



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACION DEL EFECTO REMOTO POR
BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN
PLANTAS (BPCP) SOBRE LA MICROALGA *Chlorella*
vulgaris

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

Edgar Adrian Amavizca Valdez

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 5 del Mes de febrero del 2014, 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:

"Evaluación del efecto remoto por bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) sobre la microalga *chlorella vulgaris*"

Presentada por el alumno:

Edgar Adrian Amavizca Valdez

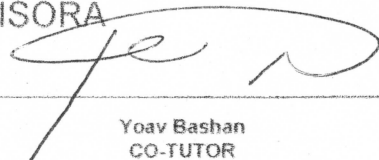
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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 Gonzalez de-Bashan
DIRECTOR DE TESIS



Yoav Bashan
CO-TUTOR



Choong-Min Ryu
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial

Dra. Luz Estela González de Bashan
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S.C.
Director de tesis

Dr. Yoav Bashan
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S.C.
Co-tutor

Dr. Choong-Min Ryu
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
Co-tutor

Comité revisor de tesis:

Dra. Luz Estela González de Bashan
Dr. Yoav Bashan
Dr. Choong-Min Ryu

Jurado de examen de grado:

Dra. Luz Estela González de Bashan
Dr. Yoav Bashan
Dr. Macario Bacilio Jiménez

Suplente:

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Resumen

Entre los mecanismos más destacados por los cuales actúan las bacterias denominadas promotoras del crecimiento vegetal (PGPB por sus siglas en inglés), es el aumento de la disponibilidad y absorción de nutrientes en el suelo y apoyar la salud de las plantas. Poco se sabe acerca de cómo las emisiones de compuestos volátiles microbianos pueden afectar la fisiología de las plantas en la ausencia de contacto físico. El sistema microalga-bacteria ha sido utilizado recientemente como un modelo de estudio eucariota-procariota, basado principalmente en respuestas asociadas a la adherencia o contacto físico entre los dos. En este trabajo el objetivo fue determinar el efecto de las PGPB *A. brasilense* y *B. pumilus* en el crecimiento y metabolismo de *Chlorella vulgaris* en ausencia de contacto físico en un sistema con espacios de crecimiento separados. Incubando los microorganismos en un sistema de matraces kitasato sellados y conectados en par, se midieron parámetros de crecimiento poblacional y volumen celular de la microalga además de contenido total de lípidos, carbohidratos y clorofila *a*. El mayor efecto en los parámetros anteriores, se obtuvo en los tratamientos bacteria-microalga comparado con el control de la microalga sola. *B. pumilus* ES4 fue la bacteria que tuvo más efecto sobre *C. vulgaris*. El estímulo remoto por parte de las PGPB *B. pumilus* ES4 y *A. brasilense* Cd sobre *Chlorella vulgaris* provoca cambios a niveles metabólicos de la microalga. Con la técnica de cromatografía de gases-masas-microextracción en fase sólida (CG-MS-MEFS) se identificaron compuestos volátiles producidos por *B. pumilus* ES4 y *A. brasilense* Cd durante su crecimiento en un medio mínimo mineral utilizado en el sistema, dando pie a un posible efecto remoto por parte de estas bacterias sobre la microalga por lo que la adherencia o contacto físico entre estos organismos no es necesario para producir efectos beneficiosos sobre *C. vulgaris*.

Palabras clave: *Efecto remoto, sistema microalga-bacteria, compuestos volátiles.*

Abstract

Among the most prominent features that plant growth promoting bacteria (PGPB) are in development and health in plants is related to increased availability and uptake of nutrients from soil. Little is known about how other routes such as volatile microbial emission compounds can affect physiology of plants in the absence of physical contact. Microalga-bacterium system has been recently used as a model for studying eukariotic-prokariotic interactions, mainly based on associated physical contact or adhesion responses between the two. The objective of this study was to determine if there are remote effects of the PGPB *Azospirillum brasilense* Cd and *Bacillus pumilus* ES4 on growth and metabolism of microalgae *Chlorella vulgaris*, in absence of physical attachment was grown in separate spaces from the bacteria. The microorganisms were incubated in side-arm sealed system flasks connected in pairs. After incubation, total lipids, carbohydrates, chlorophyll *a*, growth of the population and size of microalgae cells were measured. The greatest effect on these parameters was obtained in treating microalga-bacteria in comparison to controls of microalgae growing alone or adjacent. The greatest effect was with *B. pumilus* ES4. Changes in metabolic levels of *C. vulgaris* occurred in response to remote stimulation by PGPB *B. pumilus* ES4 and *A. brasilense* Cd on the microalga. Using gas chromatography mass-solid phase microextraction (SPME-GC-MS) to determine volatile compounds produced by *B. pumilus* ES4 and *A. brasilense* Cd were identified during the growth phase in a minimal mineral medium in response to a remote effect of these bacteria on the microalga. We demonstrated that physical attachment is not necessary to produce beneficial effects.

Keywords: *Remote effect, microalga-bacteria system, volatile compounds*

Dedicatoria

A mis padres por ser un soporte y apoyarme siempre en cualquier lugar en que me encuentre, a ellos que son los que han hecho un gran esfuerzo junto conmigo, motivo por el cual me siento orgulloso de ellos.

A mis hermanos por ser parte de esta familia unida, por ser un buen ejemplo para cada uno de ellos.

A Francia por ayudarme y darme fuerza durante los escollos que se presentaron en este trabajo, por ser una persona muy importante en mi vida.

“Estoy en una búsqueda continua de materiales, busco formarme continuamente entorno a ellos. Solo aprendo como poner los ladrillos y construir después”

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las becas otorgadas:

- Beca No. 321403 para estudios de posgrado (Maestría Septiembre 2011-septiembre 2013)
- Becas Mixtas 2013 Movilidad en el Extranjero (Agosto-Septiembre 2013)

Al Posgrado del CIBNOR por la extensión de beca otorgada y el apoyo de transportación a estancia de investigación en Daejeon, Corea del Sur.

A las siguientes instituciones y laboratorios que nos brindaron la ayuda para hacer este trabajo posible:

- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR
- Laboratorio de Salud Ambiental y Biomedicina del CIBNOR
- Dirección de estudios de posgrado del CIBNOR y su directora Dra. Elisa Serviere Zaragoza
- Laboratorio de cómputo y su técnico el Lic. Horacio Sandoval Gómez
- Laboratorio de Fitopatología molecular del Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)
- A la extensión en investigación y servicios agrícolas de la ciudad de Jeollabuk-do, Corea del Sur.

Agradecer principalmente con toda sinceridad a los Doctores Yoav Bashan y Luz de Bashan por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por abrirme las puertas al mundo del conocimiento y la ciencia, por ser una guía en este trabajo, por ser un ejemplo de vocación y por sobre todo tenerme paciencia. Mi directora de tesis, Luz, porque sé que invirtió tiempo personal para revisar esta tesis en tiempos cortos. Son un ejemplo a seguir.

A todo el grupo de microbiología ambiental del CIBNOR, al M. en C. Manuel Moreno por todos los comentarios, sugerencias y soporte técnico. M. en C. Juan pablo Hernández por sus observaciones y facilidades técnicas. A la Dra. Blanca Romero por cada consejo, crítica y sugerencia que abrieron perspectiva a este trabajo. A todos mis compañeros de laboratorio.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Choong-Min Ryu por todas las facilidades y apoyo que me fueron dadas durante mi estancia en Daejeon, Corea del sur. Por todos sus consejos y charlas sobre la generación de conocimiento e ideas creativas. Un gran científico.

A mi familia por dame consejos siempre, por ser unida, apoyarme en cada decisión y ser el núcleo del desarrollo del hombre que ahora soy.

A Francia por darme fuerza emocional, por ser parte de este trabajo, gracias por escuchar todas las ideas y problemas que se generaron de esta investigación, por haber entrado en mi vida y haberte conocido en este mismo lugar.

A toda la ciudad de la Paz, B.C.S. por permitirme conocer a todas las personas y amigos que formaron parte de esta etapa, por todas sus playas hermosas y permitirme pescar responsablemente con mi maestro de pesca Luis Alonso Leyva y sus secuaces Norma Lagunas y Cyntia Nevarez, por permitirme ser parte de su equipo y vacaciones para conocer todas las playas de esta bonita y pacífica ciudad.

Contenido

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. <i>Azospirillum brasilense</i>	3
2.2. <i>Bacillus pumilus</i>	4
2.3. <i>Chlorella</i>	5
2.4. Mecanismo de interacción microalga-bacteria PGPB en contacto físico	6
2.5. Modos de acción de las PGPB	8
2.6. Compuestos orgánicos volátiles producidos por PGPB.....	9
3. Justificación	11
4. Objetivos	12
4.1. Objetivo general	12
4.2. Objetivos particulares	12
5. Hipótesis	13
6. Materiales y métodos	14
6.1. Microalga y bacterias, condiciones de crecimiento	14
6.2. Conteo y medición de volumen celular de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	15
6.3. Conteo de bacterias	15
6.4. Medición del efecto remoto de las PGPB sobre <i>Chlorella vulgaris</i>	15
6.4.1. Experimento en caja petri con división	15
6.4.2. Experimentos en matraces kitasato duales con conexión.....	16
6.4.3. Experimento en matraces kitasato duales con filtro de Hidroxido de litio (LiOH)	17
6.5. Métodos analíticos	18
6.5.1. Cuantificación de clorofila <i>a</i>	18
6.5.2. Cuantificación de lípidos totales	18
6.5.3. Cuantificación de carbohidratos totales	19
6.5.4. Extracción de los compuestos volátiles.....	19
6.5.4.1 Microextracción en fase solida (SPME) por sus siglas en ingles	19
6.5.5. Análisis de compuestos volátiles bacterianos mediante la técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)	20
6.6. Volumen celular.....	21

6.7. Análisis estadísticos.....	22
7. Resultados	22
7.1. Crecimiento de microalga en sistema de caja Petri con división.....	22
7.2. Crecimiento total de <i>C.vulgaris</i> en el sistema de matraces kitasato duales.....	24
7.2.1. Cinética de crecimiento y volumen celular de <i>Chlorella vulgaris</i>	24
7.2.2. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en sistema con filtro de Hidróxido de litio (LiOH).....	26
7.3. Cinética de crecimiento de bacterias	28
7.4. Lípidos totales.....	29
7.5. Carbohidratos totales	30
7.6. Clorofila <i>a</i>	31
7.7. Identificación de compuestos volátiles producidos por <i>A.brasilense</i> Cd y <i>B.pumilus</i> ES4.....	32
8. Discusión	34
9. Conclusiones	39
10. Literatura citada	40
11. Anexos	48

Lista de tablas**Tabla I.** Compuestos volátiles producidos por *B. pumilus* ES4.....33**Tabla II.** Compuestos volátiles producidos por *A. brasilense* Cd.....33

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo general de interacción microalga-bacteria cuando se encuentran co-inmovilizados en esferas de alginato.....	7
Figura 2. Grupo formado por los dos microorganismos (<i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Azospirillum brasilense</i>) conectados entre si y con la matriz de alginato por una red de material fibrilar.....	8
Figura 3. Vías por las cuales las PGPB actúan.....	9
Figura 4. Proceso para la obtención de inóculos puros de <i>B. pumilus</i> y <i>A. brasilense</i>	14
Figura 5. Sistema-tratamiento de cajas petri divididas para medir el efecto promotor de crecimiento de los compuestos volátiles	15
Figura 6. Sistema tratamiento de matraces kitasato duales con conexión en incubacion. ..	16
Figura 7. Sistema tratamiento de matraces kitasato duales con filtro de Hidroxido de litio (LiOH)	17
Figura 8. Viales con muestras de compuestos volátiles bacterianos	20
Figura 9. Cromatógrafo de gases-Masas Agilent Technologies 7890 ^a utilizado para el análisis de compuestos volátiles bacterianos.....	21
Figura 10. Grafica de crecimiento poblacional de <i>C.vulgaris</i> en cada tratamiento después de 48 horas de incubación..	23
Figura 11. Fotografía de sistema de cajas petri con división central.....	23
Figura 12. Gráfica de crecimiento poblacional de <i>C.vulgaris</i> en cada tratamiento con un tiempo de incubación total de 96 horas..	24
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> de 0 a 96 horas..	25
Figura 14. Volumen celular de <i>C.vulgaris</i> en μm^3 durante un periodo de 0 a 96 horas.. ...	26
Figura 15. Crecimiento de <i>C.vulgaris</i> con 0.3 g de LiOH como filtro en el sistema.....	27
Figura 16. Crecimiento de <i>C.vulgaris</i> con 0.5 g de LiOH como filtro en el sistema.....	28
Figura 17. Concentración celular de bacterias en Log_{10} UFC x mL durante un periodo de 0 a 96 horas.....	29
Figura 18. Contenido total de lípidos en <i>C.vulgaris</i> por cada tratamiento en mg/g durante un periodo de incubación de 96 horas.	30
Figura 19. Contenido total de carbohidratos en <i>C.vulgaris</i> durante un periodo de incubación de 96 horas..	31
Figura 20. Contenido total de clorofila <i>a</i> en <i>C.vulgaris</i> en un periodo de incubación de 96 hrs..	32

