilense* (Okon *et al.*, 1983), sin embargo, la aportación de este microorganismo en la fijación de nitrógeno en planta continúa en debate (Bashan y Holguin, 1997). La solubilización de fosfatos, es otro mecanismo que se ha relacionado con la inoculación de este microorganismo en plantas, se genera por la capacidad de algunas especies de *Azospirillum* para producir ácidos al medio (Puente *et al.*, 2004). Por otra parte, el uso de este microorganismo como control biológico en cultivos, ha mostrado la capacidad de *A. brasilense* para competir con diversos patógenos de plantas en diferentes cultivos (Bashan y de-Bashan, 2010). Además de todos estos mecanismos de acción se ha observado que *Azospirillum* tiene la capacidad de producir compuestos volátiles como óxido nítrico, que participa como intermediario en el proceso de señalización provocado por el ácido indol-3-acético para la formación de raíces adventicias (Pagnussat *et al.*, 2003; 2004). Así también se ha propuesto una hipótesis aditiva, en la que el efecto de *A. brasilense* sobre la planta, se presenta debido a una posible combinación de todos los mecanismos mencionados anteriormente (Bashan y de-Bashan, 2010).

2.1.2 Ácido Indol-3-acético (AIA)

El AIA es la fitohormona más estudiada y caracterizada, está compuesta de un grupo carboximetil (ácido acético) y pertenece a la familia de las auxinas, que se relacionan con la división, extensión y diferenciación celular en plantas (Teale *et al.*, 2006; Bashan y de-Bashan, 2010). En microalgas, por su parte, se ha observado un efecto positivo sobre el crecimiento poblacional de *Chlorella sorokiniana* (de-Bashan *et al.*, 2008).

En microorganismos la biosíntesis de AIA se da a partir de 3 vías; 1) vía ácido indol-3-piruvico, 2) vía indol-3-acetamida, y 3) vía indol-3-acetaldoxima, usando el

triptófano como precursor (Zakharova *et al.*, 1999), aunque se ha descrito su producción en ausencia de triptófano (Prinsen *et al.*, 1993; Carreño-López *et al.*, 2000). Se ha observado que la síntesis de AIA en *A. brasilense* se da en todas las etapas de crecimiento, pero preferentemente durante la fase estacionaria (Malhorta y Srivastava, 2009).

Noventa por ciento de la producción de AIA en *A. brasilense* se da por medio de la vía del ácido indol-3-piruvico a partir de triptófano, el cual por medio de una aminotransferasa, y posteriormente una descarboxilación y oxidación, se forma el AIA (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). La enzima indol piruvato descaboxilasa (IPDC) actúa en la conversión de ácido indol-3-piruvico a el intermediario indol-3-acetaldehído (Costacurta *et al.*, 1994). El silenciamiento en *A. brasilense* del gen *ipdC* que codifica para esta enzima, mostró una disminución en la síntesis de AIA de más del 90%, indicando que tiene un papel clave en la producción de la fitohormona (Prinsen *et al.*, 1993; Spaepen *et al.*, 2007). La IPDC muestra una estructura de tetrámero, y requiere como cofactores tiamina y magnesio para mantener su estructura activa (Koga *et al.*, 1992). También se ha observado que el gen *ipdC* presenta una expresión dependiente de triptófano (Zimmer *et al.*, 1998).

Los múltiples mecanismos que tiene *A. brasilense*, para promover el crecimiento y desarrollo de diversas plantas, se ha visto como una oportunidad para promover el incremento poblacional de otros microorganismos con aplicación biotecnológica como es el caso de la microalga *Chlorella* (Tam *et al.*, 1994; de-Bashan *et al.*, 2002a; Hernandez *et al.*, 2006).

2.2 Microalgas.

Se define como alga, cualquier organismo con clorofila "a" y un cuerpo no diferenciado en raíces, tallo y hojas, refiriéndose el término microalga a microorganismos que cumplen con estas características. Estos organismos

presentan diferentes tipos de organización celular ya sea unicelular, colonial o filamentosa. Siguiendo estas características, es posible encontrar microalgas en todo el mundo, distribuidas a diferentes profundidades de agua, así como en todo tipo de suelo, viviendo en vida libre o en asociación, de forma simbiótica con otros organismos (Tomaselli, 2004).

Estos microorganismos han sido ampliamente usados debido principalmente al hecho de que tienen la capacidad, bajo condiciones óptimas de cultivo, de producir biomasa a partir de la conversión de luz solar, con un rendimiento de 8 a 10 veces mayor, que las plantas naturales y agrícolas más productivas (Metting, 1996). Partiendo de estos hechos, así como de que son microorganismos capaces de producir una gran variedad de compuestos como lípidos, carbohidratos, vitaminas y proteínas, han sido aprovechados en el campo de la farmacéutica, industria química, alimenticia, acuicultura y agricultura (Pulz y Gross, 2004).

2.2.1 *Chlorella* spp.

Chlorella es un género ampliamente distribuido, tanto en ambientes marinos como de agua dulce. Las especies de este género tienen ciclos de vida y requerimientos nutricionales simples (Iwamoto, 2004). Así también, este género tiene la capacidad de producir una gran variedad de carbohidratos (como sacarosa, ribosa, manosa, galactosa, fructosa e inositol, entre otros) al medio, así como diversas concentraciones de vitaminas principalmente del grupo B (Tabla I). Debido a estas características han sido usadas en estudios de fotosíntesis, síntesis de carbohidratos y respiración (Ilangovan *et al.*, 1998).

Tabla I. Concentración de vitaminas en diversas especies de *Chlorella* bajo condiciones autotróficas (Pratt y Johnson, 1965).

Microalga	Vitamina	Concentración (ng/mL)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Tiamina	3.3 – 43.3
	Riboflavina	7.2 – 13.6
	Biotina	0.8 – 2
	Ácido fólico	1.3 – 35.5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Tiamina	5.4 – 53.5
	Riboflavina	12.6 – 136.5
	Biotina	0.3 – 9
	Ácido fólico	4 – 50.3

La exudación de estas vitaminas al medio se ha visto incrementada con el aumento de la multiplicación celular de la microalga (Nishijima *et al.*, 1979).

2.2.1.1 *Chlorella sorokiniana*.

C. sorokiniana (reportada por Bashan y de-Bashan, anteriormente como *C. vulgaris*) es una microalga verde, no móvil, unicelular, ampliamente distribuida y estudiada. Este microorganismo tiene aplicaciones como productor de lípidos para biocombustibles, pigmentos para la industria de alimentos tanto para el ser humano como para animales, así como en la remoción de metales pesados (Richmond, 2004; Wilde y Benemann, 1993; Converti *et al.*, 2009). Sin embargo, desde hace unos años ha ido ganando importancia en el tratamiento terciario de aguas residuales. Se ha implementado el uso de esferas de alginato, para llevar a cabo la inmovilización de este microorganismo, con bacterias promotoras del crecimiento de plantas, como *Azospirillum*, en donde se aprovecha la característica semi-porosa de la esfera, misma que permite el intercambio de nutrientes, facilitando así la remoción de amonio y fosforo (de-Bashan *et al.*,

2002a). La capacidad que tiene este género de microalga para producir una gran variedad de compuestos, facilitaría la sobrevivencia de la bacteria en un medio pobre en nutrientes (Watanabe *et al.*, 2006; Pratt y Johnson, 1965).

2.2.1.2 Tiamina.

Entre las principales vitaminas producidas por *Chlorella* spp. se encuentra la vitamina hidrosoluble B1, también denominada “tiamina” (Pratt y Johnson, 1965). La estructura de esta vitamina está conformada por un anillo de tiazol y uno de pirimidina unidos a través de un grupo metilo (Figura 1). La tiamina en su forma fosforilada (Tiamina difosfato - TDP) se presenta como cofactor universal en diversas rutas metabólicas, como la glucólisis, las pentosas fosfatos y el ciclo de ácidos tricarboxílicos. En plantas, sirve como cofactor de la enzima piruvato deshidrogenasa tanto en mitocondrias, donde favorece la conversión de piruvato a acetil-CoA para su subsecuente entrada al ciclo de krebs; como en cloroplastos, donde el acetil-CoA servirá como precursor en la biosíntesis de ácidos grasos (Goyer, 2010).

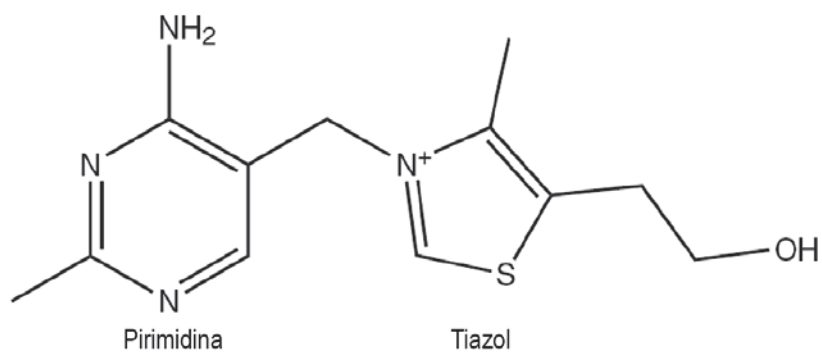


Figura 1. Estructura química de vitamina B1 (Tiamina) (Roje *et al.*, 2007).

La enzima piruvato descarboxilasa (4.1.1.1) es otra de las enzimas que requiere de tiamina como cofactor. Esta enzima facilita la conversión de piruvato a

acetaldehído y dióxido de carbono, para posteriormente reducir el acetaldehído a etanol mediante la oxidación de NADH a NAD⁺ por la enzima alcohol deshidrogenasa. Este proceso denominado fermentación alcohólica, es indispensable en la formación de energía en condiciones anóxicas (Gass *et al.*, 2005). Por otra parte, la transcetolasa (2.2.1.1) enzima responsable en organismos fotosintéticos de la regeneración de la ribulosa 1,5-bifosfato a partir de fosfoglicerato formado durante la fijación de CO₂, usa también a la tiamina difosfato como cofactor (Goyer, 2010).

Otras enzimas en las cuales la tiamina es un cofactor indispensable para su función son la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la acetolactato sintasa. La primera es una enzima esencial en la producción de energía, asimilación de nitrógeno y metabolismo de aminoácidos, mientras que la segunda está involucrada en la síntesis de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Goyer, 2010).

En cuanto a la función de esta vitamina en bacterias promotoras de crecimiento, se ha descrito que funge como el principal cofactor para la enzima indol piruvato descarboxilasa (manteniendo la estructura activa de la enzima, de tétradas) (Koga *et al.*, 1992). Esta enzima es clave en la síntesis de AIA, misma que ha mostrado efectos sobre el crecimiento de plantas y microalgas (de-Bashan *et al.*, 2008).

2.3 Inmovilización.

La inmovilización como proceso físico se define como la restricción de movimiento de un objeto en un espacio o región limitada por una estructura sólida (Zhang *et al.*, 2004). En el ámbito biológico, una célula inmovilizada se define como una célula viva a la cual, por procesos naturales o artificiales, se le limita su desplazamiento de manera independiente de su localización, a cualquier parte de una fase acuosa o sistema (Tampion y Tampion, 1987).

El proceso de inmovilización, también llamado encapsulación, ha tenido aplicación en diversos campos como la industria alimenticia, en donde se ha utilizado para la encapsulación de colorantes, nutrientes, antioxidantes y probióticos (Gibbs *et al.*, 1999); y en procesos de tratamiento de aguas residuales y bioremediación de suelos (Mallick, 2002; Trejo *et al.*, 2012).

La inmovilización puede darse por medio de seis diferentes procesos como son el acoplamiento covalente, la inmovilización por afinidad, adsorción, confinamiento en emulsiones líquido-líquido, captura en membrana semi permeable y el encapsulamiento en polímeros (Mallick, 2002).

Se han usado una gran variedad de materiales para la elaboración de la matriz inmovilizante o encapsulante, siendo los más usados la agarosa, el alginato, celulosas, quitosano y algunos polímeros sintéticos (Nussinovitch, 2010).

2.3.1 Alginato.

El ácido algínico es un copolímero compuesto por uniones 1,4-glucosídicos de diferentes proporciones de ácido manurónico y ácido galurónico. Estas proporciones son las que determinan características como solubilidad, viscosidad y la capacidad que tendrá el polímero para intercambiar iones con metales divalentes (Martinsen *et al.*, 1989; Skaugrud *et al.*, 1999). La formación de geles de alginato se genera a partir de interacciones con cationes divalentes, siendo el más usado el calcio (Nussinovitch, 2010).

El alginato es obtenido principalmente a partir de algas cafés (*Macrocystis pyrifera*, principal alga usada para la obtención), en donde es el mayor componente estructural de la pared celular y la matriz intracelular (Yabur *et al.*, 2007).

Algunas de las características que han hecho al alginato uno de los polímeros más usados en los procesos de inmovilización son el ser fácilmente manejable, así como no presentar toxicidad para el hombre ni el ambiente (Nussinovitch, 2010). Aunado a esto, las células inmovilizadas no sufren cambios en sus condiciones fisicoquímicas durante el procedimiento de inmovilización; así también, al presentarse como una matriz transparente y semipermeable, permite su manejo en diferentes campos, como su utilización en la inmovilización de microalgas para la remoción de contaminantes de aguas residuales (de-Bashan y Bashan, 2010), como matriz encapsulante para el estudio de interacciones entre microorganismos (de-Bashan y Bashan, 2008), así como protección de enzimas para su uso y viabilidad de su actividad en procesos industriales (Haider y Husain, 2007).

2.4 Interacción *Chlorella* – *Azospirillum*

En años recientes se comenzó a estudiar el efecto de la bacteria promotora de crecimiento de plantas *A. brasilense* en la microalga *C. sorokiniana* (antes *C. vulgaris* – Bashan *et al.*, 2015), pensando en la promoción de crecimiento poblacional de la microalga para el tratamiento de aguas residuales (Gonzalez y Bashan, 2000). La interacción de estos dos microorganismos se presentó como una idea innovadora en el campo de la biotecnología, debido principalmente a la diferencia de ambientes de los que se originan estos organismos, siendo necesario el uso de un encapsulante (como el alginato), para mantener la cercanía y garantizar la interacción (Figura 2) (Gonzalez y Bashan, 2000; de-Bashan y Bashan, 2008).

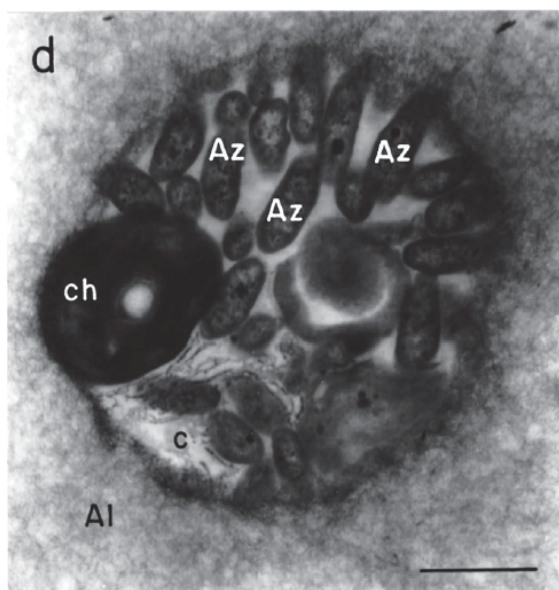


Figura 2. Cavity interna (c) de una esfera de alginato (Al) del co-inmovilizado de *A. brasilense* (Az) y *C. sorokiniana* (Ch) (Lebsky *et al.*, 2001).

La inmovilización de estos microorganismos en esferas de alginato, no solo facilita la interacción de ambos, sino que al presentarse la esfera como una matriz semiporosa, permite el intercambio de nutrientes del medio exterior al interior de la esfera, formándose un sistema abierto (Figura 3), pero que sin embargo proporciona protección a los microorganismos contra microbiota competidora (de-Bashan y Bashan, 2008).

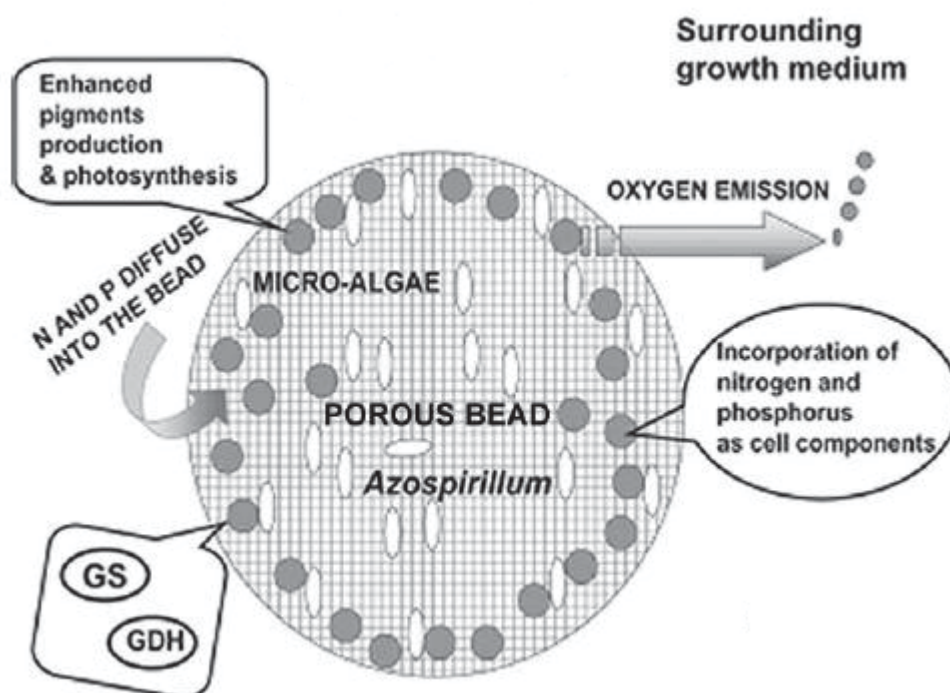


Figura 3. Modelo conceptual de la inmovilización de *C. sorokiniana* – *A. brasilense* en esferas de alginato (de-Bashan y Bashan, 2008).

Durante el estudio de esta interacción, se han observado efectos en la microalga tales como un incremento poblacional significativo (reconociendo de esta forma a *Azospirillum* como bacteria promotora del crecimiento de microalga, Gonzalez y Bashan, 2000), así como una mayor acumulación de carbohidratos (principalmente almidón) tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas, lo que indica un incremento en el metabolismo de carbohidratos, principalmente en la fijación de CO_2 por parte de *Chlorella* (Choix *et al.*, 2012a, b). También se han encontrado alteraciones en el metabolismo de lípidos, asimilación de nitrógeno y fósforo, así como en la producción de pigmentos fotosintéticos (Leyva *et al.* 2014; de-Bashan *et al.*, 2002a, b; de-Bashan *et al.*, 2004).

2.4.1 Interacción física dentro de la esfera.

Para poder comprender mejor este modelo, se estudió la interacción física (que se daba en la esfera) entre los microorganismos, encontrando que *Azospirillum* tiene la capacidad de moverse a través de la matriz hacia las células inmóviles de *Chlorella*, así como que la interacción se da de manera similar que en plantas superiores, donde sucede la liberación de materia fibrilar, que mantiene unidas las células bacterianas a la raíz (Figura 4) (de-Bashan *et al.*, 2011).

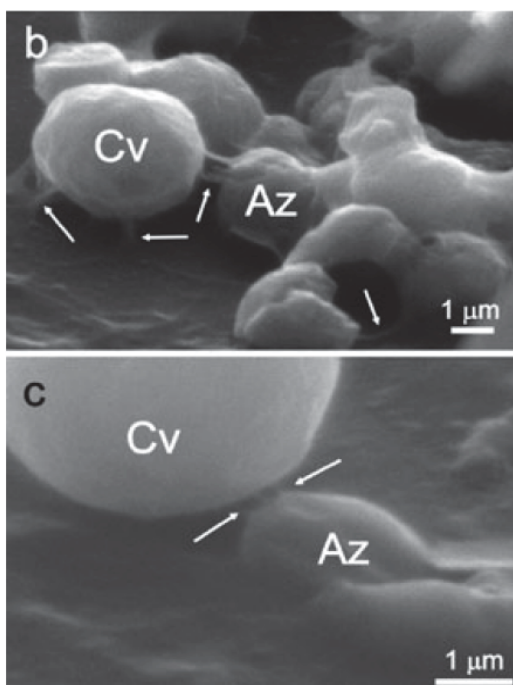


Figura 4. Interacción entre *A. brasilense* y *C. sorokiniana* mediante material denso desconocido, durante la coinmovilización de estos organismos en esferas de alginato (de-Bashan *et al.*, 2011).

La observación de estos compuestos desconocidos, los cuales mantienen unidos a los microorganismos dentro de la esfera; así como los efectos observados en la microalga (como el incremento significativo en la población cuando estuvo inmovilizada con *Azospirillum*), y el incremento poblacional de la bacteria inmovilizada con la microalga, nos permite inferir que la bacteria esta siendo capaz

de mantenerse en esta interacción (Pérez-García *et al.*, 2010). Estas observaciones dieron la pauta para la búsqueda de los compuestos producidos durante esta interacción.

El AIA, se propuso como el compuesto responsable del incremento poblacional de la microalga durante la interacción (de-Bashan *et al.*, 2008). Esta fitohormona se cree facilita la solubilización de la matriz de alginato, permitiendo de esta manera el movimiento de la bacteria a través de este (de-Bashan *et al.*, 2011). Sin embargo, aún se desconocen los compuestos que pudieran estar siendo producidos y liberados por *C. sorokiniana*, mismos que pudieran facilitar el mantenimiento de *A. brasilense* durante la interacción.

3 JUSTIFICACIÓN

El estudio de interacciones entre microorganismos es básico para el entendimiento de procesos que se dan en la naturaleza. La biotecnología se fundamenta en el aprovechamiento de estos mecanismos para generar tecnología en beneficio de la sociedad. El entendimiento de los posibles intercambios de recursos entre células eucariotas y procariotas, no solo nos brindara mayor información de procesos tan complicados como los que ocurren a nivel rizosféricos, si no que también permitirán tener conocimiento de posibles efectos que se podrán generar al aplicar tecnologías como biofertilizantes y el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, las cuales en la actualidad han ido creciendo en interés en el campo de la agricultura, debido a su bondad con cultivos de interés comercial a nivel mundial.

Por esta razón, en este trabajo, el estudio de la capacidad de *Chlorella* para producir compuestos como triptófano y tiamina al medio, así como la habilidad de una de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal más reconocida y usada a nivel mundial como lo es *Azospirillum* para usar estos compuesto y producir AIA, permitirá responder una de las principales hipótesis generadas respecto al estudio de la interacción entre plantas y bacterias, la cual mantiene que la planta es la responsable de generar los precursores necesario para la síntesis de los compuestos responsables de la promoción de crecimiento vegetal producidos por las PGPB.

4 HIPÓTESIS

Si *C. sorokiniana* tiene la capacidad de producir diversos compuestos entre los que se encuentran el aminoácido triptófano (principal precursor en la síntesis de AIA) y vitaminas, como tiamina, la cual actúa como co-factor en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, fotosíntesis y durante la síntesis de AIA, *A. brasilense* ha mostrado tener efecto en la producción de lípidos, carbohidratos y pigmentos fotosintéticos en *C. sorokiniana* durante su co-inmovilización en esferas de alginato, además de la producción de AIA durante esta interacción (sin la adición de triptófano al medio), durante la co-inmovilización de estos microorganismos, *A. brasilense* aumentará la producción de tiamina y triptófano en *C. sorokiniana*, y a su vez estos compuestos favorecerán la producción de AIA en *A. brasilense*.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *A. brasilense* sobre la producción de tiamina por parte de *C. sorokiniana*, así como el efecto de esta vitamina sobre *A. brasilense* durante su interacción mutualista en esferas de alginato.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimización de una técnica analítica basada en HPLC para la determinación cualitativa y cuantitativa de tiamina en exudados de *C. sorokiniana*.
- Determinar el efecto de *A. brasilense* sobre la producción de tiamina en *C. sorokiniana* durante la relación mutualista.
- Determinar el efecto de tiamina y triptófano producidos por *C. sorokiniana* en la producción de ácido indol-3-acético por *A. brasilense* durante la relación mutualista.
- Determinar el efecto de la relación mutualista entre *C. sorokiniana* y *A. brasilense*, sobre la expresión del gen *ipdC* en *A. brasilense*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Optimización de una técnica analítica basada en HPLC para la determinación cualitativa y cuantitativa de tiamina en exudados de *Chlorella sorokiniana*.

6.1.1 Equipo de cromatografía líquida.

Se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta presión Agilent 1100, que consiste en una bomba de gradiente, automuestreador, termostato de columna, un detector de matriz de diodos, así como un detector de fluorescencia. El registro de los cromatogramas se llevo a cabo con ayuda del software HPCHEM.

Se hizo uso de una columna LiChrosorb-RP 18 de 250 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 10 µm. El volumen de inyección, la composición de la fase móvil, así como el modo de aplicación (isocrático o en gradiente) dependió del método probado.

6.1.2 Reactivos y estándares para HPLC.

Debido a que uno de los principales problemas en la optimización de la técnica para determinar tiamina en exudados, fue la presencia de compuestos con tiempos de retención similares a la tiamina, (como fue riboflavina) fue necesario incluir estándares para esta última vitamina, para asegurar la correcta separación de las dos vitaminas.

Las soluciones estándar de ambas vitaminas se prepararon a partir de clorhidrato de tiamina y riboflavina; acetonitrilo 99.9% grado HPLC; Metanol 99.9% grado HPLC; ácido fosfórico 85%; hidróxido de sodio, hidróxido de potasio; fosfato de potasio monobásico; hexacianoferrato de potasio (III), todos estos grado analítico (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

6.1.3 Preparación de estándares HPLC

Se prepararon soluciones madre de clorhidrato de tiamina y riboflavina a concentraciones de 10 mg/mL y 100 µg/mL (respectivamente) en agua grado miliQ, así como en el medio sintético de crecimiento (de-Bashan *et al.*, 2008), y se almacenaron en frascos ámbar en refrigeración hasta su uso. Las curvas de calibración se realizaron con diluciones seriadas de las soluciones madre hasta obtener una concentración de 0.02 ng/mL.

6.1.4 Obtención de exudados producidos por *Chlorella sorokiniana*

Se tomó una muestra de 10 mL del cultivo de *C. sorokiniana* y se centrifugó a 5,500 rpm durante 5 minutos; posteriormente el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 µm de porosidad. Una vez filtrado, se colocó en un vial y se analizó por HPLC la presencia y concentración de tiamina.

6.1.5 Determinación de tiamina por HPLC absorbancia.

La determinación y cuantificación de tiamina por HPLC de absorbancia se observó no solo en los estándares, también se analizó la presencia de esta en exudados producidos por *Chlorella sorokiniana* crecida de manera autotrófica, en condiciones favorables.

6.1.5.1 Método de elución en gradiente (Li y Chen, 2001).

Se probó la técnica descrita por Li y Chen (2001) para la determinación de vitaminas hidrosolubles, empleando un método de elución en gradiente (Tabla II), donde la fase móvil estuvo compuesta por buffer de fosfatos pH 7.0 (eluyente A) y

metanol (eluyente B), el volumen de inyección fue de 20 μL , con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min; la duración de la corrida fue de 15 minutos.

Tabla II. Condiciones de HPLC absorbancia descritas por Li y Chen (2001).

Método	Li and Chen (2010)
Columna	LiChrosorb-RP 18 (250x4.6mm)
Tamaño de partícula	10 μm
Método de elución	Gradiente
Eluyente A	Buffer de fosfatos pH 7.0
Eluyente B	Metanol
Temperatura	25 $^{\circ}\text{C}$
Volumen de inyección	20 μL
Velocidad de flujo	1.5 mL/min
Longitud de onda	234nm – Tiamina
(ajustadas de acuerdo al barrido de máxima absorbancia)	270nm – Riboflavina
Duración	15 minutos
Gradiente	En base a eluyente B
0 – 7 minutos	10%
8 – 15 minutos	40%

6.1.5.2 Modificación del método de elución en gradiente descrito por Li y Chen (2001).

Se cambio el gradiente de la fase móvil descrita por Li y Chen (2001), para la determinación de vitaminas por absorbancia, quedando de la siguiente manera (en base a eluyente B): 0–5 minutos 0%, 5–10 minutos 0–40%, 10–15 minutos 40–0%.

6.1.6 Determinación de tiamina por HPLC fluorescencia.

La determinación de tiamina por medio de fluorescencia, se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sánchez-Machado *et al.* (2004), tanto en soluciones estándar como en exudados producidos por *C. sorokiniana* crecida de manera autotrófica, en condiciones favorables. Para la determinación de estas vitaminas se usó como fase móvil una solución de buffer de fosfatos/acetónitrilo (72:28 v/v) pH 6.5, en modo isocrático con una velocidad de flujo de 0.65 mL/min, a una temperatura de la columna de 35 °C (Tabla III). La determinación de tiamina en su forma oxidada (tiocromo) se midió a una longitud de onda de excitación de 370 nm y una longitud de onda de emisión de 435 nm, mientras que para la determinación de riboflavina se empleó una longitud de onda de excitación de 370 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm.

