



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**REUTILIZACIÓN DEL SISTEMA MICROALGA-
BACTERIA EMPLEADO PARA EL TRATAMIENTO
TERCIARIO DE AGUAS RESIDUALES
DOMÉSTICAS: SU APLICACIÓN COMO
INOCULANTE EN SUELO DE ZONAS ÁRIDAS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

p r e s e n t a

Adán Trejo Rangel

La Paz, B.C.S. Marzo de 2010

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15:00 horas del día 15 del Mes de Febrero del 2009, 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:

"Reutilización del sistema microalga-bacteria empleado para el tratamiento terciario de aguas residuales domésticas: Su aplicación en suelo de zonas áridas"

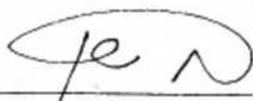
Presentada por el alumno:

Adán Trejo Rangel

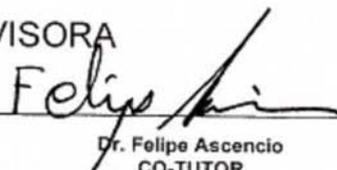
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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



Dr. Yoav Bashan
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Felipe Ascencio
CO-TUTOR



Dra Concepción Lora Vilchis
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Conformación del comité

Comité tutorial y comité de revisión de tesis:

Director de Tesis:

Dr. Yoav Bashan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Tutores:

Dra. Concepción Lora Vilchis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Dr. Felipe Ascencio Valle

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Jurado de Examen de grado:

Dr. Yoav Bashan

Dra. Concepción Lora Vilchis

Dr. Felipe Ascencio Valle

Suplente:

Dra. Elisa Serviere Zaragoza

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

RESUMEN

Una de las biotecnologías que ha sido investigada a nivel de laboratorio en los últimos años ha sido la inmovilización de microalgas y bacterias en esferas alginato para el tratamiento terciario de aguas residuales domésticas. Ya que la biomasa resultante queda disponible al finalizar dicho proceso, se propone reutilizarla y así dar una continuidad a su aplicación biotecnológica. De esta manera, este proyecto tuvo como objetivo evaluar la reutilización del sistema microalga-bacteria como inoculante así como su efecto al ser aplicado en suelo. Las estrategias desarrolladas para tal fin fueron: 1) determinación de la viabilidad de *Azospirillum brasilense* Cd después de utilizarse en el sistema microalga-bacteria para la eliminación de nitrógeno de agua; 2) evaluación de la utilidad del sistema microalga-bacteria como inoculante a partir de la detección de *Azospirillum brasilense* en raíz y su efecto positivo en el crecimiento de la planta; y 3) determinación del efecto del sistema microalga-bacteria en suelo de zonas áridas. Para probar el sistema microalga-bacteria como inoculante, las esferas se deshidrataron a 28-30°C durante 48 hrs. Después de la deshidratación de las esferas, se llevó a cabo el conteo directo de células de *A. brasilense* mediante tinción de Fluoroscein diacetato (FDA) y el apoyo de un microscopio óptico de epifluorescencia. Para evaluar la utilidad del sistema microalga-bacteria como inoculante, se inocularon semillas de sorgo y se sembraron en suelo procedente de la zona del Comitán, a 17 km al noreste de la Paz, Baja California Sur, México, el cual se utilizó por tener muy bajo contenido y aportación de materia orgánica (0.4334%). Las semillas inoculadas se mantuvieron en invernadero y crecieron durante 20 días, para después realizar la medición de longitud de raíz y parte aérea, además de su peso seco. La detección de *A. brasilense* en raíz se realizó utilizando la técnica de hibridación fluorescente *in situ*, microscopía óptica epifluorescente y microscopía láser confocal, incluyendo además el uso de microscopía electrónica de barrido. Para determinar el efecto del sistema microalga-bacteria en suelo, se midieron el porcentaje de materia orgánica y carbono y la cantidad de biomasa microbiana del suelo. Se realizaron 3 resiembras en el mismo suelo y en cada resiembra se aplicó el sistema microalga-bacteria como inoculante. En cada resiembra se evaluaron los parámetros de crecimiento de planta, la detección de *A. brasilense* en raíz, la materia orgánica y el carbono microbiano del suelo. La biomasa microbiana sólo se analizó en la tercera resiembra. Como resultado se encontró que después de hacer un seguimiento por 12 meses a la viabilidad de *A. brasilense*, la bacteria mantiene su viabilidad durante las primeras 48 horas después de la deshidratación, y va disminuyendo progresivamente. Al aplicar el sistema microalga-bacteria como inoculante en suelo, se observó un aumento en los parámetros de crecimiento (longitud y peso seco de raíz y parte aérea) en plantas de sorgo comparado con plantas sin inocular. Se logró detectar *A. brasilense* en las raíces de sorgo después de 20 días de crecimiento en invernadero, utilizando hibridación fluorescente *in situ*, microscopía óptica epifluorescente y microscopía láser confocal, incluyendo además el uso de microscopía electrónica de barrido. El porcentaje de materia orgánica, carbono orgánico y la cantidad de biomasa microbiana del suelo aumentaron cuando se aplicó el sistema microalga-bacteria como inoculante, en comparación con tratamientos donde se adicionó planta sola y suelo solo. El reuso de las esferas de alginato con organismos inmovilizados, una vez finalizado el tratamiento del agua residual, constituye un valor agregado de la biotecnología, lo cual la hace “ambientalmente amigable” ya que no

produce ningún tipo de contaminación secundaria, al crear reciclado eficiente de todos los elementos que la componen.

Palabras Clave: Sistema microalga-bacteria, Inoculante microbiano, Hibridación fluorescente *in situ*

ABSTRACT

Immobilization of the microalgae *Chlorella vulgaris* with the bacteria *Azospirillum brasilense* in alginate beads for tertiary municipal wastewater treatment is one of the latest biotechnologies investigated at the laboratory level. Since the final product of this biotechnological process is greater microalgal and bacterial biomass, it can be re-used in further applications. This study assessed re-use of the microalgae-bacteria system as an inoculant and its effect when used as an amendment for infertile desert soils. The strategies developed for this purpose were: (1) Determine the viability of *Azospirillum brasilense* Cd after the microalgae-bacteria system was used for removing nitrogen products from water; (2) Assess the effect of the microalgae-bacteria system as an inoculant on plants to increase growth and measure *Azospirillum brasilense* on plant roots after inoculation; and (3) Determine the effect of the microalgae-bacteria system on organic matter and carbon content in desert soils. To evaluate the microalgae-bacteria system as an inoculant, the beads were dehydrated at 28–30 °C for 48 h. After dehydration, cell counts of *A. brasilense* were made by fluorescein diacetate staining and an epifluorescence microscope. Sorghum seeds were inoculated with dehydrated beads and planted in soil with low organic matter (0.4334%). Inoculated seeds were grown for 20 days in a greenhouse. Root and shoot length and dry weight were measured. Detection of *A. brasilense* on plant root was performed by fluorescence *in situ* hybridization technique and epifluorescence and confocal laser microscopy, as well as scanning electron microscopy. The effect of the microalgae-bacteria system on carbon and organic matter content of the soil was measured by the Walkey-Black method, and the microbial biomass was analyzed by the fumigation-extraction method. The experiment consisted of three cycles of planting. For each cycle, seeds were planted in inoculated soil. After 20 days of incubation, plants were removed and growth parameters, detection of *A. brasilense* on plant root, organic matter concentration, and changes in carbon concentration in soil were measured. Then another set of seeds were added to the same soil, after being inoculated with another set of beads. This was done three times. Microbial biomass was analyzed only after the third planting cycle. After tracking *A. brasilense* for 12 months, results showed that the bacteria maintained their viability. As a result of inoculation, there was an increase in length and dry weight of roots and shoots of sorghum plants, compared to non-inoculated plants. *A. brasilense* was successfully detected in sorghum roots after 20 days. The percentage of organic matter, carbon, and the amount of soil microbial biomass increased, compared to controls of non-inoculated plants or soil that was not planted or treated. The use of these immobilized microorganisms in alginate beads, once the waste water treatment is over, constitutes an added-value to this biotechnology, making it environmentally friendly because it does not produce any secondary pollution, creating an efficient recycling of all components.

Keywords: microalgae-bacteria system, microbial inoculant,

Fluorescent *in situ* hybridization

DEDICATORIA

A mis padres Noemi Rangel Hernández y Matias Trejo Casas

A la memoria de Jaime Trejo Casas

A Natalia Rodríguez Trejo

A Yuy@

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de las siguientes becas:

- Beca otorgada Núm. 212243 (Agosto 2007-Agosto 2009) para Maestría.
- Beca denominada “Becas Mixtas 2009 CONACYT” para estancia de becarios en el extranjero (Julio-Agosto 2009).
- Beca otorgada por medio del proyecto Proyecto 50052-Z (CONACYT) denominado “Phytostabilization of mine in northwestern México: The role of plant-soil microbe Interactions” para estancia de investigación en el Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Alemania (Julio-Agosto del 2009).
- Beca otorgada por medio del proyecto 50052-Z (CONACYT) denominado “Phytostabilization of mine in northwestern México: The role of plant-soil microbe Interactions” (Noviembre 2009-Febrero 2010)

Al Posgrado del CIBNOR por los siguientes apoyos otorgados:

- Beca de pre-Maestría (Julio-Agosto 2007) con cargo a través del proyecto 23917 (CONACYT)
- Beca de extensión con cargo a través de proyecto 23510 (Septiembre-October 2009).
- Apoyo para estancia de investigación en el Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Alemania, con cargo al proyecto POSG Capítulo 4000.