1. Introducción

Las interacciones que se presentan entre bacterias que se encuentran asociadas al suelo, la rizósfera o rizoplano, que bajo ciertas condiciones son benéficas para las plantas que toman a esta matriz de suelo como un medio de soporte y obtención de sustancias necesarias para su nutrición se han vuelto un foco de estudio con la intención de descifrar la serie de mecanismos por los cuales estos organismos interactúan. Entre los mecanismos más destacados por los cuales actúan estas bacterias denominadas promotoras del crecimiento vegetal (PGPB por sus siglas en inglés), es el aumento de la disponibilidad y absorción de nutrientes en el suelo y apoyar la salud de las plantas (Adesemoye y Kloepper, 2009). Una de las mayores dificultades para el estudio de estas interacciones entre organismos procariontas y eucariotas es la complejidad del eucariota, esta última con un valor económico y de amplio interés generalmente. Estudios básicos que han sido dirigidos hacia el conocimiento de las interacciones planta-bacteria y de cómo las PGPB promueven un crecimiento vegetal son complicados ya que se tienen múltiples funciones de los tejidos y numerosas posibles interacciones con las raíces de las plantas añadiéndole la interferencia con la matriz del suelo. Subsecuentemente hay disponible mayor información sobre las bacterias que de la propia interacción (Bashan *et al.*, 2004; Spaepen *et al.*, 2007; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Con el interés de facilitar el estudio de esta asociación planta-bacteria, ha sido propuesto un modelo experimental cuantitativo, simple, que ofrece un enfoque práctico y básico para los estudios de estas interacciones. Esto implica la inmovilización de un microorganismo eucariota unicelular que es una microalga de agua dulce, especie *Chlorella* que presenta características similares a las de una planta, con una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB), *Azospirillum*, en pequeñas perlas de alginato para poder permitir una interacción más estrecha entre ambos organismos evitando así la interferencia externa de bacterias contaminantes (de-Bashan y Bashan, 2008).

Se han hecho estudios dentro de los cuales se ha visto un efecto a nivel experimental en donde *Chlorella* spp. presenta un incremento de su tasa crecimiento, un aumento en sus

niveles de pigmentos y lípidos, variedad de ácidos grasos, cuando esta se encuentra en co-inmovilización con *A.brasilense* (de-Bashan *et al.*, 2002), además de obtener una alta eficiencia de remoción de nutrientes como nitrógeno y fósforo de agua residual (González y Bashan, 2000; González-Bashan *et al.*, 2000).

Uno de los mecanismos por los cuales se le atribuye el efecto benéfico en esta asociación microalga-bacteria, es la producción de ácido indolacético (IAA) por parte de *Azospirillum brasilense* (de-Bashan *et al.*, 2008) provocando así un incremento en el metabolismo de la microalga (Gonzalez-Bashan *et al.*, 2000). Se han hecho análisis de co-inmovilización de *Chlorella vulgaris* con otras PGPB como *Bacillus pumilus* ES4 (originalmente aislado del rizoplaneo de un cactus de tierra árida) y se ha visto también un cambio en la actividad metabólica de la microalga (Hernandez *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios que se han hecho con la intención de entender las interacciones planta-bacteria, han sido generalmente bajo condiciones de contacto físico entre la planta huésped y el microorganismo. Poco se sabe acerca de cómo las emisiones de compuestos volátiles microbianos pueden afectar la fisiología de las plantas en la ausencia de contacto físico (Esquer *et al.*, 2010).

Compuestos volátiles de bajo peso molecular que se producen por las plantas como los terpenos, jasmonatos, etc., han sido identificados como moléculas de señalización potenciales de comunicación para las plantas y organismos de otros niveles tróficos (Farmer, 2001; Farag y Pare, 2002). Recientemente se descubrió que existen compuestos orgánicos volátiles que son producidos por algunas PGPB que tienen la capacidad de estimular el crecimiento en plantas en ausencia de contacto físico, a través de mecanismos que aún se desconocen en gran medida (Zhang *et al.*, 2007). En un trabajo de investigación reciente se reportaron productos químicos en el aire producidos y lanzados a partir de cepas específicas de PGPB que promovieron el crecimiento en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Se ha encontrado en análisis de compuestos volátiles de dos bacterias, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, que revelaron la emisión de 2 compuestos de los más potentes promotores de crecimiento, 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanediol, además de

ser compartida la presencia de estos dos subconjuntos de componentes volátiles en otras cepas de PGPB (Ryu *et al.*, 2003).

Este tipo de mecanismos aun es considerablemente desconocido, pero se le ha reconocido que afecta al desarrollo de las plantas como un mecanismo de promoción de crecimiento vegetal.

El propósito de este trabajo es utilizar el sistema microalga-bacteria para determinar las respuestas y estímulos asociados al efecto remoto por parte de Bacterias promotoras de crecimiento en plantas sobre la microalga *Chlorella vulgaris*, todo esto basado en un modelo de estudio en donde no exista contacto físico entre estos microorganismos.

2. Antecedentes

2.1. *Azospirillum brasilense*

Azospirillum brasilense es una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB) de vida libre, capaz de afectar el crecimiento y rendimiento de numerosas especies de plantas, muchas de estas con importancia agronómica y ecológica. Una de las teorías más aceptadas actualmente es la capacidad de producir varias fitohormonas que mejoran el crecimiento y elongación de las raíces, absorción de minerales que eventualmente en un mayor plazo se obtienen buenos rendimientos, y en muchos casos esto hace a las plantas más productivas. *Azospirillum* es de gran importancia debido a la gran variedad de trabajos en los que ha sido utilizada por la capacidad que presenta esta bacteria para provocar crecimiento en plantas (Dobbelaere *et al.*, 2001). *Azospirillum* es una de las PGPB más estudiadas (Bashan y de-Bashan, 2005). Es una bacteria fijadora de nitrógeno bajo condiciones microaerobias y desnitrificante bajo condiciones anaeróbicas, en condiciones microaerofilicas y puede asimilar NH_4^+ , NO_3^- , o NO_2^- (Hartmann y Zimmer, 1994) además actúa de manera general como una PGPB para numerosas especies de plantas.

Azospirillum spp. es conocido principalmente por tener la capacidad de producir fitohormonas que son aprovechadas por las plantas, así como también poliaminas y aminoácidos que son excretados al medio (Thuler *et al.*, 2003). Muchas de las fitohormonas

producidas por esta bacteria como el ácido indol acético (AIA) y giberelinas juegan un papel importante en el desarrollo de la planta.

Los estudios que han hecho en la producción de AIA de diferentes cepas de *Azospirillum* han demostrado que la producción de esta fitohormona dependía del tipo de medio de cultivo en el cual la bacteria se desarrollaba, además de la disponibilidad de triptófano como precursor. La producción auxinas por *Azospirillum* se cree que juega un papel importante en la promoción de crecimiento vegetal, aunque no sea un mecanismo descubierto recientemente como evidencia de acción en plantas que se haya publicado en los últimos años. *A. brasilense* produce grandes cantidades de AIA extracelular y triptopol en medios de cultivo que son suplementados con triptófano, precursor del AIA (Bashan *et al.*, 2004).

2.2. *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus es una bacteria que presenta una alta resistencia a condiciones ambientales como altas temperaturas, resistencia a desinfectantes, baja disponibilidad de nutrientes, radiación y químicos (Wayne *et al.*, 2000). Es una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB) que está ligada a la liberación de factores, o bien de evitar los efectos que son perjudiciales como organismos patógenos o facilitar la absorción de nutrientes que se encuentran en el medio ambiente (Kloepper, 1993). Puede tener un efecto benéfico ayudando a la supervivencia y crecimiento de la plantas que se encuentran bajo condiciones de suelos contaminados por desechos mineros haciendo disponible los nutrientes para las plantas, el aumento de la resistencia a la toxicidad de metales o disminución de la biodisponibilidad de metales tóxicos en la rizósfera (Burd *et al.*, 1998, 2000; Pishchik *et al.*, 2002; Glick, 2003; Belimov *et al.*, 2004; Reed and Glick, 2005; Reed *et al.*, 2005; Vivas *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2007; Rajkumar y Freitas, 2008a,b).

Bacillus pumilus ES4, utilizado en este trabajo, es una bacteria de suelo, aislado de cactus cardón *Pachycereus pringlei* y ha sido utilizado en el sistema microalga-bacteria con el fin de remover nitrógeno y fosforo de aguas residuales mientras se encuentra co-inmovilizado en esferas de alginato con la microalga *Chlorella vulgaris* (Hernandez, J.P. *et al.*, 2009)

La producción de algunas fitohormonas como las auxinas han sido reportadas como presentes en algunas PGPB incluidas 2 del genero *Bacillus*, las cuales son *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* (Gutierrez-Mañero *et al.*,1996). *Bacillus pumilus* también tiene la capacidad de producir cantidades relativamente altas de giberelinas demostrando que en determinados medios bacterianos tienen el potencial de alargar tallos de plantas indicando la presencia de estas fitohormonas producidas y que son probablemente fisiológicamente activas en plantas hospedantes (Gutie y Talon, 2001).

2.3. *Chlorella*

Chlorella es un género de microalga verde acuática que forma parte de la familia Chlorophyceae, son organismos simples, no móviles. Estas fueron una de las primeras algas que se aislaron como un cultivo puro en 1980 por Martinus Beijerinck (Oh-Hama y Miyachi, 1992). Esta microalga se ha utilizado en estudios de fotosíntesis y respiración (Ilangovan *et al.*,1998), además de que muchos del conocimiento generado sobre la síntesis de carbohidratos en microalgas ha sido obtenido por los estudios de estas especies (Ramazanov y Ramazanov, 2006; Hosono *et al.*, 1994).

Las microalgas del genero *Chlorella*, se caracterizan por tener forma elíptica o esférica, poseen un ciclo de vida simple. El modo de reproducción de estos organismos eucariotas es por la vía asexual en donde cada célula madre madura produce de 4 a 8 esporas. La división celular se lleva a cabo durante la noche y el incremento en el volumen celular en el día, dependiendo estos ciclos de las intensidades de luz y a las temperaturas a las cuales la microalga este expuesta. Debido a varias de sus capacidades en su desarrollo y nutrición, *Chlorella* presenta la capacidad de crecer en presencia y ausencia de luz (Richmond,1986).

Desde hace algunas décadas, se ha puesto atención al gran potencial de cultivo masivo de esta microalga para la producción de alto valor y bajo volumen de compuestos, tales como pigmentos para la industria alimentaria, incluido el mercado de la salud en países industrializados (Richmond,1990), y para la aplicación en el tratamiento de aguas residuales (Oswald,1992). Se cree que hasta el momento, el genoma de *Chlorella* es el más pequeño para un microorganismo eucariota de características fotosintéticas (Higashiyama y Yamada,1991; de-Bashan y Bashan, 2008).

2.4. Mecanismo de interacción microalga-bacteria PGPB en contacto físico

Durante los primeros días del año 1998 termino por formarse una idea notablemente creativa, con propósitos ambientales, que comenzó a dar pie a una nueva y fructífera línea de trabajo científico. La relación en ese entonces que había entre una microalga de agua dulce y una bacteria terrestre promotora del crecimiento vegetal, era prácticamente nula, pero se quería aprovechar las cualidades que presentaban estos dos microorganismos, *Chlorella* es un género de microalga que puede absorber amonio y fosforo de cuerpos de agua, *Azospirillum* es una PGPB que puede fijar nitrógeno y producir fitohormonas que mejoran el crecimiento en plantas. La inmovilización de microorganismos atrapados en esferas de alginato es una técnica ampliamente utilizada para células microbianas viables (O'Reilly y Scott, 1995); de esta manera se llegó a la idea de utilizar esta técnica para mantener juntos a estos dos organismos, uno eucariota y otro procariota. Fue así que se propuso la co-inmovilización de *Chlorella* y *Azospirillum* (Gonzalez y Bashan, 2000) en una idea aun trabajada actualmente en el grupo de microbiología ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Las perspectivas de esta asociación y el entendimiento a los mecanismos por los cuales la microalga y la bacteria trabajaban juntos fueron notablemente alentadores, lo que provoco que durante todos estos años se siguiera descifrando este mutualismo.