Tabla III. Condiciones de HPLC fluorescencia descritas por Sánchez-Machado *et al.* (2004).

Método	Sánchez-Machado <i>et al.</i> , 2004
Columna	LiChrosorb-RP 18 (250x4.6mm)
Tamaño de partícula	10 µm
Método de elución	Isocrático
Eluyente	Buffer de fosfatos pH 7.0/Acetonitrilo (72:28 v/v)
Temperatura	35 °C
Volumen de inyección	30 µL
Velocidad de flujo	0.65 mL/min
Longitud de onda de excitación	370 nm – Tiamina (tiocromo) 370 nm – Riboflavina
Longitud de onda de emisión	435 nm – Tiamina (tiocromo) 520 nm – Riboflavina
Duración	10 Minutos

6.1.6.1 Oxidación de tiamina.

1 mL de la solución estándar de tiamina fue oxidada para la obtención de su derivado fluorescente, tiocromo, mediante la adición de 500 μ L de una solución de ferrocianuro de potasio 1% (en una solución de hidróxido de sodio 15%). Posteriormente se mezcló por vortex durante 10 segundos, se adicionó 100 μ L de ácido fosfórico concentrado y se mezcló por vortex durante 5 segundos más. La solución obtenida se pasó a un vial para HPLC y se llevó a cabo su análisis.

6.1.6.2 Preparación de la muestra

Para la determinación de tiamina en las muestras de exudados producidos por *C. sorokiniana*, estos se procesaron en forma similar a los estándares de tiamina, llevando a cabo la oxidación con ferrocianuro de potasio. Para la determinación de riboflavina, se inyectaron las muestras sin procesar directamente, bajo las condiciones descritas para su determinación.

6.1.6.3 Efecto del pH en la separación de la tiamina y riboflavina.

Se observó el efecto de 4 diferentes pH de la fase móvil (Buffer de fosfatos: Acetonitrilo 72/28 v/v) sobre la separación de tiamina y riboflavina. Se modificó el pH resultante de la combinación de estos dos reactivos (pH 7.87) por medio de la adición de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (según fuera necesario) hasta obtener soluciones con pH de 5.93, 6.47 y 7.0.

6.2 Microorganismos y condiciones de crecimiento iniciales.

En la presente tesis se usola microalga unicelular *C. sorokiniana* (UTEX 2714 – antes *C. vulgaris* – Bashan *et al.*, 2015) y tres cepas de *Azospirillum* spp. las

cuales difirieren en la cantidad de AIA que producen. Estas fueron la cepa silvestre *A. brasilense* Sp6 la cual produce $51.18 \pm 0.81 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de AIA en cultivo puro (Barbieri y Galli, 1993), su mutante atenuado en producción de AIA *A. brasilense* SpM7918 (AIA = $15.53 \pm 0.4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Barbieri y Galli, 1993) y la cepa silvestre *A. brasilense* Cd 1843 (AIA = $44.01 \pm 0.17 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, DSM 1843) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania). Esta última cepa silvestre fue usada para el cumplimiento de los objetivos 2, 3 y 4 de la presente tesis, mientras que las demás cepas fueron incluidas solo en el objetivo 3.

Para obtener pre-cultivos de la microalga, 10 mL de cultivo axénico de cada microalga fueron inoculados independientes en 90 mL de medio mineral (C30), el cual tiene la siguiente composición (en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): KNO_3 (25), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10), KH_2PO_4 (4), K_2HPO_4 (1), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1), (en $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): H_3BO_3 (2.86), $\text{MnCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.11), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.09), NaMoO_4 (0.021) e incubados a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, y agitados a 140 rpm bajo una intensidad de luz de $60 \mu\text{mol} \cdot \text{photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 7 d (González *et al.*, 1997). La bacteria creció en medio BTB-2 (Bashan *et al.*, 2011) el cual tiene la siguiente composición (en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl (1.2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.25); K_2HPO_4 (0.13), CaCl_2 (0.22), K_2SO_4 (0.17), Na_2SO_4 (2.4), NaHCO_3 (0.5), Na_2CO_3 (0.09), NH_4Cl (1), triptona (5), extracto de levadura (5), gluconato (5), $\text{Fe}_{\text{III}}\text{EDTA}$ (0.07). El pH fue ajustado a 7 con 1 M KOH e incubado a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ y agitado a 120 rpm por 16 h.

6.3 Inmovilización de los microorganismos.

100 mL de cultivos de la microalga y de la bacteria fueron centrifugados por 5 min a 6000 g, se resuspendieron y enjuagaron tres veces con 20 mL de solución salina al 0.85 %; al final de los lavados los microorganismos se resuspendieron en 20 mL de la misma solución salina.

Para inmovilizar y co-inmovilizar los microorganismos, primero se preparó una solución de alginato de sodio (3000 CP) al 1.8% en 80 mL de agua destilada y se esterilizó. Para inmovilizar la microalga, se añadieron los 20 mL de cultivo de la microalga resuspendida en la solución salina en la solución de alginato estéril y se agitaron hasta homogenizar. Para inmovilizar la bacteria inicialmente se ajustó la concentración de la misma a 10^9 UFC, ajustando la densidad óptica de la solución a 1 a una longitud de onda de 540 nm; posteriormente se añadieron los 20 mL de la solución salina con la bacteria en la solución de alginato estéril y se homogenizaron.

Para co-inmovilizar ambos microorganismos en la esfera de alginato, se siguió el mismo procedimiento, simplemente que se resuspendieron en 10 mL de la solución salina, de esta forma obtenemos los 20 mL que se agregaron a los 80 mL de la solución de alginato estéril y se homogenizaron.

Una vez que se obtuvieron las soluciones de alginato con 1) Bacteria, 2) Microalga y 3) Microalga-Bacteria, se procedió a inmovilizarlos mediante la ayuda de una bomba peristáltica y a través de una manguera de silicón y una aguja estéril. Las gotas de solución de alginato homogenizada con los microorganismos se recibieron en 100 mL de una solución endurecedora de cloruro de calcio al 3 % (Figura 5) y se dejaron por 30 min en dicha solución. Posteriormente las esferas fueron enjuagadas dos veces con solución salina 0.85% y finalmente las esferas con los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados fueron sometidos a crecimiento secundario en una solución de caldo nutritivo 10% v/v (Sigma-Aldrich) a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, agitado por 140 rpm, con una intensidad de luz de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 24 h.

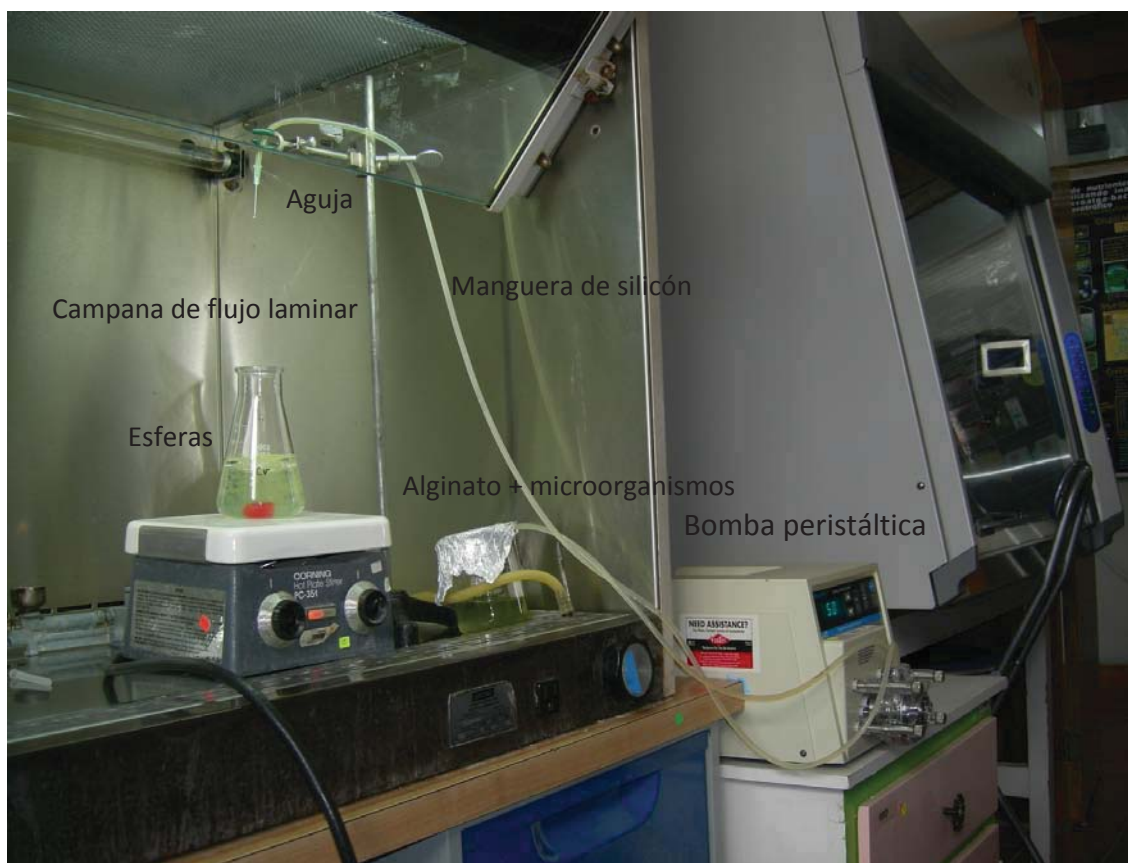


Figura 5. Proceso de inmovilización de microalgas y bacterias en esferas de alginato de calcio (www.bashanfoundation.org).

Una vez obtenidas las esferas de alginato con los microorganismos, se obtuvieron los siguientes tratamientos y controles:

- 1) *C. sorokiniana* inmovilizada – Control
- 2) *C. sorokiniana* + *Azospirillum* spp co-inmovilizada
- 3) *A. brasilense* inmovilizada – Control

6.4 Efecto de *Azospirillum brasilense* sobre la producción de tiamina en *Chlorella sorokiniana* durante la relación mutualista

6.4.1 Condiciones de cultivo experimentales.

Para el cumplimiento del segundo objetivo específico de la presente tesis, después del crecimiento secundario, las esferas fueron lavadas tres veces en solución salina estéril (0.85% NaCl) para remover los remanentes del medio. Para cada experimento, 20 g de esferas con microorganismos, tanto inmovilizados solos como co-inmovilizados, fueron inoculados 300 mL de medio sintético de crecimiento (MSC) (en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad) descrito en de-Bashan *et al.* (2011) el cual contenía (en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl (7), CaCl_2 (4), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2), K_2HPO_4 (217), KH_2PO_4 (8.5), Na_2HPO_4 (33.4), NH_4Cl (191). El medio inoculado fue incubado bajo condiciones autotróficas a diferentes intensidades de luz, pH, y condiciones de nitrógeno, de acuerdo a como se indica a continuación:

- 1) Cuatro diferentes intensidades de luz de 30, 60, 300 y 500 $\mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7,
- 2) pH6 (ajustado con HCl, 1N), pH 7 y pH 8 (ajustado con NaOH, 0.3N) a 60 $\mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.
- 3) Dos regímenes de ayuno de nitrógeno fueron probados. El primero aplicando el ayuno solo durante el crecimiento secundario (24 h después de inmovilizar los microorganismos) y el segundo régimen aplicado después del crecimiento secundario. Los experimentos bajo condiciones de ayuno de nitrógeno fueron realizados en medio sintético de crecimiento libre de nitrógeno a pH 7, 60 $\mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Todos los experimentos fueron mantenidos en agitación a 140 rpm a 27 ± 2 °C durante 144 h.

6.4.2 Métodos analíticos.

6.4.2.1 Determinación de tiamina.

Muestras de 5 mL (por réplica y por tratamiento; n = 9) de esferas de alginato (aproximadamente 25 esferas = 1 g) y 10 mL de medio de cultivo de cada tratamiento fueron tomadas a intervalos de 48 h. Las esferas fueron disueltas en 30 mL de buffer de citrato conteniendo (en mM): citrato de sodio (55) EDTA anhídrido (30), y NaCl₂ (150), en un volumen final de 1 L y ajustado a pH 8.2 con NaOH. Las soluciones fueron centrifugadas a 6000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente; y filtrados a través de un filtro con poro de diámetro de 0.22 µm (GSWP02500, Millipore, Bilerica, MA), y se analizaron por medio de HPLC de acuerdo a la técnica de Sanchez-Machado *et al.* (2004), descrita previamente.

6.4.2.2 Conteo de microorganismos.

Para cada tratamiento, de cada frasco Erlenmeyer de 250 mL se tomaron al azar 3 esferas. Cada esfera fue solubilizada mediante su inmersión en 1 mL de buffer citratos (composición descrita previamente) durante 30 minutos. Las células de *A. brasilense* fueron contadas por medio del método de diacetato de fluoresceína descrito por Chrzanowski *et al.* (1984) bajo un microscopio de fluorescencia (BX41, Olympus, Tokio). *Chlorella sorokiniana* fue contada mediante una cámara de Neubauer, bajo un microscopio de luz conectado a un analizador de imágenes (Image ProPlus 4.5, Media Cybernetics Silver Spring, MD) (Gonzalez y Bashan, 2000).

6.4.3 Diseño experimental y análisis estadísticos.

Los experimentos en este segundo objetivo se realizaron en cultivos por lote, contando con tres réplicas, donde cada frasco Erlenmeyer de 250 mL se consideró

una réplica. El experimento consistió de 3 tratamientos: 1) esferas conteniendo *C. sorokiniana*; 2) esferas conteniendo *A. brasilense* (estos dos primeros sirviendo como controles), y 3) esferas conteniendo los dos microorganismos co-inmovilizados ($n = 9$). El experimento fue repetido dos veces. La cantidad de tiamina determinada mediante la suma de tiamina difosfato y tiamina monofosfato fue expresada como tiamina total por mililitro de solución. La linealidad de las curvas de calibración fue analizada por medio de un análisis de correlación, seguido de un análisis de regresión. Los datos de células contadas y producción de vitamina fue analizado primero por medio de un ANDEVA de una vía seguido de una prueba de DMS (Diferencia Mínima Significativa), con significancia de $P < 0.05$, usando el software estadístico Statistica 6.0 (StartSoft, Tulsa, OK). La comparación entre la producción de tiamina por el tratamiento del co-inmovilizado vs la producción de tiamina por *C. sorokiniana* y *A. brasilense*, cada uno inmovilizado por separado, fue analizado mediante un análisis de contrastes ortogonales con significancia de $P < 0.05$, usando el software analítico SAS 9.00 (SAS Institute, Cary, NC).

6.5 Efecto de tiamina y triptófano producidos por *Chlorella sorokiniana* en la producción de ácido indol-3-acético por *Azospirillum brasilense* durante una relación mutualista.

Para el cumplimiento del objetivo 3 de la presente tesis, usaron uso la microalga *Chlorella sorokiniana* y tres cepas de *Azospirillum* spp. (previamente mencionadas) con diferencia en su producción de AIA bajo condiciones de cultivo heterotrófico y autotrófico.

6.5.1 Condiciones de cultivo experimentales - Heterotrófico

Los tratamientos utilizados bajo esta condición fueron los siguientes:

1) Esferas solas;

- 2) *C. sorokiniana* inmovilizada sola;
- 3) *C. sorokiniana* inmovilizada sola en MCS enriquecido con AIA sintético, concentración promedio a la producida por las cepas silvestres de *A. brasilense* utilizadas en la presente tesis;
- 4) *A. brasilense* Cd inmovilizada sola;
- 5) *A. brasilense* Sp6 inmovilizada sola;
- 6) *A. brasilense* SPM7918 inmovilizada sola;
- 7) *C. sorokiniana* – *A. brasilense* Cd co-inmovilizadas;
- 8) *C. sorokiniana* – *A. brasilense* Sp6 co-inmovilizadas;
- 9) *C. sorokiniana* – *A. brasilense* SPM7918 co-inmovilizadas.

La inmovilización de los microorganismos se hizo de la manera descrita previamente. Para el presente objetivo, el crecimiento secundario dependió del tipo de condición de crecimiento en el que se desarrolló después el experimento: Así, el crecimiento secundario se llevó a cabo en una solución de caldo nutritivo 10% v/v (Sigma-Aldrich), o en medio OAB compuesto de (en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): KOH (4.80), ácido málico (5.00), NaCl (1.20), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.25), K_2HPO_4 (0.13), CaCl_2 (0.22), K_2SO_4 (0.17), Na_2SO_4 (2.40), NaHCO_3 (0.50), Na_2CO_3 (0.09), $\text{Fe}_{\text{III}}\text{EDTA}$ (0.07) y (en $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): H_3BO_3 (0.2), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.2), ZnCl_2 (0.15), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.2), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20) (Bashan *et al.*, 1993), incubado a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h.

Después del crecimiento secundario, las esferas fueron lavadas 3 veces con solución salina estéril (0.85% NaCl). Para los experimentos, 12 g de esferas con microorganismos, tanto inmovilizados por separado, como co-inmovilizados, fueron inoculados en 150 mL de medio sintético de crecimiento (libre de triptófano), con la composición arriba mencionada, fue saturada con nitrógeno (+ N_2) (Bashan *et al.*, 2011). Para obtener condiciones de ayuno de nitrógeno se omitió el reactivo NH_4Cl en la preparación del medio sintético de crecimiento.

El medio MSC fue suplementado con $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de D- glucosa (G5767, Sigma) como fuente de carbono. Esta fuente de carbono fue esterilizada por filtración a través de un filtro con poros de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro (Acrodisc 28145-477, Pall

Corp., Port Washington, NY). Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones heterotróficas en completa oscuridad y agitados a 140 rpm a 27 ± 2 °C durante 96 h.

6.5.1.1 Métodos analíticos.

6.5.1.1.1 Determinación de triptófano y AIA en exudados.

Muestras de 1 mL de medio de cultivo de cada tratamiento (por replica y por tratamiento; $n = 27$) fueron tomadas a intervalos de 24 h. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro con poros de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro (GSWP02500, EMD Millipore, Billerica, MA) y analizadas por medio de HPLC.

6.5.1.1.2 Análisis de HPLC.

Se uso un equipo de HPLC (Agilent 1100; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) para el análisis de triptófano y AIA. Los cromatogramas obtenidos fueron analizados mediante el uso del software integrado HPCHEM (G2170BA; Hewlett-Packard, Wilmington, DE).

6.5.1.1.3 Condiciones de cromatografía.

El sistema de HPLC fue equipado con una columna de fase reversa (TSKgel ODS-120A, tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$, $150 \times 46 \text{ mm}$; Supelco, Bellefonte, PA) y una fase móvil en método isocrático, compuesta de metanol:agua:ácido acético (36:64:1 v/v). El volumen de inyección fue $100 \mu\text{L}$ a una velocidad de flujo de $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. La longitud de onda de detección fue 290 nm. Los estándares fueron: triptófano (PHR1176, Sigma) y AIA (I5148, Sigma). Condiciones obtenidas de Zakharova *et al.* (1999).

6.5.1.1.4 *Conteo de microorganismos.*

Para cada tratamiento, de cada frasco Erlenmeyer de 250 mL se tomaron al azar 3 esferas. Cada esfera fue solubilizada mediante su inmersión en 1 mL de buffer citratos (composición descrita previamente) durante 30 minutos. Las células de *A. brasilense* fueron contadas por medio del método de diacetato de fluoresceína descrito por Chrzanowski *et al.* (1984) bajo un microscopio de fluorescencia (BX41, Olympus, Tokio). *C. sorokiniana* fue contada mediante una cámara de Neubauer, bajo un microscopio de luz conectado a un analizador de imágenes (Image ProPlus 4.5, Media Cybernetics Silver Spring, MD) (Gonzalez y Bashan, 2000).

6.5.1.2 *Diseño de experimentos y análisis estadísticos.*

Los experimentos se realizaron en cultivos por lote, contando con tres replicas, donde cada frasco Erlenmeyer de 250 mL se considero un replica. Cada experimento contenía 9 tratamientos : 1). esferas sin microorganismos, 2). esferas con *C. sorokiniana*, 3). esferas con *C. sorokiniana* (añadiendo al MSC AIA sintético), 4). esferas con *A. brasilense* Cd, 5). esferas con *A. brasilense* Sp6, 6). esferas con *A. brasilense* SPM (todos estos controles); 7). esferas con *C. sorokiniana* – *A. brasilense* Cd, 8). esferas con *C. sorokiniana* – *A. brasilense* Sp6, 9). esferas con *A. brasilense* SPM (estos últimos tratamientos) (n = 27). Cada experimento fue repetido dos veces, los datos de cada tratamiento de cada repetición (n = 54) fueron combinados y analizados primero por un ANDEVA de una vía, y posteriormente mediante un análisis de DMS (Diferencia mínima significativa), con significancia de $P < 0.05$, usando el software Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK)

6.5.2 Condiciones de cultivo experimentales - Autotrófico

Bajo esta condición, se uso la microalga *C. sorokiniana* y la bacteria *A. brasilense* Cd. Una vez inmovilizados y co-inmovilizados los microorganismos como de describió previamente, se llevo a cabo el crecimiento secundario en una solución de caldo nutritivo 10% v/v (Sigma-Aldrich) a 27 ± 2 °C durante 24 h. Después del crecimiento secundario, las esferas fueron lavadas 3 veces en solución salina estéril (0.85% NaCl) para remover los remanentes del caldo nutritivo. Para el experimento, 20 g de esferas con microorganismos tanto inmovilizados solos como co-inmovilizados, fueron inoculados en 300 mL de MSC, cuyo contenido fue descrito previamente. Para los tratamientos con *A. brasilense* solo, el MSC fue suplementado tanto con L-triptófano sintético ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, #93659, Sigma, esta concentración corresponde a la cantidad de triptófano presente en exudados de *C. sorokiniana*, determinados en la presente tesis), o una mezcla de triptófano ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) y tiamina difosfato ($70 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, C8754, Sigma, concentración correspondiente a la cantidad de tiamina presente en exudados de *C. sorokiniana*, determinada en la presente tesis). En otro tratamiento se creció la bacteria inmovilizada sola en exudados producidos por *C. sorokiniana*. La obtención de los exudados se llevo a cabo mediante el procedimiento previamente descrito. Todos los tratamientos fueron mantenidos bajo condiciones autotróficas, en ausencia de fuente de carbono, con una intensidad de luz de $60 \mu\text{molphoton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, con agitación continua a 140 rpm a 27 ± 2 °C durante 120 h.

6.5.2.1 Métodos analíticos.

6.5.2.1.1 Determinación de triptófano en exudados de *Chlorella sorokiniana* crecida en suspensión.

Para cuantificar la cantidad de triptófano liberado por cultivos de *C. sorokiniana*, la microalga fue cultivada in MSC bajo condiciones autotróficas (previamente

descritas) durante 5 días. Cinco mL de medio de cultivo (por triplicado) fueron tomados cada 24 h y centrifugados a 6000 x g durante 5 minutos. El botón celular fue descartado y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de poro con 0.22 μm de diámetro (GSWP02500, EMD Millipore, Billerica, MA) y analizados por medio de HPLC (método previamente descrito).

6.5.2.1.2 Determinación de triptófano y AIA en experimentos de los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados.

Muestras de 1 mL de medio de cultivo de cada tratamiento (por réplica y por tratamiento, n = 15) fueron tomadas a intervalos de 24 h. Estas muestras fueron filtradas a través de una membrana con poro de diámetro de 0.22 μm (GSWP02500, EMD Millipore, Billerica, MA) y analizadas por medio de HPLC de acuerdo al método previamente descrito (basado en Zakharova *et al.*, 1999).

6.5.2.1.3 Actividad enzimática de indol piruvato descarboxilasa (IPDC)

Para determinar la actividad enzimática de IPDC (E.C.4.1.1.74) 6 g de esferas de alginato de cada tratamiento fueron tomadas a intervalos de 24 h. Las esferas fueron disueltas en 30 mL de buffer de citratos (composición previamente descrita) y centrifugadas a 2000 x g por 6 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón celular fue lavado tres veces con solución salina estéril (0.85% NaCl_2). La actividad de IPDC fue determinada de acuerdo a Minamisawa *et al.* (1996), como se describe en seguida: las células fueron resuspendidas en 10 mL de buffer de fosfatos (KP, pH 8.2) conteniendo 5 mM de MgCl_2 (M8266, Sigma) y 1 mM de tiamina difosfato. Se agrego nitrógeno líquido y se homogenizaron y trituraron las células mediante un mortero. El extracto fue centrifugado a 10,500 g durante 10 minutos. La mezcla de reacción, en un volumen final de 500 μL , conteniendo

extracto libre de células y 0.2 mM de ácido indol-3-piruvico, fue incubada durante 30 minutos a 30 °C con agitación continua a 120 rpm. Se detuvo la reacción mediante la adición de HCl 0.1 M a igual volumen que la mezcla de reacción. El sobrenadante fue analizado por medio de HPLC de acuerdo a las condiciones previamente descritas.

6.5.2.1.4 Actividad enzimática de triptófano sintasa cadena β .

Al igual que para determinar la actividad de la enzima IPDC, se tomaron 6 g de esferas de alginato de cada tratamiento a intervalos de 24 h. las esferas fueron disueltas en 30 mL de buffer de citratos (composición previamente descrita) y centrifugadas a 2000 g por 6 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón celular fue lavado tres veces con solución salina estéril (0.85% NaCl₂). La actividad de la enzima triptófano sintasa cadena β fue determinada de acuerdo a la metodología descrita por Last *et al.* (1991), como se describe a continuación: las células fueron resuspendidas en 2 mL de buffer de fosfatos (KP, pH 8.2) conteniendo 600 mg de polivinilpolipirrolidona (#77627, Sigma). Se agrego nitrógeno liquido y se homogenizaron y trituraron las células mediante el uso de un mortero. El extracto fue centrifugado a 10,500 g durante 10 minutos. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 mL, conteniendo 400 μ L de extracto libre de células y 600 μ L de solución de reacción (preparada como se indica a continuación: 60 μ mol L-serina (#84959, Sigma), 0.2 μ mol de indol (#442619, Sigma), 10 μ g de piridoxal fosfato (#P9255, Sigma), disueltos en 600 μ L de KP), se incubaron a 30 °C con agitación constante a 120 rpm durante 90 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de 0.1 mL de NaOH 0.2 M. El indol residual se extrajo en 4 mL de tolueno (#244511, Sigma) con agitación gentil. Posteriormente se centrifugo a 1500 g durante 15 minutos, y se recupero 0.5 mL de la capa de tolueno. El tolueno recuperado fue agregado a 2 mL de etanol (#459844, Sigma) y 1 mL de reactivo de Ehrlich (#159477, Sigma). Se dejo la

muestra reposando durante 30 minutos (para permitir la formación del color) a temperatura ambiente, y el producto fue medido espectrofotométricamente a 540 nm.

6.5.2.2 Diseño de experimentos y análisis estadísticos.

Al igual que en el objetivo 2, los experimentos se realizaron en cultivo por lote, contando con 3 replicas, donde cada frasco Erlenmeyer de 500 mL se considero una réplica. Cada experimento contenía 5 tratamientos: 1) esferas con *C. sorokiniana*, 2) esferas con *A. brasilense* Cd, 3) esferas con *A. brasilense* Cd (añadiendo triptófano al MSC), 4) esferas con *A. brasilense* Cd (añadiendo triptófano y tiamina al MSC) (estos 4 primeros tratamientos como controles), 5) esferas con *C. sorokiniana* – *A. brasilense* Cd (tratamiento) (n = 15). Cada experimento fue repetido dos veces, los datos de cada tratamiento de cada repetición (n = 30) fueron combinados y analizados primero por un ANDEVA de una vía y posteriormente mediante un análisis DMS (Diferencia Mínima Significativa), con significancia de $P < 0.05$, usando el software Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

6.6 Efecto de la relación mutualista entre *Chlorella sorokiniana* y *Azospirillum brasilense*, sobre la expresión del gen *ipdC* en *Azospirillum brasilense*

6.6.1 Condiciones de cultivo experimentales.

Para llevar a cabo el objetivo 4 de la presente tesis, se uso la microalga *C. sorokiniana* y la bacteria *A. brasilense* Cd. Una vez inmovilizados y co-inmovilizados los microorganismos como se describió previamente, y llevado a cabo el crecimiento secundario, se tomaron 20 g de esferas con microorganismos

tanto inmovilizados solo como co-inmovilizados y fueron inoculados en 300 mL de MSC, cuyo contenido fue descrito previamente. Al igual que el objetivo anterior, las esferas con *A. brasilense* solo se inocularon en MSC suplementado tanto con L-triptófano sintético ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), o una mezcla de triptófano ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) y tiamina difosfato ($70 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$). Un último tratamiento en el que se creció la bacteria inmovilizada sola en exudados producidos por *C. sorokiniana*. La obtención de los exudados se llevo a cabo mediante el procedimiento previamente descrito. Todos los tratamientos fueron agitados a 140 rpm a $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 120 h.

6.6.2 Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y cuantificación por PCR de tiempo real (qRT-PCR).