Esta investigación fue realizada con el apoyo de los siguientes proyectos:

- Proyecto 23510 (SEMARNAT-CONACYT) denominado “Escalamiento de una novedosa tecnología para el tratamiento de aguas residuales combinado con la recuperación de suelos erosionados de zonas áridas, utilizando microalgas y bacterias coimmobilizadas.
- Proyecto 50560-Z (CONACYT) denominado “Mecanismos de control celular en el crecimiento de la microalga combinada con la bacteria promotora de crecimiento de microalgas y su contribución en la eliminación de nutrientes (N y P) del agua residuales.
- Proyecto 50052-Z (CONACYT) denominado “Phytostabilization of mine in northwestern Mexico: The rote of plant-soil microbe Interactions”.

A las siguientes instituciones y laboratorios a través de su infraestructura, así como técnicos

- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.:
- Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR y sus técnicos Dra. Luz Estela González de-Bashan, al M. en C. Juan Pablo Hernández Sánchez, M. en C. Manuel Moreno Legorreta, Biol. Patricia Vázquez Correa y la Tec. Adm. Isaura de la Vega del Castillo
- Laboratorio de Edafología del CIBNOR y su técnico el M. en C. Manuel Trasviña Castro.
- Laboratorio de Microscopía Electrónica del CIBNOR y su técnico Ariel Cruz Villacorta.
- Dirección de estudios de Posgrado, CIBNOR, y su director la Dra. Elisa Serviere Zaragoza.
- Laboratorio de Cómputo, y su técnico el Lic. Horacio Sandoval Gómez.
- Helmholtz Centre, German Research Centre for Environmental Health:

- Department of Plant-Microbe Interactions, HMGU y al Prof. Dr. Anton Hartmann, al Dr. Michael Schmith y el Dr. Michael Rothballer.
- Universidad Autónoma de Baja California Sur:
- Laboratorio de suelos y aguas agrícolas, y su técnico Consuelo Méndez Garfias.
- Bashan Foundation:
- Dr. Yoav Bashan, Presidente de la Bashan Foundation, y a la Dra. Luz Estela González de-Bashan, Vice-presidente de la Bashan Foundation.

A los siguientes investigadores:

- Dr. Yoav Bashan por la dirección y asesoría para llevar a cabo esta tesis
- Dra. Luz Estela González de-Bashan por la dirección y asesoría que me brindó durante toda la tesis, la cual por cuestiones burocráticas no fue posible incluir en el comité tutorial.
- Dra. Concepción Lora Vilchis, Dra. Elisa Serviere y Dr. Felipe Ascencio, por su apoyo parcial y total en la tutoría de esta tesis, y también a la Dra. Esther Puente por su apreciable tutoría hasta su salida del comité tutorial.

Quiero agradecer Al Dr. Yoav Bashan por todas las enseñanzas, y motivaciones académicas que me transmitió, pero sobretodo gracias por haber creído en mi como estudiante, gracias por darme la guía y libertad de crecer académicamente, y gracias por enseñarme ese maravilloso mundo de la investigación. Es y será un modelo académico a seguir.

A la Dra. Luz Estela González de-Bashan, gracias por todo Luz, por su incondicional e invaluable apoyo académico en las buenas y en las malas, gracias por ser mi profesora y por todas las asesorías que me brindó, como me hubiera gustado que se reconociera en esta tesis su co-dirección, gracias por ser un ejemplo a seguir de investigador, y de igual manera, gracias por haber sido una motivación académica durante mi tesis.

A ustedes Yoav y Luz, en verdad les agradezco el haber arriesgado tanto por mí como estudiante.

A mis padres, Noemi Rangel y Matias Trejo, gracias por estar conmigo durante toda la tesis, una más para ustedes, gracias por sentirse orgullosos de lo hago y de lo que soy. A ti papa, gracias por ser la mano que me levantó en los tropiezos que me dejó la tesis, por animarme y darme fuerzas para terminarla. A ti mamá, gracias por ser la mente preocupada, por ser los ojos sin sueño, la medicina que me mantuvo en pie durante toda la tesis. Quizás no tengan idea del tema de mi tesis, pero sé que están seguros que lo que hago me hace feliz, y por eso les agradezco.

Agradezco a mis hermanos Hiram y Ariel Trejo Rangel, gracias por seguir al pendiente de mí y de la tesis desde lejos, también por todo su apoyo durante toda la tesis. A ti Hiram por ser el oído que escuchó todos mis malviajes en la tesis, por ser el hermano mayor que siempre tiene tiempo para su hermano menor, por motivarme a ser mejor estudiante cada día y por ser un ejemplo a seguir de disciplina. A ti Ariel, por todos tus consejos, gracias por todos tus regaños y todos tus ánimos para finalizar la tesis, gracias por darme fuerzas y coraje cuando hice la estancia, gracias por escucharme hablar de mis problemas de tesis una y otra y otra vez. A ustedes hermanos, mis queridos hermanos, gracias.

A mis hermanas Judith y Noemi Trejo Rangel, gracias por todas las alegrías que me dieron durante la tesis y gracias por estar a mi lado siempre. A ti Judith, gracias por preocuparte siempre por mi salud y el estrés que me dejaba a veces la tesis, por venirme a visitar y enseñarte un poco de mi vida académica, yo sé que siempre estás ahí, aunque no me lo digas. A ti Noemi, por ser mi mayor influencia para continuar estudiando, gracias por ser el motivo externo para hacer la maestría, gracias por tu apoyo y tu comprensión durante toda la tesis, en verdad gracias. Gracias mis queridas hermanas.

Agradezco a mi amorcito Getzabeth González, la luz de mi vida, mi amuleto de la suerte, la persona por la que vale la pena todo. Tu sabes más que nadie lo que representa esta tesis, tú la viviste junto a mi día con día, gracias por estar a mi lado durante toda la tesis, por escucharme hablar de bacterias alginolíticas por toda una semana, por aclararme dudas de mi tesis, por ser mi amiga, por regañarme cuando descuidaba la tesis, por escuchar una y otra y otra y otra vez mis exposiciones de la tesis, por leer mi tesis, por darme la fuerza necesaria para seguir adelante y por darme ánimos en esos momentos en que pensé que no era capaz de hacer una maestría. Por ti amorcito, lo logré.

Agradezco a las personas que forman parte del grupo de Microbiología Ambiental del CIBNOR, tanto estudiantes, técnicos e investigadores, pues todas ellas enriquecieron objetivamente la tesis con sus comentarios y recomendaciones, gracias por su guía durante mi formación académica, en especial al M. en C. Juan Pablo Hernández Sánchez, muchas muchas gracias por todo el apoyo técnico que me brindaste, por estar al pendiente de los experimentos de la tesis y de aclarar cualquier duda que se me presentara, por todas las enseñanzas técnicas que me transmitiste y por aguantarme todo este tiempo en el laboratorio. De igual manera un agradecimiento especial a la Dra. Blanca Romero, al M. en C. Luis Leyva y al M. C. Octavio Pérez, con quienes pasé la mayor del tiempo debatiendo y discutiendo dudas, ideas, sugerencias que mejoraran la tesis, y que hicieron tan agradable el tiempo en laboratorio, gracias por transmitirme su conocimiento y su amistad.

A todos mis compañeros de generación de Maestría, Fernando Aranceta, Rafael Cabral, Jorge Massó, Tania López, Ana Mará Millán, Marcela Vélez, Patricia McCoy, Miguel Trip, José Quinatzin García, Obet Silva, Oswaldo Rodríguez, Fausto Valenzuela, Georgina Tena, Luz María Cruz, Meri Alderete y Misha, por brindarme su amistad, por todos esos buenos e inolvidables momentos de clases y no clases. Porque gracias a ustedes siempre hay un buen momento alegre y divertido para recordar de las materias, exámenes, horas de desvelo, reuniones “académicas” y todas las clases que llevamos.

A mis amigos Rodolfo Garza alias “Reno”, Fernando Aranceta alias “cremas”, Rafael Cabral alias “Zeck”, Sergio Vega alias “Serch” y Mario Rojas alias “rojo, güero, mariachi”, gracias por brindarme su amistad en las buenas y en las malas, por ser mis confidentes, los amigos zonzacadores y parranderos, los que siempre estaban ahí cuando necesité de ellos, por apoyarme durante toda la maestría. Agradezco muchísimo el tener su amistad.

A mis hermanos de bronce Jonathan Hernández alias “Jony”, Francisco Flores alias “pajo”, José Ávila alias “papaya”, Oscar Castro alias “master”, Karla Aguilar alias

“Kar” y diana Aparicio alias “Dianiss” que a pesar de la distancia siempre estuvieron apoyándome y brindándome su amistad, gracias amigos.

A todas aquellas personas que conocí en la Paz y con las que pasé tantos momentos inolvidables, gente del CIB (camaradas del taller: jorch, poncho, carlos, mandujano; choferes: veto y Alberto; técnicos: ever, marte, paco, manuel trasviña; administrativos: joy, isra, bucanero, Silvia; estudiantes, equipos de futbol del CIB y de tochito y colados) a todititos los miembros del equipo de futbol “Realzamesta” F.C. (pasados y nuevos), gente del Bar “Salsipuedes” (Rafita, Car, Mark, Rox, Dany y Pepe) y a la banda (cremas, reno, arre, octavius, rojo, tanja, yoshi, mini, drew, march, chio, negro, joqui, massó, cocho, normichis, burro, Betty, oswald, mitzuko, paper, jehú, orso, izel, chava, misha, serch, raja, makoya, jóse, kalin, yare, ever, neri, ulicerdo, trip, anita, angie, chino) y todos los que por mi mala memoria faltan.

Finalmente agradezco el apoyo musical de las bandas Pink Floyd, Manowar y The Beatles que me ayudaron a concentrarme en la escritura de la tesis.