Se ha encontrado que la bacteria excreta ácido indol acético (AIA) y otras moléculas de señalización que aún son desconocidas, que muy posiblemente tengan contacto con las células microalgales que se encuentran cerca (González y Bashan, 2000). Durante la inmovilización se ve mejorada la actividad de las enzimas glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa, la producción de pigmentos fotosintéticos es mayor, la absorción de nitrógeno y fosforo en los orgánulos de la microalga es mejorada, además de que el sistema conjuntamente inmovilizado libera oxígeno producido por *Chlorella* como un subproducto de la fotosíntesis, pero el efecto más notable es el incremento en la población de la microalga cuando esta se encuentra co-inmovilizada con la bacteria, adicionalmente se tiene incrementos en las cantidad y variedad de lípidos (de-Bashan y Bashan, 2008; de-Bashan *et al.*, 2002). En la Figura 1 se muestra un esquema general del modelo microalga-bacteria en co-inmovilización en esferas de alginato. *Azospirillum* fue designada como una

bacteria promotora de crecimiento en microalga al mantener un efecto similar sobre esta al igual que en plantas superiores (de-Bashan *et al.*, 2002; 2004; 2005; 2008). Con el tiempo, durante la interacción microalga-bacteria se produce una interacción de tipo cluster en donde se forman pequeñas conexiones entre las células de las dos especies formadas por un material tipo fibrilar tal como se muestra en la Figura 2, la distribución de este material es desconocida, pero aparentemente se forman estas estructuras solidas conectándose (de-Bashan *et al.*, 2011). Con esta evidencia se tiene que muy probablemente las PGPB tienen un efecto significativo en distintas rutas metabólicas durante la interacción con la microalga.

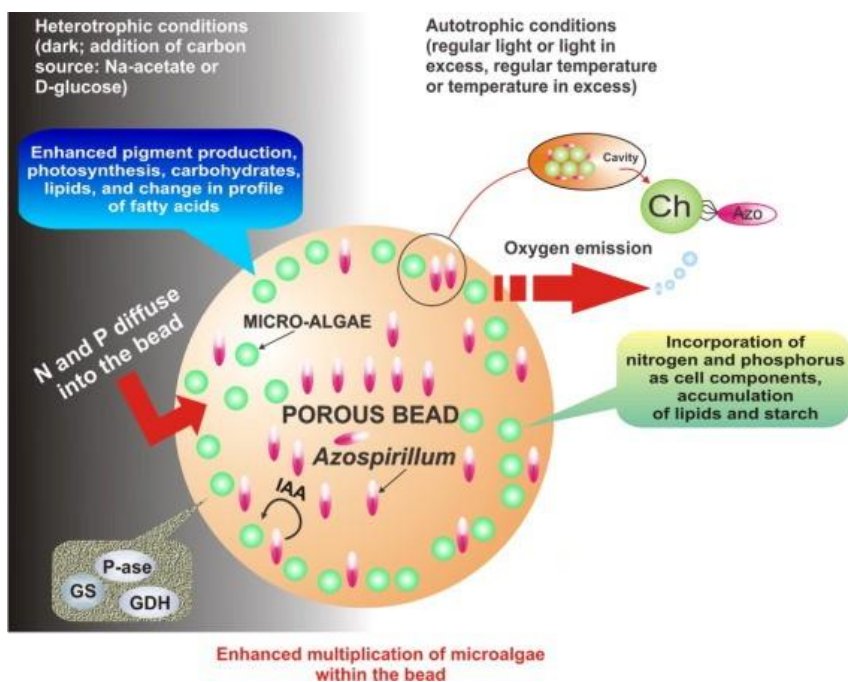


Figura 1. Mecanismo general de interacción microalga-bacteria cuando se encuentran co-inmovilizados en esferas de alginato.

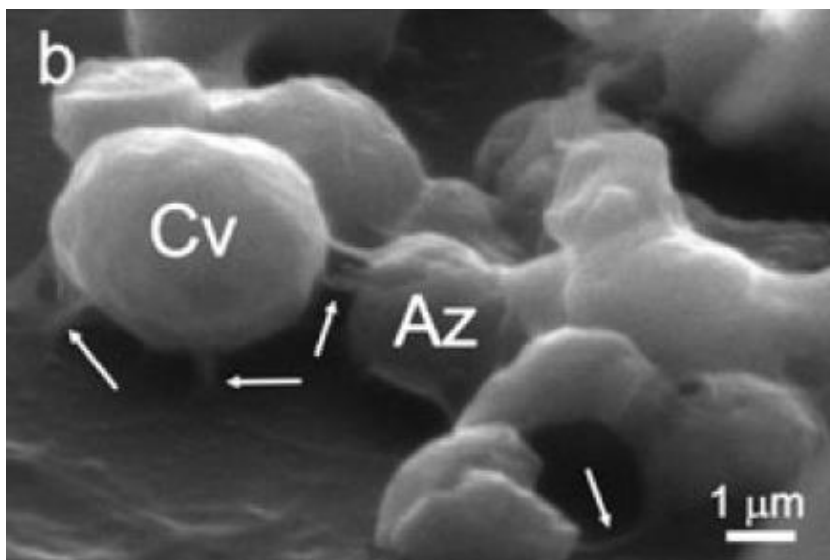


Figura 2. Grupo formado por los dos microorganismos (*Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense*) conectados entre sí y con la matriz de alginato por una red de material fibrilar (de-Bashan *et al.*, 2011)

2.5. Modos de acción de las PGPB

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés), se han definido como bacterias que encuentran libremente en el suelo, rizósfera o rizoplasma que bajo ciertas condiciones son beneficiosas para las plantas. Uno de los mecanismos por los cuales las PGPB promueven el crecimiento vegetal es por vía directa el cual consiste en afectar directamente el metabolismo de las plantas proporcionando sustancias que naturalmente suelen ser escasas. Estas bacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo y hierro, sintetizar fitohormonas como auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno. Adicionalmente mejoran la tolerancia de las plantas al estrés, como la sequía, alta salinidad, toxicidad por metales y alta carga de plaguicidas (Bashan and de-Bashan., 2005). La promoción de crecimiento indirecta se produce cuando estas bacterias promueven el crecimiento en plantas mediante la mejora de las condiciones de restricción de crecimiento (Glick *et al.*, 1999). Esto puede ocurrir mediante la producción de sustancias antagónicas, o mediante la inducción de resistencia a patógenos (Glick, 1995; Kloepper, 1993). Estas bacterias pueden presentar un efecto en el crecimiento de las plantas por uno o más de estos mecanismos como se puede ejemplificar en la Figura 3, utilizando estas habilidades para

estimular el crecimiento en varios momentos durante el ciclo de vida de la planta (Glick et al., 1999).

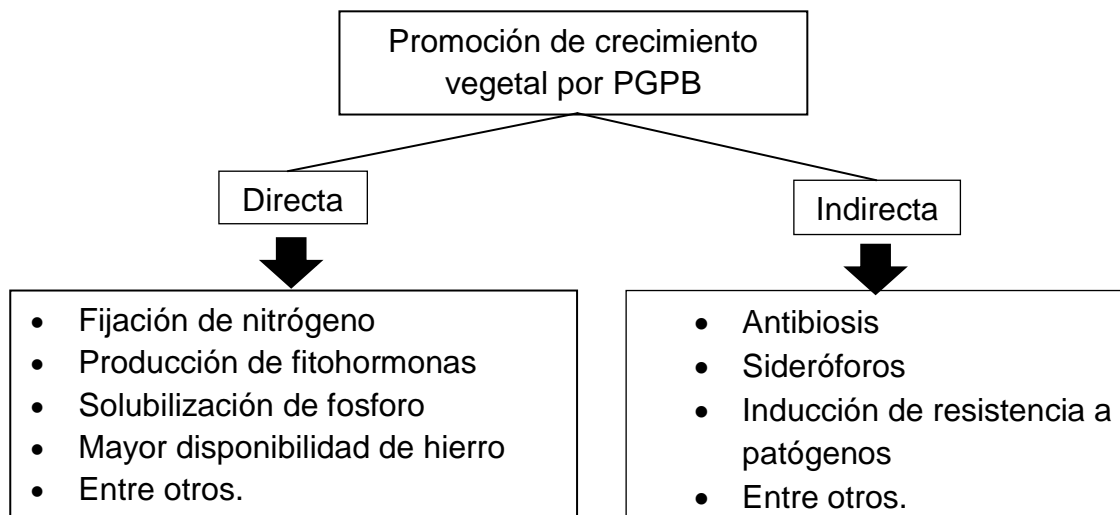


Figura 3. Vías por las cuales las PGPB actúan.

2.6. Compuestos orgánicos volátiles producidos por PGPB

Las plantas y ciertas bacterias forman asociaciones mutuamente beneficiosas que se encuentran mediadas a través del intercambio de metabolitos químicos. Los exudados de las raíces proveen ácidos orgánicos ricos en energía que son metabolizados en cuestión de horas por microorganismos del suelo (Jones *et al.* 2003), por su parte las PGPB, generan compuestos biológicamente activos que promueven el crecimiento vegetal en plantas (Kloepper *et al.* 1999; Ryu *et al.* 2004; Paré *et al.* 2005). Se ha demostrado que ciertos compuestos como el etileno gaseoso, ácido jasmónico, terpenos, etc., funcionan como moléculas de señalización en plantas (Shulaev *et al.*,1997). Ryu *et al.*, (2003) encontraron ciertos compuestos químicos volátiles (2,3-butanediol y 3-hidroxi-2-butanona) emitidos por algunas bacterias promotoras de crecimiento vegetal que en ausencia de contacto físico provocaron una promoción de crecimiento en *Arabidopsis*. Garcia-Juárez *et al.*, (2010) realizaron un estudio con distintas PGPB en donde encontraron compuestos volátiles que pueden ser sintetizados de novo (2-metil propanoico y el 3- metil butanol) por estas bacterias y que tienen un efecto en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. La

identificación de los mensajeros químicos emitidos por las bacterias que provocan una promoción de crecimiento vegetal ha sido limitada en parte por la comprensión de como las plantas responden a estímulos externos. Poco se ha reportado en relación al papel de los compuestos orgánicos volátiles bacterianos en la regulación del desarrollo y crecimiento vegetal, aunque se ha observado recientemente que los compuestos volátiles bacterianos pueden servir como agentes para activar la promoción de crecimiento en plantas (Ryu *et al.*, 2003).

3. Justificación

Se han realizado estudios con la intención de descifrar los mecanismos mediante los cuales las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) influyen positivamente en el crecimiento de las plantas. Con base a este principio, se han realizado estudios en los que se ha demostrado que diversos mecanismos basados en adherencia y contacto físico de las PGPB afectan a la microalga *Chlorella* de manera similar que a las plantas. Incremento en las tasas poblacionales, aumentos en los niveles de pigmentos y lípidos, aumento en la eficiencia de remoción de nutrientes como nitrógeno y fosforo de agua residual, son evidencia de estos efectos positivos en la interacción microalga-bacteria. Se ha reportado que existen otros mecanismos de acción por parte de algunas PGPB en ausencia de contacto físico en plantas. Nada se sabe cómo otros mecanismos pueden afectar a *Chlorella vulgaris* en ausencia de contacto físico. Es importante el entendimiento de estos efectos y como cualquier estímulo que sea beneficioso para esta interacción pueda ser utilizado para futuras aplicaciones.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de las PGPB *Azospirillum brasilense* Cd y *Bacillus pumilus* ES4 en el crecimiento y metabolismo de la microalga *Chlorella vulgaris* en ausencia de contacto físico en un sistema con espacios de crecimiento separados.

4.2. Objetivos particulares

- a) Determinar el efecto de *A. brasilense* Cd y *B. pumilus* ES4 en el crecimiento y volumen celular de *C. vulgaris* en un sistema de crecimiento con espacios separados.

- b) Determinar el efecto en el contenido lípidos, carbohidratos y clorofila *a* de *Chlorella vulgaris* después de los tratamientos.

- c) Identificar los compuestos volátiles producidos por *A. brasilense* Cd y *B. pumilus* ES4 en cultivo medio mínimo mineral utilizado en el sistema.

5. Hipótesis

Azospirillum brasilense Cd y *Bacillus pumilus* ES4 afectaran el crecimiento y metabolismo de *Chlorella vulgaris* en ausencia de contacto físico y medio de crecimiento de la microalga.

6. Materiales y métodos

6.1. Microalga y bacterias, condiciones de crecimiento

Se realizaron inóculos específicos para *Chlorella vulgaris*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus pumilus* ES4. Las condiciones de crecimiento de la microalga fueron en un matraz Erlenmeyer con medio mineral C30 creciendo por 6 días a una temperatura de 28 °C en agitación a 120 rpm. Partiendo de cepas puras, las bacterias se pasaron a un sistema de cajas petri con agar nutritivo al 2% en una inoculación por estrías. Posteriormente se realizaron los inóculos para cada microorganismo, utilizando matraces de 250 ml con medio mineral C30 para *Chlorella vulgaris*. Para *A. brasilense*, *B. pumilus* se utilizaron matraces de 125 ml con los medios BTB, TYG respectivamente. En la Figura 4 se muestra esquematizado el proceso. Posterior a las 16-18 horas de crecimiento en medios nutritivos, las bacterias se pasaron a medio mínimo mineral BRUNNER por 48 horas, adicionando 10 g/L al medio de glucosa (*B. pumilus*) y gluconato (*A. brasilense*) como fuente de carbono.