Para determinar la expresión del gen *ipdC*, 18 g de esferas de alginato de cada replica y experimento fueron muestreados ($n = 24$). Las esferas fueron disueltas en 100 mL de buffer de citratos (composición previamente descrita) y centrifugados a $2000 \times g$ durante 6 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón celular fue lavado 2 veces con buffer de citratos para eliminar el alginato remanente. El botón celular fue lavado 3 veces con solución salina estéril (0.85% NaCl_2) para eliminar residuos del buffer de citratos. El botón celular fue homogenizado con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se almaceno a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. La muestra congelada fue mezclada vigorosamente en vortex durante 30 segundos para extraer el ARN. El ARN extraído fue cuantificado con el uso de un espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop (Thermo Scientific, GA, USA) y se analizó su integridad en gel de agarosa-formaldehido al 1%. Un μg de ARN total fue tratado con ADNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se llevo a cabo la síntesis de ADN complementario en un volumen final de 20 μL conteniendo lo siguiente: 1.5 mM MgCl_2 , 1X de buffer de reacción, 500 ng de random primers, 500 μM de mezcla de dNTP, 20 U de ribonucleasa recombinante RNasing® y 1 μL de transcriptasa reversa ImProm-II™ (Promega, Madison, WI) y se almaceno a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Se llevo a cabo el diseño de primers (Tabla IV) basándose en la secuencia

de *ipdC* del Genbank (NC_016617.7); se incluyeron dos potenciales genes de referencia (los genes *recA* y *glyA*, McMillan y Pereg 2014). La eficiencia de cada curva estándar fue estimada usando la ecuación: $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1)$ (Bustin *et al.* 2009). Las curvas estándar fueron obtenidas a partir de diluciones seriadas (usando como factor de dilución 1:2) de una mezcla de ADN complementario. El qRT-PCR fue llevado a cabo por triplicado de todos los genes usando Sso Fast Eva Green Supermix (Biorad, Hercules, CA) en una maquina de tiempo real Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) bajo las siguientes condiciones: 95 °C, 1 minuto; 95 °C, 10 segundos; 60 °C, 15 segundos; 72 °C, 20 segundos (40 ciclos); 72 °C, 5 minutos. Al final de cada corrida, se llevo a cabo una curva de disociación iniciando en 75 °C e incrementando la temperatura 1 °C por segundo hasta alcanzar 99 °C, para asegurar la ausencia de artefactos, formación de estructuras no deseadas como dimeros, así como para verificar la especificidad del producto de PCR. Para determinar cambios en la expresión relativa del gen, los datos fueron analizados mediante el algoritmo de Livak y Schmittgen (2001) $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabla IV. Secuencias de primers del gen objetivo y genes constitutivos.

Gen	Secuencia	Eficiencia (%)
<i>ipdC</i>	Forward: 5' AGTCGTCCAGGTCGTTGAAG 3' Reverse: 5' ACCCCATCGTGATCCTG 3'	95.9
<i>recA</i> (McMillan and Pereg 2014)	Forward: 5' GTCGAACTGCCTGGTGAT 3' Reverse: 5' GACGGAGGCGTAGAACTT 3'	97.2
<i>glyA</i> (McMillan and Pereg 2014)	Forward: 5' GGAGATCGCCAAGAAGAT 3' Reverse: 5' GCTCTTGGCGTAGGTCTT 3'	96.6

6.6.3 Diseño de experimentos y análisis estadísticos.

Al igual que en los objetivos pasados, los experimentos se realizaron en cultivo por lote, contando con 3 replicas, donde cada frasco Erlenmeyer de 500 mL se considero una réplica. Cada experimento contenía 4 tratamientos: 1) esferas con *A. brasilense* Cd; 2) esferas con *A. brasilense* Cd (añadiendo triptófano al MSC); 3) esferas con *A. brasilense* Cd (añadiendo triptófano y tiamina al MSC) (estos 3 primeros tratamientos como controles); 4) esferas con *C. sorokiniana* – *A. brasilense* Cd (tratamiento) (n = 12). Cada experimento fue repetido dos veces, los datos de cada tratamiento de cada repetición (n = 24) fueron combinados y analizados primero por un ANDEVA de una vía y posteriormente mediante un análisis DMS (Diferencia Mínima Significativa), con significancia de $\alpha = 0.05$, usando el software Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

7 RESULTADOS

7.1 Optimización de una técnica analítica basada en HPLC para la determinación cualitativa y cuantitativa de tiamina en exudados de *Chlorella sorokiniana*.

7.1.1 Determinación de tiamina por HPLC de absorbancia.

Partiendo de soluciones madre de clorhidrato de tiamina y riboflavina, se realizaron diluciones seriadas y se analizaron bajo las condiciones descritas por Bendryshev *et al.* (2010) (para el análisis de tiamina bajo este método no fue necesaria la oxidación de la vitamina). Bajo estas condiciones los estándares de tiamina mostraron tiempo de retención de 2.53 ± 0.02 minutos; sin embargo también se apreció la presencia de picos de ruido (Figura 6). Por su parte el estándar de riboflavina bajo estas condiciones mostró un tiempo de retención mayor (3.39 ± 0.02 minutos) al presentado por el estándar de tiamina (Figura 7).

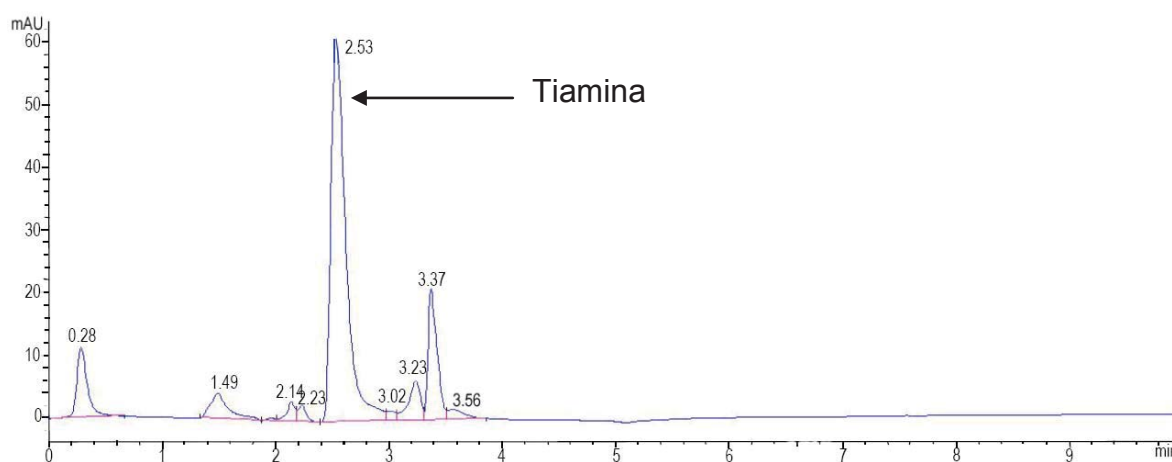


Figura 6. Cromatograma del estándar de tiamina 300 nM inyectando 30 μ L. Método Bendryshev *et al.* (2010).

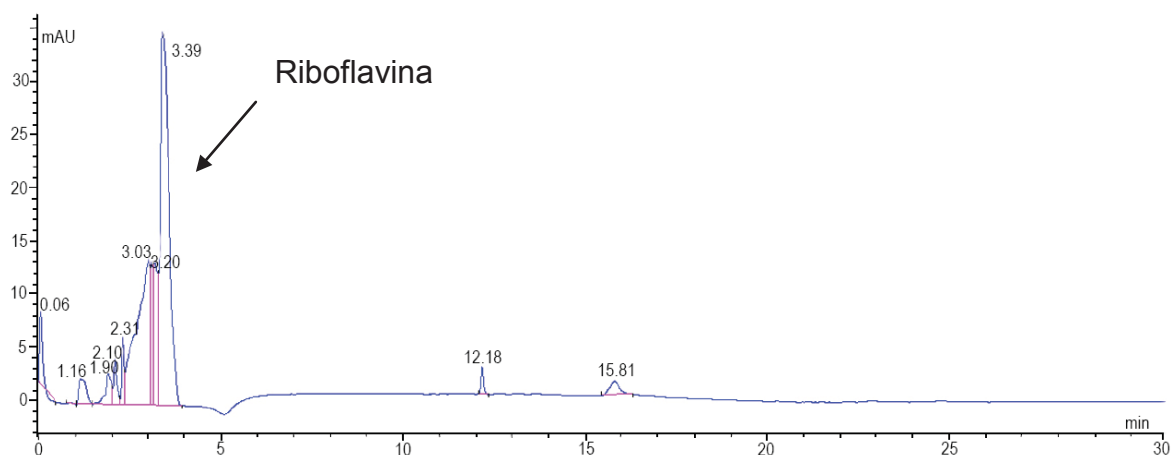


Figura 7. Cromatograma del estándar de riboflavina 50 μ M inyectando 30 μ L. Método Bendryshev *et al.* (2010).

Una vez obtenida una correcta separación de los estándares de cada una de las vitaminas, se prosiguió a determinar la presencia de tiamina en exudados producidos por un cultivo de *C. sorokiniana*, crecido en medio C30, en el cual fue posible observar un pico con tiempo de retención cercano al mostrado por el estándar de tiamina (2.35 ± 0.035 minutos), y con un área bajo la curva de 2000 mAU (Figura 8).

El análisis del medio C30 sin inocular (Figura 9), mostró la presencia dos principales picos con tiempos de retención similares a los encontrados en los cromatogramas de los estándares de tiamina y riboflavina (2.35 ± 0.035 y 3.43 ± 0.14 minutos), así como a los presentados en la muestra de exudados producidos por el cultivo de *C. sorokiniana*.

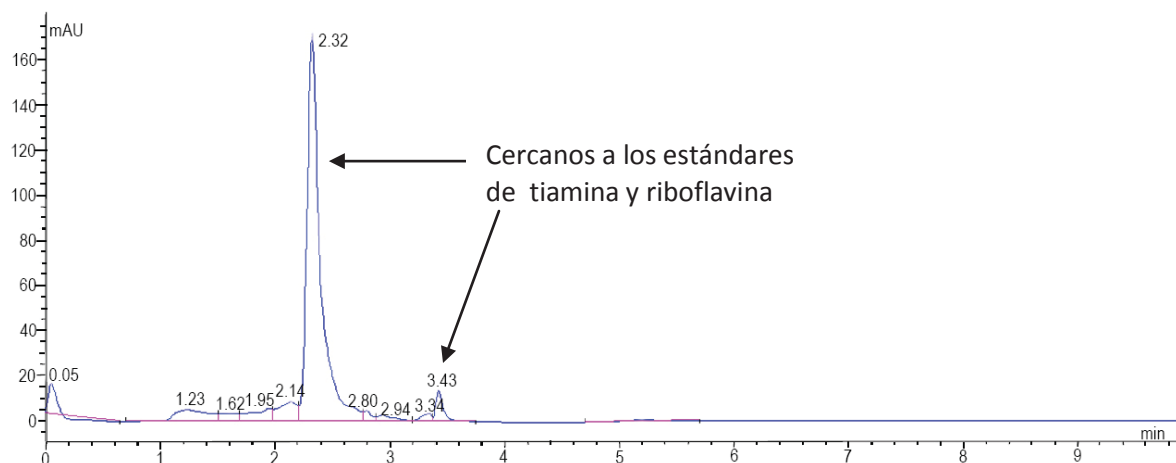


Figura 8. Cromatograma de exudados producidos por *C. sorokiniana* crecida durante 14 días en medio C30. Método Bendryshev *et al.* (2010).

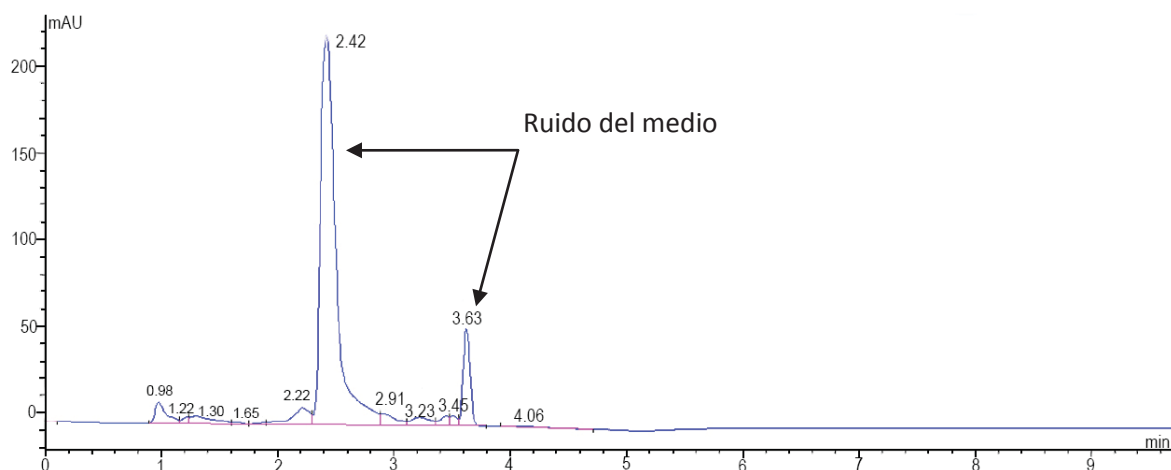


Figura 9. Cromatograma del medio de cultivo "C30" sin inocular, usado para el cultivo de *Chlorella sorokiniana*. Método Bendryshev *et al.* (2010).

La presencia del pico de ruido con tiempo de retención de 2.35 ± 0.035 , presente en el medio de cultivo fue debido a la solución de nitrato de potasio (Figura 10), el cual presentó una intensidad de absorbancia de 1805 mAU. Este compuesto se presenta como uno de los componentes de este medio de crecimiento para microalgas.

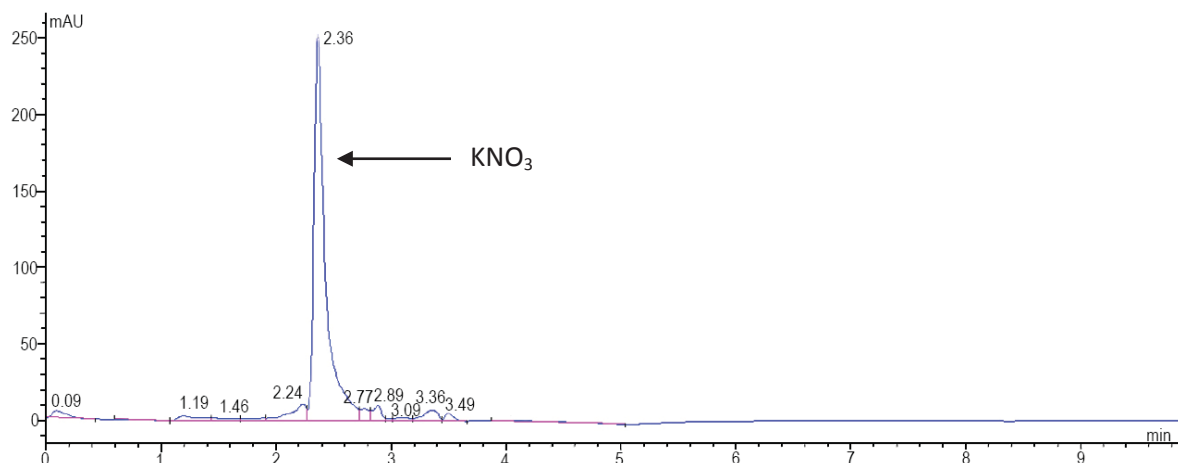


Figura 10. Cromatograma de la solución madre de nitrato de potasio. Método Bendryshev *et al.* (2010).

Debido a que uno de los componentes del medio de cultivo C30 presenta picos de ruido con tiempo de retención muy cercanos a los presentados por los estándares de las vitaminas analizadas, se optó por cambiar el medio de crecimiento de microalga, por el medio sintético de crecimiento descrito por de-Bashan *et al.* (2002a), el cual presenta en su composición cloruro de amonio como fuente de nitrógeno.

El análisis del medio sintético de crecimiento (MSC) sin inocular mostró varios picos de ruido (Figura 11), de los cuales 2 (2.34 ± 0.015 y 3.47 ± 0.02) presentaron tiempos de retención similares a los estándares de vitaminas, sin embargo, intensidad de absorbancia de estos fue mucho menor (19.8 y 25.5, respectivamente), a comparación con la mostrada en el medio C30.

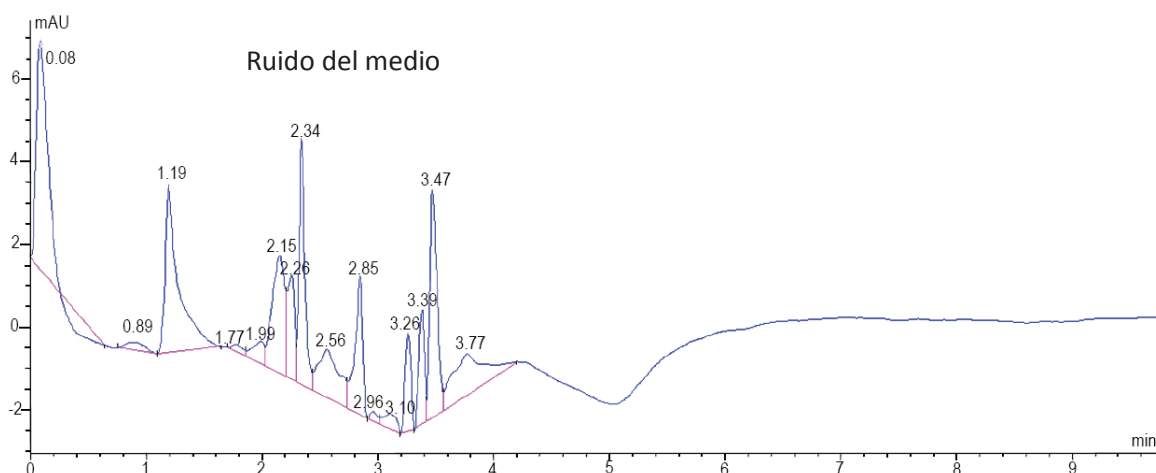


Figura 11. Cromatograma del medio sintético de crecimiento (MSC). Método Bendryshev *et al.* (2010).

Debido a la presencia de múltiples picos de ruido dentro de los primeros minutos de corrida (tiempo en el cual aparecen los picos correspondientes a tiamina y riboflavina), se decidió cambiar la composición de la fase móvil, a la descrita por Li y Chen (2001). Bajo este método, se siguieron observando picos de ruido en los primeros minutos (Figura 12), así como también los estándares mantuvieron tiempos de retención cortos. Los estándares de tiamina mostraron un tiempo de retención de 2.19 ± 0.012 (Figura 13), mientras que el estándar de riboflavina, mostró un tiempo de retención de 2.19 ± 0.002 (Figura 14).

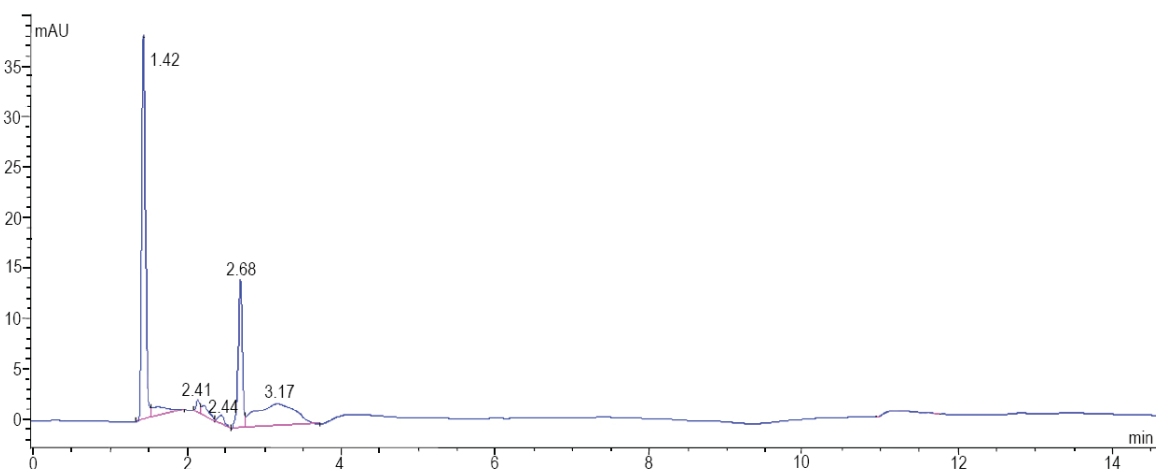


Figura 12. Cromatograma del medio sintético de crecimiento (MSC). Método de Li y Chen (2001).

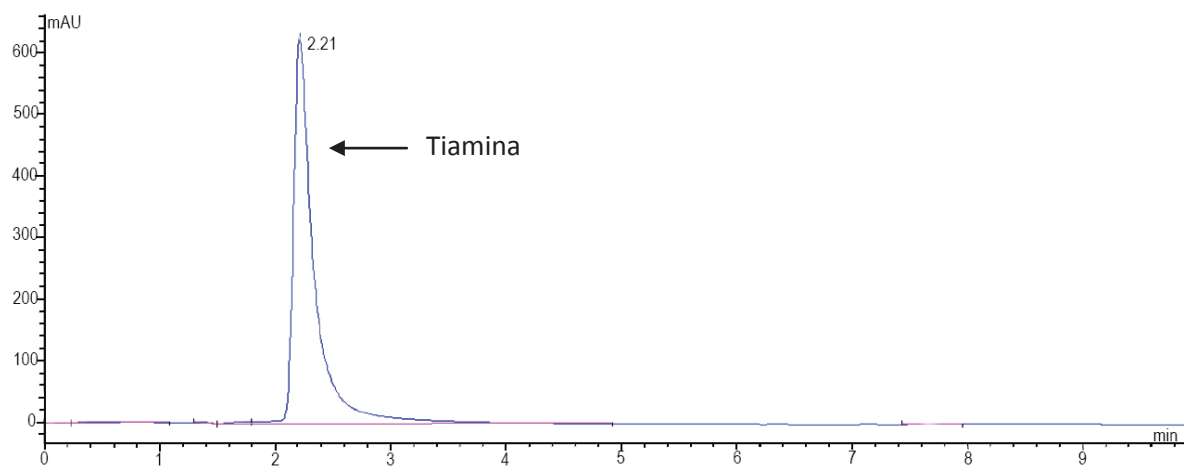


Figura 13. Cromatograma del estándar de Tiamina. Método de Li y Chen (2001)

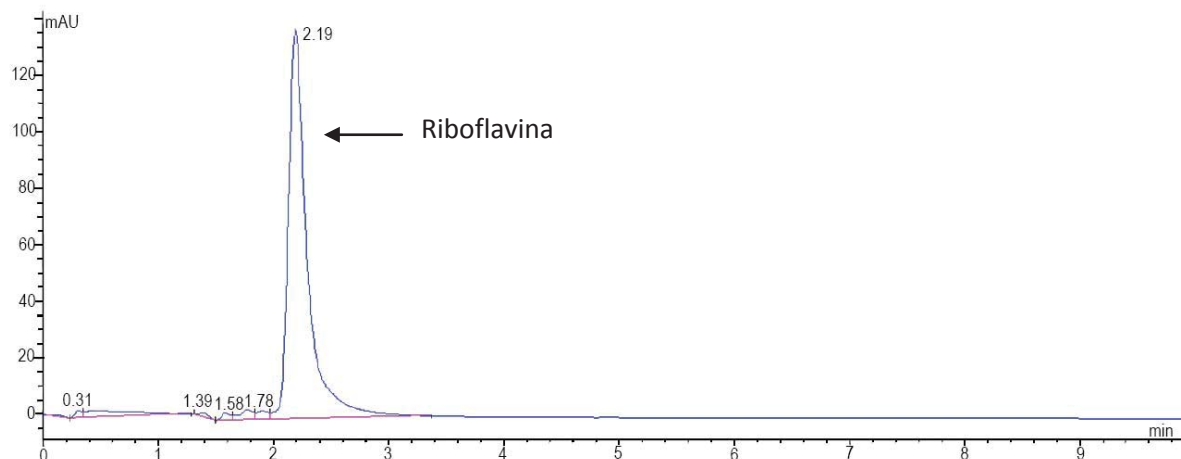


Figura 14. Cromatograma de estándar de riboflavina. Método de Li y Chen (2001)

Basándose en la falta de separación mostrada por los estándares bajo este método, así como de la cercanía de los tiempos de retención de los picos de ruido con los picos de los estándares, se procedió a modificar el gradiente mencionado por Li y Chen (2001), obteniendo de esta forma, para el estándar de tiamina, un tiempo de retención de 11.20 ± 0.001 minutos (Figura 15). El estándar de riboflavina, por su parte, mostró un tiempo de retención de 12.24 ± 0.003 minutos (Figura 16). Así también, bajo este método, el medio sintético de crecimiento no

mostró picos de ruido con tiempos de retención similares a los presentados por los estándares analizados (Figura 17).

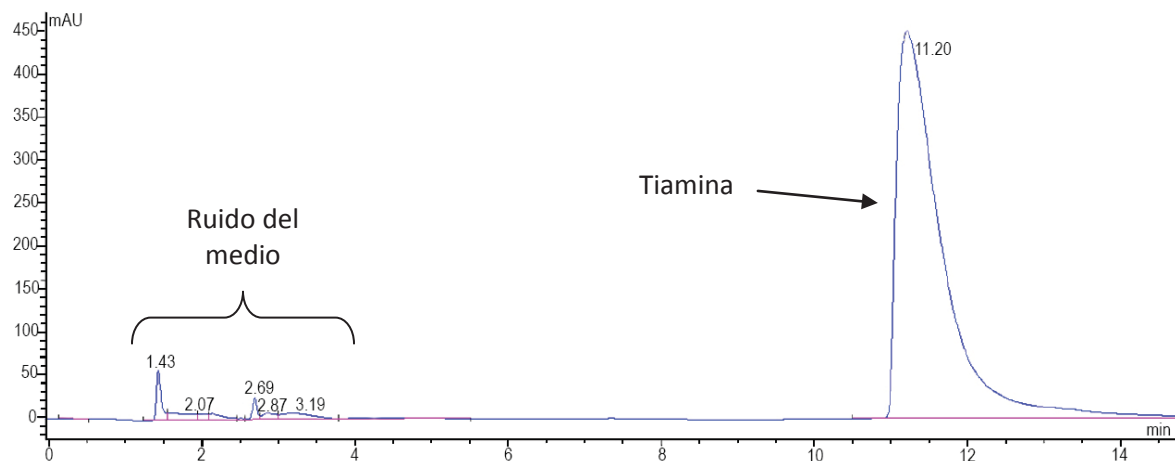


Figura 15. Cromatograma del estándar de tiamina. Método modificado de Li y Chen (2001).

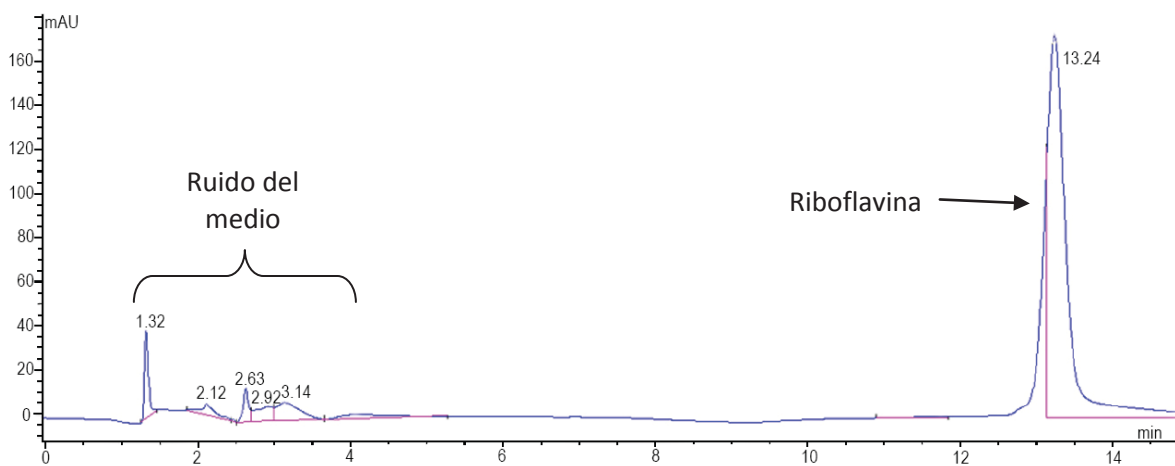


Figura 16. Cromatograma de estándar de riboflavina. Método modificado de Li y Chen (2001).