Everything should be made as simple as possible, but not simpler.
Albert Einstein

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES GENERALES | 4 |
| 2.1. Microorganismos inmovilizados, uso y aplicación..... | 4 |
| 2.2. Coinmovilización de bacterias y microalgas para tratamiento terciario de aguas residuales..... | 6 |
| 2.3. <i>Azospirillum</i> , utilización como inoculante, promotora de crecimiento vegetal, identificación en raíz y su inmovilización..... | 9 |
| 2.4. <i>Chlorella</i> y el uso de su biomasa..... | 15 |
| 2.4.1. Aditivo para alimento..... | 16 |
| 2.4.2. Biosorción de metales pesados..... | 16 |
| 2.4.3. Tratamiento de aguas..... | 16 |
| 2.4.4. Obtención de pigmentos y otros productos..... | 17 |
| 2.4.5. Producción de biodiesel..... | 17 |
| 2.4.6. Aditivo en agricultura y biofertilizante..... | 18 |
| 2.5. Alginato, Producción, usos y aplicaciones en biotecnología..... | 18 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 22 |
| 4. HIPÓTESIS | 23 |
| 5. OBJETIVOS | 23 |
| 6. METODOLOGÍA | 24 |
| 6.1. Obtención del sistema microalga-bacteria..... | 24 |
| 6.1.1. Microorganismos, condiciones de cultivo y preparación del sistema microalga-bacteria..... | 24 |
| 6.1.2. Deshidratación del sistema microalga-bacteria..... | 26 |
| 6.2. Viabilidad de <i>Azospirillum brasilense</i> después de la eliminación de nitrógeno de agua..... | 26 |
| 6.2.1. Cuantificación de células de <i>Azospirillum brasilense</i> | 26 |
| 6.3. Detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz y su efecto positivo en el crecimiento de la planta..... | 28 |
| 6.3.1. Incorporación del sistema microalga-bacteria a suelo y planta..... | 28 |
| 6.3.1.1. Características del suelo..... | 28 |
| 6.3.1.2. Desinfección de semillas, pre-germinado y siembra de semillas..... | 28 |
| 6.3.2. Evaluación de parámetros de crecimiento de sorgo..... | 29 |
| 6.3.3. Detección y visualización de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíces de sorgo..... | 30 |
| 6.3.4. Detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz por Hibridación fluorescente <i>in situ</i> | 30 |
| 6.3.5. Detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz por Microscopía óptica fluorescente..... | 33 |
| 6.3.6. Detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz por Microscopía láser confocal..... | 34 |
| 6.3.7. Detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz por Microscopía electrónica de barrido..... | 35 |
| 6.4. Efecto del sistema microalga-bacteria en el suelo..... | 36 |
| 6.4.1. Determinación de materia orgánica y carbono en suelo..... | 36 |
| 6.4.2. Determinación de biomasa microbiana del suelo..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 6.5. Diseño experimental..... | 41 |
| 6.6. Análisis estadístico..... | 44 |
| 7. RESULTADOS..... | 44 |
| 7.1. Deshidratación y almacenamiento del sistema microalga-bacteria..... | 44 |
| 7.2. Cuantificación de células viables de <i>Azospirillum brasilense</i> a través del tiempo..... | 47 |
| 7.3. Incorporación del sistema microalga-bacteria a suelo y planta..... | 50 |
| 7.4. Promoción de crecimiento y detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíces de sorgo..... | 51 |
| 7.5. Detección y visualización de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz..... | 57 |
| 7.5.1. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> | 57 |
| 7.5.2. Microscopía óptica fluorescente..... | 57 |
| 7.5.3. Microscopía láser confocal..... | 60 |
| 7.5.4. Microscopía electrónica de barrido..... | 63 |
| 7.6. Características del suelo..... | 66 |
| 7.7. Determinación de materia orgánica y carbono en suelo..... | 67 |
| 7.8. Determinación de carbono microbiano del suelo..... | 69 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 72 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 91 |
| 10. LITERATURA CITADA..... | 92 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Metodología general..... | 25 |
| Figura 2. Incorporación de esferas en el mismo suelo durante tres ciclos..... | 43 |
| Figura 3. Representación de la deshidratación del sistema microalga-bacteria..... | 45 |
| Figura 4. Presentación de esferas hidratadas y deshidratadas..... | 46 |
| Figura 5. Número de células/esfera de <i>Azospirillum brasilense</i> durante 12 meses en preservación..... | 47 |
| Figura 6. Micrografías del conteo de células de <i>Azospirillum brasilense</i> por FDA y microscopía óptica fluorescente en diversos períodos de tiempo..... | 49 |
| Figura 7. Longitud de la raíz en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento..... | 52 |
| Figura 8. Peso seco de la raíz en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento..... | 53 |
| Figura 9. Crecimiento de la parte aérea de la raíz en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento..... | 55 |
| Figura 10. Peso seco de parte aérea de la raíz en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento..... | 56 |
| Figura 11. Localización de células de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz utilizando microscopio óptico de fluorescencia..... | 58 |
| Figura 12. Detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz por FISH y LSCM en separación de canales..... | 61 |
| Figura 13. Detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz por FISH y LSCM..... | 62 |
| Figura 14. Micrografías de muestras de raíz de sorgo del set 1, utilizando microscopía electrónica de barrido..... | 63 |
| Figura 15. Micrografías de muestras de raíz de sorgo del set 2, utilizando microscopía electrónica de barrido..... | 64 |
| Figura 16. Micrografías de muestras de raíz de sorgo del set 2, utilizando microscopía electrónica de barrido..... | 66 |
| Figura 17. Materia orgánica en el suelo en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento..... | 68 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla I. Estudios sobre el modelo microalga-PGPB..... | 7 |
| Tabla II: Algunas aplicaciones comerciales del alginato..... | 20 |
| Tabla III Composición de buffer de lavado y buffer de hibridación..... | 32 |
| Tabla IV. Guía para la interpretación de los resultados de materia orgánica y carbono orgánico en el suelo..... | 38 |
| Tabla V. Datos de medición de materia orgánica, carbono orgánico, pH y capacidad de campo del suelo utilizado en el experimento..... | 67 |
| Tabla VI. Carbono orgánico en los tratamientos..... | 69 |
| Tabla VII. Carbono orgánico de suelo en los tratamientos..... | 71 |

1. INTRODUCCIÓN

La inmovilización de microorganismos en polímeros es una técnica que ha sido ampliamente investigada y utilizada en diversos campos biotecnológicos (O'Reilly y Scott, 1995), entre los cuales se pueden mencionar: 1) producción de metabolitos secundarios con valor comercial, 2) como herramienta en la manipulación genética de bacterias recombinantes para mejorar la estabilidad del plásmido, y 3) para remover compuestos inorgánicos y metales pesados de aguas residuales, donde es una gran ventaja ya que facilita la cosecha de biomasa producida después del tratamiento (de-Bashan y Bashan 2008a). Particularmente en lo que respecta al tratamiento terciario de aguas residuales domésticas, el uso de microalgas y bacterias inmovilizadas en alginato es una tecnología que se ha investigado en los últimos años (González y Bashan, 2000; González *et al.*, 2000; Lebsky *et al.*, 2001; de-Bashan *et al.*, 2002 a, b, 2004, 2005, 2008 a, b, c; Hernández *et al.*, 2006, Yabur *et al.*, 2007). Esta interacción deliberada la conforman *Chlorella* spp., una microalga de agua dulce conocida por remover nutrientes de aguas residuales domésticas (de la Noüe, 1988; Tam y Wong, 2000), y *Azospirillum brasilense*, una bacteria conocida por promover el crecimiento en plantas (Okon y Kapulnik, 1986; Bashan, 1986; Bashan y Levanovy, 1990). Se ha observado a nivel experimental que *Chlorella* spp. incrementa su tasa de crecimiento y otros parámetros fisiológicos como niveles de pigmentos y lípidos cuando se encuentra inmovilizada con *A. brasilense*, y al mismo tiempo aumenta la remoción de nitrógeno y fósforo de agua (González y Bashan, 2000; González *et al.*, 2000; de-Bashan *et al.*, 2002 a, b, 2004).

Al finalizar dicho proceso, el sistema queda disponible y con la posibilidad de emplearse en otra actividad biológica. En este sentido, las alternativas de uso se relacionan con la disponibilidad de la biomasa una vez realizado el proceso de eliminación de nutrientes de agua. Por ejemplo, algunas alternativas de uso estarían directamente relacionadas con la biomasa de la microalga; entre ellas se pueden mencionar la producción de lípidos (Feng *et al.*, 2005; Witjaja *et al.*, 2009), biodiesel (Miao y Wu, 2006; Xu *et al.*, 2006; Converti *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007), etanol (Hirano *et al.*, 1997), pigmentos (Govueia *et al.*, 1996; 1998; 2006) e hidrógeno (Benemann, 2000), entre otros. El interés de uso también pueden inclinarse hacia ocupar la bacteria disponible en el sistema como inoculante en plantas (Bashan y Levanony, 1990; Holguín *et al.*, 1999), donde el alginato actuaría como una matriz de transporte de las bacterias hacia el suelo y la planta (Bashan, 1986).

Una posible alternativa de uso posterior del sistema microalga-bacteria es aplicarlo en suelo. Esta propuesta se estableció por dos razones: i) al agregar el sistema microalga-bacteria se puede dar una contribución de materia orgánica y carbono al suelo por la biomasa de la microalga y por el alginato; y ii) al agregar *Azospirillum brasilense* en el suelo, podría utilizarse como inoculante en plantas, colonizar la raíz y promover su crecimiento. De esta manera, al aplicar el sistema microalga-bacteria al suelo se evitaría, por un lado, el desechar las esferas después del tratamiento terciario de agua, lo cual eliminaría problemas de polución, y bien se estaría ocupando la biomasa del sistema, mientras que por otro lado, se tendría una contribución de materia orgánica y carbono en el suelo a partir de la biomasa de la microalga y el alginato así como la contribución de una

bacteria promotora de crecimiento en plantas dentro del suelo, utilizando las esferas como un inoculante.