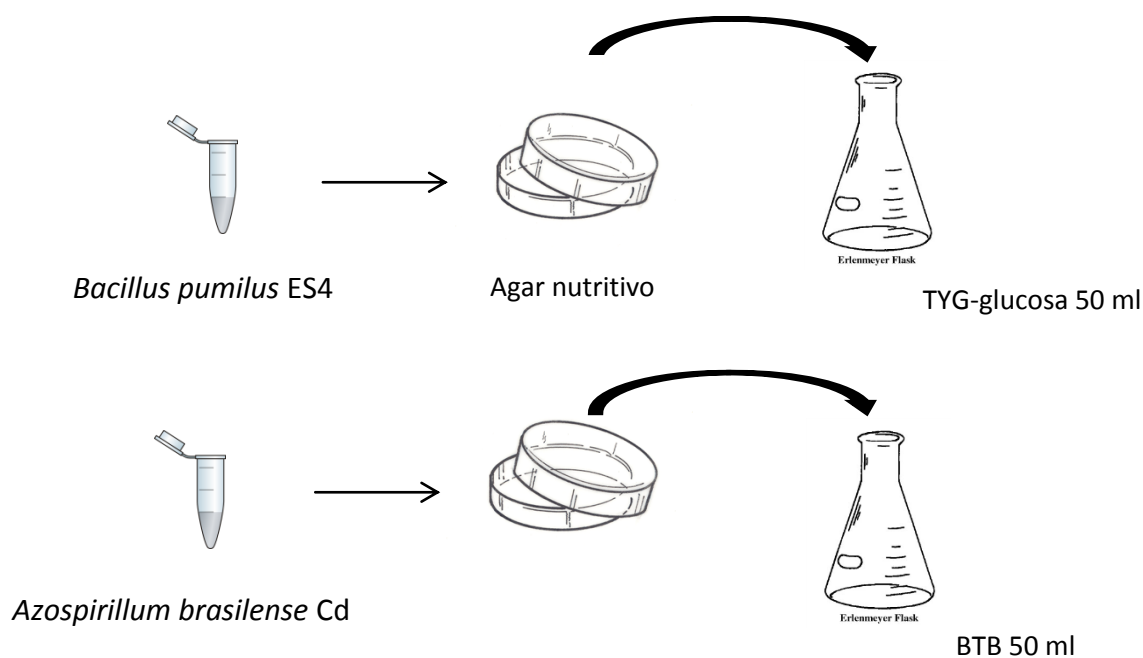


Figura 4. Proceso para la obtención de inóculos puros de *B. pumilus* y *A. brasilense*.

6.2. Conteo y medición de volumen celular de la microalga *Chlorella vulgaris*

Se realizaron conteos directos en cámara de Neubauer (Bright line counting chamber, Hausser Scientific Company Harsham, PA, USA), se llevaron a cabo mediciones de tamaño y volumen celular utilizando un microscopio equipado con un analizador de imágenes con un programa de análisis image pro plus versión 6.3.

6.3. Conteo de bacterias

Se realizaron conteos de unidades formadoras de colonia (UFC) por medio de diluciones seriadas. (Breed y Dotterrer, 1916).

6.4. Medición del efecto remoto de las PGPB sobre *Chlorella vulgaris*

6.4.1. Experimento en caja petri con división

El sistema para medir el efecto remoto de las PGPB se realizó a partir de un sistema de cajas petri con una división en la parte central, en un lado de las cajas se inoculó la microalga *Chlorella vulgaris* en 10 mL de medio mineral C30 con una concentración de 6×10^6 cel/ml. *B. pumilus* y *A. brasilense* se cultivaron 100 μ L independientemente en la otra parte de las cajas petri con medios TYG, BTB y un control con agua respectivamente. Se realizaron 2 tratamientos 1 control con 5 réplicas por 48 horas. En la figura 5 se muestra el esquema general de los 2 tratamientos y el control.

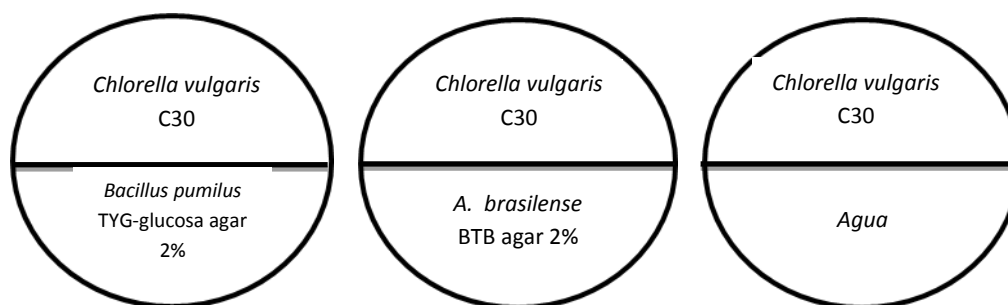


Figura 5. Sistema-tratamiento de cajas petri divididas para medir el efecto promotor de crecimiento de los compuestos volátiles

6.4.2. Experimentos en matraces kitasato duales con conexión.

Los experimentos en matraces kitasato de 250 ml duales con conexión para la obtención de biomasa microalgal, se realizó conectando las dos salidas laterales a través de un tubo de plástico esterilizable masterflex (Figura 6); una vez realizado el proceso el sistema se selló con papel aluminio y sometió a esterilización. Una vez obtenidos los inóculos bacterianos después de transcurridas las 48 horas de crecimiento en medio mineral BRUNNER, todo el material en condiciones asépticas, los cultivos celulares de las bacterias fueron sometidos a un proceso de lavado de 2 ciclos con una solución salina de NaCl de 0.85% centrifugando a 5500 rpm y 7 minutos por cada ciclo; después se ajustaron a una densidad óptica de 1×10^9 cel/ml en la misma solución salina. 2 ml de cultivo fueron adicionados a uno de los matraces kitasato del sistema conteniendo 100 ml de medio mineral BRUNNER. 10 ml de cultivo de *C. vulgaris* a una concentración celular de 8×10^6 cel/ml fueron añadidos en el otro matraz que completaba el par conteniendo 90 ml de medio mineral C30. El sistema se selló con tapones de goma estériles. 2 tratamientos y un control con 5 replicas cada uno fueron incubados durante 96 horas a 28 °C en agitación a 120 rpm (Figura 6).



Figura 6. Sistema tratamiento de matraces kitasato duales con conexión en incubación.

6.4.3. Experimento en matraces kitasato duales con filtro de Hidroxido de litio (LiOH)

Se utilizó el LiOH como filtro dentro del sistema debido a que este es capaz de absorber CO_2 , este ultimo producido por una amplia variedad de bacterias, con la finalidad de reducir la cantidad de dióxido de carbono que se producía dentro del sistema se utilizó la misma metodología que el punto 6.4.2, con ligeras diferencias, añadiendo concentraciones de 0.3 y 0.5 gramos de LiOH. Para tal fin se utilizaron dos bordes de gasa tapando las salidas laterales del sistema apoyadas con el tubo de plástico esterilizable para impedir que el LiOH traspasara a cualquiera de los dos lados de los matraces. Una vez hecho este proceso dentro de la campana de flujo, todos sistemas armados como se muestra en la figura 7, se sometieron a un tratamiento de esterilización con UV por 15 minutos antes añadir los microorganismos. Se dejó un tiempo de incubación de 0 a 120 horas con el sistema de 0.3 g de LiOH y un tiempo de 120 a 216 horas para el sistema con 0.5 g de LiOH. Se hicieron 5 replicas por cada tratamiento y se tomaron muestras cada 24 horas.

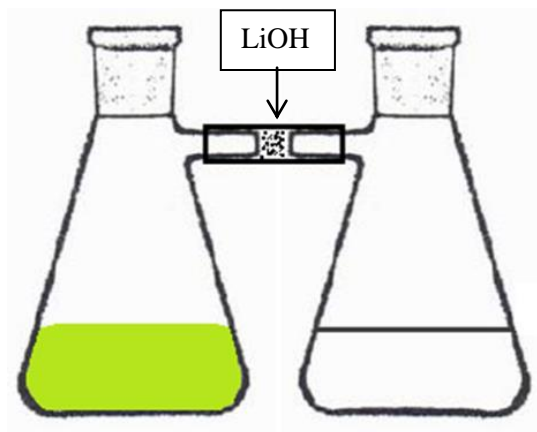


Figura 7. Sistema tratamiento de matraces kitasato duales con filtro de Hidroxido de litio (LiOH)

6.5. Métodos analíticos

6.5.1. Cuantificación de clorofila *a*

Método de metanol caliente. 5 ml de la muestra del cultivo se centrifugan a 5000 x g por 10 minutos. Se separó el paquete celular y se le adicionaron 5 ml de metanol al 90%. Los tubos se agitaron y se pusieron a baño de Maria a 60°C por 10 minutos. Las muestras se refrigeraron a 4°C por 20 horas. Pasado este tiempo se volvió a recuperar el volumen evaporado de metanol y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones, recuperando el sobrenadante. La Densidad Óptica se determinó contra el blanco de metanol a 665 y 750 nm.

La concentración de clorofila se obtuvo de la siguiente forma:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/l)} = 13.9 * (D.O._{665} - D.O._{750}) * \frac{U}{V}$$

Donde: U = Volumen final de metanol y V= Volumen de la muestra.

6.5.2. Cuantificación de lípidos totales

La cuantificación de lípidos se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Pande *et al* (1963) y la extracción fue realizada de acuerdo al método de Bligh and Dyer (1959) con algunas modificaciones adecuadas a la microalga. Aproximadamente se pesaron aprox. 5 mg de muestra de microalga liofilizada, posteriormente se añadieron 4 ml de una mezcla de metanol-cloroformo (2:1,v/v). Las muestras fueron sonicadas por 4 minutos (2 ciclos a 30KHz, parando 1 minuto transcurridos los primeros 2, después por 1 minuto) en baño frío. Las muestras sonicadas se incubaron a una temperatura de 4 °C durante 24 horas en oscuridad, después las muestras se sonicaron bajo las mismas condiciones. Las muestras se centrifugaron a 5000 x g , 5 minutos y el sobrenadante fue pasado a otro tubo limpio. 2 ml de agua destilada se añadieron al sobrenadante y se sometieron a vortex por 5 segundos, después las muestras fueron centrifugadas bajo las mismas condiciones. La fase de cloroformo con lípidos fue colectada y evaporada a 30 °C.

La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración con tripalmitina (Sigma-Aldrich) como estándar. 3 ml de dicromato de potasio al 2 % disuelto en ácido sulfúrico al

98 % fueron añadidos a la muestra y se incubaron a 100 °C por 15 minutos. Los tubos se pasaron a un baño en frío y 4.5 ml de agua destilada se añadieron a la muestras, de nuevo fueron puestas a baño en frío antes de ser cuantificadas en un lector de microplaca (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 590 nm.

6.5.3. Cuantificación de carbohidratos totales

El tratamiento de las muestras se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Choix *et al* (2012). Los carbohidratos fueron extraídos por hidrólisis ácida durante 60 minutos a 100 °C. Los carbohidratos se cuantificaron por el método fenol-ácido sulfúrico de acuerdo con Dubois (1956) adaptado a un lector de microplaca (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

6.5.4. Extracción de los compuestos volátiles

La extracción y análisis de los compuestos volátiles bacterianos se realizó mediante los procedimientos especificados en la metodología descrita por Ryu *et al* (2004). Las bacterias se mantuvieron por un tiempo de incubación de 24 horas a 37 °C dentro de viales de vidrio con agar medio mineral BRUNNER.

6.5.4.1 Microextracción en fase sólida (SPME) por sus siglas en inglés

Dos fibras de SPME (Supelco, Bellefonte, PA) que se encuentran comercialmente fueron utilizadas para el análisis de las muestras de compuestos volátiles bacterianos. Estas fueron de poli (dimetilsiloxano) (PDMS; 7 µm) y stable flex divinilbenzeno/carboxeno/PDMS (DCP, 50/30 µm). Los viales (Figura 8) que contenían las muestras se colocaron en un bloque de calentamiento (Gerstel Multipur-pose Sampler MPS 2, Baltimore, MD) a 50 °C con la fibra de SPME insertada en el espacio de cabeza por encima de la muestra bacteriana. La adsorción fue medida en un tiempo de 30 min.



Figura 8. Viales con muestras de compuestos volátiles bacterianos

6.5.5. Análisis de compuestos volátiles bacterianos mediante la técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

Las fibras de SPME se desorbieron a 210 °C durante 1 minuto en el puerto de inyección de un Cromatógrafo de gases-Masas (Agilent Technologies 7890) como se muestra en la Figura 9, con una columna BR-ms (30m x 0.25 mm x di= 0.25µm espesor de película). La corrida fue de 25 minutos y las fibras permanecieron en el puerto de inyección durante 10 minutos después de cada corrida. El puerto de inyección se hizo funcionar en el modo sin división con flujo constante de 1 ml/min. La temperatura inicial de la estufa fue de 33 °C, se mantuvo durante 3 minutos con una rampa de 10 °C min⁻¹ a 180 °C, después con rampa de 40 °C min⁻¹ a 220 °C manteniéndose por 5 minutos. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo de ionización de electrones a 70 eV, temperatura de la fuente de 200 °C, temperatura de cuadrupolo de 150 °C, con una exploración continua de m/z 40 a 500.