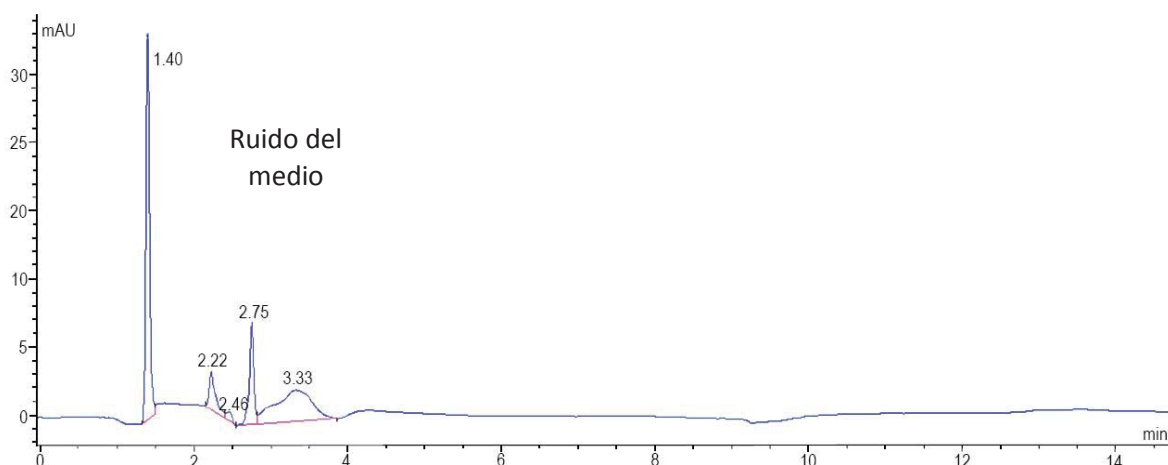


Figura 17. Cromatograma del medio sintético de crecimiento (SGM). Método modificado de Li y Chen (2001).

El método de Li y Chen modificado, mostró una linealidad de 0.9935 para ambos estándares, así como un límite de detección de 6.7 y 3.7 ng/mL para tiamina y riboflavina, respectivamente. El límite de cuantificación alcanzado con este método fue de 15 y 27.5 ng/mL para tiamina y riboflavina, respectivamente (Tabla V).

Tabla V. Tiempo de retención, linealidad y límite de detección de tiamina y riboflavina bajo el método modificado de Li y Chen (2001), por HPLC absorbancia.

Vitamina	Tiempo de retención (min)	Límite de detección ng/mL	Límite de cuantificación ng/mL	Coefficiente de correlación
Tiamina	11.20	6.7	15	0.9935
Riboflavina	13.24	3.7	27.5	0.9935

Con la correcta separación de los estándares probados, se prosiguió a analizar bajo este método, la presencia de tiamina en exudados producidos por *C. sorokiniana* crecida en medio sintético de crecimiento. El análisis de estos exudados no mostró la presencia del pico correspondiente al tiempo de retención de tiamina (Figura 18).

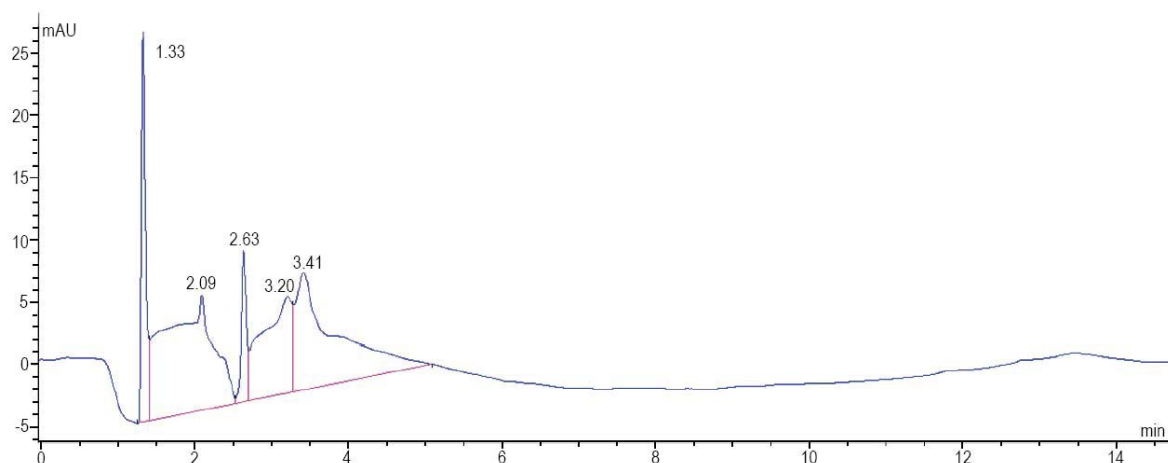


Figura 18. Cromatograma de exudados de *C. sorokiniana*, cultivo de 7 días en medio sintético de crecimiento. Exudados analizados por el método de Li y Chen modificado.

7.1.2 Determinación de tiamina por HPLC de fluorescencia.

Para el análisis de tiamina por HPLC de fluorescencia, se realizaron diluciones seriadas de solución madre de los estándares de tiamina y riboflavina y se analizaron con el método descrito por Sánchez-Machado *et al.* (2004). Debido a que la tiamina no presenta fluorescencia, fue necesaria su oxidación con ferrocianuro de potasio, para obtener el compuesto fluorescente tiocromo.

Bajo estas condiciones, los estándares de tiamina (oxidada a tiocromo) y riboflavina mostraron tiempos de retención muy similares (4.29 ± 0.05 y 4.31 ± 0.049 minutos, respectivamente). Ver figuras 19 y 20.

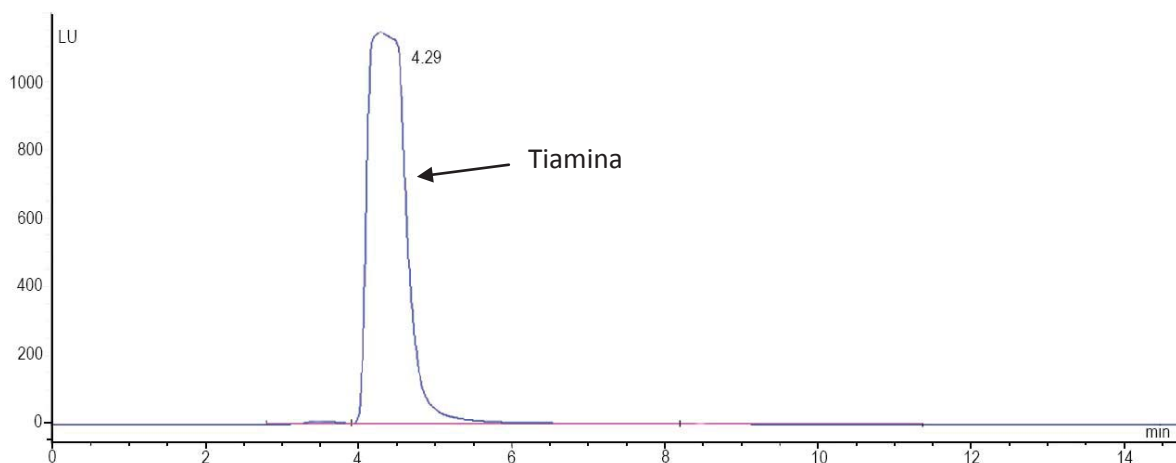


Figura 19. Cromatograma de estándar de tiamina por fluorescencia, fase móvil pH 7.87.

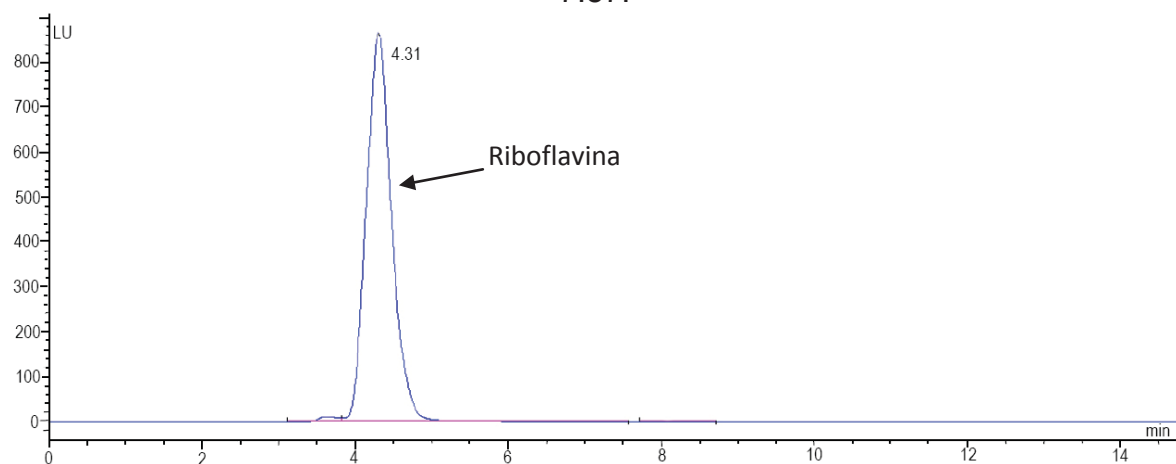


Figura 20. Cromatograma de estándar de riboflavina por fluorescencia, fase móvil pH 7.87.

Con el objetivo de obtener una mejor separación entre las vitaminas probadas, se observó el perfil de elución a 3 diferentes pH de la fase móvil (Tabla VI). A pH básicos y ácidos (pH 5.93 y 7.87) se observó que ambas vitaminas mostraban el mismo tiempo de retención. Sin embargo a pH neutro o ligeramente ácido (pH 6.47 y 7.0) se obtuvo una separación entre los compuestos de 0.5 minutos, logrando así la diferenciación de ambos compuestos (Figuras 21 y 22).

Tabla VI. Efecto de pH de la fase móvil, sobre el perfil de elución de tiamina y riboflavina.

pH	Vitamina	Tiempo de retención (min)
5.93	Tiamina	4.29 ± 0.02
	Riboflavina	4.31 ± 0.002
6.47	Tiamina	5.05 ± 0.02
	Riboflavina	4.55 ± 0.007
7.0	Tiamina	5.04 ± 0.03
	Riboflavina	4.55 ± 0.008
7.87	Tiamina	4.33 ± 0.01
	Riboflavina	4.35 ± 0.07

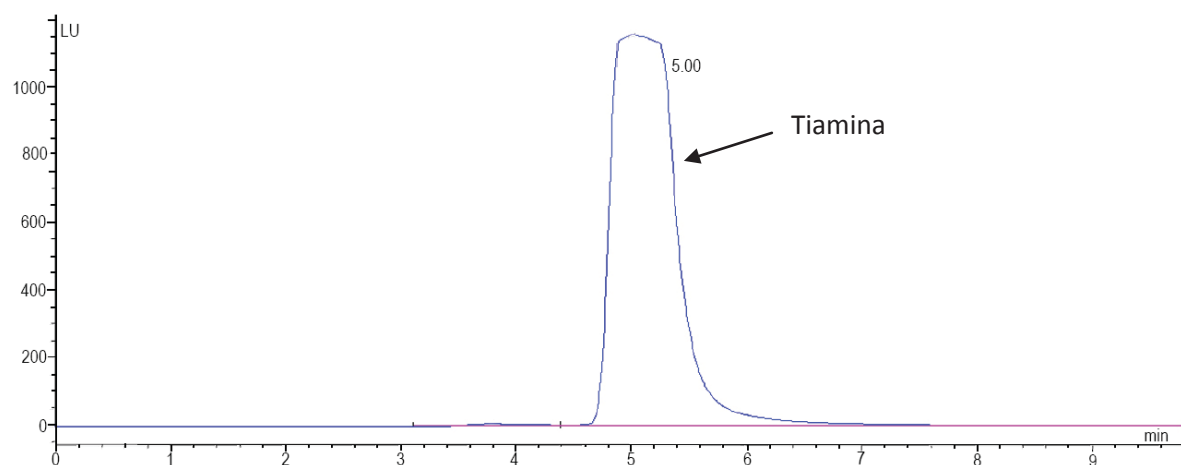


Figura 21. Cromatograma de estándar tiamina, fase móvil pH 6.47, método fluorescencia.

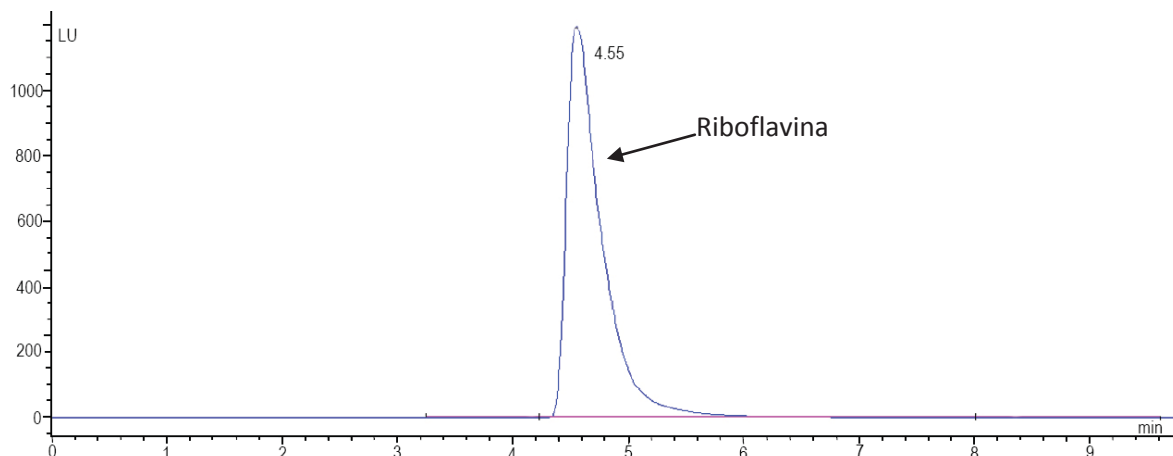


Figura 22. Cromatograma de estándar riboflavina, fase móvil pH 6.47, método fluorescencia.

Con el método de Sánchez-Machado *et al.* (2004), a pH 6.47 de la fase móvil, se observó una linealidad de 0.991 para los estándares de tiamina, y 0.997 para los estándares de riboflavina. Los límites de detección del método fueron de 0.15 ng/mL para tiamina y 0.02 ng/mL para riboflavina. Por su parte, el límite de cuantificación alcanzado con este método fue de 0.5 y 1.5 ng/mL para tiamina y riboflavina, respectivamente (Tabla VII).

Tabla VII. Tiempo de retención, linealidad y límite de detección de tiamina y riboflavina bajo el método de Sanchez-Machado *et al.* (2004) pH 6.47.

Vitamina	Tiempo de retención (min)	Límite de detección ng/mL	Límite de cuantificación ng/mL	Coefficiente de correlación
Tiamina	5.0	0.15	0.5	0.991
Riboflavina	4.5	0.02	1.5	0.997

Con la correcta separación de los estándares probados mostrada a los pH 6.47 y 7.0, se prosiguió a analizar a pH 6.47 la presencia de tiamina en exudados producidos por *C. sorokiniana* crecida en medio sintético de crecimiento. El análisis de los exudados no oxidados, muestra la presencia de 3 picos, de los

cuales uno corresponde al pico de riboflavina, así también se observa la ausencia del pico correspondiente a tiamina (Figura 23). Sin embargo al oxidar estos mismos exudados, se puede apreciar la aparición de un pico (adicional a los 3 observados) con el mismo tiempo de retención que el mostrado por el estándar de tiamina (Figura 24), así como un incremento en la intensidad de fluorescencia en el pico con tiempo de retención de 3.5 minutos. El área mostrada por el pico correspondiente a tiamina, mostró una concentración de esta vitamina en los exudados de 2.99 ± 0.05 ng/mL.

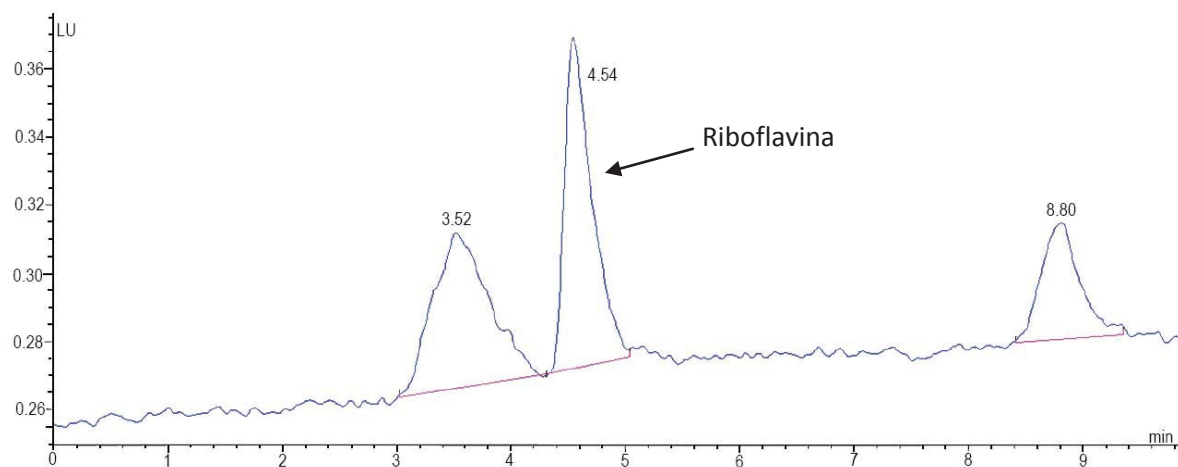


Figura 23. Cromatograma de la determinación de riboflavina en exudados producidos por *C. sorokiniana*, cultivo de 10 días. Método fluorescencia, fase móvil pH 6.47.

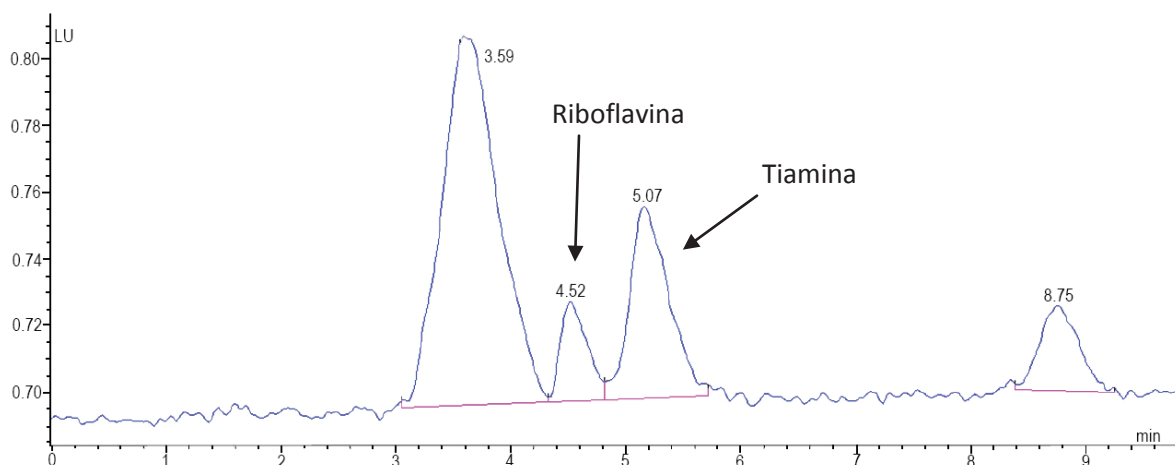


Figura 24. Cromatograma de la determinación de tiamina en exudados producidos por *C. sorokiniana*, cultivo de 10 días. Método fluorescencia, fase móvil pH 6.47.

7.2 Efecto de *A. brasilense* sobre la producción de tiamina en *C. sorokiniana* durante una relación mutualista.

7.2.1 Efecto del pH del medio de crecimiento sobre la liberación de tiamina.

La liberación de tiamina durante la co-inmovilización de *C. sorokiniana* con *A. brasilense* fue significativamente mayor a pH 6 después de 96 h, comparado con la liberación de tiamina de cada uno de los microorganismos inmovilizados solos (Figura 25a). La cantidad de tiamina liberada por los microorganismos co-inmovilizados ($116 \pm 45.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) fue mayor que la suma de la concentración de tiamina liberada por cada uno de los microorganismos inmovilizados solos ($28.5 \pm 8.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ para *C. sorokiniana*; $37.3 \pm 4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ para *A. brasilense*; $p < 0.0045$). Resultados similares se observaron a pH 7, donde la exudación de tiamina en el tratamiento co-inmovilizado ($64.5 \pm 4.02 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ después de 96 h) fue también mayor que la cantidad de tiamina liberada por cada uno de los microorganismos inmovilizados solos (Figura 25b). A pH 8, *C. sorokiniana* mostro la mayor cantidad de tiamina liberada en el experimento después de 96 h ($241.7 \pm 144.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Figura 25c). A otros tiempos de muestreo, el tratamiento co-

inmovilizado libero cantidades de tiamina que fueron similares a la suma de tiamina liberada por cada uno de los microorganismos inmovilizados solos. Estas cantidades fueron menores a las cantidades liberadas a pH 6. Analizando los mismo datos y comparando los efectos de los tratamientos a diferentes pH se observa que el pH no tuvo un efecto significativo sobre la liberación de tiamina en ambos microorganismos (excepto a pH 8 para *C. sorokiniana* y pH 6 y 7 para los microorganismos co-inmovilizados después de 96 h) (Figura 26a-c). A pH 6 y 7, una ganancia de tiamina fue detectada (ganancia calculada de la resta de la producción de tiamina por parte del co-inmovilizado menos la producción de tiamina por parte de los microorganismos inmovilizados solos), con una liberación neta de tiamina por parte de los microorganismos co-inmovilizados de $50.19 \pm 20.97 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ a pH 6 y $9.2856 \pm 1.0125 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ a pH 7. A pH8, el rendimiento de tiamina en el tratamiento co-inmovilizado fue similar a la suma de la tiamina liberada por *C. sorokiniana* y *A. brasilense* inmovilizados solos, indicando que no hubo ganancia de tiamina (Figura 25c).

Independientemente del pH, *C. sorokiniana* presento una población mayor cuando estuvo co-inmovilizada con *A. brasilense* (Figuras 25d-f, 26d-f). Cuando se inmovilizó sola, los cultivos de *C. sorokiniana* presentaron un significativo menor crecimiento a pH 6 (Figura 25d). Sin embargo, cuando fue co-inmovilizada, la población se recuperó y no se observó diferencia significativa entre el crecimiento de las poblaciones a los diferentes pH (Figura 26f) indicando así mitigación de estrés. A todos los pH analizados, la población de *A. brasilense* fue siempre menor en el co-inmovilizado (Figuras 25g-i, 26e).

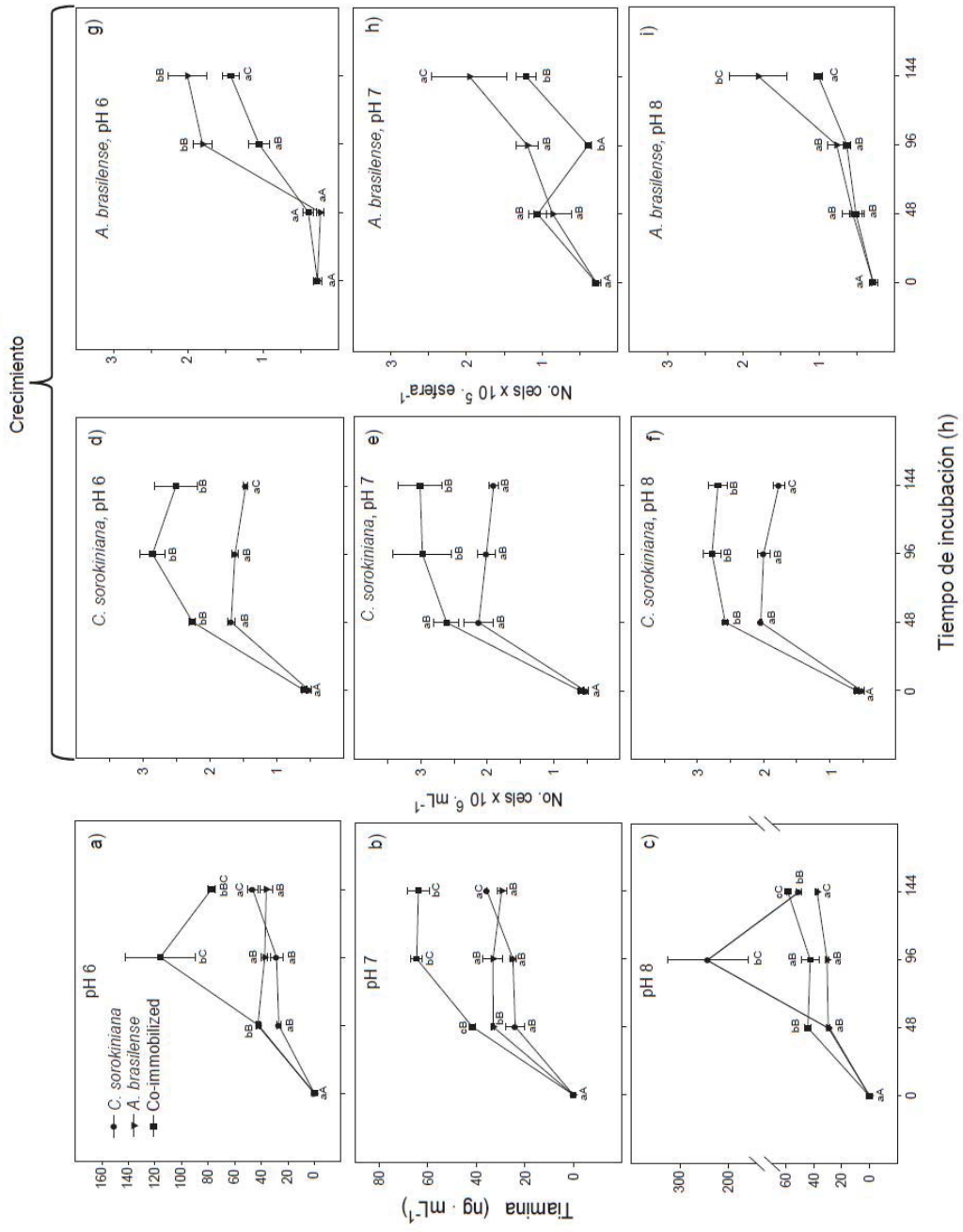


Figura 25. Tiamina en exudados a pH 6 (a), 7 (b), y 8 (c) producida y liberada por *C. sorokiniana* y *A. brasilense* inmovilizados por separado o co-inmovilizados juntos en esferas de alginato, así como el crecimiento de estos microorganismos en estos cultivos (d, e, f, g, h, i). Los valores a lo largo de las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y una prueba a posteriori DMS a $P < 0.05$. Los puntos a cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a $P < 0.05$ por medio del mismo análisis estadístico. Las barras representan DE.

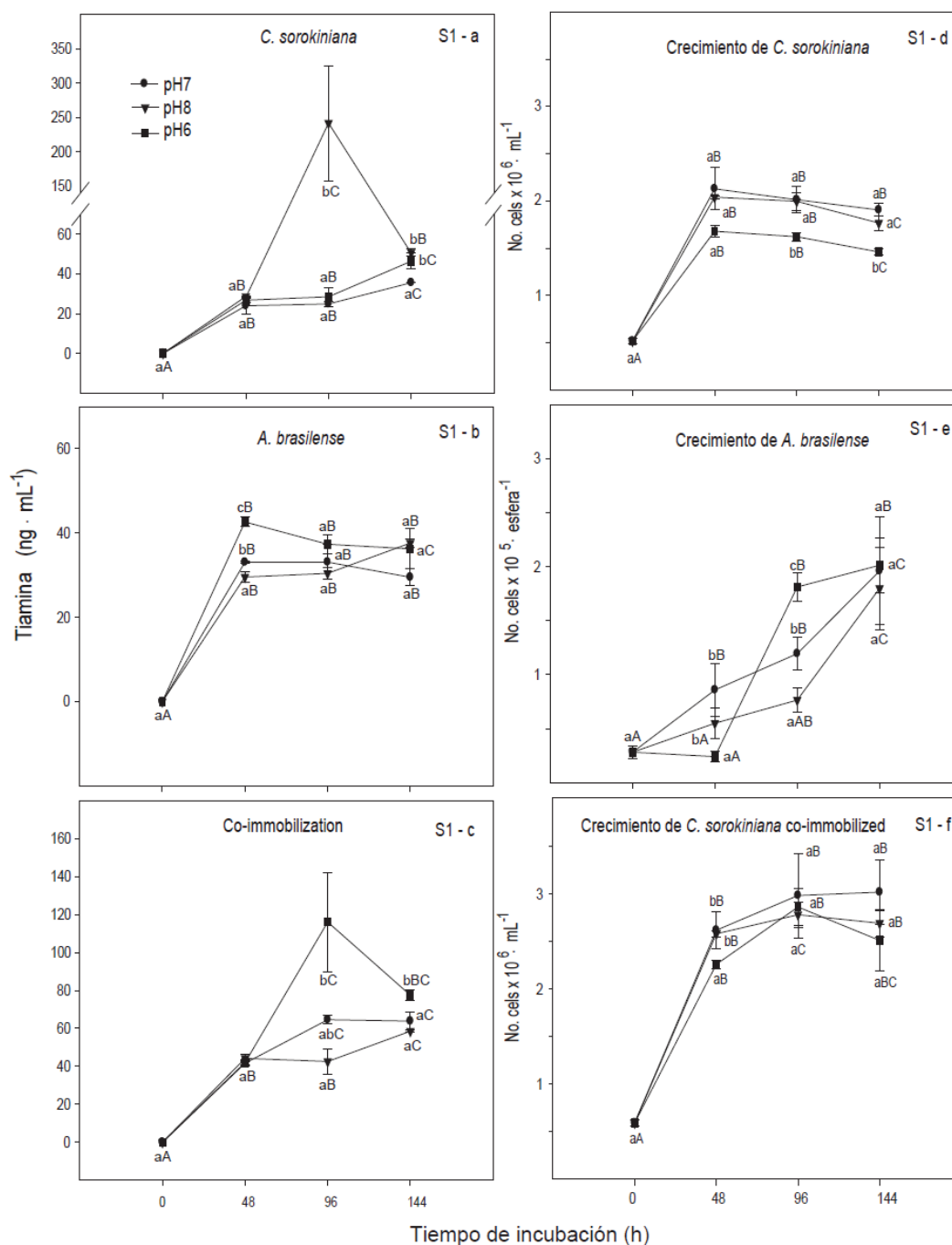


Figura 26. Comparación de la liberación de tiamina por *C. sorokiniana* y *A. brasilense* a diferente pH del medio cuando fueron inmovilizados por separado o co-inmovilizados juntos en esferas de alginato (a, b, c), así como el crecimiento de estos microorganismos en estos medios de cultivo (d, e, f). Los valores a lo largo de las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y una prueba a posteriori DMS a $P < 0.05$. Los puntos a cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a $P < 0.05$ por medio del mismo análisis estadístico. Las barras representan DE

7.2.2 Efecto de la intensidad de la luz sobre la liberación de tiamina.

Bajo todas las condiciones de luz probadas, los dos microorganismos liberaron tiamina al medio de crecimiento (Figura 27) y esta liberación fue dependiente de la intensidad de luz en el rango de 30 – 300 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A mayor intensidad de luz, mayor liberación de tiamina (Figuras 27a, 28a), alcanzando el más alto nivel de liberación a 300 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A 500 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ la liberación de tiamina tuvo su más bajo nivel en todos los tratamientos (Figuras 27d, 28a–c).