La idea de aplicar el sistema microalga-bacteria en suelo después de utilizarse para la eliminación de nitrógeno de agua fue estudiada por tres vías:

- 1) Viabilidad de *Azospirillum brasilense* después de utilizarse en el sistema microalga-bacteria para la eliminación de nitrógeno de agua.
- 2) Utilidad del sistema microalga-bacteria como inoculante a partir de la detección de *Azospirillum brasilense* en raíz y su efecto positivo en el crecimiento de la planta.
- 3) Efecto del sistema microalga-bacteria en suelo de zonas áridas.

Actualmente son pocos los estudios en biotecnología que abordan la idea de reutilización. La presente tesis estudia el inicio de la reutilización de la biotecnología basada en el inmovilizado de microalgas y bacterias en alginato, mostrando el desarrollo de una posible alternativa posterior al tratamiento terciario de aguas residuales domésticas, y con ello una aplicación futura del sistema, no sólo en el tema de biorremediación de agua.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Microorganismos inmovilizados, uso y aplicación

Aunque el término “inmovilizado” es ahora parte del lenguaje de la biotecnología, el término es delineado más para ejemplos prácticos que para una definición precisa únicamente. Un microorganismo inmovilizado es definido como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, se le impide desplazarse de manera independiente de su medio (Tampion y Tampion, 1987). Tal definición es suficientemente amplia y general como para incluir diversos ejemplos de inmovilización. Una idea complementaria a este concepto lo mencionan de-Bashan y Bashan (2010) relacionándolo a microalgas, donde refieren que un microorganismo inmovilizado en una matriz, ya sea natural o artificial, puede ayudar en los beneficios biotecnológicamente requeridos para los cuales se utiliza la microalga, como por ejemplo en la obtención de un metabolito específico o bien para remover contaminantes. En este sentido, la inmovilización es abordada con diversos intereses y aplicaciones.

Según Chibata y Tosa (1981) las técnicas de inmovilización de células pueden ser clasificadas en tres categorías: carrier-binding, cross-linking, y entrapping. Entre ellos, los métodos para atrapar células ha sido el más ampliamente estudiado. Diversas matrices son utilizadas en este tipo de técnica. Entre ellas se encuentran: Agar, alginato, carrageenina, celulosa y sus derivados, colágeno, gelatina, diversas resinas, acrilamida, poliéster, poliestireno, y poliuretano, entre otros; tales matrices son además utilizadas en base a su

forma (como cápsulas ó esferas, membranas, espirales, redes o fibras, etc.), de acuerdo a sus propiedades físicas (viscosidad, tamaño del poro) y de acuerdo al tipo de proceso en el que se utilicen. Dentro de los principales campos en que se han utilizado células inmovilizadas se pueden mencionar en biosíntesis y bioconversión, en el ambiental, en la industria de alimentos, y como biosensores (Junter y Jouenne, 2004), incluyendo además el campo médico (Oribe *et al.*, 2003 a, b).

La inmovilización de células incluye diversos microorganismos, desde bacterias (O'Reilly y Crawford, 1989; Jung y Mugner, 1982; Rekha *et al.*, 2007), levaduras (Meena y Raja, 2006), hongos (Hyde *et al.*, 1991), microalgas (Moreno, 2008; Mallick, 2006; Shi *et al.*, 2007), cianobacterias (Ertuğrul *et al.*, 2007) entre otros. Por ejemplo, Prabakaran y Hoti (2008) estudiaron la inmovilización de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en alginato de sodio para almacenar las células durante períodos prolongados, encontrando que la bacteria mantiene una excelente viabilidad y su actividad larvicida durante 10 años. Asimismo, Shrivastava *et al.* (2008) estudiaron la producción de IAA de *Kitasatospora* spp. inmovilizado en esferas de alginato, donde observaron una elevada formación de micelio dentro de la esfera y una mayor cantidad de ácido indolacético producido, en comparación con células no inmovilizadas. Por otro lado, Meena y Raja (2006) describen la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diversos iones metálicos como estroncio, bario, calcio-estroncio, calcio-bario y estroncio-bario, como un nuevo método de tecnología de inmovilización. Además, Tam y Wong (2000) estudiaron la remoción de nitrógeno y fósforo de agua residual sintética realizada por *Chlorella vulgaris* inmovilizada en esferas de alginato de calcio, y empleando bioreactores, observaron que la microalga inmovilizada elimina una cantidad de amonio del 95% en 24 horas, y además se reducen

los niveles de ortofosfatos en 24 horas. En lo que se refiere a coinmovilización de diferentes especies de bacterias, Hesam y EI-Komy (2005) estudiaron a las bacterias *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus megaterium* y su potencial para solubilizar Ca_3PO_4 . Los autores observaron que la combinación *B. megaterium* y *A. lipoferum* inmovilizados en alginato demuestra mayor solubilización del sustrato. En cuanto a la coinmovilización de bacterias y microalgas, se tienen reportes como el de Chevalier y de la Noüe (1987), quienes estudiaron la conducta de *Bacillus subtilis* para sintetizar alfa-amilasa cuando se inmoviliza con *Scenedesmus obliquus* en carragenina, observando que la actividad enzimática de la bacteria incrementa hasta un 20% cuando se encuentra coinmovilizada.

La inmovilización de microorganismos ha adquirido bastante atención en el campo de la biotecnología, y actualmente se pueden encontrar estudios en diversos campos y con diversos microorganismos, donde algunos de estos estudios eventualmente alcanzan su aplicación.

2.2. Coinmovilización de bacterias y microalgas para tratamiento terciario de aguas residuales

Varios aspectos técnicos en el modelo microalga-bacteria que apoyan el uso de este sistema en el tratamiento de aguas residuales han sido previamente publicados. En la Tabla I se muestran enlistados los estudios que se han realizado utilizando este modelo (de-Bashan y Bashan, 2008a).

Tabla I. Estudios sobre el modelo microalga-PGPB (Modificado de de-Bashan y Bashan, 2008a).

| Tipo de estudio | Especie <i>Chlorella</i> | Cepas PGPB | Referencias |
|--|---|---|---|
| Promoción de crecimiento (Peso seco, num cel, tamaño de colonias, tamaño de célula) | <i>C. vulgaris</i> <i>C. sorokiniana</i> | <i>A. brasilense</i> Cd, Sp6, Sp245, <i>A. lipoferum</i> JA4. <i>B. pumilus</i> | de-Bashan <i>et al.</i> (2008a; 2008c); González y Bashan (2000); Hernández <i>et al.</i> (2008) |
| Hormonas IAA | <i>C. vulgaris</i> | <i>A. brasilense</i> Cd, Sp6, Sp245, FAJ0009, Sp M7918; <i>A. lipoferum</i> JA4::ngfp15 | de-Bashan <i>et al.</i> (2008a) |
| Absorción de nitrógeno y fósforo | <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> | <i>A. brasilense</i> Cd; <i>P. myrsinacearum</i> ; <i>B. pumilus</i> | de-Bashan <i>et al.</i> (2002; 2004); González <i>et al.</i> (2000); Hernández <i>et al.</i> (2006; 2008); Yabur <i>et al.</i> (2008) |
| Pigmentos fotosintéticos | <i>C. vulgaris</i> | <i>A. brasilense</i> Cd | de-Bashan <i>et al.</i> (2002a) |
| Lípidos | | | |
| Modificación de ácidos grasos | | <i>A. brasilense</i> Cd, <i>P. myrsinacearum</i> | Lebsky <i>et al.</i> (2001) |
| Interacción célula-célula | | | González <i>et al.</i> (2000); Lebsky <i>et al.</i> (2001) |
| Retraso de senescencia | | | |
| Control de población | <i>C. sorokiniana</i> | <i>A. brasilense</i> Cd | de-Bashan <i>et al.</i> (2002a; 2005; 2008c) |
| Dinámica de población | | | |
| Mitigación de calor e intensidad luminosa | <i>C. vulgaris</i> | <i>A. brasilense</i> Cd | Hernández <i>et al.</i> (2006) |
| Ayuno de nutrientes | | | |
| Mitigación a la inhibición por pH | | | |
| Mitigación a la inhibición por triptófano | <i>C. vulgaris</i> | <i>A. brasilense</i> Cd | de-Bashan <i>et al.</i> (2005; 2008a; 2008b) |
| Enzimas en el ciclo del nitrógeno | | | |

Inicialmente, los estudios en el sistema microalga- bacteria se realizaron utilizando a la microalga *Chlorella vulgaris* y a la cepa *Azospirillum brasilense* Cd como modelo, sin embargo en los últimos años se ha explorado la utilización de diversas cepas tanto de *Chlorella* como de *Azospirillum*. Por ejemplo, de Bashan *et al.* (2008c) aislaron y caracterizaron a la cepa *C. sorokiniana* UTEX 2805, la cual, al igual que otras cepas de *C.*

sorokiniana, se conoce por tolerar condiciones de temperatura e intensidad luminosa extremas; los autores evaluaron esta característica al inmovilizarse con *A. brasilense Cd*, observando que la microalga tolera temperaturas hasta de 40-42°C y una intensidad luminosa equivalente a $2500 \mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$ durante 5 horas cada día, al igual que incrementa la cantidad de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b, violaxantina y zeaxantina) cuando se encuentra inmovilizada con la bacteria, y bajo éste régimen de cultivo, la microalga coinmovilizada con la bacteria es capaz de eliminar una mayor cantidad de nitrógeno, comparado con la eliminación de amonio bajo un régimen de cultivo de 28°C y una intensidad luminosa equivalente a $60 \mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$.

Por otro lado, Hernández *et al.* (2009) estudiaron la inmovilización de una especie diferente de *Azospirillum* con la microalga para conocer si el efecto de promover la tasa de crecimiento de la microalga y remover nutrientes del agua es semejante cuando se utilizan otras bacterias en el sistema. En este sentido, el modelo de bacteria fue *Bacillus pumilus*, una bacteria aislada del suelo, la cual se inmovilizó con *Chlorella vulgaris* en esferas de alginato. Los autores observaron que, a nivel celular, la bacteria mejora la eliminación de nutrientes por parte de la microalga, aunque en términos generales de eliminación, el modelo utilizando *Chlorella* y *Azospirillum brasilense* resulta más eficiente, ya que se observó que *Bacillus pumilus* fijaba nitrógeno atmosférico en el medio, y esto crea problemas en la eliminación de nitrógeno.