Figura 9. Cromatógrafo de gases-Masas Agilent Technologies 7890^a utilizado para el análisis de compuestos volátiles bacterianos.

6.6. Volumen celular

Se realizó la medición de volumen celular de *Chlorella vulgaris* en un microscopio Olympus BX41 equipado con una cámara digital (CoolSnap-Pro Color, Japan) acoplada a un analizador de imágenes (ImageProPlus 4.5, Media Cybernetics, Japan). Se seleccionaron las microalgas con la forma más esférica midiendo el diámetro total celular, 5 mediciones por campo y un total de 5 campos por muestra. El análisis se realizó por quintuplicado. Para obtener el volumen celular se aplicó la siguiente fórmula general de volumen para una esfera:

$$\frac{4}{3}\pi r^3$$

6.7. Análisis estadísticos

Cada experimento se realizó con 5 réplicas por tratamiento y se repitieron 2 veces. Para los datos resultantes de la cuantificación de *B. pumilus*, *A.brasilense*, *C.vulgaris*, volumen celular, lípidos, carbohidratos totales y clorofila a se realizó un análisis de varianza de una vía ANDEVA con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y una prueba de Fisher Pos Hoc, con la finalidad de observar si había diferencias significativas entre tratamientos. Estos datos se analizaron con el software Statistica 6.0. Los resultados en las gráficas muestran el promedio más el error estándar.

7. Resultados

7.1. Crecimiento de microalga en sistema de caja Petri con división

En la figura 10 se puede observar en número de células/mililitro de *C.vulgaris* obtenidas a través de conteo directo en cámara de Neubauer, esto durante un periodo de 48 horas. El mayor número de células se obtuvo en el tratamiento con *B.pumilus* mostrando un crecimiento total de 4.32×10^6 cel/mL, comparado con el tratamiento con *A.brasilense* que mostro un total de 3.42×10^6 cel/mL, siendo así menor el efecto en el control con agua con un número total de 2.08×10^6 cel/mL. Hubo diferencia significativa entre los tratamientos. En la Figura 11 se muestra el experimento realizado.

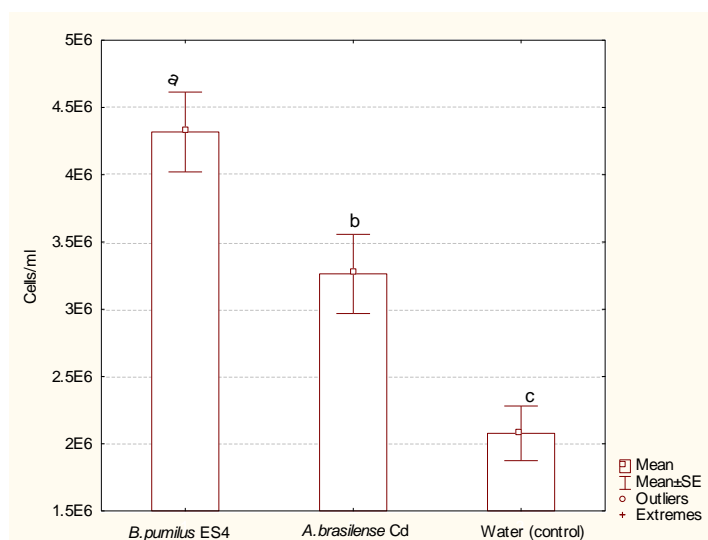


Figura 10. Las barras representan el número de células por mililitro de *C. vulgaris* en cada tratamiento después de 48 horas de incubación. Las letras superiores representan la diferencia significativa entre cada conteo a partir de un análisis de varianza de una sola vía a $p \leq 0.05$.

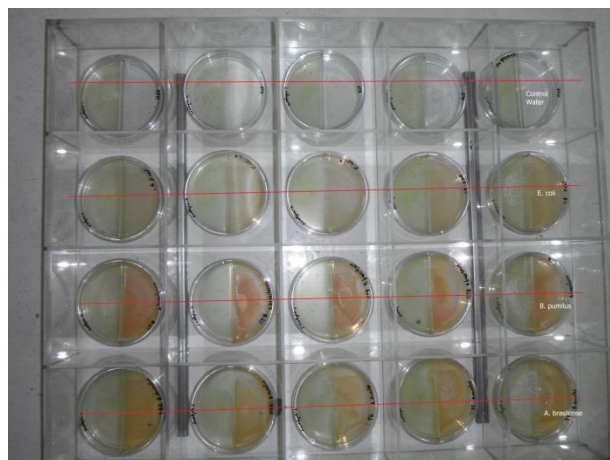


Figura 11. Sistema de cajas Petri con división central, en la imagen se pueden observar los distintos tratamientos, las primeras dos líneas horizontal de arriba hacia abajo se pueden observar los controles, seguido de las últimas dos líneas de 5 cajas con los tratamientos.

7.2. Crecimiento total de *C.vulgaris* en el sistema de matraces kitazato duales.

La figura 12 muestra las concentraciones de *C.vulgaris* para cada tratamiento. El comportamiento fue muy similar a los obtenidos con el sistema de caja Petri dividida mostrando una tendencia con un mayor número de células en el tratamiento con *B.pumilus* con 2.63×10^7 cel/mL seguido por el tratamiento con *A.brasilense* con 1.94×10^7 cel/mL. En el control se encontró un máximo de 2.37×10^6 cel/mL siendo el menor de los crecimientos comparado con los tratamientos. Hubo diferencia significativa entre los tratamientos.

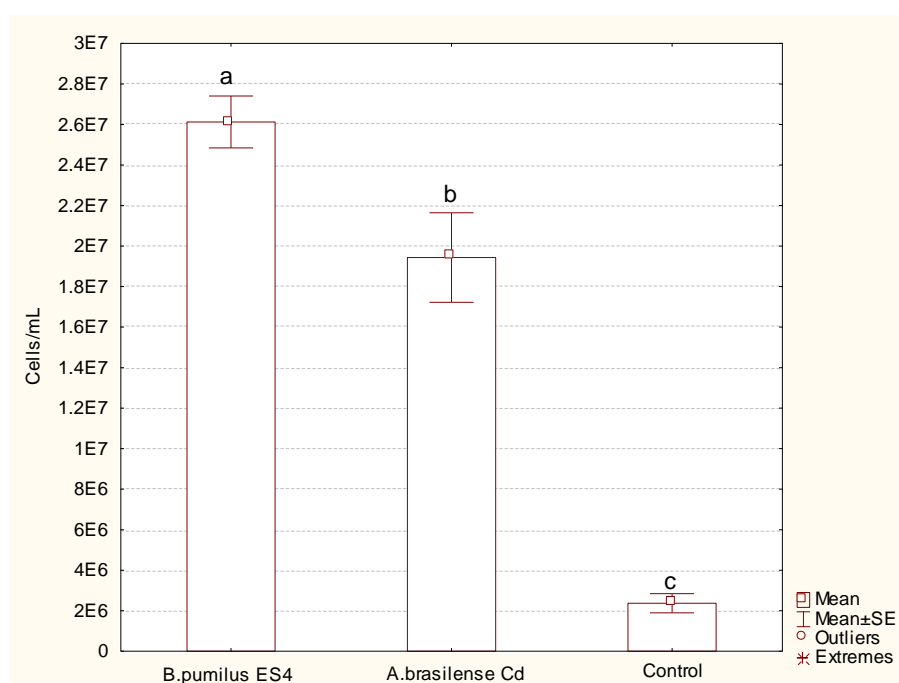


Figura 12. En la gráfica las barras representan el número total de células por mililitro de *C.vulgaris* en cada tratamiento con un tiempo de incubación total de 96 horas. Las letras superiores representan la diferencia significativa entre cada conteo a partir de un análisis de varianza de una sola vía a $p \leq 0.05$.

7.2.1. Cinética de crecimiento y volumen celular de *Chlorella vulgaris*

En la figura 13 se muestra la cinética de crecimiento de *C.vulgaris* en un periodo de incubación de 96 horas, los dos tratamientos con bacterias muestran un crecimiento mayor al control de la microalga sola. El tratamiento *A.brasilense* es donde se presentó el mayor

número de células por mililitro de *C.vulgaris* en el periodo de las 0 a las 72 horas alcanzando su punto máximo de crecimiento y después se alcanza a observar que comienza a entrar en una fase estacionaria. Las concentraciones celulares de la microalga fueron menores de las 0 a las 72 horas con tratamiento con *B.pumilus* comparado con *A.brasilense*. A las 96 horas se obtuvieron mayores concentraciones por mililitro de la microalga con el tratamiento de *B.pumilus* con un total de 1.54×10^7 cel/mL, seguido de *A.brasilense* con 1.22×10^7 cel/mL de *C.vulgaris*. El control se mantuvo casi con un crecimiento línea teniendo así el menor número de células por mililitro. Hubo diferencia significativa entre tratamientos.

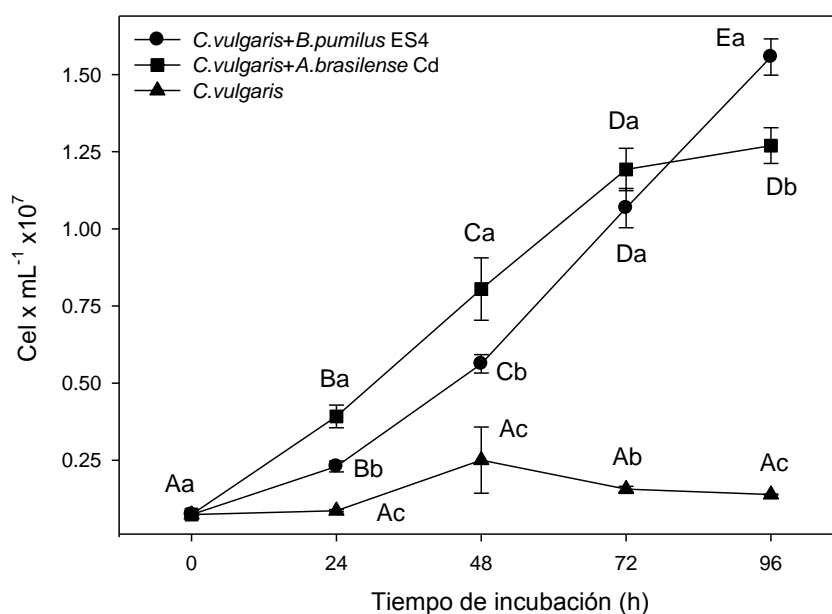


Figura 13. Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* de 0 a 96 horas, los puntos en las líneas representan el número de células por mililitro de *C.vulgaris*. Las letras mayúsculas sobre cada punto denotan una diferencia significativa por tratamiento con una prueba de ANDEVA de una vía con $p \leq 0.05$. Las letras minúsculas representan la diferencia significativa entre tratamientos.

En la figura 12 se representan los resultados de volumen celular de *Chlorella vulgaris* durante un periodo de incubación de 0 a 96 horas. En los tratamientos se obtuvieron las mayores diferencias a las 96 horas siendo así mayor el volumen celular de $62.74 \mu\text{m}^3$ con el tratamiento de *B. pumilus* en ese punto. Entre las 24 y 48 horas fue mayor el volumen celular en el tratamiento con *A.brasilense* con la cantidad de $41.53 \mu\text{m}^3$, habiendo en el punto de las 72 horas en donde el volumen celular fue muy similar entre todos los tratamientos. Se encontró diferencia significativa entre tratamientos.

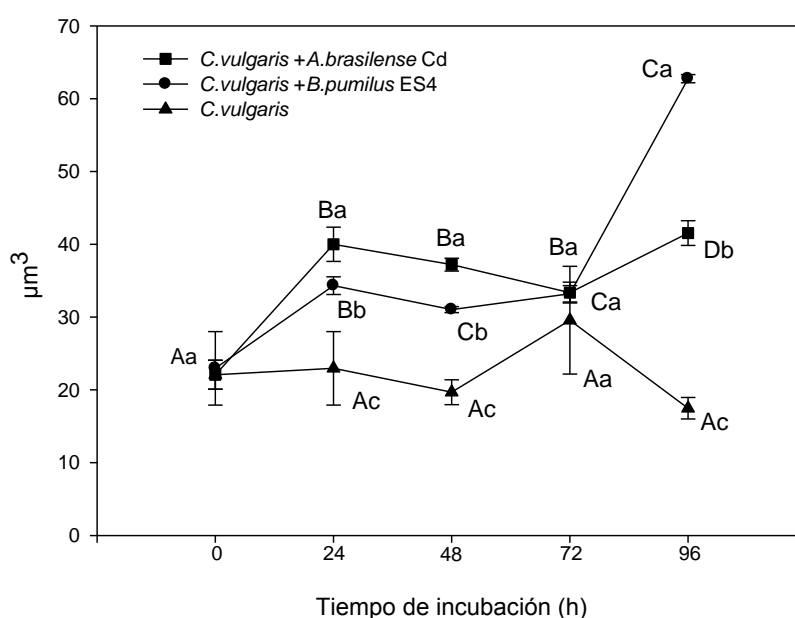


Figura 14. Los puntos en las líneas muestran el volumen celular de *C.vulgaris* en μm^3 durante un periodo de 0 a 96 horas. Las letras mayúsculas sobre los puntos denotan diferencia significativa por tratamiento con una prueba de ANDEVA de una vía con $p \leq 0.05$. Las letras minúsculas muestran la diferencia significativa entre los tratamientos incluido el control.