A 30 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ no se observó diferencia en la cantidad de tiamina liberada por los tratamientos. A 96 h de incubación bajo 60 y 500 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz, más tiamina fue liberada por el co-inmovilizado que la suma de tiamina liberada por los microorganismos inmovilizados solos (Figura 27b). A este tiempo e intensidad de luz, la liberación neta de tiamina en el co-inmovilizado fue $6.22 \pm 3.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. A 300 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se observó la más alta liberación de tiamina por *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada; solo después de 144 h de incubación se observó diferencia entre los dos tratamientos (Figuras 27c, 28a–c). A este tiempo de incubación e intensidad de luz, la liberación neta de tiamina en el tratamiento del co-inmovilizado fue $6.22 \pm 3.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

A. brasilense potenció el crecimiento de *C. sorokiniana* en todos los casos, excepto bajo una intensidad de luz de 30 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 27e–h). Aunque no se observó crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola bajo una intensidad de luz de 500 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la co-inmovilización de la microalga con *A. brasilense* después de 144 h de incubación permitió un ligero pero significativo crecimiento (Figura 27h). El crecimiento de *A. brasilense* fue similar a todas las intensidades de luz probadas (Figura 28e).

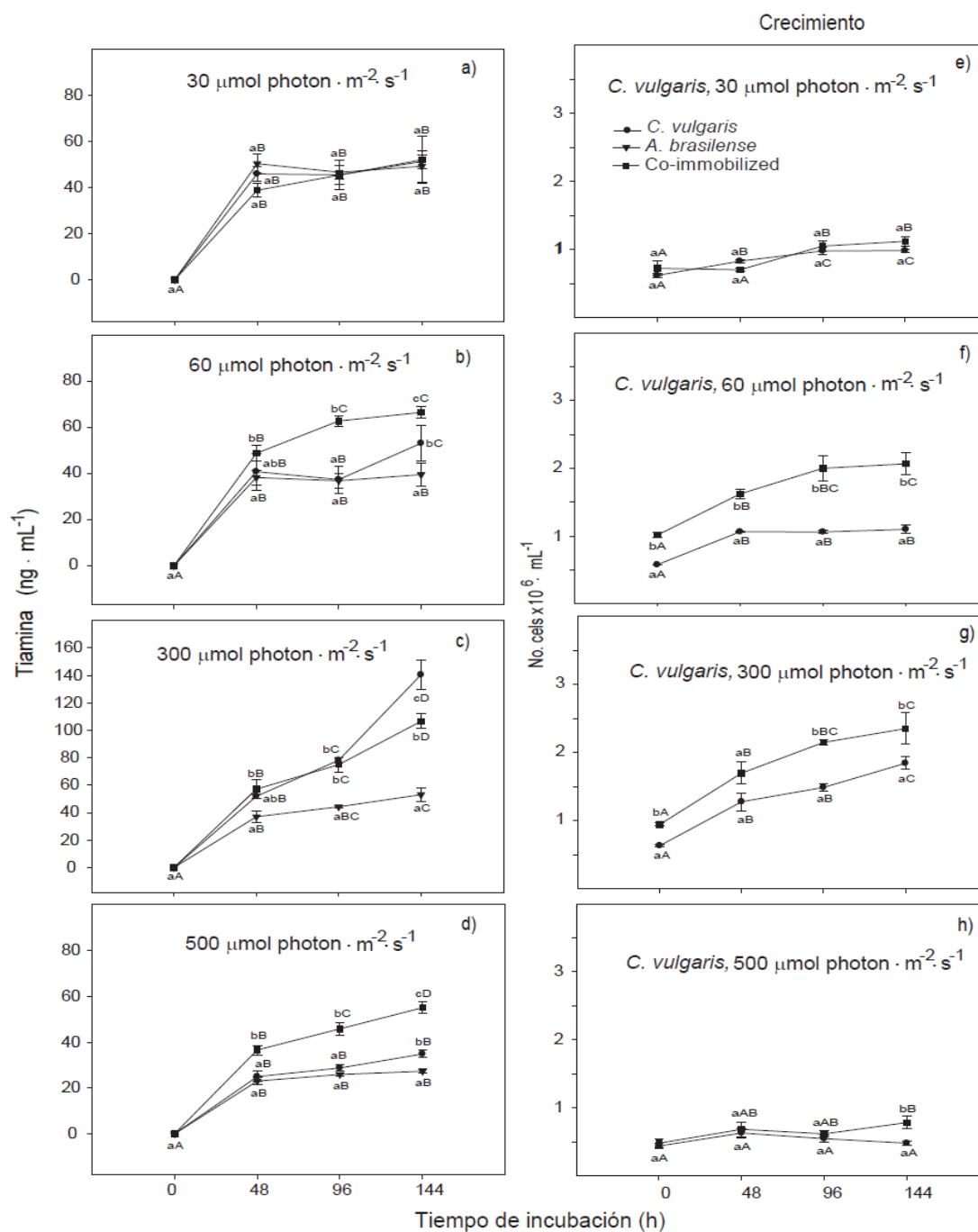


Figura 27. Comparación del contenido de tiamina en exudados bajo diferentes intensidades de luz de 30, 60, 300 y 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ liberada por *C. sorokiniana* y *A. brasilense* inmovilizados por separado y co-inmovilizados juntos en esferas de alginato (a, b, c, d), así como el crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* en estos cultivos (e, f, g, h). Los valores a lo largo de las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y una prueba a posteriori DMS a $P < 0.05$. Los puntos a cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a $P < 0.05$ por medio del mismo análisis estadístico. Las barras representan DE

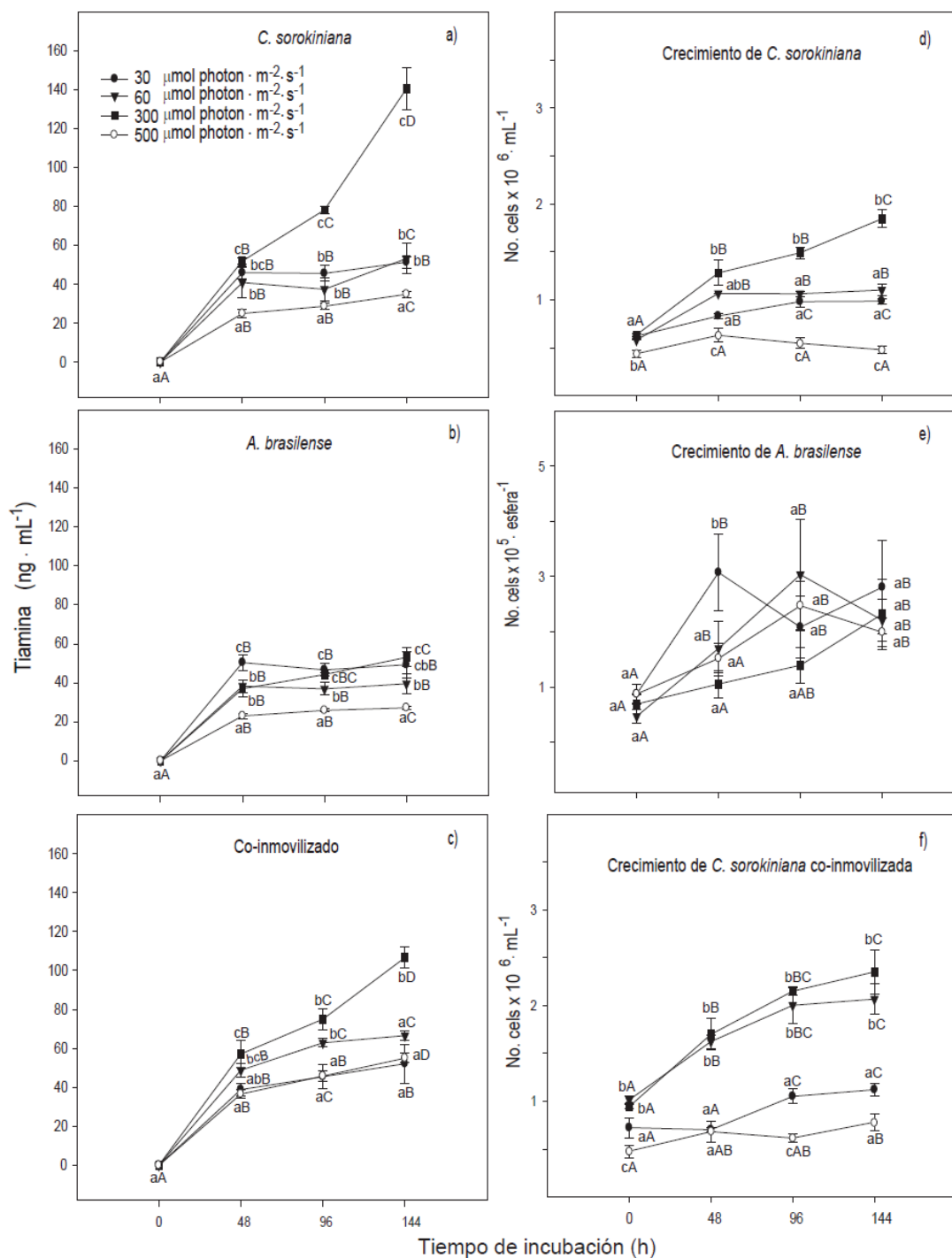


Figura 28. Comparación del contenido de tiamina en exudados bajo diferentes intensidades de luz liberada por *C. sorokiniana* (a), *A. brasilense* (b) inmovilizados solos y co-inmovilizados (c), y comparación del crecimiento de estos microorganismos en estos cultivos (d, e, f). Los valores a lo largo de las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y una prueba a posteriori DMS a $P < 0.05$. Los puntos a cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a $P < 0.05$ por medio del mismo análisis estadístico. Las barras representan DE.

7.2.3 Efecto del ayuno de nitrógeno sobre la liberación de tiamina.

La liberación de tiamina por parte de *C. sorokiniana* cuando fue inmovilizada sola cesó después de 48 h de incubación ($8.81 \pm 3.23 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$). Aún cuando el nitrógeno fue restaurado después de 24 h de incubación, la liberación de tiamina por *C. sorokiniana* no se recuperó (Figura 29a, b).

El ayuno de nitrógeno durante las primeras 24 h dentro de la fase de crecimiento secundario, afectó de manera negativa la liberación de tiamina en ambos microorganismos; sin embargo el efecto fue mayor en *C. sorokiniana* (Figura 29b).

La liberación de tiamina bajo el tratamiento co-inmovilizado y en *A. brasilense* inmovilizado solo fue similar cuando el nitrógeno fue o no restaurado (Figura 29a, b). Las cantidades de tiamina liberada en estos tratamientos fue en todos los tiempos de incubación mayor que la cantidad liberada por *C. sorokiniana* inmovilizada sola (Figura 29a, b). La única diferencia observada se encontró durante el tratamiento co-inmovilizado, donde la liberación de tiamina fue continua durante las 144 h del experimento (Figura 29a, b). No se observó diferencia significativa en el crecimiento de *C. sorokiniana* cuando esta se inmovilizó sola o se co-inmovilizó con *A. brasilense* en las dos condiciones de nitrógeno (Figura 29c, d). Sin embargo, bajo condiciones parciales de ayuno de nitrógeno, *C. sorokiniana* inmovilizada sola o co-inmovilizada con *A. brasilense* y *A. brasilense* inmovilizada sola, crecieron mejor que bajo un ayuno total de nitrógeno (Figura 29 c–f).

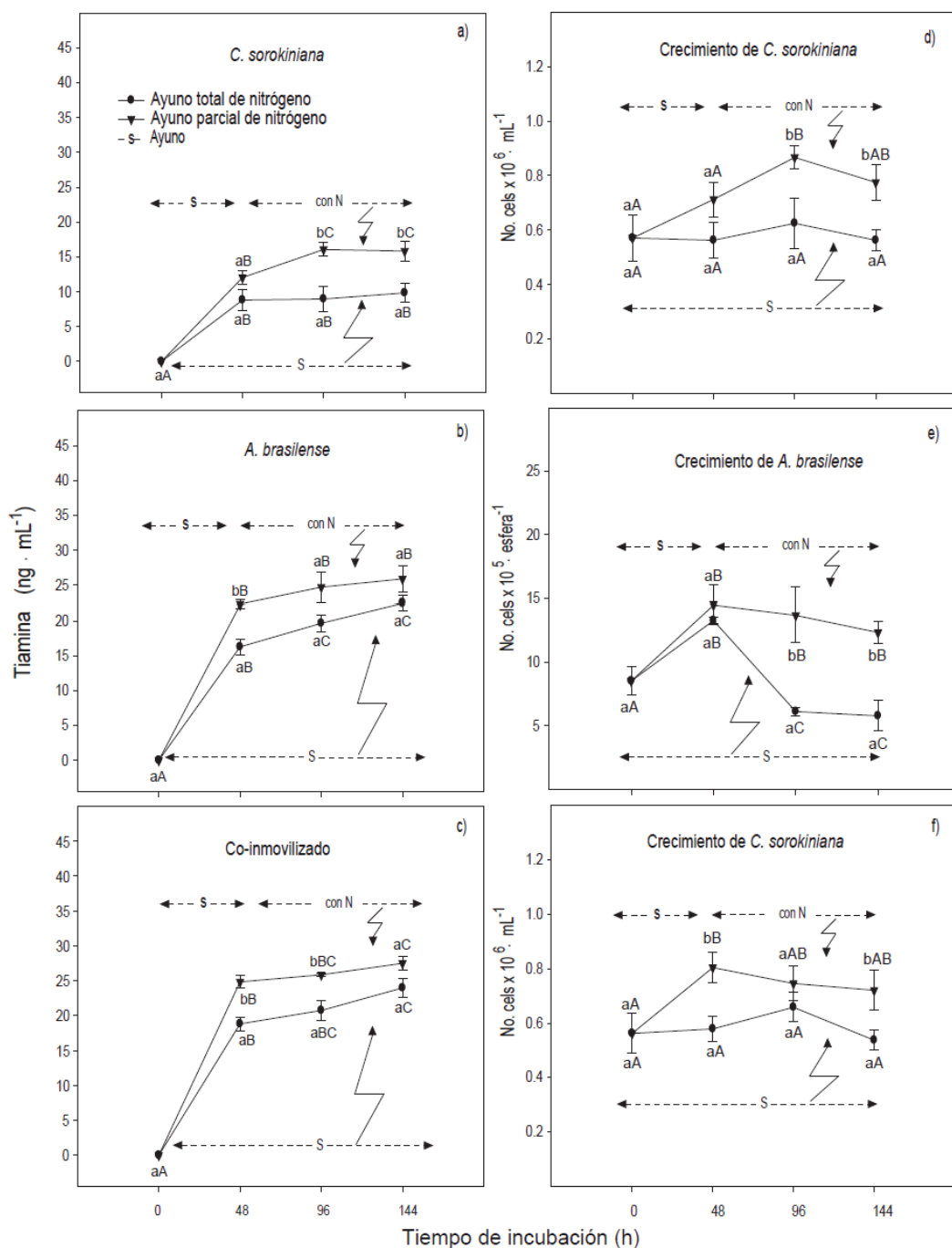


Figura 29. Comparación del contenido de tiamina en exudados liberados por *C. sorokiniana* y *A. brasilense* inmovilizados por separado y co-inmovilizados juntos en esferas de alginato bajo condiciones de ayuno de nitrógeno durante todo el experimento o ayuno parcial de nitrógeno (a, b), y crecimiento de *C. sorokiniana* (c, d) y *A. brasilense* (e, f) bajo estas condiciones. Los valores a lo largo de las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y una prueba a posteriori DMS a $P < 0.05$. Los puntos a cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a $P < 0.05$ por medio del mismo análisis estadístico. Las barras representan DE.

7.3 Efecto de tiamina y triptófano producidos por *C. sorokiniana* en la producción de ácido indol-3-acético por *A. brasilense* durante la relación mutualista.

7.3.1 Condiciones heterotróficas.

7.3.1.1 Producción de triptófano por *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense*.

Bajo condiciones con nitrógeno o en ayuno de nitrógeno, las tres cepas de *A. brasilense* (Cd, Sp6 y SpM7918) no produjeron cantidades detectables de triptófano a ningún tiempo de incubación. Bajo condiciones con nitrógeno, después de 96 h de incubación, todos los tratamientos de *C. sorokiniana* mostraron niveles similares de producción de triptófano (Figura 30a, análisis letras minúsculas). Después de 120 h, solamente en el tratamiento de *C. sorokiniana* suplementada con AIA o cuando estuvo inmovilizada con la cepa mutante *A. brasilense* SpM7918, se observó un incremento en la producción de triptófano (Figura 30a, análisis letras minúsculas). Sin embargo, el triptófano fue significativamente mayor en la microalga interactuando con esta cepa mutante (Figura 30a, análisis letras minúsculas). Dentro de los primeros dos intervalos de tiempo (48 y 72 h de incubación), solo la microalga suplementada con AIA sintético o inmovilizada con la cepa mutante *A. brasilense* SpM7918 produjo triptófano, alcanzando 1.42 ± 0.35 en el primer caso y $0.33 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en el segundo caso a 72 h.

Bajo condiciones de ayuno de nitrógeno, los tratamientos con *C. sorokiniana* produjeron triptófano a las 72 h de incubación (Figura 30b). A este tiempo, la microalga inmovilizada sola y suplementada con AIA sintético generó un pico de producción de triptófano y luego disminuyó (Figura 30b, análisis letras mayúsculas). Esta concentración de triptófano fue significativamente mayor que el triptófano producido en los demás tratamientos y en los demás tiempos de incubación (Figura 30b, análisis letras mayúsculas).

Cuando *C. sorokiniana* fue co-inmovilizada con las cepas silvestres, *A. brasilense* Cd o *A. brasilense* Sp6, alcanzo su mayor producción de triptófano a las 96 h (Figura 30b, análisis letras mayúsculas) siendo significativamente mayor cuando interactuó con *A. brasilense* Cd (Figura 30b, análisis letras minúsculas). Cuando *C. sorokiniana* fue inmovilizada sola o co-inmovilizada con la cepa mutante *A. brasilense* SPM7918, la mayor producción de triptófano se alcanzo después de 120 h de incubación (Figura 30b, análisis letras mayúsculas) y fue significativamente mayor cuando la microalga interactuó con la cepa mutante *A. brasilense* SPM7918 (Figura 30b, análisis letras minúsculas).

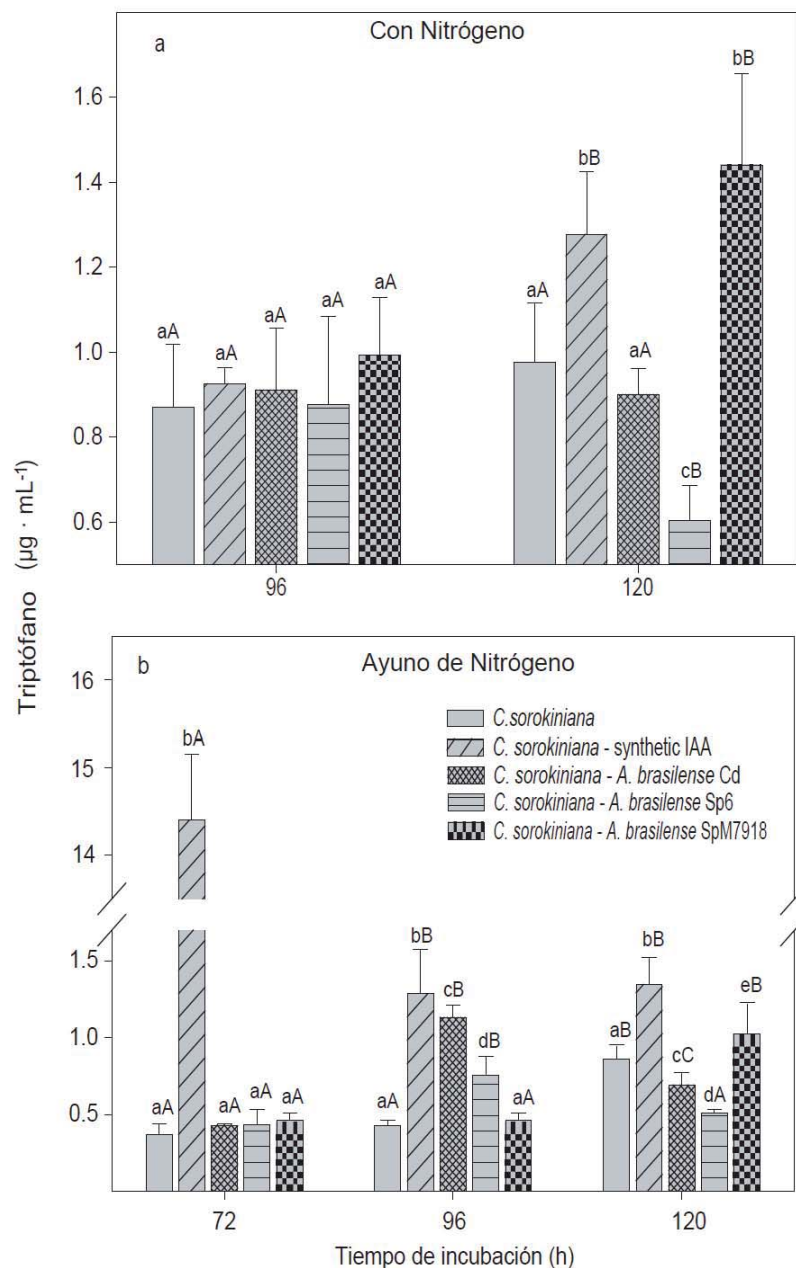


Figura 30. Producción de triptófano por *C. sorokiniana* inmovilizada sola o co-inmovilizada con diferentes cepas de *A. brasilense* en esferas de alginato bajo condiciones con de nitrógeno (a) y condiciones de ayuno de nitrógeno (b), usando D-glucosa como fuente de carbono. a) Columnas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente a varios tiempos de muestreo, usando análisis de prueba de *t* a $P < 0.05$. b) Columnas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente en diferentes intervalos a varios tiempos de muestreo, usando ANDEVA de una vía y un análisis a posteriori DMS a $P < 0.05$, donde los valores a cada tiempo de muestreo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente, usando ANDEVA de una sola vía y un análisis a posteriori DMS a $P < 0.05$. Las barras representan DE.

7.3.1.2 Producción de AIA por *A. brasilense* co-inmovilizada con *C. sorokiniana*.

Bajo condiciones con de nitrógeno, *A. brasilense* Cd co-inmovilizada con *C. sorokiniana* produjo $0.55 \pm 0.14 \mu\text{g AIA} \cdot \text{mL}^{-1}$ después de 96 h de incubación y después la producción fue menor (Figura 31a). Bajo estas mismas condiciones, *A. brasilense* Sp6 alcanzó un pico de producción de $0.37 \pm 0.04 \mu\text{g AIA} \cdot \text{mL}^{-1}$ después de 120 h (Figura 31b). *A. brasilense* Cd y Sp6, inmovilizadas solas, alcanzaron su mayor pico de producción de AIA a las 24 y 48 h de incubación, 2.68 ± 0.47 y $2.48 \pm 0.53 \mu\text{g AIA} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectivamente. La cepa atenuada en producción de AIA *A. brasilense* SPM7918 no produjo AIA cuando creció sola o co-inmovilizada con *C. sorokiniana* (Figura 31c).

Bajo condiciones de ayuno de nitrógeno, tanto *A. brasilense* Cd como *A. brasilense* Sp6 co-inmovilizadas con *C. sorokiniana* produjeron AIA, alcanzando un pico de producción después de 48 h de incubación. A las 72 h de incubación, *A. brasilense* Cd co-inmovilizada alcanzo su mayor pico de producción, seguido por una disminución en su producción (Figura 31d). De manera similar, *A. brasilense* Sp6 co-inmovilizado alcanzó un pico de producción a las 96 h de incubación, seguido por una disminución en su producción (Figura 31e). Con o sin nitrógeno, la cepa mutante *A. brasilense* SPM7918 co-inmovilizada con *C. sorokiniana* no produjo cantidades detectables de AIA por medio de HPLC a ningún tiempo de incubación (Figura 31c y f). Resultados similares se observaron cuando *C. sorokiniana* fue inmovilizada sola o cuando fue suplementada con AIA sintético a tiempo cero. Después de 24 h de incubación, el análisis de HPLC no detecto AIA en el medio de cultivo de *C. sorokiniana* inmovilizada sola o cuando fue suplementada con AIA sintético. Presumiblemente *C. sorokiniana* consumio el AIA sintético y no produjo más.

Independientemente de la condición de nitrógeno o de las cepas silvestres, la producción de AIA por *A. brasilense* tiene una alta correlación con la producción

de triptófano por *C. sorokiniana*. Bajo condiciones con nitrógeno, la producción de AIA por *A. brasilense* Cd o Sp6 mostró una correlación altamente significativa ($P = 0.007$ y 0.032 , respectivamente) con la producción de triptófano por parte de *C. sorokiniana* (Figura 31a, b). Cuando se inocularon en ausencia de nitrógeno, se observó también una correlación significativa para *A. brasilense* Sp6 ($P = 0.007$), pero no para *A. brasilense* Cd ($P = 0.388$). Sin embargo, patrones similares de producción de triptófano y AIA fueron encontrados (Figura 31d, e). Bajo las dos condiciones de nitrógeno, la cepa mutante atenuada en AIA *A. brasilense* SPM7918 no se correlacionó con la producción de triptófano por parte de *C. sorokiniana* debido a que no produjo AIA (Figura 31c,f).

7.3.1.3 Crecimiento de ambos microorganismos bajo condiciones heterotróficas.

La co-inmovilización en general redujo el crecimiento de *C. sorokiniana* en la mayoría de los tratamientos y a casi todos los tiempos de muestreo (Figura 32a, b). La suplementación con AIA potenció el crecimiento poblacional solo bajo condiciones de ayuno de nitrógeno. El crecimiento de las 3 cepas de *Azospirillum* bajo ambas condiciones de nitrógeno fue variable (Figura 33a, b).