El sistema microalga-bacteria incluye además estudios como el reportado por Hernández *et al.* (2006), quienes evaluaron la remoción de fósforo de agua residual domestica por parte de *C. sorokiniana* inmovilizada con *A. brasilense* bajo condiciones de

ayuno. Es importante mencionar que en este estudio se utilizó agua residual proveniente de una planta de tratamiento de aguas municipales, lo cual apoya la idea de aplicar en un futuro el coimmobilizado de microorganismos en esferas de alginato para biorremediación de agua, y eventualmente estudiar su escalamiento aplicando ingeniería en biorreactores, al igual que otros procesos industriales, como la evaluación de diversos regímenes de cultivos de la microalga, como el heterotrófico, mecanismos involucrados en la interacción microalga-bacteria, como puede ser la producción de IAA por parte de *A. brasilense* (de-Bashan *et al.*, 2008a) o bien estudios básicos implicados en el ciclo del nitrógeno, abordándolos desde un punto de vista enzimático (de-Bashan *et al.*, 2008b).

2.3. Azospirillum, utilización como inoculante, promotora de crecimiento vegetal, identificación en raíz y su inmovilización

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias (Garrity, 2005); generalmente se presentan en forma de bacilo, como un bastón gordo curvilíneo, entre 0.8-1.0x25 µm de tamaño, con gránulos de polímeros como polihidroxibutirato (PHB), los cuales pueden alcanzar hasta un 50% del peso seco celular (Okon *et al.*, 1976; Hartmann y Baldani, 2006). En la actualidad se han reportado 10 especies para este género: *A. brasilense*; *A. lipoferum*; *A. amazonense*; *A. halopreferens*; *A. irakense*; *A. largimobile*; *A. doebereineriae*; *A. oryzae*; *A. melinis* y *A. canadense* (Menhaz *et al.*, 2007). Las bacterias del género *Azospirillum* han sido aisladas de la superficie de la raíz de una muy amplia variedad de plantas y de su rizósfera, incluyendo generalmente cereales como maíz, trigo, arroz, sorgo, avena y pastos forrajeros (Bashan y Levanovy, 1990). Usualmente se conoce a

Azospirillum por colonizar la raíz de las plantas. Hay además diversos estudios donde se indica que la inoculación con *Azospirillum* puede beneficiar plantas por varios mecanismos (Okon y Kapulnik, 1986). Si bien no se ha definido el mecanismo por el cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, existe literatura donde se reportan diversos modos de acción relacionados con este parámetro, como son fijación de nitrógeno (Hartmann, 1998), efectos hormonales como la producción de ácido indolacético (AIA) (Dobbelaere *et al.*, 1999; Croizer *et al.*, 1998); ácido abscísico (ABA) (Cohen *et al.*, 2008), ácido índol butírico (Martínez *et al.*, 2003) giberelinas (Bottini *et al.*, 1989); 2004; fijación de nitrógeno (Holguín y Bashan, 1996), y una hipótesis aditiva que propone la intervención de todos los mecanismos mencionados (Bashan *et al.*, 2004). El interés científico por esta bacteria es principalmente basado en su habilidad de mejorar el crecimiento de numerosos cultivos de interés agrícola (Rothballer *et al.*, 2003), de ahí que se le conozca como bacteria promotora de crecimiento en plantas (PGPB por sus siglas en inglés) (Bashan y Holguín, 1998). La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede resultar en un cambio significativo en diversos parámetros de crecimiento de la planta, los cuales pueden o no afectar el cultivo. Entre tales parámetros se pueden mencionar: Incremento en el peso seco total de la planta, cantidad de nitrógeno en granos, germinación temprana y alta tasa de germinación, incremento del peso del grano, mayor altura de la planta y tamaño de la hoja, etc. (Bashan y Levanovy, 1990). También la inoculación de plantas con *Azospirillum* se ha observado en el desarrollo de la raíz. Los efectos más marcados se observan directamente en cambios morfológicos del sistema radicular, como son incremento en la longitud de la raíz (zona de elongación), incremento en el número y longitud de raíces laterales,

incremento en el peso seco de la raíz, incremento en el área del sistema radicular, y estimulación de exudados de la raíz (Hadas y Okon, 1987; Levanony y Bashan, 1989).

Para la identificación de *A. brasilense* en raíz es necesario contar con más un tipo de herramienta, o bien considerar que la complementariedad de técnicas puede alcanzar un mejor argumento en la identificación. Durante años se ha trabajado con la aplicación de técnicas dependientes de cultivo y el uso de microscopía convencional. En los últimos años, la identificación de *Azospirillum* en raíz así como su efecto en la rizósfera se ha reportado a partir del uso de técnicas moleculares ó independientes de cultivo, acompañadas y diversos tipos de microscopías. Entre ellas se pueden mencionar la técnica llamada hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en ingles) y la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en ingles). En ecología microbiana, la hibridación fluorescente *in situ* permite la visualización de células procariontas en su ambiente natural, y además pueden ser identificadas sin ser cultivadas, utilizando regiones específicas del 16S ó 23S rRNA (Schmith *et al.*, 2006). La técnica utiliza moléculas fluorescentes para localizar genes o fragmentos de DNA, y consiste en preparar cortas secuencias de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias de DNA que se quieren marcar y examinar. Estas sondas son marcadas con moléculas fluorescentes. Las sondas se hibridizan o unen al DNA complementario y, como están marcadas con moléculas fluorescentes, permiten localizar las secuencias en las que se encuentran (Zwirgmaier, 2005; O'Donnell y Whiteley, 1999; Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995; Amann, 1995). La visualización de la sonda, que se encuentra en cada una de las células microbianas, se realiza mediante el apoyo de microscopía fluorescente ó microscopía confocal. Por ejemplo, Rothballer *et al.* (2003) utilizaron la técnica de

hibridación fluorescente *in situ* para visualizar a 2 cepas de *Azospirillum brasilense* (Sp245 y Sp7) en raíces de 3 diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum*), analizando los efectos benéficos de la inoculación de la bacteria sobre las plantas y combinando la visualización con microscopía confocal. Otro ejemplo es el reportado por Assmus *et al.*, (1995), quienes utilizaron además etiquetas fluorescentes como DAPI, principalmente para visualizar la región complementaria del 16S rRNA específica para el dominio *Bacteria*, la región 18S rRNA específica para el dominio *Eucarya*, la región 16S rRNA conservada para la subclase alfa de *Proteobacteria* y la región 23S rRNA complementaria para *Azospirillum brasilense* con el propósito de visualizar la colonización de tres cepas de *A. brasilense* (Sp7, Sp245 y Wa3) en raíces de trigo, utilizando la técnica de hibridación fluorescente *in situ* y visualizando las muestras con microscopía láser confocal.

En el caso de la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), es un método molecular que consiste en la separación de fragmentos cortos de cadenas de DNA dependiendo de su punto de desnaturización, la cual se lleva a cabo por medios químicos (agentes desnaturizantes, como urea y formamida). La electroforesis se basa en la migración de moléculas de DNA a través de geles de poliacrilamida que contienen concentraciones crecientes de agente desnaturizante. En este sentido, el punto de desnaturización aumentará ó disminuirá con el tamaño de la secuencia de nucleótidos que lo conforman, y también por la composición de nucleótidos de la secuencia, que suele aumentar con altos contenidos de Guanina (G) y Citocina (C). La técnica DGGE se ha consolidado como una herramienta útil en el campo de la ecología microbiana, generalmente por el fundamento de que a partir de la extracción de DNA de muestras naturales, el cual se segmenta en fragmentos de 16S rRNA a partir de su amplificación por

PCR, se obtiene una mezcla de productos de PCR que al separarse por medio de la electroforesis con gradiente desnaturizante, se forma un patrón de bandas; el número de bandas que aparezcan en el gel corresponde a una secuencia distinta en tamaño y composición de nucleótidos (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer *et al.*, 1996; Muyzer y Smalla, 1998). Para obtener una información detallada acerca de este perfil, cada banda que aparece en el gel es cortada, hibridizada y secuenciada. De esta manera se puede obtener información de que cada banda corresponda a un miembro microbiano de una muestra natural. Existen estudios realizados con *Azospirillum* utilizando la técnica DGGE, por ejemplo, Lerner *et al.*, (2006) observaron que el efecto de la inoculación de *Azospirillum* en *Zea mays* causa cambios morfológicos en el sistema radicular, y tales cambios pueden indirectamente afectar la comunidad microbiana de la rizósfera, la cual fue examinada a partir del uso de la técnica DGGE y por Análisis de los espacios intergénicos ribosomales automatizados (ARISA por sus siglas en inglés).

Otro tipo de herramientas similares complementarias en la identificación fenotípica de *A. brasilense* en raíz se pueden mencionar el uso de diversas técnicas inmunológicas (Bashan *et al.*, 1991a; Schloter *et al.*, 1994), microscopía electrónica de barrido (Bashan, 1986; Bashan *et al.*, 1991b; Holguín y Glick, 2003; Bacilio *et al.*, 2001), o bien microscopía electrónica de transmisión para la identificación morfológica (Levanony *et al.*, 1989; Alexandre *et al.*, 1999; Menhaz *et al.*, 2007). También se ha reportado en microorganismos el uso de tinciones fluorescentes como el Fluorescein Diacetato (FDA) (Chrzanowski *et al.*, 1984; Clarke *et al.*, 2001; Wanandy *et al.*, 2005) y marcadores moleculares como es el caso de proteínas autofluorescentes (Larrainzar *et al.*, 2005; Egener *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2002) para su identificación. Por ejemplo, Bacilio *et al.* (2004)

estudiaron la mitigación al estrés salino de *Azospirillum. lipoferum* en plantas de *Triticum aestivum* cv. Rayon, donde su identificación y colonización fue comprobada gracias a que este mutante de cepa expresa el gen *gfpmut2* que codifica una proteína fluorescente. La visualización de la bacteria así como su colonización se realizó mediante el uso de microscopía óptica fluorescente.