7.2.2. Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en sistema con filtro de Hidróxido de litio (LiOH)

Los resultados obtenidos con los dos filtros a las concentraciones de LiOH se observan en las Figuras 15 y 16. Con el filtro de 0.3 gamos el crecimiento se muestra de 0 a 120 horas, mientras que con el filtro de 0.5 gramos, el crecimiento de la microalga se retardo,

pudiendo registrar valores de crecimiento hasta las 120 horas. Hay un punto para las dos bacterias en el que el crecimiento de *C.vulgaris* incrementa considerablemente, de las 48 a las 120 horas para *Chlorella* con *A.brasilense* y de las 72 a las 120 con *B.pumilus*, esto durante el primer experimento con filtro de 0.3 gramos de LiOH. En el segundo experimento con 0.5 gramos se realizaron mediciones a partir de las 120 horas. El mayor incremento en el número de células de *C.vulgaris* se mostró entre las 144 y las 168 horas de incubación con *A.brasilense* siendo más prolongado con *B.pumilus* que fue de las 144 hasta las 216 horas de incubación. En los dos casos el control no presenta crecimiento.

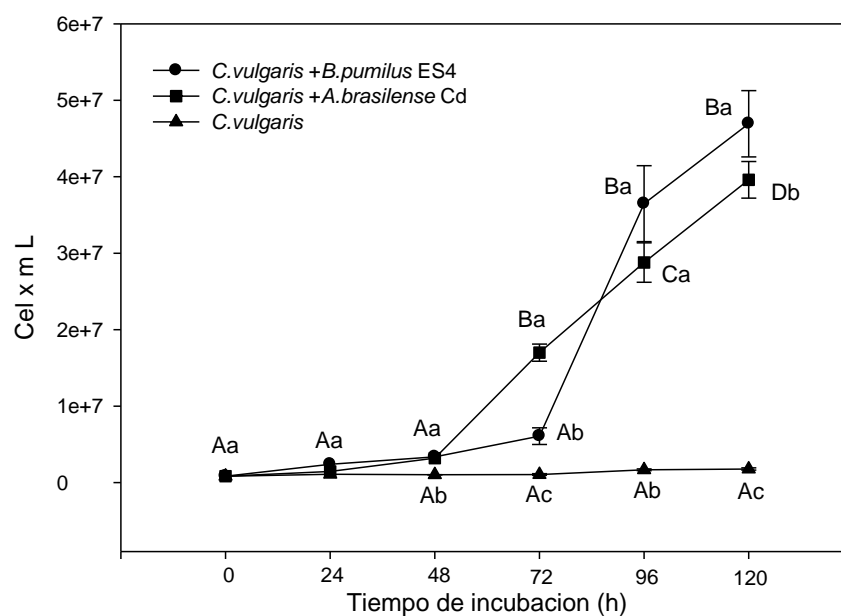


Figura 15. Crecimiento de *C.vulgaris* con 0.3 g de LiOH como filtro en el sistema

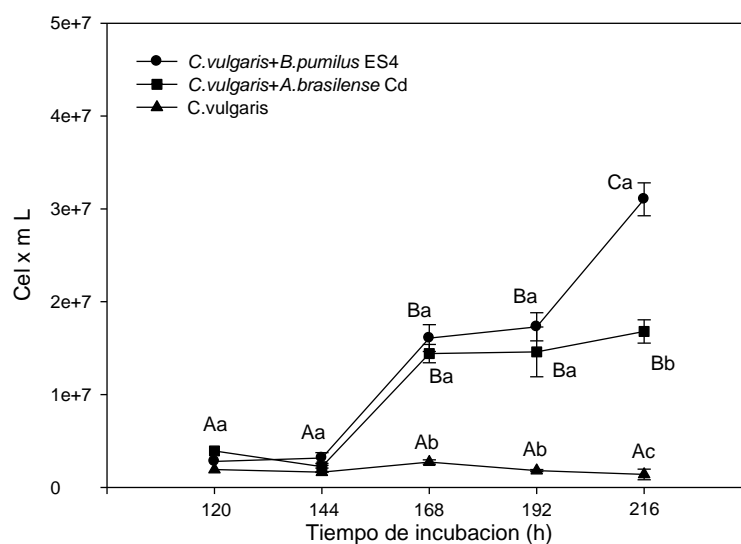


Figura 16. Crecimiento de *C. vulgaris* con 0.5 g de LiOH como filtro en el sistema

7.3. Cinética de crecimiento de bacterias

Los crecimientos obtenidos de las bacterias en el sistema durante la cinética de crecimiento se presentan en la figura 17, durante un tiempo de incubación que va de las 0 a las 96 horas. El incremento de unidades formadoras de colonia (UFC) de *A. brasilense* fue mayor de las 24 a las 72 horas con número total de 2.17×10^7 y 8.74×10^{12} UFC/mL respectivamente. Para *B. pumilus* se midieron concentraciones de 4.8×10^6 y 8.73×10^{11} UFC respectivamente durante el mismo periodo. A las 96 horas fue donde se obtuvo un mayor conteo en *B. pumilus* con 1.51×10^{14} comparado con 9.50×10^{12} UFC de *A. brasilense*. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

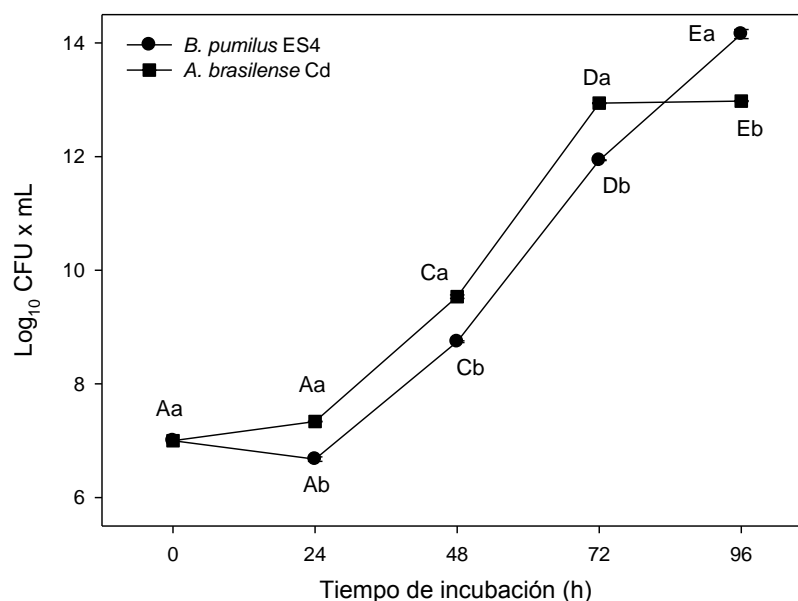


Figura 17. Concentración celular de bacterias en Log₁₀ UFC x mL durante un periodo de 0 a 96 horas. Las letras mayúsculas sobre los puntos denotan diferencia significativa por tratamiento con una prueba de ANDEVA de una vía con $p \leq 0.05$. Las letras minúsculas muestran la diferencia significativa entre los tratamientos incluido el control.

7.4. Lípidos totales

La cantidad de lípidos totales en *C.vulgaris* mostraron diferencias con cada tratamiento de bacterias, siendo mayor el contenido de lípidos en el tratamiento de *B.pumilus* con una concentración total de 419.279 mg/g comparado con el tratamiento con *A.brasilense* de 358.994 mg/g. El contenido de lípidos totales no se pudo cuantificar en el tratamiento control, debido a la cantidad muy pobre de biomasa que se generó durante el periodo de incubación de la microalga. En la figura 18 se pueden ver las concentraciones totales de lípidos para cada tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

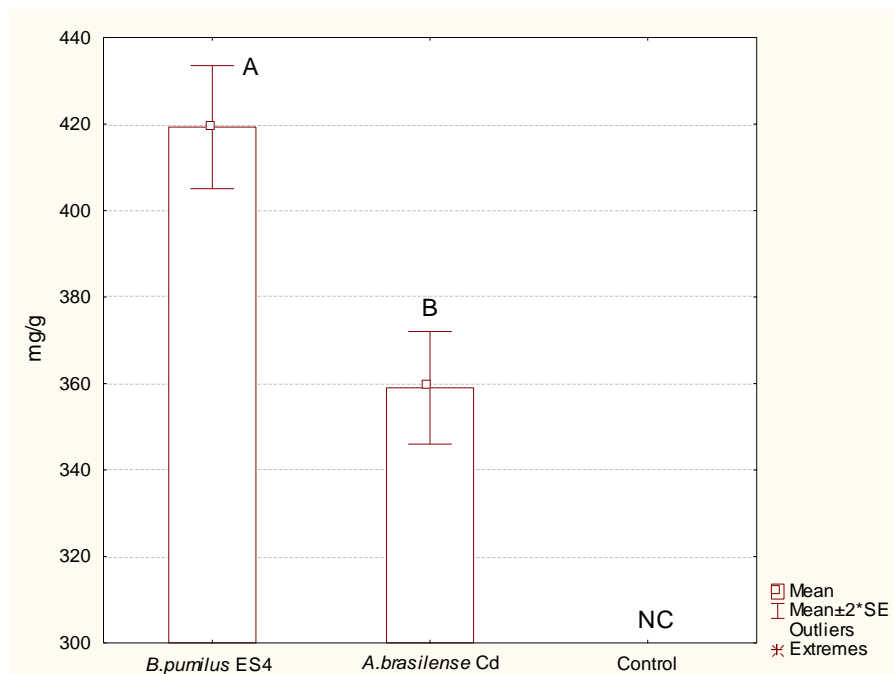


Figura 18. Las barras muestran el contenido total de lípidos por cada tratamiento en mg/g durante un periodo de incubación de 96 horas. Las letras NC en el control indican que no fue cuantificable. Las letras mayúsculas sobre las barras indican diferencia significativa entre tratamientos con una prueba de ANDEVA de una vía con $p \leq 0.05$.

7.5. Carbohidratos totales

La mayor cantidad de carbohidratos totales de *C.vulgaris* fueron encontrados en el tratamiento con *A.brasilense* dando un total de 20.43 mg/g de carbohidratos totales, seguido del tratamiento con *B.pumilus* con un total de 11.52 mg/g. Debido a la poca cantidad de biomasa generada en el control no se pudo cuantificar el contenido de carbohidratos totales al final de los experimentos. En la figura 19 se pueden notar las concentraciones totales para cada tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

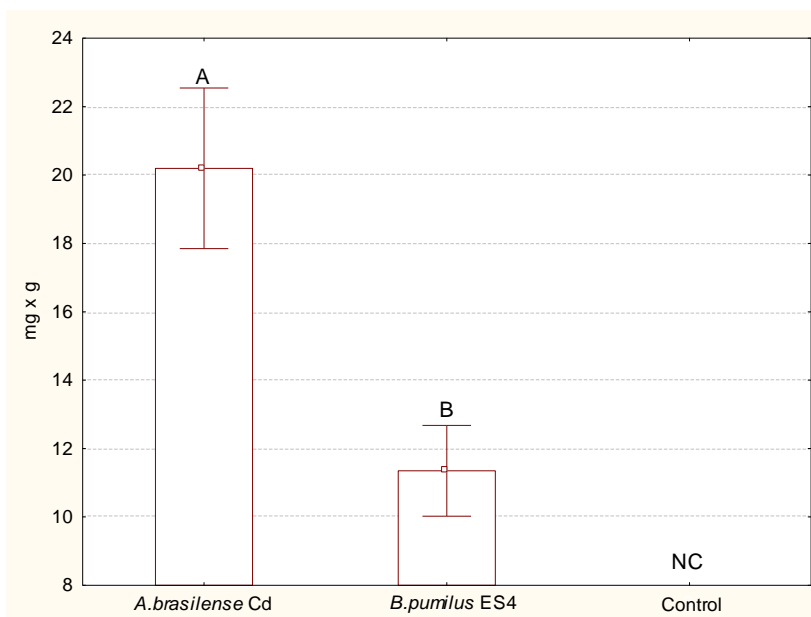


Figura 19. Contenido total de carbohidratos en *C.vulgaris* durante un periodo de incubación de 96 horas. Las letras NC en el control indican que no fue cuantificable. Las letras mayúsculas sobre las barras indican diferencia significativa entre tratamientos con una prueba de ANDEVA de una vía con $p \leq 0.05$.

7.6. Clorofila a

La concentración total de clorofila *a* en *Chlorella* es de 3.25 mg/g en el tratamiento con *B.pumilus* y de 1.83 mg/g con *A.brasiliense*. La menor cantidad se cuantifico con 0.696 mg/g de clorofila a en el control (Figura 20).