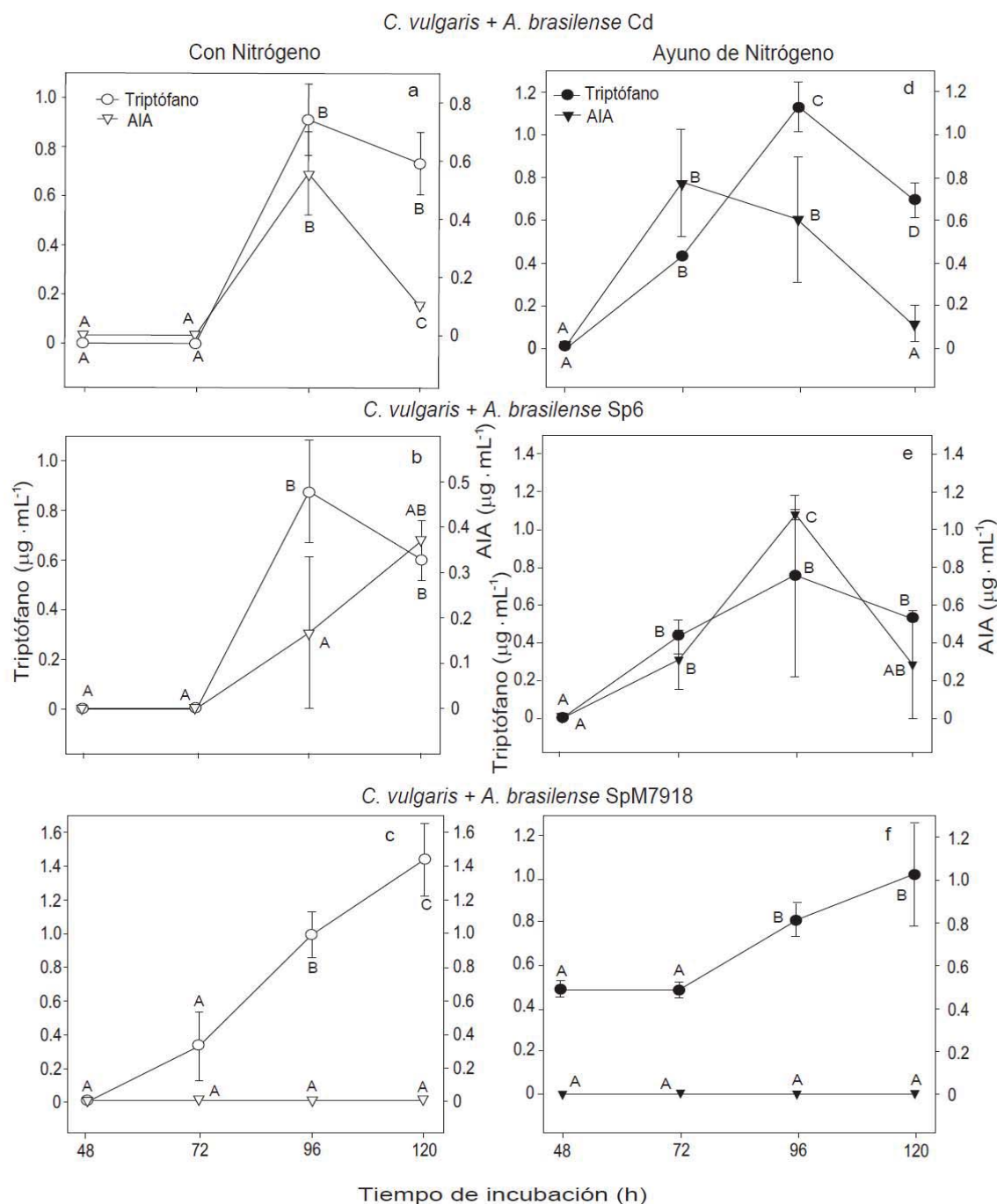


Figura 31. Relación entre triptófano generado (círculo) por *C. sorokiniana* y producción de AIA (triángulo) por *Azospirillum* cuando fueron co-inmovilizados en esferas de alginato bajo condiciones con de nitrógeno (a, b, c) y de ayuno de nitrógeno (d, e, f), usando D-glucosa como fuente de carbono. Los valores en las curvas con diferentes letrás mayúsculas difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y una análisis a posteriori DMS a $P < 0.05$. Las barras representan DE. La ausencia de barras indica DE negligible.

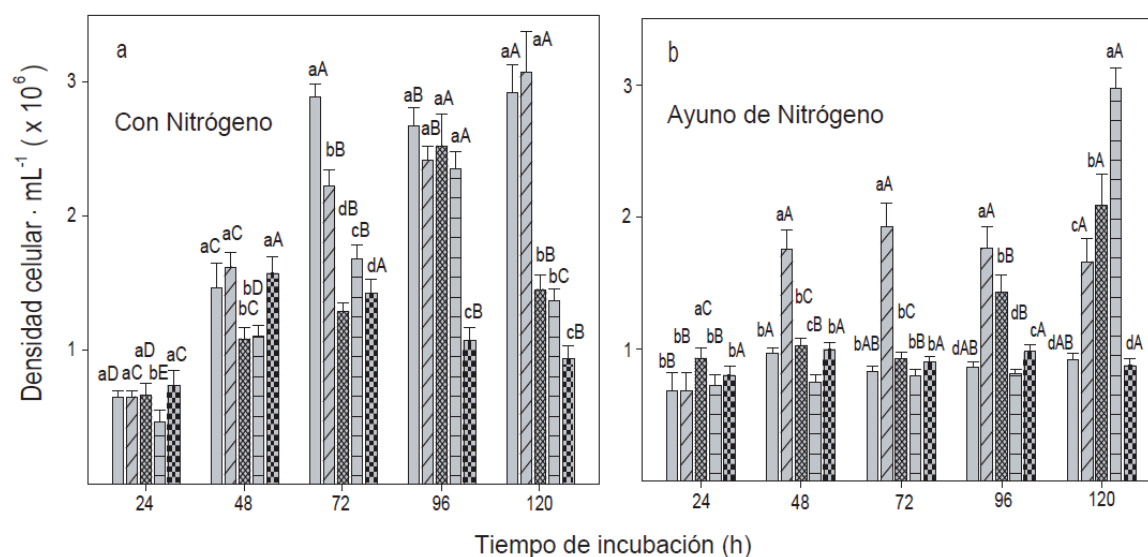


Figura 32. Crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con diferentes cepas de *Azospirillum* bajo condiciones con nitrógeno (a), y bajo ayuno de nitrógeno (b). Columnas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente a varios tiempos de muestreo, donde los tratamientos a cada tiempo de muestreo con diferente letra minúscula difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y un análisis a posteriori DMS a $P < 0.05$. Las barras representan DE.

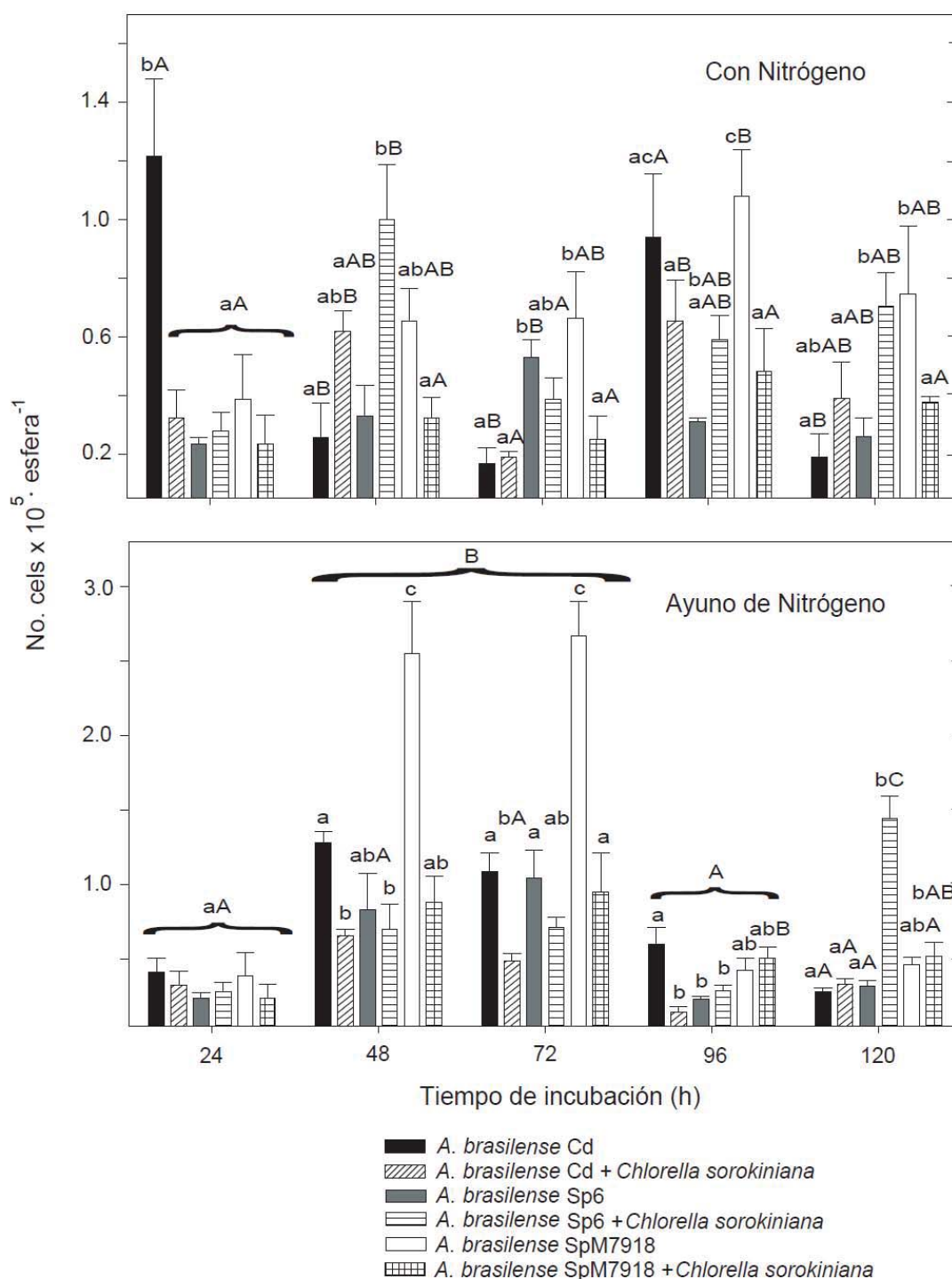


Figura 33. Densidad celular de las diferentes cepas de *A. brasilense*, creciendo sola o co-inmovilizada con *C. sorokiniana* bajo condiciones con nitrógeno (a), y bajo condiciones de ayuno de nitrógeno. Las columnas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente a varios tiempos de muestreo, donde los valores a cada intervalo de tiempo de muestreo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y un análisis a posteriori DMS a $P < 0.05$. Las barras representan DE.

7.3.2 Condiciones autotróficas.

7.3.2.1 Liberación de triptófano en cultivos en suspensión de *C. sorokiniana*.

Los cultivos de *C. sorokiniana* mostraron producción constante de triptófano, alcanzando la mayor liberación de triptófano ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) después de 72 h de incubación (Figura 34). Esta concentración de triptófano fue agregada después a los tratamientos de *A. brasilense* Cd creciendo en MSC enriquecido con triptófano sintético con o sin tiamina.

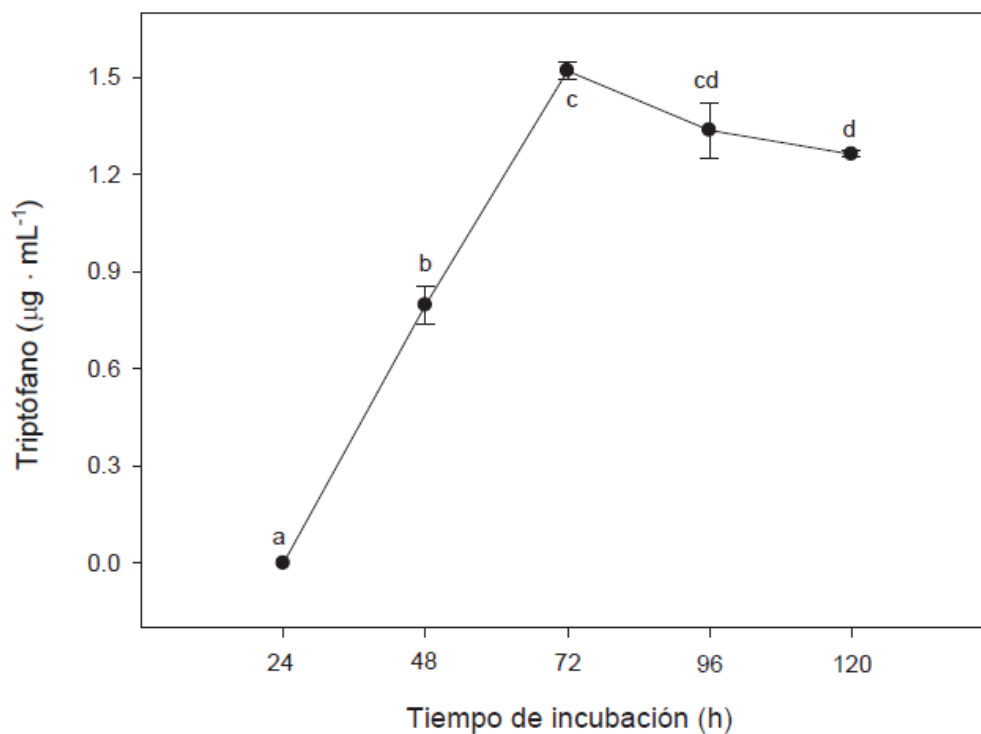


Figura 34. Producción de triptófano por *C. sorokiniana* creciendo sola en medio sintético de crecimiento (MSC). Los valores con diferentes letras difieren significativamente usando ANDEVA de una vía y un análisis a posteriori DMS a $P < 0.05$. Las barras representan DE.

7.3.2.2 Consumo de triptófano y producción de AIA por *A. brasilense*.

No se detectó triptófano o AIA en el medio de cultivo cuando *A. brasilense* Cd inmovilizada sola fue crecida en MSC. Bajo estas condiciones, *A. brasilense* presento su mayor crecimiento después de 72 h de incubación y después su crecimiento decreció a las 120 h de incubación (Figura 35c). Cuando el MSC fue suplementado con triptófano, *A. brasilense* consumió todo el triptófano a las 120 h de incubación, sin embargo no se observo liberación de AIA (Figura 35a).

Cuando se agregó tiamina al MSC, todo el triptófano fue consumido por *A. brasilense* después de 72 h de incubación, y pudo observarse liberación de AIA ($0.448 \pm 0.165 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) después de 96 h de incubación (Figura 35a). *A. brasilense* creciendo en MSC enriquecido con triptófano y tiamina alcanzo su fase estacionara de crecimiento después de 72 h de incubación (Figura 35c). Cuando *A. brasilense* creció en exudados de *C. sorokiniana*, el triptófano presente en los exudados fue consumido en su totalidad en las primeras 48 h de incubación, al mismo tiempo se comenzó a observar liberación de AIA (Figura 35a). Bajo estas condiciones *A. brasilense* alcanzo su fase de crecimiento estacionario a las primeras 48 h de incubación (Figura 35a). Cuando *A. brasilense* fue co-inmovilizado con *C. sorokiniana* no se observó triptófano o AIA en el medio de cultivo, por lo que no se presentan estos resultados en la Figura 35a. Aun así, cuando ambos microorganismos fueron co-inmovilizados pudo observarse un incremento en la población de *C. sorokiniana* en las primeras 48 h de interacción (Figura 35b).

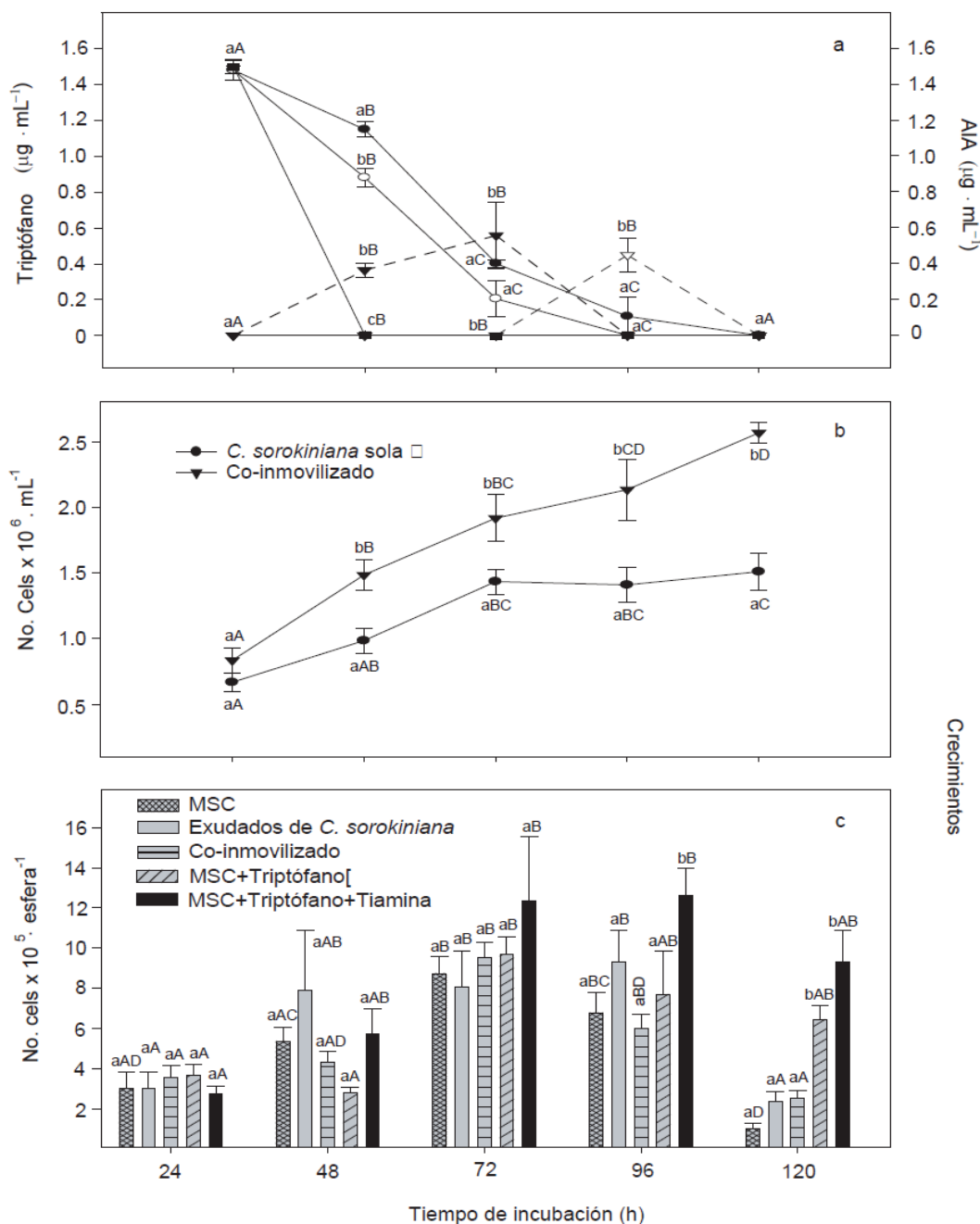


Figura 35. (a) Producción de AIA (cuadro) y consumo de triptófano (triángulo) por *A. brasilense* Cd creciendo en exudados producidos por *C. sorokiniana* (negro), en medio sintético de crecimiento (MSC) enriquecido con triptófano (circulo negro), así como MSC enriquecido con triptófano y tiamina (circulo y triángulo blanco). (b) Crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd en MSC. (c) Crecimiento de *A. brasilense* Cd bajo diferentes condiciones. Letras mayúsculas diferentes difieren significativamente a varios tiempos de muestreo, los tratamientos al mismo tiempo de muestreo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente, ambos usando ANDEVA de una vía y prueba a posteriori DMS a $P < 0.05$. Las barras representan DE. La ausencia de barras indican DE no detectable.

7.3.2.3 Actividad de la enzima triptófano sintasa.

Generalmente la actividad de la enzima triptófano sintasa en la microalga co-inmovilizada con *A. brasilense* fue mayor en las primeras 24 h de interacción (34.29 ± 6.467 U), y disminuyó hasta las 72 h de incubación (Figura 36), luego mostró de nuevo un incremento hasta un nivel comparable (34.82 ± 13.51 U) al de las primeras 24 h de interacción. Cuando la microalga fue inmovilizada sola, la enzima mostró una mayor actividad a las 48 h de incubación (34.17 ± 1.503 U) y luego disminuyó, pero aumentó de nuevo a las 120 h de incubación (Figura 36). La actividad enzimática mostrada por *A. brasilense* fue mínima (Figura 36) comparada por la mostrada por *C. sorokiniana*.

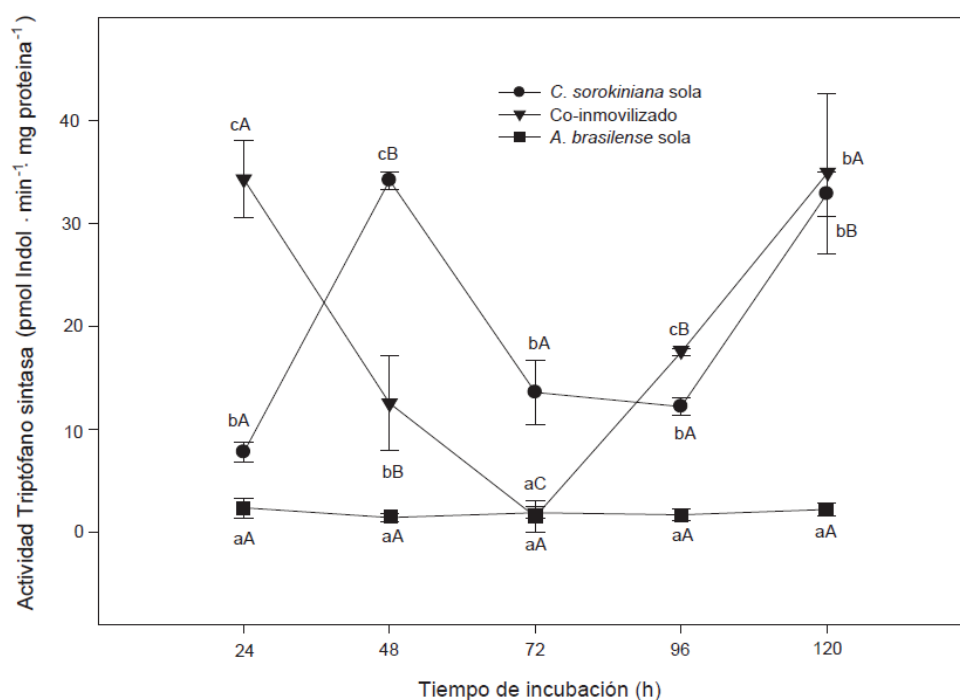


Figura 36. Actividad de la enzima TS en *C. sorokiniana* inmovilizada sola (circulo) y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd (triángulo), así como en *A. brasilense* (cuadro). Valores con diferente letra mayúscula difieren significativamente a varios tiempos de muestreo, tratamientos al mismo tiempo con diferente letra minúscula difieren significativamente, ambas usando ANDEVA de una vía y prueba a posteriori DMS a $P < 0.05$. Barras representan DE. La ausencia de barra indica DE no detectable.

7.3.2.4 **Actividad de la enzima indol piruvato decarboxilasa (IPDC)**

La mayor actividad de IPDC fue alcanzada a las 72 h de interacción cuando *A. brasilense* fue co-inmovilizada con *C. sorokiniana* ($2.581 \pm 0.19 \mu\text{g AIA} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), tuvo una disminución en las siguientes 24 h, pero incremento de nuevo a las 120 h de interacción (Figura 37, análisis letras mayúsculas). De manera similar, cuando *A. brasilense* fue inmovilizado solo y crecido en exudados de *C. sorokiniana*, la mayor actividad IPDC fue observada a las 72 h de incubación ($1.35 \pm 0.12 \mu\text{g AIA} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), y posteriormente disminuyó con el tiempo. Creciendo en MSC sin triptófano y tiamina, *A. brasilense* inmovilizado solo mostró un incremento en la actividad IPDC también a las 72 h de incubación ($0.992 \pm 0.023 \mu\text{g AIA} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) y posteriormente disminuyó (Figura 37). Aún así, la actividad de la IPDC fue significativamente menor que la actividad de la enzima mostrada por *A. brasilense* co-inmovilizado con *C. sorokiniana* o inmovilizado solo y crecido en exudados (Figura 37, análisis letras minúsculas). En MSC enriquecido solo con triptófano (sin tiamina), la actividad de IPDC en *A. brasilense* fue baja en todos los tiempos de incubación. Sin embargo, cuando tiamina fue agregada al medio MSC junto con triptófano, la actividad enzimática en *A. brasilense* aumentó con el tiempo y alcanzó su pico a las 120 h de incubación ($0.587 \pm 0.01 \mu\text{g AIA} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) (Figura 37).

La microalga *C. sorokiniana* inmovilizada sola también mostró actividad de la enzima con pico a las 120 h de incubación ($0.402 \pm 0.035 \mu\text{g} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$). Sin embargo, los valores de actividad de IPDC mostrados por *C. sorokiniana* en los demás tiempos de incubación fueron menores que la actividad mostrada por *A. brasilense* creciendo co-inmovilizada con esta microalga o cuando esta bacteria creció en exudados de *C. sorokiniana*.

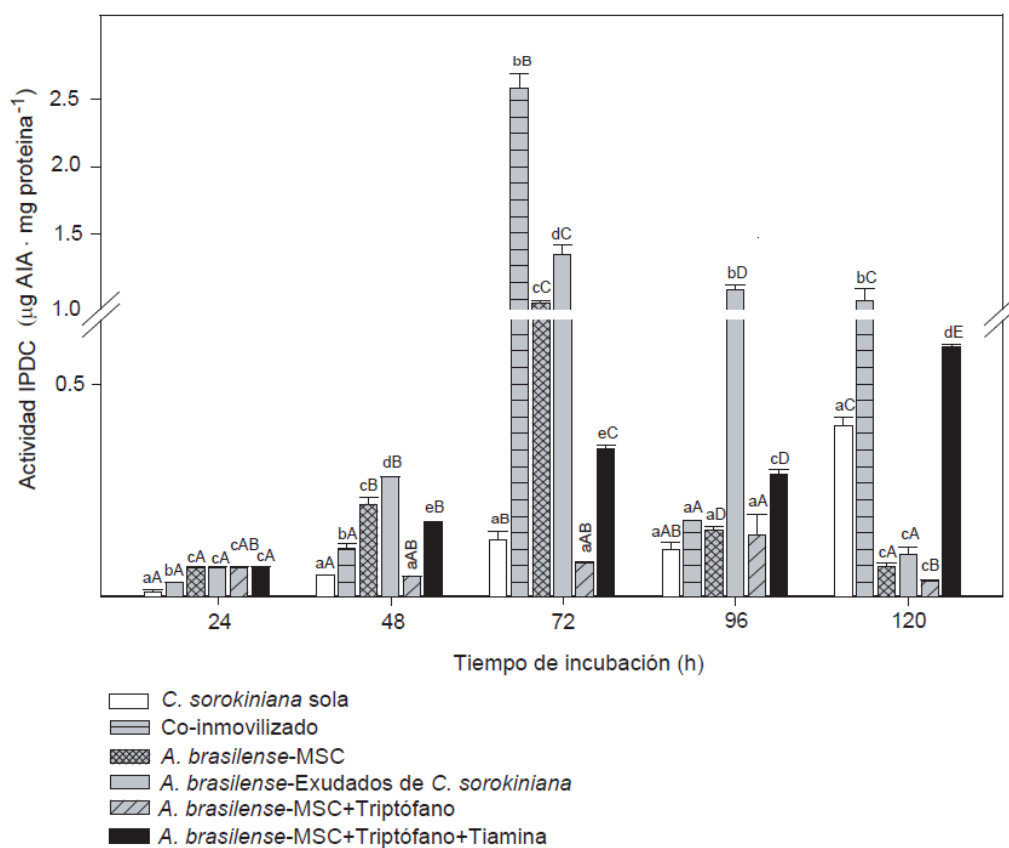


Figura 37. Actividad de la enzima IPDC a diferentes condiciones de cultivo. Los valores con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente a diferente tiempo de muestreo, los tratamientos al mismo tiempo de muestreo con diferente letra minúscula difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y análisis a posteriori DMS a $P < 0.05$. Las barras representan DE. La ausencia de barras indica DE no detectable.

7.4 Definición de la actividad de IPDC encontrada a las 72 y 120 h de incubación, mediante la evaluación de la expresión del gen *ipdC* en *Azospirillum brasilense*.

Considerando que las mayores actividades de la enzima IPDC observadas en los tratamientos fueron a las 72 y 120 h de incubación, se analizó la expresión del gen *ipdC* en los tratamientos de *A. brasilense* inmovilizada tanto sola como co-inmovilizado con *C. sorokiniana* a las 48 y 96 h de incubación (24 h antes del incremento de la actividad IPDC).

El gen de referencia más estable para la normalización durante el análisis cuantitativo de la expresión del gen *ipdC* fue el gen *recA*. Este gen fue usado para establecer diferencias en la expresión relativa entre los tratamientos. Los niveles relativos de expresión del gen *ipdC* fueron significativamente sobre expresados ($P < 0.05$) a 48 h de incubación en *A. brasilense* crecido en exudados de *C. sorokiniana* (Figura 38a). Cuando ambos microorganismos fueron co-inmovilizados, el gen *ipdC* fue sobre expresado a las 96 h de incubación (Figura 38b). Sin embargo, en los demás tratamientos a ambos tiempos, la expresión del gen *ipdC* fue significativamente reprimido ($P < 0.05$).