La tecnología de utilizar *Azospirillum* inmovilizado en polímeros es un campo que continúa en etapa experimental. Se tienen reportes donde evaluaron el uso de *Azospirillum brasilense* inmovilizado en alginato como biofertilizante en acuicultura, básicamente para fijar nitrógeno atmosférico (Tripathy y Ayyappan, 2005), inmovilizar *Azospirillum lipoferum* 137 y *Bacillus megatherium* en alginato y agar para mejorar la solubilización de fósforo (Hesham y El-Komy, 2005), y además inmovilizar *Azospirillum lipoferum* en alginato de sodio bajo un período de deshidratación para evaluar pérdida de viabilidad de la bacteria (Paul *et al.*, 1993). El uso de alginato como matriz de transporte de *Azospirillum* para utilizarse como inoculante en plantas también es un campo que se encuentra en etapa experimental. En general, la idea de inmovilizar a la bacteria en polímeros permite dos cosas: 1) una lenta liberación de los microorganismos dentro del polímero, lo cual beneficia el éxito de colonizar la raíz, y 2) protección contra microorganismos patógenos ó competitivos del suelo (Bashan, 1998). Se ha estudiado por ejemplo la inoculación de trigo con *A. brasilense* inmovilizado en alginato (Bashan, 1986), y ésta tecnología ha sido utilizada además en la inoculación de otras plantas (Bashan y Holguín, 1997); dicha tecnología ha sido mejorada con el desarrollo de un sistema que produce microesferas con *Azospirillum*, la cual es capaz de promover el crecimiento de las plantas de trigo y tomate (Bashan *et al.*, 2002). Por otro lado, Bashan *et al.* (2006) observaron que la cantidad de los

pigmentos fotosintéticos clorofila a, b, así como pigmentos fotoprotectores como violaxantina, zeaxantina, enteroxantina, luteína, neoxantina y β -caroteno de plantas de trigo aumentaron cuando fueron inoculadas con *Azospirillum brasilense* inmovilizado en microesferas de alginato, en comparación con plantas sin inocular.

Otro parámetro que se incluye en la evaluación de *Azospirillum* inmovilizado en alginato como inoculante es el reportado por Bashan y González (1999), quienes evaluaron la sobrevivencia de *Azospirillum brasilense* Cd inmovilizado en esferas de alginato por un período de 14 años, donde se observó que células de *A. brasilense* continúan viables, aún después de someterse a períodos prolongados de conservación, y además mantiene su capacidad de colonizar plantas y de producir los efectos de promoción de crecimiento, tal y como lo realizó antes de ser conservado el inoculante.

2.4. *Chlorella* y el uso de su biomasa

Chlorella es un género de microalgas verdes, unicelular, miembro de phylum Chlorophyta, es esférica, mide de 2-10 μm de diámetro y carece de flagelo (Richmond, 1986). Esta microalga ha sido utilizada como modelo biológico en el estudio de fotosíntesis (Myers, 1974), y además es cultivada y utilizada para diferentes procesos, entre los que se pueden mencionar: como aditivo para de alimento, Biosorción de metales pesados, tratamiento de aguas, obtención de productos como pigmentos, en la industria de cosméticos, obtención de biogás, producción de biodiesel, como aditivo en agricultura y biofertilizante entre otros. A continuación se describen algunos ejemplos.

2.4.1. Aditivo para alimento

Como ejemplo del uso de *Chlorella vulgaris* como aditivo para alimento, se tiene el reportado por Maruyama *et al.* (1997) quienes estudiaron la aplicación de la microalga como alimento para el rotífero *Brachionus plicatilis*, donde observaron que *C. vulgaris* presenta componentes similares a los del alga *Nannochloropsis oculata*, utilizada también como alimento del rotífero, en lo que se refiere al contenido de proteína, aminoácidos, minerales y vitaminas. Con éste perfil, los autores demostraron que *C. vulgaris* puede ser utilizado como una buena alternativa de alimento en cultivo de rotíferos.

2.4.2. Biosorción de metales pesados

Las especies de *Chlorella* son conocidas por poseer una alta capacidad de acumular metales pesados como cobre, cadmio, níquel, zinc, etc., la cual es dependiente de la concentración de biomasa. En el caso de la biosorción de metales pesados, como ejemplo se puede mencionar el reportado por Günther *et al.* (2007), quienes estudiaron la habilidad de *C. vulgaris* para acumular uranio a diferentes niveles de pH en condiciones experimentales. Además, la reducción de uranio de aguas contaminadas con este metal ha sido estudiado utilizando *Chlorella pyrenoidosa* inmovilizada en alginato de calcio (Singhal *et al.*, 2004).

2.4.3. Tratamiento de aguas

El uso de *C. vulgaris* para eliminar nitrógeno y fósforo de aguas residuales ha sido reportado en las últimas décadas (de la Noüe *et al.*, 1992) y utilizando la microalga inmovilizada en alginato también ha sido reportado (González *et al.*, 1997). Como ejemplo,

Tam y Wong (2000) estudiaron la eliminación de nitrógeno y fósforo realizada por *Chlorella vulgaris* inmovilizada en esferas de alginato, donde observaron que la microalga elimina completamente la concentración de nitrógeno (30 mg/L NH₄⁺) en 48 horas, mientras que cerca de un 95% del fósforo presente en el agua.

2.4.4. Obtención de pigmentos y otros productos

En el campo de la acuicultura, los pigmentos producidos por microalgas pueden ser utilizados para aumentar el valor comercial de un producto. Por ejemplo, Gouveia *et al.*, (1998) utilizaron a *Chlorella vulgaris* como fuente de carotenoides. Los autores observaron que al alimentar al salmón *Oncorhynchus mykiss* con *C. vulgaris*, la retención de carotenoides en su tejido muscular incrementa en comparación con la dieta basada con pigmentos comerciales. Por otro lado, Gouveia *et al.* (2006) estudiaron el uso de carotenoides obtenidos de biomasa de *C. vulgaris*. Propiedades como color y su función como antioxidantes fueron los parámetros que los autores evaluaron, con la finalidad de utilizar estos pigmentos en emulsiones como mayonesa, donde se puede obtener un mayor valor si la emulsión contiene tales propiedades.

2.4.5. Producción de biodiesel

Las aplicaciones biotecnológicas de la biomasa de microalgas ha incrementado, incluyendo la producción de biodiesel y etanol (Karakashev *et al.*, 2007). Por ejemplo, en el caso de utilizar especies de *Chlorella* para producción de biodiesel, Miao y Wu (2006) estudiaron la extracción de lípidos de *Chlorella protothecoides*, donde observaron que cultivando a la microalga en condiciones heterotróficas, la producción de lípidos alcanza

hasta un 55% de la biomasa total, en comparación de cultivos sometidos a condiciones fototróficas.

2.4.6. Aditivo en agricultura y biofertilizante

Shaaban (2001a) estudió el efecto de utilizar extractos de *C. vulgaris* en plantas de trigo (*Triticum aestivum*), y observó que tales aditivos favorecen el crecimiento de la planta, el peso seco, y aumenta hasta un 40% el peso del grano, en comparación con plantas que fueron adicionadas con fertilizante comercial. Asimismo, el mismo autor observó que el estatus nutricional y crecimiento de la raíz de plantas de maíz (*Zea mays*) mejoran cuando son adicionadas con extractos de *C. vulgaris* (Shaaban, 2001b).

2.5. Alginato, producción, usos y aplicaciones en biotecnología

El alginato es un tipo de polisacárido encontrado en gran abundancia como parte de la pared celular y material intracelular de algas pardas (Phaeophyceae). Muchos de los alginatos utilizados comercialmente son obtenidos de tres géneros de macroalgas, *Macrocystis*, *Laminaria*, y *Ascophyllum*. El alginato es además producido por dos familias de bacterias heterotróficas, la *Pseudomonadaceae* y la *Azotobacteriaceae* (Wong *et al.*, 2000). En 1881, la British Chemist E. C. C. de Stanford describe la existencia de alginato en algas pardas, como el polisacárido más abundante, abarcando cerca de un 40% de su peso seco. El alginato microbiano fue descubierto más de 80 años después, por Linker y Jones en 1964, cuando aislaron y caracterizaron parcialmente exopolisacárido de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*; posteriormente se demostró que *Azotobacter vinelandii* producía

una clase de alginato acetilado (Sabra *et al.*, 2001). El alginato tiene propiedades físicas y químicas que, como sustancia, son de interés para diversos usos y aplicaciones. Algunas propiedades como viscosidad, formación de gel y agente estabilizador hacen posible la aplicación de este polímero en la industria textil, en emulsiones y espesantes para cremas, en alimentos, papel, detergentes, biomateriales, productos farmacéuticos (Osawa *et al.*, 2005).

Las cadenas poliméricas del alginato están compuestas por dos ácidos, el ácido manurónico (M) y el ácido gularónico (G). Tales ácidos varían en proporción y en el arreglo secuencial del polímero (Yabur *et al.*, 2007) Ante ello, el alginato se puede organizar de tres formas: 1) en bloques homopoliméricos G y poliguluronato G (GGGGGGGGGGGGGGG); 2) en bloques homopoliméricos M y polimonomero M (MMMMMMMMMMMMM); y 3) bloques heteropoliméricos G/M (GMGMGMGM) los cuales pueden estar organizados al azar ya sea por secuencias GM, ó MMGG (Wong *et al.*, 2000). Los monómeros se pueden vincular por medio de iones metálicos (Meena y Raja, 2006) divalentes, como calcio, a través de los bloques de los ácidos, para formar un gel. La cantidad relativa así como la secuencia de tales monómeros depende del origen del alginato, tanto ambiental como genéticamente (Yabur *et al.*, 2007). Esta conformación dicta las propiedades del alginato, como solubilidad, viscosidad, y la habilidad para cambiar iones con metales divalentes (King, 1983).