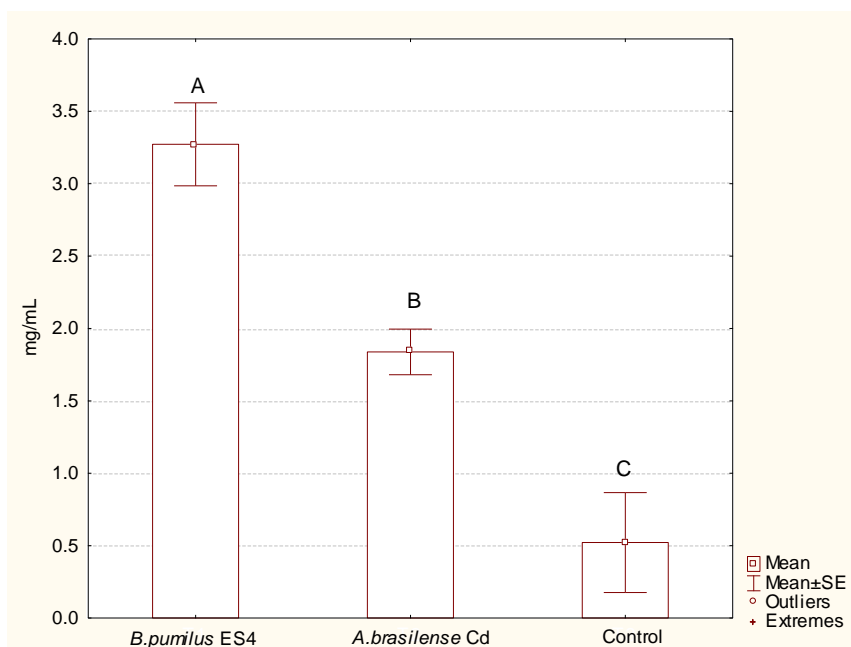


Figura 20. Contenido total de clorofila a en *C. vulgaris* en un periodo de incubación de 96 hrs. Las letras mayúsculas sobre las barras indican diferencia significativa entre tratamientos con una prueba de ANDEVA de una vía con $p \leq 0.05$.

7.7. Identificación de compuestos volátiles producidos por *Azospirillum brasilense* Cd y *Bacillus pumilus* ES4.

En la identificación de compuestos volátiles producidos por *A. brasilense* y *B. pumilus* se obtuvo una gran variedad de moléculas. El total de compuestos identificados para *B. pumilus* y *A. brasilense* fueron 12 y 8 respectivamente, siendo así, mayor la variedad de moléculas de dichas características que fueron producidas por *B. pumilus*. En las tablas I y II se muestran todos los compuestos volátiles identificados para las dos bacterias, entre las cuales destaca el tolueno como compuesto que es producido en común por las dos bacterias. Los pesos moleculares entre algunos compuestos varían, notándose así el más pesado, Cyclotetrasiloxane, octamethyl- con una masa de 296.075.

Tabla I. Compuestos volátiles producidos por *B.pumilus* ES4

Nombre	Formula	Masa de referencia
Toluene	C7H8	92.063
Spiro[2.4]hepta-4,6-diene	C7H8	92.063
Cyclobutene, 2-propenylidene-	C7H8	92.063
1,3,5-Cycloheptatriene	C7H8	92.063
Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	C8H24O4Si4	296.075
Spiro[3.3]hepta-1,5-diene	C7H8	92.063
Tetracyclo[3.2.0.0(2,7).0(4,6)]heptane	C7H8	92.063
Bicyclo[3.2.0]hepta-2,6-diene	C7H8	92.063
2-Dodecanone	C12H24O	184.183
1,5-Heptadien-3-yne	C7H8	92.063
2,5-Norbornadiene	C7H8	92.063
2-Heptanone, 6-methyl-	C8H16O	128.12

Tabla II. Compuestos volátiles producidos por *A.brasilense* Cd

Nombre	Formula	Masa de referencia
Toluene	C7H8	92.063
Disulfide, dimethyl	C2H6S2	93.991
1-Phenyl-2-propanol	C9H12O	136.089
Benzeneethanol, .alpha.-methyl-	C9H12O	136.089
1,5-Heptadien-3-yne	C7H8	92.063
Bicyclo[2.2.2]oct-7-en-2-one,5-methylene-	C9H10O	134.073
N-Hydroxymethyl-2-phenylacetamide	C9H11NO2	165.079
Benzeneacetamide	C8H9NO	135.068

8. Discusión

La estimulación, el efecto promotor de crecimiento o cualquier actividad benéfica por medio de la interacción remota entre organismos fotosintéticos, como las plantas y PGPB es un fenómeno que ha sido demostrado en experimentos *in vitro*, fue reportado por primera ocasión por Ryu *et al.* (2003); sin embargo, no hay estudios en los que se haya demostrado estos efectos en otros organismos fotosintéticos como microalgas. Diferentes estudios realizados por de-Bashan y Bashan (2000,2005, 2008,2012) han demostrado que muchos de los efectos que las PGPB tienen en plantas superiores ocurren de manera muy similar en microalgas como *Chlorella vulgaris*. En este trabajo se estudió el efecto remoto producido por *A.brasilense* Cd y *B.pumilus* ES4 sobre *C.vulgaris* en un sistema de crecimiento en donde no existe ningún tipo de contacto físico entre los dos organismos, tratando de aportar evidencia que permitiera comprobar la hipótesis en la que se basó esta investigación.

Por medio de la cuantificación total de células de *Chlorella vulgaris* se pudo establecer el comportamiento de la microalga al estar dentro del mismo sistema con *A.brasilense* y *B.pumilus* en ausencia de contacto físico. Luego de establecer las condiciones de crecimiento y observar los cambios poblacionales de la microalga a través del tiempo fue posible relacionar el fenómeno de acuerdo a la bacteria utilizada. Esta es una técnica que ha sido muy usada en recientes estudios para monitorear el comportamiento poblacional de microalgas del género *Chlorella* en interacciones con *A.brasilense* (Covarrubias *et al.*, Choix *et al.*, 2012). El número total de células y el volumen de la microalga varío con el paso del tiempo debido a una estimulación por parte de las PGPB. Esto concuerda con resultados similares que se han obtenido de efecto remoto de PGPB en plantas (Zhang., 2007, Ryu., 2005, Lee., 2012) y microalgas (Perez-Garcia *et al.*, 2010), aunque en este caso durante una interacción física.

El crecimiento poblacional de las bacterias durante el periodo de incubación de 0 a 96 horas aumento durante el tiempo transcurrido, observándose que el crecimiento de *A.brasilense* concuerda con el crecimiento de *C.vulgaris.*, similar resultado se encontró con *B.pumilus*; esto nos permite elucidar un efecto directo dependiendo del crecimiento poblacional de la

bacteria. Kloepper *et al.* (1989) mostraron que durante la interacción entre bacterias de suelo y plantas existen procesos por los cuales mucho de los efectos beneficiosos que se producen sobre plantas son proporcionales al número de bacterias que se benefician de la misma manera de estos organismos fotosintéticos, adhiriéndose a su sistema radicular.

Marco Kai y Birgit Piechulla (2009) realizaron un modelo de estudio de planta-bacteria en donde en un sistema de cajas petri divididas pusieron a prueba el efecto remoto por parte de PGPB en plantas, utilizando Hidróxido de bario (BaOH) como compuesto absorbente de CO₂, con la finalidad de eliminar gran parte del efecto que el dióxido de carbono estuviera provocando en la planta; de esta manera, pudieron atribuir el efecto solamente a la acción de compuestos volátiles que son producidos por las PGPB y que actúan directamente sobre el metabolismo y desarrollo de la planta. Los resultados obtenidos en los dos experimentos que se desarrollaron con un filtro absorbente de Hidróxido de litio (LiOH) como secuestrante de cualquier exceso de CO₂ muestra que la microalga sola como control no creció. El CO₂ es la principal y única fuente de carbono para la microalga creciendo en condiciones fotoautotróficas y es inevitable el efecto que este tiene sobre la misma ya que es un factor limitante creciendo en condiciones de espacios sellados (Halling-Sorensen *et al.*, 1996). Experimentos de estimulación con diferentes concentraciones de CO₂ llevados a cabo en *Chlorella sorokiniana* (Xia *et al.*, 2013) mostraron un efecto directo a nivel poblacional de la microalga. Según los resultados obtenidos es inevitable pensar que hay un efecto producido por parte del dióxido de carbono. Sin embargo es importante resaltar que hay una amplia gran variedad de compuestos que de cierta manera están afectando a la microalga, hoy en día se reconocen alrededor de poco más de 300 moléculas que han sido identificadas y que son producidas por esta clase de bacterias que se encuentran asociadas de manera natural o artificial a plantas (Bailly y Weiskopf., 2012). Muchos de estos compuestos son capaces de difundirse y distribuirse también sobre soluciones acuosas (Vespermann *et al.*, 2007).

Las variaciones que se encontraron en las concentraciones de lípidos totales concuerdan con variaciones e incrementos de lípidos (aceites esenciales) en plantas como *Mentha piperita* en donde Santoro *et al.*, (2011) utilizaron 3 rizobacterias, incluido *A. brasilense*, en

un tratamiento por separado en donde únicamente había intercambio de moléculas a través de la fase gaseosa del sistema. Estos hallazgos sugieren que el efecto remoto por PGPB, además de inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios, afecta el metabolismo de algunos monoterpenos en plantas. El mayor efecto a las 96 horas de incubación se vio en el tratamiento con *B. pumilus* seguido de *A. brasilense*. En estudios realizados por de-Bashan y Bashan (2002) con *A. brasilense* en coinmovilización en esferas de alginato con *Chlorella vulgaris*, se observó que después de 10 días de inoculación la microalga presentó cantidades de lípidos considerablemente más altas que las de la microalga creciendo sola, además de un incremento en la variedad de ácidos grasos de *C. vulgaris*. Esto soporta el hecho que hay otros mecanismos mediante las PGPB pueden afectar el crecimiento y metabolismo de la microalga, incrementando la producción de sustancias de reserva energética como son los lípidos.

Por otra parte, poco se sabe acerca de cómo la ausencia de contacto físico con PGPB pueden afectar la producción primaria de carbohidratos en microalgas y plantas. La concentración de carbohidratos incrementa de acuerdo al tratamiento utilizado; los carbohidratos no pudieron ser cuantificados en el control debido a la poca cantidad de biomasa de microalga que se produjo dentro del sistema; esto demuestra que al no haber un intercambio gaseoso del medio con el exterior, la fuente de carbono dentro del sistema no es suficiente para que pueda ser usado en procesos de división celular (XIA *et al.*, 2013). El mayor contenido de carbohidratos totales en *C.vulgaris* fue obtenido con el tratamiento de *A.brasilense*, mientras el contenido de lípidos fue menor con *A.brasilense*; este fenómeno se puede explicar por el hecho que en esa etapa de crecimiento mucho de los carbohidratos se mantienen como la primera reserva energética que la microalga tiene para seguir realizando sus procesos metabólicos. De manera contraria con *B.pumilus*, en ese punto específico de crecimiento (96 h) se encontraron mayores cantidades de lípidos pero menores de carbohidratos; podemos hipotetizar que muchos de los carbohidratos han sido utilizados para la síntesis de ácidos grasos (Perez-Garcia *et al.*, 2010). Los resultados concuerdan con los de Choix *et al.* (2012) quienes demostraron una mayor acumulación de carbohidratos en *C. vulgaris* cuando se encuentra coinmovilizada con *A. brasilense*. De la

misma forma se encontró un aumento en contenido de almidón en plantas superiores en una interacción remota de batería-planta por Ezquer *et al.* (2010).

El contenido de pigmentos, específicamente clorofila *a*, aumento cuando la microalga se encuentra en interacción no física con las dos PGPB. de-Bashan y Bashan (2002) utilizaron el sistema microalga-bacteria para demostrar que hay un incremento en los niveles de pigmentos fotosintéticos como clorofila *a* durante los tratamientos en comparación de los controles de *C.vulgaris* sola; sin embargo, este sistema es en coinmovilización de los dos organismos dentro de esferas de alginato con la finalidad de promover el apego físico entre microalga-bacteria. Los resultados obtenidos muestran la estimulación provocada por PGPB sobre este organismo fotosintético.

Según el análisis de compuestos volátiles realizado para las dos cepas de bacterias se observó una mayor variedad de compuestos producidos por *B.pumilus*, dando un total de 13 compuestos, comparado con 8 que produjo *A.brasilense*. Este resultado concuerda con diferentes estudios en los que se ha identificado específicamente al género *Bacillus* como uno de los que más variedad de compuestos volátiles produce que mayor efecto tiene sobre la actividad y desarrollo de plantas superiores en una interacción remota (Ryu *et al.*, 2003; Lee B. *et al.*, 2012; Pieterse M.J. *et al.*, 2009; Farag M. *et al.*, 2013).