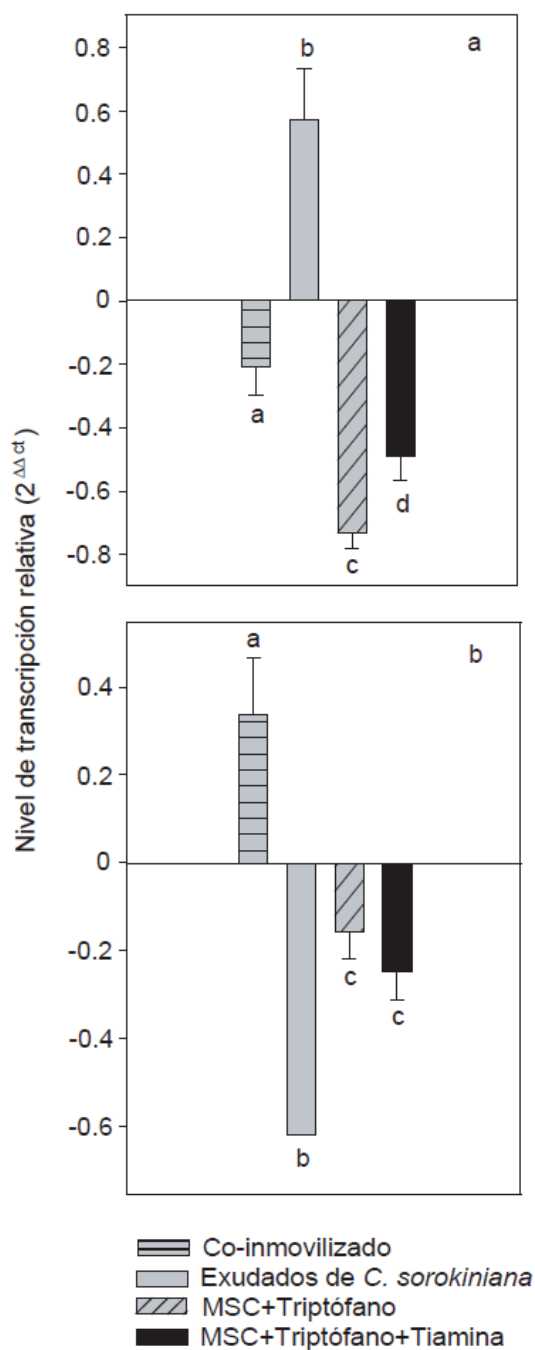


Figura 38. Expresión del gen *ipdC* a dos tiempos (48 h – a; y 96 h – b de incubación) en *A. brasilense* co-inmovilizada con *C. sorokiniana*, e inmobilizada sola a diferentes condiciones de crecimiento. Columnas con diferentes letras difieren significativamente, usando ANDEVA de una vía y análisis a posteriori DMS a $P < 0.05$. Las barras representan DE. La ausencia de barra indica DE no detectable.

8 DISCUSIÓN.

8.1 Optimización de una técnica analítica basada en HPLC para la determinación cualitativa y cuantitativa de tiamina en *C. sorokiniana* y sus exudados.

La determinación de vitaminas del grupo B por HPLC en diferentes compuestos, se ha trabajado a lo largo de los años bajo dos métodos de detección (absorbancia o fluorescencia), reportándose diferente sensibilidad para cada método. En el presente estudio se llevó a cabo la determinación de tiamina tanto por fluorescencia como por absorbancia, encontrando una mayor sensibilidad en el primero. La ventaja del uso de fluorescencia en lugar de absorbancia ha sido reportada con anterioridad (Fellman *et al.*, 1982; Finglas y Faulks, 1987; Blake, 2007). Dentro de las principales desventajas de la determinación de esta vitamina por absorbancia, se encuentran la baja absorptividad molar que presenta, así como la presencia en la matriz a analizar, de compuestos que presenten absorbancia a longitudes de onda similares a la empleadas para el análisis del compuesto de interés (Blake, 2007). Desventaja que se observó con el nitrato de potasio presente en medio de crecimiento de microalga C30 el cual muestra su máxima absorptividad molar en un rango de longitudes de onda que va desde 230 a 350 nm (Krishnan y Guha, 1934; Johnson y Coletti, 2002), rango que incluye la longitud de onda (244 nm) en la cual la tiamina presentó su máxima absorbancia.

La determinación de tiamina por HPLC fluorescencia, aunque requiere de la oxidación de este compuesto para formar el compuesto fluorescente tiocromo, tiene como principal ventaja el limitado número de compuestos que pudieran interferir en su determinación, aumentando así la reproducibilidad y sensibilidad del método (Fellman *et al.*, 1982; Finglas y Faulks, 1987). Sin embargo, la presencia de otras vitaminas que por su estructura presentan fluorescencia natural, como la riboflavina (la cual puede ser detectada en un rango de longitud

de onda que va desde 450 a 530 nm (Sikorska *et al.*, 2008), abarcando así la longitud de onda máxima de emisión en la determinación de tiamina), se presenta como una de los principales compuestos de interferencia en la determinación de tiamina.

La característica fluorescente de la riboflavina, así como la dificultad de separación entre tiamina y riboflavina que se ha reportado con anterioridad (Esteve *et al.*, 2001; Sanchez-Machado *et al.*, 2004), generó la necesidad de variar condiciones de corrida en el método de HPLC. En este sentido, cuando la fase móvil en el método probado (Sánchez-Machado *et al.*, 2004) se mantuvo a un pH ácido o básico (5.93 y 7.87), la molécula de tiamina mostró un tiempo de retención muy similar al de la riboflavina, mientras que un pH cercano a la neutralidad (6.47 y 7.0) incrementó su tiempo de retención, separándose así ambos compuestos. Esta característica de la tiamina ha sido observada anteriormente, y es debida a su ionización cuando está en un pH neutro, mientras que la riboflavina permanece estable (Augustin, 1984; Sánchez-Machado *et al.*, 2004).

El contenido y liberación de vitaminas por microalgas ha sido de interés en el campo de la ciencia de los alimentos desde hace más de 50 años (Pratt y Johnson, 1965), sin embargo los últimos trabajos reportados sobre la liberación de vitaminas al medio por parte de microalgas datan de los años 70s (Aaronson, 1977). En ellos se reporta la capacidad de *C. vulgaris* para liberar tiamina al medio en concentraciones de 1.08 a 2.16 ng/mL en un periodo de tiempo de cultivo de 6 a 12 días (Nishijima *et al.*, 1979), mientras que otros autores no detectan producción de esta vitamina en un cultivo de 11 días (Pratt y Johnson, 1965; Aaronson *et al.*, 1977).

Los resultados obtenidos muestran la presencia de tiamina en el medio de un cultivo de 10 días, a una concentración de 2.99 ± 0.05 ng/mL, por lo que la sensibilidad alcanzada con el método de absorbancia (6.7 ng/mL) fue insuficiente,

para su detección. Los trabajos realizados por Aaronson *et al.* (1977) y Pratt y Johnson (1965) se basan en una determinación indirecta de tiamina, mediante ensayos microbiológicos en los cuales se usan cepas bacterianas que requieren de la vitamina como factor de crecimiento. Sin embargo, este tipo de técnicas indirectas presentan grandes desventajas, debido a la variedad de factores que pueden afectar el crecimiento de la bacteria (temperatura, pH, competencia, potencial hídrico y presión de oxígeno) (García *et al.*, 2004). Por su parte, la determinación de tiamina por HPLC se da de forma directa en el medio a analizar (medio de cultivo) y no depende de factores externos al método.

Tanto la tiamina como la riboflavina se presentan como precursores de otros compuestos como son los ésteres de tiamina (tiamina monofosfato-TMP, difosfato-TDP y trifosfato-TTP) y ésteres de riboflavina (Flavina mononucleótido-FMN y flavín adenina dinucleótido-FAD). Los ésteres de riboflavina por su similitud estructural, presentan las mismas características fluorescentes que la riboflavina, por lo que pueden ser detectados con el mismo método (Yu *et al.*, 1999; Pallota, 2011; Ooi *et al.*, 2012). Los ésteres de tiamina por su parte son también oxidados a tiocromo en presencia de ferrocianuro de potasio (Penttinen, 1976), por lo que, al igual que la tiamina oxidada, presentan fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión similares (Ihara *et al.*, 2005; Körner *et al.*, 2009; Buchholz *et al.*, 2012). La presencia de otros picos, aparte de los correspondientes a las vitaminas, en los cromatogramas de los exudados sin oxidar, pudieran corresponder a la presencia de ésteres de riboflavina, mientras que el incremento de fluorescencia, después de la oxidación con ferrocianuro de potasio, del compuesto con tiempo de retención de 3.5 minutos, indicaría la presencia de alguno de los ésteres de tiamina, en forma de tiocromo, con tiempo de retención similar al mostrado por alguno de los ésteres de riboflavina.

De los tres ésteres de tiamina, la tiamina difosfato, actúa como cofactor en diversas rutas metabólicas. La tiamina monofosfato es un intermediario en la

formación de tiamina difosfato (Goyer, 2010). Por su parte, se ha reportado que la tiamina trifosfato tiene un papel en la regulación de canales iónicos en células del sistema nervioso (Bettendorff *et al.*, 1994), sin embargo, en plantas se desconoce su función.

La concentración de tiamina y sus esteres en *Arabidopsis thaliana* varían durante estrés oxidativo, pero se ha observado que la tiamina en su forma libre y la tiamina difosfato se presentan en mayor cantidad, bajo condiciones normales y de estrés abiótico probadas (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2009). Al presentarse una mayor concentración de tiamina libre y tiamina difosfato en la planta, es posible que el compuesto liberado junto con la tiamina, y que presentó un incremento de fluorescencia cuando se llevo a cabo la oxidación de los exudados, fuera el tiocromo de la tiamina difosfato.

8.2 Efecto de *Azospirillum brasilense* sobre la producción de tiamina en *Chlorella sorokiniana* durante la relación mutualista.

El mutualismo sintético entre *C. sorokiniana* y *A. brasilense* es producido artificialmente y esta lejos de ser encontrado en la naturaleza. Este mutualismo tiene dos propósitos: 1) El estudio del mutualismo entre plantas y bacterias, debido a la gran similitud que mantienen la interacción entre *C. sorokiniana* y *A. brasilense*, con la interacción que ocurre entre PGPB y plantas superiores (de-Bashan y Bashan, 2008; de-Bashan *et al.*, 2015). 2) Para explorar el potencial uso de este mutualismo en procesos biotecnológicos (ver referencias en sección de antecedentes). El estudio de extrusión de tiamina, la cual se sabe participa en interacciones entre plantas y PGPB (Palacios *et al.*, 2014), y como cofactor en el metabolismo de carbono y amino acidos en todos los organismos (Jurgenson *et al.*, 2009), es clave para describir nuevas funciones en las interacciones y para incrementar nuestro entendimiento de las interacciones entre células eucariotas y procariotas. Al mismo tiempo, el objetivo de esta investigación es proveer

herramientas para el desarrollo biotecnológico. Estas ideas son soportadas por 2 ejemplos en la contribución de tiamina por parte de bacterias, a microalgas marinas auxotróficas de tiamina: 1) el co-cultivo de la microalga *Ostreococcus lucimarinus* con *Pseudomonas* sp cepa TW7. Esta cepa, la cual sintetiza tiamina, muestra la influencia bacteriana sobre la viabilidad de tiamina, permitiendo el crecimiento de microalgas. Esta bacteria puede incrementar la viabilidad de tiamina más allá de la síntesis *de novo* de tiamina (Paerl *et al.*, 2015). 2) La bacteria marina *Dinoroseobacter shibaea*, un simbiote de microalgas marinas cosmopolitas, puede proveer de tiamina a microalgas auxotrofas de tiamina (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Sin embargo, la contribución novedosa de este estudio es el mostrar los cambios en tiamina viable entre dos microorganismos que pueden producir y consumir tiamina, y que ambos son beneficiados por su interacción.

Durante este mutualismo sintético, la PGPB *A. brasilense* potencia la producción de diversos compuestos en *C. sorokiniana*, como carbohidratos, lípidos y pigmentos fotosintéticos, durante su interacción en esferas de alginato (Choix *et al.*, 2012; Gonzalez and Bashan, 2000; de-Bashan *et al.*, 2002b; Leyva *et al.*, 2014). En este estudio específicamente se extienden sus efectos en la liberación de tiamina, cuando ambos microorganismos interactúan bajo condiciones de crecimiento óptimo o bien de estrés. Este estudio demostró que, durante el mutualismo sintético, *C.sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* potencia la liberación de tiamina en el medio de crecimiento bajo condiciones de estrés de pH.

Midiendo el efecto relativo de cada estresor, solo a pH 6 (condición que se observo estresante para el crecimiento de la microalga), se observo una mayor liberación de tiamina en el tratamiento del co-inmovilizado que la suma de la tiamina liberada por *C. sorokiniana* y *A. brasilense* inmovilizados solos. Esto puede ser debido a que la producción de tiamina por parte de la microalga esta relacionada a la multiplicación celular (Nishijima *et al.*, 1979) y se ha observado

que *A. brasilense* mitiga el estrés provocado por pH en *C. sorokiniana* (de-Bashan *et al.*, 2005), recuperando y potenciando el crecimiento de la microalga. Bajo condiciones de crecimiento no estresantes, a pH 7 e intensidad de luz de 60 $\mu\text{molphoton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (los cuales sirvieron como controles en el presente estudio), se observó una mayor liberación de tiamina en el tratamiento del co-inmovilizado. Bajo estas condiciones óptimas de crecimiento, diversos efectos metabólicos han sido reportados en la microalga *C. sorokiniana* cuando se encuentra co-inmovilizada con la bacteria *A. brasilense* (Gonzalez y Bashan, 2000; Choix *et al.*, 2012a,b, 2014; de-Bashan *et al.*, 2002b; Leyva *et al.*, 2014, 2015). El papel de la tiamina como cofactor de diversas rutas metabólicas está bien establecido (Schyns *et al.*, 2005) y puede explicar el incremento en la liberación de tiamina al medio durante el óptimo mutualismo sintético de estos microorganismos, permitiendo así una mayor disponibilidad de tiamina para ambos microorganismos.

La liberación de tiamina y el crecimiento celular de *C. sorokiniana* fue dependiente de la luz cuando estuvo tanto inmovilizada sola o co-inmovilizada con *A. brasilense*. Lv *et al.* (2010) reportan que el crecimiento de *C. sorokiniana* incrementa con el incremento de la intensidad de luz. La tiamina difosfato actúa como cofactor de un importante número de enzimas en el metabolismo de carbohidratos (Schyns *et al.*, 2005). Por lo tanto, nosotros teorizamos que el incremento en el metabolismo de carbono incrementado por la intensidad de la luz podría inducir una mayor producción de tiamina (la cual también podría verse reflejada en liberación de esta al medio) por *C. sorokiniana*, lo cual a su vez, facilitaría la asimilación de carbón. Sin embargo, la luz a ciertos niveles puede generar efectos adversos. Nosotros encontramos que bajo altas intensidades de luz, la liberación de tiamina y el crecimiento poblacional de *C. sorokiniana*, inmovilizada sola, fue negativamente afectada. Es posible que el efecto de la alta intensidad de luz sobre el crecimiento de *C. sorokiniana* sea debido a un efecto de fotoinhibición, donde el exceso de luz genera una depresión de la fotosíntesis (Smith y Underwood, 2000). Efectos similares han sido reportados en otras

microalgas (Kana *et al.*, 1997; Pal *et al.*, 2011). Cuando *C. sorokiniana* fue co-inmovilizada con *A. brasilense*, se pudo observar una recuperación en el crecimiento de la microalga después de 144 h de interacción, indicando un efecto de mitigación de estrés por parte de *A. brasilense*. Bajo una intensa irradiación, el aparato fotosintético no usa apropiadamente la energía de la luz; el exceso de energía permite la formación de moléculas de oxígeno altamente activas (Bar *et al.*, 1995). La interacción entre *C. sorokiniana* y *A. brasilense* potencia la producción de pigmentos fotosintéticos en *C. sorokiniana*, los cuales pueden potenciar la fotosíntesis (de-Bashan *et al.*, 2002b). Se ha reportado que *Azospirillum brasilense* genera un incremento en pigmentos fotosintéticos fotoprotectores en plantulas trigo (Bashan *et al.*, 2006), sin embargo esto no ha sido reportado en microalgas. La disminución en la concentración de tiamina en exudados puede ser debido a dos procesos metabólicos: ya que la excreción de tiamina se ha visto relacionada a la multiplicación celular (Nishijima *et al.*, 1979), y a muy alta intensidad de luz (para *C. sorokiniana*) se observa una inhibición del crecimiento en células de *C. sorokiniana*, por lo tanto también se ve afectada la producción y liberación de tiamina. Otra explicación puede darse debido a que la tiamina es un compuesto altamente sensible a la luz (Dănet y Calatayud, 1994; Hagen *et al.*, 1991), lo que provocaría que el cultivo expuesto a altas intensidades de luz provocara la degradación de la vitamina antes de su determinación.

Bajo condiciones de ayuno de nitrógeno, la liberación de tiamina y el crecimiento de *C. sorokiniana* fue afectado de forma negativa. Esto puede ser debido a que un ayuno de nitrógeno afecta la eficiencia fotosintética, causando una inactivación del fotosistema II en microalgas unicelulares (Berges *et al.*, 1996). En nuestro estudio, el efecto negativo de un ayuno de nitrógeno durante las primeras 24 h fue suficiente para detener por completo el crecimiento de *C. sorokiniana*. Aún cuando se adicionó nitrógeno al medio, después de 24 h de ayuno, la microalga no fue capaz de recuperarse. Floreto *et al.* (1996) reportan que la microalga verde *Olva pertusa* fue negativamente afectada cuando se cultivo bajo ayuno de nitrógeno,

reduciéndose principalmente su biomasa y su tasa de crecimiento. Este fuerte estrés probablemente también inhiba la liberación de tiamina.

No observamos liberación de tiamina al medio por parte de *C. sorokiniana* inmovilizada sola, bajo condiciones de ayuno de nitrógeno. Esto ocurrió debido a que es sabido que el anillo de tiazol de la tiamina se produce a partir de glicina, del cual es tomado un átomo de carbono y uno de nitrógeno (Nosaka, 2006). Bajo condiciones de ayuno de nitrógeno en la diatomea *Thalassiosira pseudonana*, los osmolitos que presentan nitrógeno como prolina, homarina y glicina betaina son reemplazados por la acumulación de propionato de dimetilsulfonio, los cuales no contienen nitrógeno (Bucciarelli y Sunda, 2003). Por lo tanto, nosotros asumimos que la baja liberación de tiamina durante condiciones de ayuno de nitrógeno debe a la ausencia de precursores de tiamina, como glicina. Aunque Bertrand y Allen (2012) proponen que la tiamina puede potenciar la respuesta y generar una recuperación del fitoplancton bajo condiciones de ayuno de nitrógeno, esto no ocurrió en nuestro estudio. Aún cuando la tiamina estuvo presente en exudados del tratamiento con los microorganismos co-inmovilizados, el crecimiento de *C. sorokiniana* no se vio recuperado. Teniendo esto en cuenta, esto muestra que la disponibilidad de nitrógeno es un factor primario que controla la respuesta celular en *C. sorokiniana*, suprimiendo la producción de tiamina y su liberación.

En nuestro estudio, *A. brasilense* liberó tiamina bajo todas las condiciones de crecimiento probadas. La producción de vitaminas del grupo B por parte de esta bacteria depende de la fuente de carbono (Rodelas *et al.*, 1993) y el pH (Dahm *et al.*, 1993). En nuestro estudio, *A. brasilense* fue capaz de liberar tiamina al medio sin la presencia de ninguna fuente de carbono; sin embargo, si fue posible observar que la liberación de tiamina fue potenciada a pH ácidos, aunque solo durante las primeras 48 h de incubación. Esto se puede explicar, debido a que la bacteria puede usar compuestos de almacenamiento de energía, como son los poli β -hidroxibutiratos para regular su metabolismo y de esta forma favorecer su

establecimiento y supervivencia en ambientes bajo condiciones subóptimas (Kadouri *et al.*, 2003). Nosotros proponemos que, debido a que la tiamina es un importante co-factor en diversas rutas metabólicas, los almacenes de carbón en la bacteria aseguran la producción de tiamina aún cuando las fuentes de carbón son limitadas.

La función exacta de la tiamina en este mutualismo sintético se encuentra todavía en duda, y bajo investigación. Por otro lado, ambos microorganismos tienen la capacidad de producir por sí solos la vitamina B₁ y pueden sustentar su vida sin necesidad de tiamina externa. Aún así, la interacción de estos dos microorganismos mostró una mayor liberación de tiamina. Existen al menos dos posibles funciones adicionales de la tiamina por descubrir en otras actividades metabólicas que promuevan el crecimiento de microalgas y su metabolismo como son: 1) potenciar la producción de ácido indol-3-acético (AIA; de-Bashan *et al.*, 2008; Meza *et al.*, 2015 a,b), en el cual la tiamina se sabe es co-factor de la producción de AIA. 2) La tiamina puede participar en potenciar el metabolismo de carbohidratos en la microalga. Es sabido que la tiamina es un importante cofactor en el metabolismo de carbohidratos en todos los organismos. Recientemente Choix *et al.* (2012 a,b, 2014) mostró que durante este mutualismo sintético el contenido total de carbohidratos y especialmente de almidón, así como el metabolismo de estos, es significativamente potenciado en *Chlorella*. Sin embargo, todavía no es posible separar el efecto metabólico de cada uno de los microorganismos participantes en este mutualismo sintético. Por lo tanto, nuestros experimentos pueden solo mostrar que aplicado condiciones de estrés de pH a la microalga, se ve potenciado la liberación de tiamina. Sin embargo, no podemos mostrar un efecto directo del estresor sobre la biosíntesis de tiamina por parte de cada uno de los microorganismos. Al momento se está desarrollando una metodología para separar los microorganismos y poder evaluar los efectos de manera individual (J.P. Hernandez, comunicación personal).

Uno de los principales descubrimientos de este estudio es que durante la interacción de estos dos microorganismos, la tiamina esta siempre viable para ambos microorganismos, haciéndose evidente la liberación de esta vitamina en los exudados. Así también, esto indirectamente indica que la liberación de tiamina fue recuperada. Esto nos sugiere un campo por explorar en la interacción entre la mitigación de estrés en *C. sorokiniana* por *A. brasilense* y la tiamina.

8.3 Efecto de tiamina y triptófano producidos por *C. sorokiniana* en la producción de ácido indol-3-acético por *A. brasilense* durante la relación mutualista.

Interacciones mutualistas entre diferentes especies están basadas en el intercambio de recursos y servicios (Bronstein, 1994; Doebeli y Knowlton, 1998; Stanton, 2003). La habilidad de *Chlorella* spp. de producir triptófano y de *Azospirillum* spp. de sintetizar AIA a partir de este triptófano puede ser considerado una de los mayores intercambios de recursos durante el mutualismo sintético de *C. sorokiniana* y *A. brasilense*. Nosotros escogimos explorar el intercambio de triptófano y AIA durante la interacción mutualista entre *C. sorokiniana* y *A. brasilense* ya establecida anteriormente.

8.3.1 Condiciones heterotróficas.

Esta tesis ha demostrado que *C. sorokiniana* tiene capacidad de producir triptófano. Otros estudios demuestran que plantas mayores y otras microalgas (no *Chlorella*) exudan triptófano (Martens y Frankenberger, 1994; Tonietto *et al.*, 2014). Adicionalmente, el gen *mma7*, el cual codifica para la enzima triptófano sintasa, la cual participa en la biosíntesis de triptófano, ha sido aislado de la Chlorophyta *Chlamydomonas reinhardtii* (Palombella y Dutcher, 1998), mismo grupo taxonómico al cual pertenece *Chlorella* spp. Posiblemente, este gen podría

también ser encontrado en el genoma de *Chlorella*, una vez que este sea completamente secuenciado.

Bajo las dos condiciones de nitrógeno probadas, sin adicionar triptófano al medio, se encontró una alta correlación entre la producción de triptófano por parte de *C. sorokiniana* y la producción de AIA por parte de las cepas silvestres de *A. brasilense* (Cd y Sp6). Esto demuestra que durante esta interacción mutualista, *C. sorokiniana* provee de triptófano a *A. brasilense*, y esta bacteria a su vez convierte este aminoácido a AIA. Esta hipótesis es soportada por nuestro descubrimiento de que la cepa mutante atenuada en la producción de AIA *A. brasilense* SPM7918 no produjo AIA en cantidades medibles, aunque la microalga *C. sorokiniana* sí exudó triptófano al medio.

La biosíntesis de AIA por parte de *Azospirillum* spp. a partir de triptófano es bien conocida (Spaepen *et al.*, 2007). Esta bacteria posee diversas rutas dependientes de triptófano y una independiente de triptófano, por las cuales puede producir AIA (Carreño-Lopez *et al.*, 2000; Zakharova *et al.*, 1999; Prinsen *et al.*, 1993). Se ha también demostrado que el AIA potencia la exudación de aminoácidos, incluyendo triptófano, a partir de células de raíz en *Sorghum bicolor* (Golubev *et al.*, 2011). Este aumento en la exudación de triptófano fue también observado en nuestros experimentos, pudiendo tener dos posibles explicaciones: 1) La alta correlación encontrada entre la producción de triptófano y AIA por parte de *C. sorokiniana* y las cepas silvestres de *A. brasilense*, pero no con la cepa mutante atenuada en la producción de AIA; y 2) un efecto inductor en la síntesis de triptófano por parte de AIA, lo cual fue posible observar en *C. sorokiniana* suplementada con AIA sintético, aunque este incremento fue transitorio. El mecanismo para este aumento reversible está todavía bajo investigación.

8.3.2 Condiciones autotróficas.

La producción de AIA por parte de *A. brasilense* es uno de los principales mecanismos de promoción de crecimiento en plantas y microalgas ejercidas por esta PGPB (Dobbelaere *et al.*, 1999; de-Bashan *et al.*, 2008; Bashan y de-Bashan, 2010). Se ha propuesto que durante la interacción mutualista entre plantas o microalgas con PGPB ocurre la siguiente cascada de eventos: el precursor triptófano necesario para la producción de AIA (Carreño-Lopez *et al.*, 2000; Zakharova *et al.*, 1999) es producido y liberado por la planta o microalga. Esto permite a su vez la producción de AIA por parte de la PGPB. Posteriormente el AIA es liberado y promueve el crecimiento de la planta, así como una mayor producción de triptófano. Este mecanismo de retroalimentación progresa en un círculo cerrado durante la interacción de los dos organismos (Idris *et al.*, 2007; Kamilova *et al.*, 2006). Está bien establecido que el AIA afecta diversas rutas metabólicas en *C. sorokiniana* (Meza *et al.*, 2015 a,b). Nosotros demostramos que el triptófano (en este estudio) y la tiamina presente en exudados producidos por *C. sorokiniana* (Palacios *et al.*, 2015) son usados como precursores por *A. brasilense* para producir y liberar AIA durante su interacción mutualista en esferas de alginato.

Aunque las bacterias son capaces de producir pequeñas cantidades de triptófano de manera endógena (generalmente, los niveles de triptófano celulares en bacterias están en concentraciones de $\sim 0.004 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, Patten *et al.*, 2013), para producir grandes cantidades de AIA, diferentes bacterias requieren de diferentes cantidades de triptófano exógeno (Duca *et al.*, 2014). Esto corresponde a la habilidad inherente de cada bacteria para sintetizar triptófano de manera endógena. Las reservas de triptófano endógeno en las bacterias son primero usadas para la síntesis de proteínas, mientras que la producción de metabolitos secundarios, como es el caso de AIA, requiere de una adicional fuente de nitrógeno (Duca *et al.*, 2014). La adición de triptófano al medio de crecimiento

bacteriano permite un aumento en la producción de AIA de 6 a 8 veces más en *A. brasilense* Sp7, que el observado en un medio sin triptófano (Zimmer y Bothe, 1988). En este estudio, *A. brasilense* produce AIA solo cuando es crecido en exudados de *C. sorokiniana* (los cuales contienen triptófano y tiamina) o bien cuando es crecido en medio sintético de crecimiento (MSC) suplementado con triptófano y tiamina. Ya ha sido propuesto, anteriormente, que el L-triptófano presente en exudados de lenteja acuática (*Lemna minor*), es precursor de AIA. Esto sugiere una cercana relación simbiótica entre macrofitas y el colonizador *B. amyloliquefaciens* (Idris *et al.*, 2007).

Es bien sabido que la tiamina es cofactor de la principal enzima de la biosíntesis de AIA (Koga *et al.*, 1992; Jurgenson *et al.*, 2009). Minamisawa *et al.* (1996) demuestran que en la PGPB *Bradyrhizobium elkanii* la adición de tiamina y Mg^{+2} potencia hasta 20 veces la concentración de indol-3-acetaldehído, el cual es precursor en la biosíntesis de AIA. En nuestro estudio la suplementación de tiamina al medio conteniendo triptófano, no solo permitió la producción de AIA por *A. brasilense* sino que también se observó un incremento de la actividad de la enzima IPDC, así como un aumento en el consumo de triptófano del medio.

Durante el desarrollo del mutualismo sintético desarrollado aquí, la interacción entre los microorganismos se hace más fuerte y cercana con el paso del tiempo (de-Bashan *et al.*, 2011). El paradigma del mutualismo está fundado en que durante esta interacción mutualista ambos microorganismos pueden producir compuestos, que pueden ser usados por el compañero, como es el caso del triptófano y el AIA. La ausencia de triptófano o AIA que se observó en el medio de cultivo cuando los dos microorganismos estaban co-inmovilizados puede ser explicado como un resultado de que no se producen cantidades extras de triptófano y AIA a parte de las que son requeridas para sostener la interacción. Esta explicación está soportada por el hecho de que pudimos detectar un incremento en la actividad de la enzima IPDC en el tratamiento del co-inmovilizado

después de 72 h de interacción, junto con un incremento en la actividad de la enzima triptófano sintasa (el cual podría ser un indicativo de la producción de triptófano por *C. sorokiniana*) después de 72 h de interacción. Como evidencia que soporta la producción de AIA, encontramos que cuando *A. brasilense* fue cultivado en exudados de *C. sorokiniana*, pero en ausencia de la microalga, mostro capacidad de producir y liberar AIA al medio.