Debido a las características anteriormente mencionadas, el alginato es el polímero más comúnmente utilizado para la encapsulación microbiana, además llamado inmovilización. Las células microbianas en la matriz pueden ser protegidas de condiciones ambientales

como pH, temperatura, solventes orgánicos, venenos y hasta de otros microorganismos (Park y Chang, 2000). Desde hace varios años el alginato ha sido utilizado y aplicado en diversos campos biotecnológicos. El alginato, por ejemplo, es utilizado en el campo médico en cirugías y como matriz de liberación controlada de medicinas o ciertos químicos (Remminghorts y Rehm, 2006); también su uso se aplica al atrapamiento de células animales, células microbianas, mitocondria, cloroplastos, protoplastos y células rojas (Park y Chang, 2000). En la Tabla II se muestran algunas de las aplicaciones comerciales del alginato (Rehm y Valla, 1997).

Tabla II: Algunas aplicaciones comerciales del alginato (Rehm y Valla, 1997).

| Aplicación | Función del alginato |
|--|--|
| Impresión textil | Fijación, color y brillo, asegurando una impresión uniforme |
| Tratamiento de papel y tablón | Mejora la uniformidad de la superficie |
| Producción de soldadura | Componente de cubierta de materiales para la soldadura, asegurando flexibilidad |
| Tratamiento de agua | Incrementa el tamaño de los agregados en el proceso de floculación |
| Enlatadora | Formación de cordones en hendiduras de tapas |
| Emulsión de latex | Concentración de latex natural durante la extracción de goma de plantas |
| Producción de cerámicas; alimento para humanos y mascotas | Reduce la tasa de secado superficial;estabilizante, adelgazante, y agente gelificante |
| Industria biotecnológica y farmacéutica | Inmovilización de células, liberación de sustancias, tratamiento osea, dermatológico, e impresiones dentales |

El alginato además ha sido utilizado en preparaciones de inoculantes como matriz de transporte, debido principalmente a su naturaleza no tóxica, su biodegradabilidad, y su lenta liberación de microorganismos en el suelo (Bashan, 1986; Bashan y Holguín, 1998). Es importante resaltar estas ventajas ya que facilitan su aplicación agronómica y ecológica. Como se mencionó anteriormente, el alginato es producido, por ejemplo, por cierto grupo de microorganismos bajo condiciones limitantes de fuentes de carbono en el ambiente como una estrategia biológica de supervivencia. Por lo tanto, estos microorganismos cuentan con mecanismos enzimáticos para utilizar el polímero (Wong *et al.*, 2000; Moen y Østgaard, 1997; Ertesvåg *et al.*, 1998); de ahí que el alginato pueda ser biodegradado de manera natural, aunque se tienen reportes de su degradación también por otros mecanismos como irradiación por rayos gamma (Hien *et al.*, 2000) y depolimerización por temperatura (Holme *et al.*, 2003).

Otras aplicaciones que tiene el alginato en el campo biotecnológico es su uso como método de preservación de diversas células. Por ejemplo, Romo y Pérez (1997) estudiaron a nivel de laboratorio el uso de esferas de alginato para almacenar a la cianobacteria *Pseudanabaena galeata*. Ellos observaron que la cianobacteria mantiene características ultraestructurales y funcionales sin un cambio significativo durante un período de 14-18 meses; asimismo, la viabilidad fue evaluada, observando que la cianobacteria no solamente continua viable después de este período inmovilizadas en alginato, sino además puede recuperarse hasta en un 93% y continuar su tasa de crecimiento; asimismo, la cantidad de C, H, N y P no mostraron cambios significativos entre células inmovilizadas y no inmovilizadas. Asimismo, también se puede mencionar que de manera experimental, se ha

observado que la aplicación de alginato en plantas de arroz promueve su crecimiento, principalmente en lo que se refiere a la raíz y la parte aérea de la planta, así como aumenta el peso seco de la planta (Hien *et al.*, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los estudios en biotecnología se han desarrollado progresivamente, y algunos de ellos ya han abarcado su aplicación para el beneficio de la sociedad. Toda biotecnología conlleva una serie de procesos que eventualmente la enriquecen; sin embargo hay partes de ella que se ven limitadas por falta de algún componente que les permita alcanzar su escalamiento. En este sentido, Es importante considerar que la aplicación de organismos biológicos, sistemas, o procesos no culmina cuando se genera un bien o servicio específico, por el contrario, se debe buscar el desarrollo de posteriores aplicaciones integrales de tales procesos. En la presente tesis se persigue demostrar una alternativa de reuso de una biotecnología que ha sido estudiada a nivel de laboratorio para el tratamiento terciario de aguas residuales domésticas, que emplea el uso de microalgas y bacterias inmovilizadas en esferas de alginato.

El reuso de las esferas de alginato con organismos inmovilizados, una vez finalizado el tratamiento del agua residual, consituye un valor agregado del sistema, lo cual lo hace “ambientalmente amigable” ya que no produce ningún tipo de contaminación secundaria, al crear reciclado eficiente de todos los elementos que la componen.

4. HIPÓTESIS

Si el sistema microalga-bacteria contiene células viables de *Azospirillum. brasilense* después de su uso en la eliminación de nitrógeno de agua, entonces podrá ser utilizado como inoculante en plantas, favoreciendo su crecimiento.

El sistema microalga-bacteria favorecerá un cambio en la cantidad de materia orgánica/carbono y en la biomasa microbiana del suelo

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la reutilización del sistema microalga-bacteria como inoculante así como su efecto al ser aplicado en suelo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer la viabilidad de *Azospirillum brasilense* Cd después de utilizarse en el sistema microalga-bacteria para la eliminación de nitrógeno de agua.

Evaluar la utilidad del sistema microalga-bacteria como inoculante a partir de la detección de *Azospirillum brasilense* en raíz y su efecto positivo en el crecimiento de la planta.

Determinar el efecto del sistema microalga-bacteria en la materia orgánica, carbono y biomasa microbiana de suelo.

6. METODOLOGÍA

La metodología se divide en 4 partes: i) Obtención del sistema microalga-bacteria; ii) Viabilidad de *Azospirillum brasilense* después de la eliminación de nitrógeno de agua; iii) Detección de *Azospirillum brasilense* en raíz y su efecto positivo en el crecimiento de la planta; y iiiii) efecto del sistema microalga-bacteria en suelo. En la Figura 1 se muestra de manera general la metodología utilizada.

6.1. *Obtención del sistema microalga-bacteria*

6.1.1. *Microorganismos, condiciones de cultivo y preparación del sistema microalga-bacteria*

Se utilizó la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805 y la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd (DMS 1843). Los microorganismos fueron cultivados por separado con la metodología descrita por de-Bashan *et al.* (2004). La inmovilización de microorganismos se realizó siguiendo la técnica descrita por de-Bashan *et al.* (2005) con la modificación de utilizar una bomba peristáltica MasterFlex® (Mod. No. 7523-30. Barnant Co, Barrington U.S.A.) para la circulación del alginato y los microorganismos, acompañada de una

manguera MasterFlex® de No. 14 y una aguja B-D (Becton Dickinson & Co.) con un diámetro de 21 G x 32 mm (0.080 mm x 1 ¼'') para realizar las esferas.