Entre los compuestos producidos por las dos bacterias está el tolueno. Ugrekhelidze *et al* (1997) demostraron que a muy pequeñas cantidades, el tolueno puede ser captado por la hojas de ciertas plantas como *Acer campestre*, *Malus domestica*, y *Vitis vinífera*. Este fenómeno se da a través de una conversión del tolueno en las hojas que se produce con la escisión del anillo aromático; sus átomos de carbono se incorporan principalmente en ácidos orgánicos no volátiles, y en menor proporción como aminoácidos. *A.brasilense* produjo también disulfuro de dimetilo, el cual es un compuesto con características repelentes a cierta variedad de insectos que atacan a las plantas, por ejemplo algunos psilidos (Diaz Montano y Trumble., 2012). Hay una amplia variedad de compuestos producidos por PGPB que han demostrado tener un efecto protector a su hospedero. Es innegable el hecho que el estímulo generado por *A.brasilense* y *B.pumilus* sobre *Chlorella*

vulgaris sin un acercamiento físico ni siquiera con el medio de crecimiento de la microalga, produce un efecto remoto sobre este organismo fotosintético, dando pie a que alguno de estos, la suma de ellos u otros más generan un cambio en el metabolismo de *Chlorella vulgaris*.

9. Conclusiones

- El crecimiento y tamaño celular de *Chlorella vulgaris* se vieron favorecidos por las dos bacterias. El efecto es mayor con *B.pumilus* que con *A.brasilense*.
- Las concentraciones de lípidos, carbohidratos totales y clorofila a, aumentaron con las dos bacterias demostrando cambios en el metabolismo de *C.vulgaris*
- Una gran variedad de compuestos volátiles producidos por *B.pumilus* ES4 y *A.brasilense* Cd fueron identificados, pudiendo así, ser un mecanismo que está favoreciendo a *C.vulgaris* sin necesidad de contacto físico entre los dos organismos.
- Hay un estímulo remoto por parte de las PGPB sobre *Chlorella vulgaris*, de tal manera que el apego físico entre estos dos organismos no es una limitante para que se produzca un efecto benéfico en la microalga.

10. Literatura citada

1. Adesemoye, A.O., y Kloepper, J.W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1-12.
2. Bailly, A., y Weiskopf, L. (2012). The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: Current knowledge and future challenges. *Plant Signaling and Behavior*. 7:1-7
3. Bashan, Y., Holguin G., de-Bashan L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 50:521–577.
4. Bashan, Y., Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol–PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochemistry*. 30:1225–1228.
5. Bashan, Y., y de-Bashan L. E. (2005). Bacteria plant growth-promotion, p. 103–115. In D. Hillel (ed.), *Encyclopedia of soils in the environment*, vol. 1. Elsevier, Oxford, United Kingdom.
6. Belimov, A.A., Kunakova, A.M., Safronova, V.I., Stepanok, V.V., Yudkin, L.V., Alekseev, Y.V., Kozhemyakov, A.P. (2004). Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium. *Microbiology* 73:99–106.
7. Bligh, E.G., y Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37:911-917.
8. Breed, R. S. y Dotterer, W. D. (1916). The Number of Colonies Allowable on Satisfactory Agar Plates. *Journal of Bacteriology* 1:321–331
9. Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R. (1998). A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied Environmental Microbiology*. 64:3663–3668.
10. Choix, F. J., de-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2012). Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate immobilized *Chlorella* spp. induced by

Azospirillum brasilense: I. Autotrophic conditions. Enzyme and microbial technology 51:294–9

11. Covarrubias, S. A., de-Bashan, L. E., Moreno, M., Bashan, Y. (2012). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. Applied microbiology and biotechnology. 93:2669–80.
12. de-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2008). Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. Applied and Environmental Microbiology. 74:6797-802.
13. de-Bashan, L.E., Antoun H., Bashan Y. (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 Microbiology Ecology. 54:197–203.
14. de-Bashan, L.E., Antoun H., Bashan Y. (2008). Involvement of indole- 3-acetic-acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. Journal Phycology. 44:938–947.
15. de-Bashan, L.E., Bashan Y., Moreno M., Lebsky V. K., Bustillos J. J. (2002). 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*. Canadian Journal of Microbiology. 48:514–521.
16. de-Bashan, L.E., Hernandez J. P., Morey T., Bashan Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Research. 38:466–474.
17. de-Bashan, L.E., Magallon P., Antoun H., Bashan Y. (2008). Participation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in ammonium assimilation by *Chlorella vulgaris* jointly immobilized with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Journal of Phycology., 44, 1188–1196

18. de-Bashan, L.E., Moreno M., Hernandez J. P., Bashan Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36:2941–2948.
19. de-Bashan, L.E., Schmid, M., Rothballer, M., Hartmann, A., Bashan, Y. (2011). cell-cell interaction in the eukaryote-prokaryote model of the microalgae *Chlorella Vulgaris* and the bacterium *Azospirillum Brasilense* immobilized in polymer beads. *Journal of Phycology*, 47:1350-1359.
20. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero- Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28:871–879.
21. Ezquer, I., Li, J., Ovecka, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Montero, M., Díaz de Cerio, J., et al. (2010). Microbial volatile emissions promote accumulation of exceptionally high levels of starch in leaves in mono- and dicotyledonous plants. *Plant & Cell Physiology*, 51:1674-93.
22. Ezquer, I., Li, J., Ovecka, M., Baroja-Fernandez, E., Muñoz, F.J., Montero, M., de-Ceiro, J.D., Hidalgo, M., Sesma, M.T., Bahaji, A., Etxeberria, E., Pozueta-Romero, J. (2010). Microbial volatile emissions promote accumulation of exceptionally high levels of starch in leaves in mono- and dicotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology* 51:1674–1693.
23. Farag, M.A. y Pare, P.W. (2002) C₆-Green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. *Phytochemistry* 61, 545–554.
24. Farmer, E. E. (2001) Surface-to-air signals. *Nature* 411:854–856.
25. García-Juárez, P., Altamirano-Hernández, J., López-Bucio, J., Valencia-, E., Macías-Rodríguez, L. (2010). Efecto del perfil de compuestos volátiles de distintas rizobacterias en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, 12:20-27.
26. Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41:109-117.

27. Glick, B.R. (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*. 21:383–393.
28. Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G., y Penrose, D.M. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial College Press. London. p.215.
29. Gonzalez, L. E., y Bashan, Y. (2000). Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1527-1531.
30. Gonzalez-Bashan, L.E., Lebsky, V.K., Hernandez, J.P., Bustillos, J.J., Bashan, Y. (2000). Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 46:653-9.
31. Gutie, F.J., y Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. 11:206-211.
32. Gutierrez-Mañero, F.J., Acero, N., Lucas, J.A., Probanza A. (1996) The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. II. Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant and Soil* 182: 67–74
33. Hartmann, A., y Zimmer W. (1994). Physiology of *Azospirillum*, In Y. Okon (ed.), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 15–39.
34. Hernandez, J.P., de-Bashan, L.E., Rodriguez, D.J., Rodriguez, Y., Bashan, Y. (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology*, 45:88-93.
35. Higashiyama, T., y Yamada T. (1991). Electrophoretic karyotyping and chromosomal gene mapping of *Chlorella*. *Nucleic Acids Research*. 19:6191–6195.
36. Hosono, H., Uemura I., Takumi T., Nagamune T., Yasuda T., Kishimoto M., Nagashima H., Shimomura N., Natori M., Endo I. (1994). Effect of culture

- temperature shift on the cellular sugar accumulation of *Chlorella vulgaris* SO-26. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 78:235–240.
37. Ilangovan, K., Cañizares-Villanueva, R.O., Gonzalez Moreno S., Voltolina D. (1998). Effect of cadmium and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 60:936–943.
 38. Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G., van Hees, P.A.W. (2003) Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil* 248:31– 41
 39. Kai, M., y Piechulla, B. (2009). Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles- an effect of CO₂?. *FEBS Letters*. 583:3473-3477.
 40. Kloepper, J.W. (1993) Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting FB Jr (ed) *Soil Microbial Ecology Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, New York, NY, pp 255–274
 41. Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablutowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. 7:39-44
 42. Kloepper, J.W., Rodriguez-Kabana, R., Zehnder, G.W., Murphy J., Sikora, E., Fernandez, C. (1999) Plant root–bacterial interactions in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*. 28:27–33
 43. Lee, B., Farag, M.A., Park, H.B., Kloepper, J.W., Lee, S.H., Ryu, C.M. (2012). Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PloS one* 7:e48744
 44. Li, W.C., Ye, Z.H., Wong, M.H. (2007). Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn-hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *Journal of Experimental Botany*. 58:4173–4182.
 45. O'Reilly, A.M., y J.A. Scott. (1995). Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 17:636–646.
 46. Oh-Hama, T., y Miyachi S. (1992). *Chlorella*. In M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka (ed.), *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. p. 3–26.

47. Oswald, W.J. (1992). Microalgae and wastewater treatment. In M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka (ed.), *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. p. 305–328
48. Pande, S.V., Parvinkhan, R., Venkitasubramanian, T.A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*. 6:415-423.
49. Paré, P.W., Farag, M.A., Krishnamachari, V., Zhang, H., Ryu, C.M., Kloepper, J.W. (2005) Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynth Research*. 85:149-159
50. Perez-Garcia, O., De-Bashan, L. E., Hernandez, J.P. Bashan, Y. (2010). Efficiency of Growth and Nutrient Uptake From Wastewater By Heterotrophic, Autotrophic, and Mixotrophic Cultivation of *Chlorella Vulgaris* Immobilized With *Azospirillum Brasilense*. *Journal of Phycology*. 46:800–812
51. Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan L.E., and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45:11-36.
52. Pishchik, V.N., Vorobyev, N.I., Chernyaeva, I.I., Timofeeva, S.V., Kozhemyakov, A.P., Alexeev, Y.V., Lukin, S.M. (2002). Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interaction under cadmium stress. *Plant and Soil*. 243:173–186.
53. Rajkumar, M., Freitas, H. (2008a). Effects of inoculation of plant growth-promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresource Technology*. 99:3491– 3498.
54. Rajkumar, M., Freitas, H. (2008b). Influence of metal-resistant plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*. 71:834–842.
55. Ramazanov, A., y Z. Ramazanov. (2006). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. *Phycological Research*. 54:255–259.

56. Reed, M.L.E., Glick, B.R. (2005). Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology*. 51:1061–1069.
57. Reed, M.L.E., Warner, B.G., Glick, B.R. (2005). Plant growth-promoting bacteria facilitate the growth of the common reed *Phragmites australis* in the presence of copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Microbiology*. 51:425–429.
58. Richmond, A. (1986). Microalgae of economic potential. En: Richmond, A. (ed.). *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press. Boca Raton. p.199.
59. Richmond, A. (1990). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press, Boca Raton, FL.
60. Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Pare, P.W. (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 134:1017–1026.
61. Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W., Kloepper, J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:4927-4932.
62. Shulaev, V., Silverman, P., Raskin, I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385:718–721
63. Sorensen, B.H., Nyholm, N., Baun, A. (1996). Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere*. 32:1513-1526.
64. Spaepen, S., Vanderleyden J., Remans R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31:425–448.
65. Steenhoudt, O., y Vanderleyden J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitro- gen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:487–506.
66. Thuler, D.S., Floh, E.I.S., Handro, W., Barbosa, H.R. (2003). Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp in chemically defined media. *Letters in Applied Microbiology*. 37:174–178.

67. Ugrekhelidze, D., Korte, F., Kvesitadze, G. (1997). Uptake and Transformation of Benzene and Toluene by Plant Leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 37:24-29.
68. Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5639–5641.
69. Vivas, A., Biro, B., Ruiz-Lozano, J.M., Barea, J.M., Azcon, R. (2006). Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere*. 62:1523–1533.
70. Wayne, N.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P. (2000). Resistance of bacterial endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64:548-572.
71. Wu, S.C., Cheung, K.C., Luo, Y.M., Wong, H.M. (2006). Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental Pollution*. 140:124–135.
72. Xia, J.I., Gong, S.Q., Jin, X.J., Wan, M.X., Nie, Z.Y. (2013). Effects of simulated flue gases on growth and lipid production of *Chlorella sorokiniana* CS-01. *Journal of Central South University*. 20:730-736.
73. Zhang, H., Kim, M.-S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M.A., Ryu, C.M., Allen, R., Melo, I.S., Pare, P.W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*. 226:839-51.

11. Anexos

**MEDIO MINERAL
CRECIMIENTO DE CHLORELLA C₃₀**

REACTIVO	Gramos	mL	Para un Litro
KNO ₃	100	500	25 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	50	200	10 mL
KH ₂ PO ₄	31.25	200	8 mL
K ₂ HPO ₄	10	100	1 mL
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.28	100	1 mL
OLIGOELEMENTOS			
REACTIVO	Gr./ L	Para el stock	
H ₃ BO ₃	2.68	1 mL	
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.11		
Na ₂ MoO ₄	0.09		
CUSO ₄ .5H ₂ O	0.021		

Se prepara un litro de medio y se reparten 100 mL en matraces de 250 mL., se pone tapón de algodón y se esteriliza.