La enzima triptófano sintasa subunidad β cataliza el último paso en la síntesis de triptófano. Es bien sabido que la producción de triptófano inhibe esta enzima en un efecto de retroinhibición (Swift y Stewar, 1991). En el presente trabajo, la actividad de la enzima triptófano sintasa cadena β en *C. sorokiniana* creciendo sola es alta a las 48 h de incubación, y posteriormente disminuye. Este descenso en la actividad de la enzima triptófano sintasa corresponde con el incremento en la concentración de triptófano en los exudados de esta microalga, lo cual puede indicar un efecto de retroinhibición. El mutualismo sintético entre *C. sorokiniana* y *A. brasilense* produce un cambio en el metabolismo de la microalga, específicamente en enzimas como AGPasa (Choix *et al.* 2014) y amilasa (Palacios *et al.* 2015 - sometido) desde las primeras 24 h de interacción. Este estudio demuestra que esta interacción también afecta la producción de triptófano por *C. sorokiniana* en las primeras horas de interacción.

La enzima IPDC es una α -ceto acido descarboxilasa, la cual presenta una amplia variedad de sustratos, siendo capaz de metabolizar fenilpiruvato, piruvato y benzilformato, y producir indol-3-acetaldehído (precursor de AIA). Por lo tanto, se ha sugerido que la producción del metabolito secundario AIA no es el principal papel de esta enzima (Duca *et al.*, 2014 y referencias presentes en ese trabajo). Esta función no específica del IPDC puede explicar la alta actividad enzimática de IPDC en *A. brasilense* creciendo en MSC sin adicionar triptófano, y por lo tanto sin observar producción de AIA. Se ha reportado que el indol acetaldehído puede ser usado para soportar el crecimiento de la PGPB *Pseudomonas putida* en un medio

mínimo (Leveau y Lindow, 2005). En nuestro trabajo, la producción de indol acetaldéhidó podría ser usado como fuente de energía para el crecimiento de *A. brasilense*.

Analizando tanto el incremento de la actividad IPDC en el co-inmovilizado, como los datos en la expresión del gen *ipdC*, solo podemos sugerir que hasta este punto de nuestro conocimiento, la principal contribución de la actividad IPDC a las 72 h no es debida a *A. brasilense*, mientras que a las 120 h de interacción sí se da por parte de *A. brasilense*. Cuando ambos microorganismos están co-inmovilizados, la expresión del gen *ipdC* se encuentra reprimida a las 48 h de interacción, pero se observa sobre-expresado en *A. brasilense* creciendo en exudados. Por lo tanto la contribución en la actividad IPDC reflejada a las 72 h de interacción en el co-inmovilizado no puede ser debido a *A. brasilense* pero si a *C. sorokiniana*. A las 96 h de interacción, la expresión del gen *ipdC* se encuentra sobre expresada en *A. brasilense*, por lo tanto la principal actividad IPDC obtenida a las 120 h de interacción es de origen bacteriano.

Es bien sabido que la producción de AIA por PGPB se da principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento (Duca *et al.*, 2014). La adición de triptófano a los cultivos de *A. brasilense* incrementan la longitud de la fase logarítmica y permiten un aumento en la concentración celular (Ona *et al.*, 2005). En este estudio se da más soporte a esta idea, pero desde el punto de vista de un mutualismo sintético. Cuando *A. brasilense* alcanzó su fase de crecimiento estacionario bajo las siguientes tres condiciones: 1) creciendo en exudados de *C. sorokiniana*, 2) en medio sintético de crecimiento (MSC) enriquecido con triptófano y tiamina, o 3) co-inmovilizado con *C. sorokiniana*, fue posible observar producción de AIA y/o un incremento en la actividad de la enzima IPDC, o sobre expresión del gen *ipdC*.

9 CONCLUSIONES.

Este estudio demostró la capacidad tanto de *A. brasilense* como de *C. sorokiniana* de producir compuestos de utilidad para el sostenimiento de una interacción mutualista. El presente trabajo es el primero en estudiar la producción de vitaminas durante una interacción sintética entre célula procariota y célula eucariota y demostró el posible papel de la tiamina en el proceso de mitigación de estrés por pH por parte de la bacteria *A. brasilense* en la microalga. Por otro lado, se encontró una correlación entre la producción tanto de triptófano por *C. sorokiniana*, así como de AIA por parte cepas silvestres de *Azospirillum* bajo condiciones heterotróficas, lo que sustenta el posible papel de esta fitohormona en el metabolismo de carbohidratos observados en *C. sorokiniana* en trabajos previos bajo condiciones heterotróficas. Bajo condiciones autotróficas se demostró que el triptófano y tiamina liberados por *C. sorokiniana* pueden ser usados por *A. brasilense* para la síntesis de AIA el cual posteriormente liberado, facilitará el crecimiento de la microalga. La presencia de los compuestos triptófano y tiamina en exudados de *C. sorokiniana* soportan la interacción sintética mutualista de *C. sorokiniana* con la PGPB *A. brasilense*.

10 LITERATURA CITADA

- Aaronson, S., S.W. Dhawale, N.J. Patni, B. DeAngelis, O. Frank, H. Baker. 1997. The cell content and secretion of water – soluble vitamins by several freshwater algae. *Arch Microbiol.* 112(1):57-59.
- Aguilar-Piedras, J.J., M.L. Xiqui-Vásquez, S. García-García, B.E. Baca. 2008. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Rev Lat Microb.* 50(1):29-37.
- Ahmad, F., I. Ahmad, M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res.* 163(2):173-181.
- Augustin, J. 1984. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in food liquid chromatography. *J Assoc Off Ana Chem.* 67(5):1012-1015.
- Bar, E., M. Rise, M. Vishkautsan, S.M. Arad. 1995. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J Plant Physiol* 146(4):527-534.
- Barbieri, P., E. Galli. 1993. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Res Microbiol.* 144(1):69-75.
- Bashan Y., A. Trejo, L.E. de-Bashan. 2011. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biol Fert Soils.* 47(8):963-969.
- Bashan Y., G. Holguin, L.E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol.* 50(8):521-577.
- Bashan Y., G. Holguin. 2002. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees-Struct Funct.* 16(2-3):159-166.
- Bashan, Y., B.R. Lopez, V.A.R. Huss, E. Amavizca, L.E. de-Bashan. 2015. *Chlorella sorokiniana* (formely *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-

thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. *J Appl Phycol*. doi: 10.1007/s10811-015-0571-z

- Bashan, Y., G. Holguin, R. Lifshitz. 1993. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. En: Glick, B.R., Thompson J.E. (eds) *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press. Boca Raton, FL. 331-45pp.
- Bashan, Y., G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990 – 1996). *Can J Microbiol*. 43(2):103-121.
- Bashan, Y., J.J. Bustillos, L.A. Leyva, J.-P. Hernandez, M. Bacilio. 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol Fert Soils*. 42(4):279-285.
- Bashan, Y., L.E. de-Bashan. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – A critical assessment. *Adv Agron*. 108:77-136.
- Bendryshev, A.A., E.B. Pashkova, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun. 2010. Determination of Water-Soluble Vitamins in Vitamin Premixes, Bioactive Dietary Supplements, and Pharmaceutical Preparations Using High-Efficiency Liquid Chromatography with Gradient Elution. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 65(4):260-268.
- Berges, J.A., D.O. Charlebois, D.C. Mauzerall, P.G. Falkowski. 1996. Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. *J Plant Physiol*. 110(2):689-696.
- Bertrand, E.M., A.E. Allen. 2012. Influence of vitamin B auxotrophy on nitrogen metabolism in eukaryotic phytoplankton. *Front Microbiol*. 3:1-16.
- Bettendorff, L., H.A. Kolb, E. Schoffeniels. 1994. Thiamine triphosphate activates an anion channel of large unit conductance in neuroblastoma cells. *J Membrane Biol*. 136(3):281-288.
- Bhattacharya, D., Medlin, B. 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol*. 116(1):9-15.

- Blake, C.J. 2007. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem.* 389(1):63-76.
- Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce, R.P. Pharis. 1989. Identification of Gibberellins A₁, A₃, and Iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90(1):45-47.
- Bronstein, J.L. 1994. Our current understanding of mutualism. *Q Rev Biol.* 69(1):31-51.
- Bucciarelli, E., W.G. Sunda. 2003. Influence of CO₂, nitrate, phosphate, and silicate limitation on intracellular dimethylsulfoniopropionate in batch cultures of the coastal diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol Oceanogr.* 48(6):2256-2265.
- Buchholz, M., A.M. Drotleff, W. Ternes. 2012. Thiamine (vitamin B1) and thiamine phosphate esters in five cereals grains during maturation. *J Cereal Sci.* 56(1):109-114.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: *Minimum* information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55(4):611-622.
- Carreño-López, R., N. Campos-Reales, C. Elmerich, B.E. Baca. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol Gen Genet.* 264(4):521-530.
- Choix, F.J., L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2012a. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. *Enzyme Microb Tech.* 51(5):294-299.
- Choix, F.J., L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2012b. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. *Enzyme Microb Tech.* 51(5):300-309.

- Choix, F.J., Y. Bashan, A. Mendoza, L.E. de-Bashan. 2014. Enhanced activity of ADP glucose pyrophosphorylase and formation of starch induced by *Azospirillum brasilense* in *Chlorella vulgaris*. J Biotechnol 177:22-34.
- Chrzanowski, T.H., R.D. Crotty, J.G. Hubbard, R.P. Welch. 1984. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. Microb Ecol. 10(2):179-185.
- Cohen, A.C., R. Bottini, P.N. Piccoli. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. Plant Growth Regul. 54(2):97-103.
- Converti, A., A.A. Casazza, E.Y. Ortiz, P. Perego, M. Del Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chem Eng Process. 48(6):1146-1151.
- Costacurta, A., V. Keijers, J. Vanderleyden. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. Mol Gen Genet. 243(4):463-472.
- Creus, C.M., M. Graziano, E.M. Casanovas, M.A. Pereyra, M. Simontacchi, S. Puntarulo, C.A. Barassi, L. Lamattina. 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. Planta. 221(2): 297-303.
- Crozier, A., P. Arrunda, J.M. Jasmim, A.M. Monteiro, G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl Environ Microb. 54(11):2833-2837.
- Dahm, H., H. Rózycki, E. Strzelczyk, C.Y. Li. 1993. Production of B-group Vitamins by *Azospirillum* spp. Grown in Media of Different pH at Different Temperatures. Zbl Mikrobiol. 148(3):195-203.
- Dănet, A.F., J.M. Calatayud. 1994. FIA-spectrophotometric determination of thiamine after UV-irradiation. Talanta 41(12):2147-2151.

- de-Bashan, L., J.-P. Hernandez, T. Morey, Y. Bashan. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38(2):466-474.
- de-Bashan, L., M. Moreno, J.-P. Hernandez, Y. Bashan. 2002a. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research.* 36(12):2941-2948.
- de-Bashan, L., Y. Bashan, M. Moreno, V. Lebsky, J. Bustillos. 2002b. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co – immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Micro* 48(6):514-521.
- de-Bashan, L.E, Y. Bashan. 2008. Joint Immobilization of Plant Growth-Promoting Bacteria and Green Microalgae in Alginate Beads as an Experimental Model for Studying Plant-Bacterium Interactions. *Appl Environ Microb.* 74(21):6797-6802.
- de-Bashan, L.E., H. Antoun, Y. Bashan. 2005. Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Micorbiol Ecol.* 54(2):197-203.
- de-Bashan, L.E., H. Antoun, Y. Bashan. 2008. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *J Phycol.* 44(4):938-947.
- de-Bashan, L.E., J.-P. Hernandez, Y. Bashan. 2015. Interaction of *Azospirillum* spp. with microalgae; a basic eukaryotic–prokaryotic model and its biotechnological applications. En: Cassán, F.D., Okon, Y., Creus, C.M. (eds) *Handbook for Azospirillum*. Technical issues and protocols. Springer, international publishing. Switzerland. 367-388pp.

- de-Bashan, L.E., M. Schmid, M. Rothballer, A. Hartmann, Y. Bashan. 2011. Cell-cell interaction in the eukaryote-prokaryote model of the microalgae *Chlorella vulgaris* and the bacterium *Azospirillum brasilense* immobilized in polymer beads. *J Phycol.* 47(6):1350-1359.
- de-Bashan, L.E., Y. Bashan. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technol.* 101(6):1611-1627.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, A. VandeBroek, J. Vanderleyden. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil.* 212(2):153-162.
- Doebeli, M., N. Knowlton. 1998. The evolution of interspecific mutualisms. *PNAS*. 95(15):8676-8680.
- Duca, D., J. Lorv, C.L. Patten, D. Rose, B.R. Glick. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *A. Van Leeuw. J. Microb.* 106(1):85-125.
- Esteve, M.J., R. Farré, A. Frígola, J.M. García-Cantabella. 2001. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in mushrooms by liquid chromatography. *J Agr Food Chem.* 49(3):1450-1454.
- Fellman, J.K., W.E. Artz, P.D. Tassinari, C.L. Cole, J. Augustin. 1982. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high-performance liquid chromatography. *J Food Sci.* 47(6):2048-2050.
- Finglas, P.M., R.M. Faulks. 1987. Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. *J Micronutr Anal.* 3(4): 251-283.
- Floreto, E.A.T., S. Teshima, M. Ishikawa. 1996. Effects of nitrogen and phosphorus on the growth and fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta). *Bot Mar* 39(1-6):69-74.
- García, M.G., R.R. Quintero, A.C. López-Munguía. 2004. *Biotecnología alimentaria*. Limusa Noriega editores. Primera Edición. México, D.F. 617p.

- Gass, N., T. Glagotskaia, S. Mellema, J. Stuurman, M. Barone, T. Mandel, U. Roessner-Tunali, C. Kuhlemeier. 2005. Pyruvate decarboxylase provides growing pollen tubes with a competitive advantage in petunia. *Plant Cell*. 17(7): 2355-2368.
- Gibbs, B.F., S. Kermasha, I. Alli, C.N. Mulligan. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr*. 50(3):213-224.
- Golubev, S.N., A.Y. Muratova, L. Wittenmayer, A.D. Bondarenkova, F. Hirche, L.Y. Matora, W. Merbach, O.V. Turkovskaya. 2011. Rhizosphere indole-3-acetic acid as mediator in the *Sorghum bicolor*–phenanthrene–*Sinorhizobium meliloti* interactions. *Plant Physiol Bioch*. 49(6):600-608.
- González, L.E., R.O. Cañizares, S. Baena. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technol*. 60(3):259-262.
- Gonzalez, L.E., Y. Bashan. 2000. Increased Growth of the Microalga *Chlorella vulgaris* when Coimmobilized and Cocultured in Alginate Beads with the Plant-Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. *App Environ Microb*. 66(4):1527-1531.
- Goyer, A. 2010. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*. 71(14-15):1615-1624.
- Hagen, S.R., P. Muneta, J. Augustin, D. LeTourneau. 1991. Stability and utilization of picloram, vitamins, and sucrose in a tissue culture medium. *Plant Cell Tiss Org*. 25(1):45-48.
- Haider, T., Q. Husain. 2007. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *Int J Biol Macromol*. 41(1):72-80.
- Hernandez, J.-P., L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2006. Starvation enhances phosphorous removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme Microb Tech*. 38(1-2):190-198.

- Idris, E.E., D.J. Iglesias, M. Talon, R. Borris. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe In.* 20(6):619-626.
- Ihara, H., T. Matsumoto, Y. Shino, N. Hashizume. 2005. Assay values for thiamine or thiamine phosphate esters in whole blood do not depend on the anticoagulant used. *J Clin Lab Anal.* 19(5):205-208.
- Ilangovan, K., R.O. Cañizares-Villanueva, M.S. González, D. Voltolina. 1998. Effect of cadmium and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *B Environ Contam Tox.* 60(6):936-943.
- Iwamoto, H. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species. *Chlorella*. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell. 255-263pp.
- Johnson, K.S., L.J. Coletti. 2002. *In situ* ultraviolet spectrophotometry for high resolution and long-term monitoring of nitrate, bromide and bisulfide in the ocean. *Deep-Sea Res Pt1.* 49(7):1291-1305.
- Jurgenson, C.T., T.P. Begley, E. Ealick. 2009. The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 78:569-603.
- Kadouri, D., E. Jurkevitch, Y. Okon. 2003. Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl Environ Microb.* 69(6):3244-3250.
- Kamilova, F., L.V. Kravchenko, A.I. Shaposhnikov, T. Azarova, N. Makarova, B. Lugtenberg. 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe In.* 19(3): 250-256.

- Kana, T.M., R.J. Geider, C. Critchley. 1997. Regulation of photosynthetic pigments in micro-algae by multiple environmental factors: a dynamic balance hypothesis. *New Phytol.* 137:629-638.
- Koga, J., T. Adachi, H. Hidaka. 1992. Purification and Characterization of Indolepyruvate Decarboxylase. *J Biol Chem.* 267:15823-15828.
- Körner, R.W., A. Vierzig, B. Roth, C. Müller. 2009. Determination of thiamin diphosphate in whole blood samples by high-performance liquid chromatography – A method suitable for pediatric diagnostics. *J Chromatogr B.* 877(20-21):1882-1886.
- Krishnan, K.S., A.C. Guha. 1934. The absorption spectra of nitrates and nitrites to their photodissociation. *J Chem Sci.* 1(4):242-249.
- Last, R.L., P.H. Bissinger, D.J. Mahoney, E.R. Radawanski, G.R. Fink. 1991. Tryptophan mutants in *Arabidopsis*: the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. *Plant Cell.* 3(4):345-358.
- Lebsky, V.K., L.E. Gonzalez-Bashan, Y. Bashan. 2001. Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Microbiol.* 47(1):1-8.
- Levanony, H., Y. Bashan. 1989. Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can J Bot.* 67(7):2213-2216.
- Leveau, J.H., S.E. Lindow. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microb.* 71(5):2365-2371.
- Leyva, L.A., Y. Bashan, A. Mendoza, L.E. de-Bashan. 2014. Accumulation of fatty acids in *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions in relation to activity of acetyl-CoA carboxylase, temperature, and co-immobilization with *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften.* 101(10):819-830.

- Leyva, L.A., Y. Bashan, L.E. de-Bashan. 2015. Activity of acetyl-CoA carboxylase is not directly linked to accumulation of lipids when *Chlorella vulgaris* is co-immobilised with *Azospirillum brasilense* in alginate under autotrophic and heterotrophic conditions. *Ann Microbiol* 65(1):339-349.
- Li, H.-B., F. Chen. 2001. Simultaneous determination of nine water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography with diode array detection. *J Sep Sci*. 24(4):271-274.
- Livak, K.J., T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 25(4):402-408.
- Lv, J.-M., L.-H. Cheng, X.-H. Xu, L. Zhang, H.-L. Chen. 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technol*. 101(17):6797-6804.
- Malhotra, M., S. Srivastava. 2009. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *Eur J Soil Biol*. 45(1):73-80.
- Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae or wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*. 15(4):377-390.
- Martens, D.A., W.T. Frankenberger Jr. 1994. Assimilation of exogenous 2- ^{14}C -indole-3-acetic acid and 3- ^{14}C -tryptophan exposed to the roots of three wheat varieties. *Plant Soil*. 166(2):281-290
- Martínez-Morales, L.J., L. Soto-Urzúa, B.E. Baca, J.A. Sánchez-Ahédo. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett*. 228(2):167-173.
- Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk, O. Smidsrød. 1989. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng*. 33(1):79-89.

- McMillan, M., L. Pereg. 2014. Evaluation of reference genes for gene expression analysis using quantitative RT-PCR in *Azospirillum brasilense*. PLOS one. 9(5):1-8.
- Metting, F.B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. J Ind Microbiol Biot. 17(5-6):477-489.
- Meza, B., L.E. de-Bashan, J.-P. Hernandez, Y. Bashan. 2015b. Accumulation of intra-cellular polyphosphate in *Chlorella vulgaris* cells is related to indole-3-acetic acid produced by *Azospirillum brasilense*. Res Microbiol. 166(5):399-407.
- Meza, B., L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2015a. Involvement of indole-3-acetic acid produced by *Azospirillum brasilense* in accumulating intracellular ammonium in *Chlorella vulgaris*. Res Microbiol. 166(2):72-83.
- Minamisawa, K., K.-I. Ogawa, H. Fukuhara, J. Koga. 1996. Indolepyruvate pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. Plant Cell Physiology. 37(4):449-453.
- Nishijima, T., R. Shiozaki, Y. Hata. 1979. Production of vitamin B₁₂, thiamine and biotin by freshwater phytoplankton. B Jpn Soc Sci Fish. 45.(2): 199-204.
- Nosaka, K. 2006. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biot 72(1):30-40.
- Nussinovitch, A. 2010. Polimer macro-and micro.gel beads. Springer. Primera edición. New York, NY. 303p.
- Okon, Y., P.G. Heytler, R.W.F. Hardy. 1983. N₂ fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. Appl Environ Microb. 46(3):694-697.
- Okon, Y., Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant Soil. 90:3-16.

- Ona, O., J.V. Impe, E. Prinsen, J. Vanderleyden. 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol Lett.* 246(1):125-132.
- Ooi, T., D. Ogata, K. Matsumoto, G. Nakamura, J. Yu, M. Yao, M. Kitamura, S. Taguchi. 2012. Flavin-binding of azoreductase: direct evidences for a dual-binding property of apo-azoreductase with FMN and FAD. *J Mol Catal B-Enzym.* 74(3-4):204-208.
- Paerl, R.W., E.M. Bertrand, A.E. Allen, B. Palenik, F. Azam. 2015. Vitamin B1 ecophysiology of marine picoeukaryotic algae: Strain-specific differences and a new role for bacteria in vitamin cycling. *Limnol Oceanogr.* 60(1):215-228.
- Pagnussat, G.C., M.L. Lanteri, L. Lamattina. 2003. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.* 132(3):1241-1248.
- Pagnussat, G.C., M.L. Lanteri, M.C. Lombardo, L. Lamattina. 2004. Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol.* 135(1):279-286.
- Pal, D., I. Khozin-Goldberg, Z. Cohen, S. Boussiba. 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biot.* 90:1429-1441.
- Palacios, O.A., Y. Bashan, L.E. de-Bashan. 2014. Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria- an overview. *Biol Fert Soils.* 50(3):415-432.
- Palacios, O.A., Y. Bashan, M. Schmid, A. Hartmann, L.E. de-Bashan. 2015. Enhancement of thiamine release during synthetic mutualism between *Chlorella sorokiniana* and *Azospirillum brasilense* growing under stress conditions. *J Appl Phycol* accepted

- Pallota, M.L. 2011. Evidence for the presence of a FAD pyrophosphatase and FMN phosphohydrolase in yeast mitochondria: a possible role in flavin homeostasis. *Yeast*. 28(10):693-705.
- Palombella, A.L., S.K. Dutcher. 1998. Identification of the gene encoding the tryptophan synthase β -subunit from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*. 117(2):455-464.
- Patten, C.L., A.J.C. Blakney, T.J.D. Coulson. 2013. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol*. 39(4):395-415.
- Penttinen, H.K. 1976. Differences in thiochrome fluorescence produced by thiamine and its mono-, di-, and triphosphate esters. *Acta Chem Scand B*. 30:659-663.
- Perez-García, O., L.E. de-Bashan, J.-P. Hernandez, Y. Bashan. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *J Phycol*. 46(4):800-812.
- Pratt, R., E. Johnson. 1965. Production of thiamine, riboflavin, folic acid, and biotin by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *J Pharm Sci*. 54(6):871-874.
- Prinsen, E., A. Costacurta, K. Michiels, J. Vanderleyden, H. Van Onckelen. 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: Evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol Plant Microbe In*. 6(5):609-615.
- Puente, M.E., Y. Bashan, C.Y. Li, V.K. Lebsky. 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*. 6(5):629-642.
- Pulz, O., W. Gross. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biot*. 65(6):635-648.

- Richmond, A. 2004. Biological principles of mass cultivation. En: Richmond A. (ed.). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell. 125-177p.
- Rodelas, B., V. Salmerón, M.V. Martínez-Toledo, J. González-López. 1993. Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media. Plant Soil. 153(1):97-101.
- Roje, S. 2007. Vitamin B biosynthesis in plants. Phytochemistry. 68(14):1904-1921.
- Sánchez-Machado, D.I., J. López-Cervantes, J. López-Hernández, P. Paseiro-Losada. 2004. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in Edible Marine Seaweeds by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr Sci. 42(3):117-120.
- Schyns, G., S. Potot, Y. Geng, T.M. Barbosa, A. Henriques, J.B. Perkins. 2005. Isolation and characterization of new thiamine-deregulated mutants of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 187(23):8127-8136.
- Sikorska, E., A. Gliszczyńska-Świągło, M. Insińska-Rak, I. Khmelinskii, D. De Keukeleire, M. Sikorski. 2008. Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. Anal Chim Acta. 613(2):207-217.
- Skaugrud, Ø., A. Hagen, B. Borgersen, M. Dornish. 1999. Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan. Biotechnol Genet Eng. 16(1):23-40.
- Smith, D.J., G.J.C. Underwood. 2000. The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: The effect of growth phase and light and dark treatment. J Phycol. 36(2):321-333.
- Spaepen, S., W. Versées, D. Gocke, M. Pohl, J. Steyaert, J. Vanderleyden. 2007. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol. 189(21):7626-7633.

- Stanton, M.L. 2003. Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *Am Nat.* 162(S4):S10-23.
- Swift, S., G.S.A.B. Stewart. 1991. The molecular biology of tryptophan synthase: A model for protein-protein interaction. *Biotechnol Genet Eng.* 9(1):229-294.
- Tam, N.F.Y., P.S. Lau, Y.S. Wong. 1994. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Water Sci Technol.* 80(6):369-374.
- Tampion, J., M.D. Tampion. 1987. Immobilized cells: Principles and applications. Cambridge University Press. Primera Edición. Cambridge, UK. 257p.
- Teale, W.D., I.A. Paponov, K. Palme. 2006. Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Mol Cell Biol.* 7:847-859.
- Tomaselli, L. 2004. The microalgal cell. En: Richmond A. (ed.). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell. 3-19pp.
- Tonietto, A.E., A.T. Lombardi, A.A. Henriques Vieira, C.C. Parrish, R.B. Choueri. 2014. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) exudates: Chemical characterization and complexation capacity for Cu, Zn, Cd and Pb. *Water Res.* 41:381-390.
- Trejo, A., L.E. de-Bashan, A. Hartmann, J.-P. Hernandez, M. Rothballer, M. Schmid, Y. Bashan. 2012. Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatments as a resource to improve fertility of eroded. *Environ Exp Bot.* 75:65-73.
- Tunc-Ozdemir, M., G. Miller, L. Song, J. Kim, A. Sodek, S. Koussevitzky, A.N. Misra, R. Mittler, D. Shintani. 2009. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 151(1):421-432.

- Vande Broek, A., J. Vanderleyden. 1995. The Role of Bacterial Motility, Chemotaxis, and Attachment in Bacteria-Plant Interactions. *Mol Plant Microbe In.* 8(6):800-810.
- Wagner-Döbler, I., B. Ballhausen, M. Berger, T. Brinkhoff, I. Buchholz, B. Bunk, H. Cypionka, R. Daniel, T. Drepper, G. Gerdt, S. Hahnke, C. Han, D. Jahn, D. Kalhoefer, H. Kiss, H.-P. Klenk, N. Kyrpides, W. Liebl, H. Liesegang, L. Miencke, A. Pati, J. Petersen, T. Piekarski, C. Pommerenke, S. Pradella, R. Pukall, R. Rabus, E. Stackerbrandt, S. Thole, L. Thompson, P. Tielen, J. Tomasch, M. van Jan, N. Wanphrut, A. Wichels, H. Zech, M. Simon. 2010. The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *ISME J* 4:61-77.
- Watanabe, K., M. Imase, K. Sasaki, N. Ohmura, H. Saiki, H. Tanaka. 2006. Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Lett Appl Microbiol.* 42(5):538-543.
- Wilde, E.W., J.R. Benemann. 1993. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnol Adv.* 11(4):781-812.
- Yabur, R., Y. Bashan, G. Hernández-Carmona. 2007. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *J Appl Phycol.* 19(1):43-53.
- Yu, S.-W., Y.-R. Kim, S.-O. Kang. 1999. Spectral characterization and chemical modification of FMN-containing ascorbyl free-radical reductase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J.* 341:755-763.
- Zakharova, E.A., A.A. Shcherbakov, V.V. Brudnik, N.G. Skripko, N.S. Bulkhin, V.V. Ignatov. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. *Eur J Biochem.* 259(3):572-576.
- Zhang, Y.-Q., M.-L. Tao, W.-D. Shen, Y.-Z. Zhou, Y. Ding, Y. Ma, W.-L. Zhou. 2004. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the

natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*. 25(17):3751-3759.

- Zimmer, W., H. Bothe. 1988. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant Soil*. 110:339-247.
- Zimmer, W., M. Wesche, L. Timmermans. 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* SP7: Sequencing and functional analysis of the gene locus. *Curr Microbiol*. 36(6):327-331.