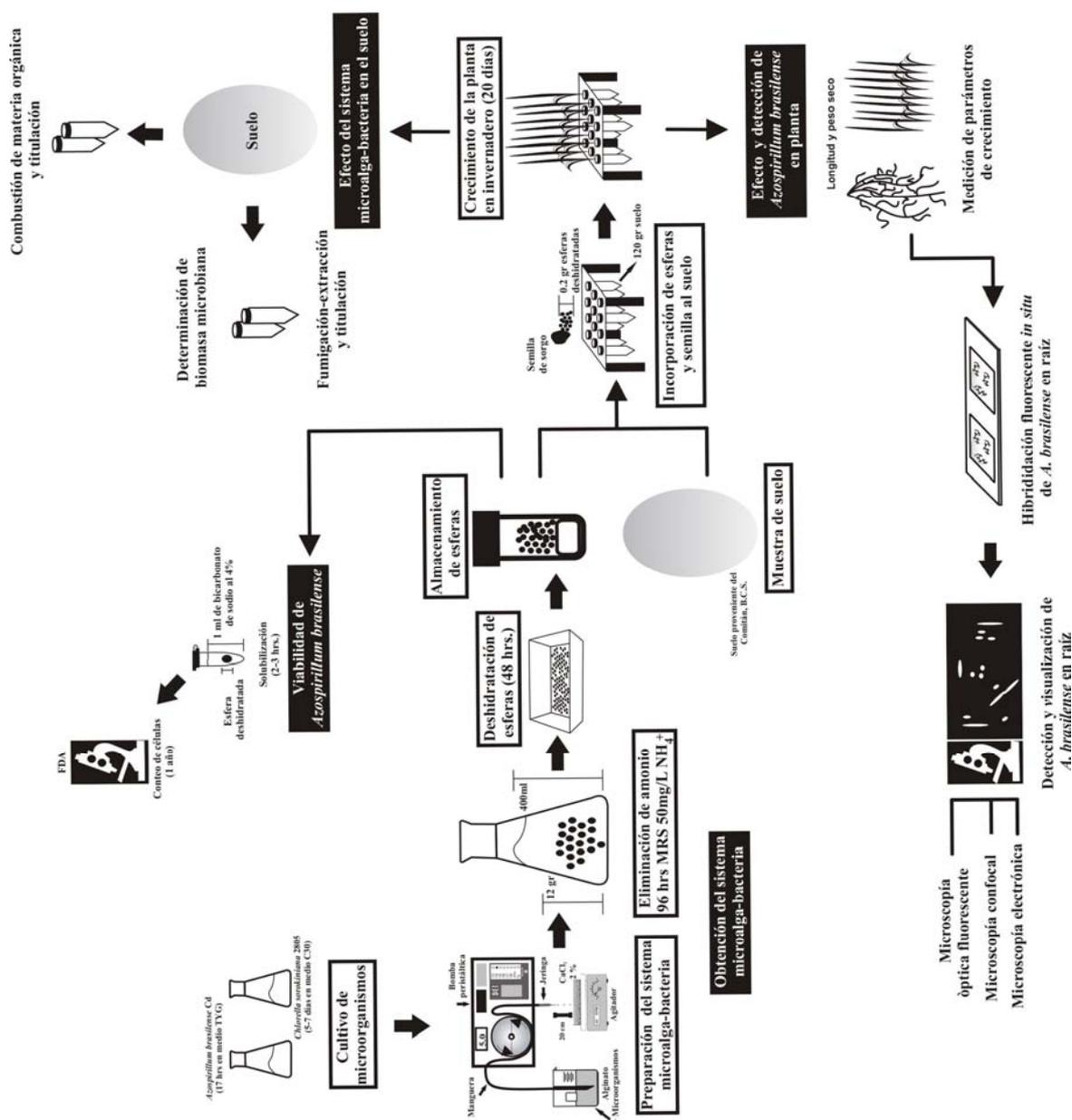


Figura 1. Metodología general

Para simular la eliminación de nitrógeno de agua Las esferas se dejaron durante 96 horas en medio residual sintético (MRS) a una concentración de 50 mg/L de NH_4^+ en matraces de 1 L.

6.1.2. Deshidratación del sistema microalga-bacteria

Una vez finalizada la eliminación de nitrógeno de agua, la cantidad total de esferas (20 g por matraz) fueron retiradas del medio, se lavaron 2-3 veces con solución salina estéril al 0.85% y se colocaron en charolas de aluminio, cubriendo toda la su superficie, para lograr su deshidratación. Se evaluaron dos opciones para deshidratar al sistema microalga-bacteria: 1) secado en horno a 40-43 °C durante 24 hrs, y 2) dentro de una campana de flujo laminar a 28-30°C durante 48 hrs. Una vez completada la deshidratación, las esferas se almacenaron herméticamente en pequeños frascos de 5 mL.

6.2. Viabilidad de *Azospirillum brasilense* después de la eliminación de nitrógeno de agua

*6.2.1. Cuantificación de células de *Azospirillum brasilense**

Después de la deshidratación de las esferas, se llevó a cabo el conteo directo de células de *A. brasilense* mediante tinción de Fluoroscein diacetato (FDA, por sus siglas en ingles) (Chrzanowski *et al.*, 1984), para lo cual, se disolvieron esferas en una solución de bicarbonato de sodio al 2% (1 esfera en 1 mL de bicarbonato de sodio) durante dos horas con agitación constante; después 500µL de esta solución fueron ocupados. Dicho volumen se homogenizó nuevamente con vortex durante 1-2 minutos 3 veces, y después se centrifugó a 12,800 *G* durante 3-5 minutos. Después de este tiempo el sobrenadante fue

retirado y se agregaron 50 μ L de una solución de trabajo compuesta de Fluorescein diacetato (20 mg de FDA en 10 mL de acetona, a 4°C) y Buffer de fosfato (KH₂PO₄ y K₂HPO₄: pH 7.2) relación FDA/Buffer: 1:10; esta solución se mezcló con el botón celular utilizando un vortex y posteriormente se dejó reposar durante 5 minutos. Después de este tiempo se centrifugó nuevamente la muestra para retirar la solución. El botón celular se resuspendió en 500 μ L de Buffer de fosfato y se mezcló con vortex. Finalmente, 20 μ L de la muestra fueron retirados para agregarse en un portaobjetos. La muestra se cubrió con un cubreobjetos para posteriormente realizar el conteo de células con el apoyo de un microscopio óptico de epifluorescencia (OLYMPUS BX41) y se utilizó además un lente de inmersión en aceite con una magnificación de 100x. La fluorescencia emitida se logró detectar con un filtro verde (FITC) el cual tiene un rango de de excitación de luz de 460-490nm y un máximo de emisión de luz de 520IF. Se capturaron imágenes con cámara digital (Evolution VF) integrada al microscopio, y las micrografías se procesaron con el apoyo de un analizador de imágenes (Image Pro Plus 6.3.1.542).

Los conteos de *A. brasilense* se realizaron eventualmente durante 12 meses, aplicando el conteo de células de aquellas esferas en almacenamiento, utilizando en todas ellas la tinción con FDA. Como comprobación complementaria, se hizo conteo en placa para contar las unidades formadoras de colonias (UFC) y para descartar problemas de contaminación.

6.3. Detección de *Azospirillum brasilense* en raíz y su efecto positivo en el crecimiento de la planta

6.3.1. Incorporación del sistema microalga-bacteria a suelo y planta

6.3.1.1.- Características del suelo

Se utilizó como modelo suelo procedente de la zona del Comitán, a 17 km al noreste de la Paz, Baja California Sur, México (24°100'N; 110°200'W). Las características físicas están descritas por Bashan *et al.* (2000). La zona donde se extrajo el suelo se caracteriza por haber sido parcialmente desmontada de vegetación desde el año 1973 para propósitos de desarrollo residencial, sin embargo se abandonó la zona y desde entonces permanece abandonada, dejando pocos árboles de mesquite y cardones (*P. pringlei*) (Bashan *et al.*, 2000). Debido a esto, la zona tiene muy bajo contenido y aportación de materia orgánica. El clima en esa zona es árido con una precipitación promedio anual de 180mm, principalmente después de verano. La temperatura promedio oscila entre 18 y 30 °C, pero durante la mitad del verano la temperatura frecuentemente excede los 40 °C (Carrillo-García *et al.*, 2000a; b). La colecta del suelo se realizó en un área de muestra de 3 m² y se retiró suelo a una profundidad no mayor de 30 cm. Posteriormente el suelo fue tamizado (>2mm) agregado en macetas de 120 g. Para este trabajo se midió la capacidad de campo, pH, materia orgánica, carbono orgánico y biomasa microbiana.

6.3.1.2. Desinfección de semillas, pre-germinado y siembra de semillas

Semillas de sorgo (*Sorghum bicolor*) fueron desinfectadas con Tween 20 al 2% durante 10 minutos e hipoclorito de sodio al 4% durante 5 minutos, resuspendiéndose después en agua destilada estéril durante dos horas en condiciones estériles. Se

mantuvieron dentro de una campana de flujo laminar durante todo el proceso de desinfección.

Para el proceso de siembra, una semilla fue colocada en macetas que contenían 120 g de suelo. En cada maceta se formó un hoyo en el suelo y se agregaron 0.1 g de esferas deshidratadas, se añadió la semilla y finalmente se agregó nuevamente 0.1 g de esferas, para después tapar suavemente todo con suelo. La cantidad total de esferas utilizadas como inoculante es de 0.2 g por semilla, que contienen aproximadamente $1-3 \times 10^5$ cel/esfera, de acuerdo con los resultados de conteos de células con FDA y conteo de CFU en placa. Posteriormente las macetas con semillas se mantuvieron en invernadero a 28-30 °C, donde se sometieron a condiciones de oscuridad durante 2-3 días para estimular su germinación (pre-germinación). Al finalizar esta etapa, las plántulas dentro de las macetas fueron regadas con 38.5 mL de agua destilada estéril cada 3 días de acuerdo a la capacidad de campo del suelo previamente establecido. El crecimiento de las plantas se llevó a cabo durante 20 días, para posteriormente realizar los análisis correspondientes. Se monitoreó además la degradación de las esferas en las macetas durante dicho período, corroborándolo con el siguiente índice (Bashan *et al.*, 2002): 0= esferas no degradadas; 1= poca degradación con pequeñas hoyos y deformaciones en la estructura de la esfera; y 2= degradación de la esfera completa.

6.3.2. Evaluación de parámetros de crecimiento de sorgo

La longitud y el peso seco fueron monitoreados hasta los 20 días de crecimiento de la planta. Las mediciones de la parte aérea y la raíz se realizaron al final del experimento. Asimismo, después de 20 días, la parte aérea y la raíz fueron almacenadas en bolsas de

papel glassine, y se mantuvieron en horno a 40-70°C durante 48 horas, para posteriormente medir el peso seco con el empleo de una balanza analítica (OHAUS PIONEER). Tanto la cuantificación y viabilidad de *A. brasilense*, la obtención del sistema microalga-bacteria y el experimento de incorporación del sistema microalga-bacteria a suelo y planta se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR, México.

6.3.3. Detección y visualización de Azospirillum brasilense en raíces de sorgo

Después de 20 días, las raíces de sorgo fueron colectadas retirando cuidadosamente la planta de la maceta. Se utilizó agua destilada estéril para retirar la tierra adherida a las raíces. Posteriormente se separó la parte aérea de la raíz; de esta manera cada parte se utilizaría para posteriores evaluaciones. La detección de *A. brasilense* en raíz se llevó a cabo de 2 formas: 1) mediante la realización de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés) (Rothballer *et al.*, 2003) y el uso de dos tipos de microscopía, óptica fluorescente y laser confocal, y 2) mediante el uso de microscopía electrónica de barrido. En el caso de la raíz, las muestras se dividieron en aquellas para la detección de *A. brasilense* por FISH, microscopía electrónica de barrido y muestras para la determinación de peso seco.

6.3.4. Detección de Azospirillum brasilense en raíz por Hibridación fluorescente in situ

Las raíces utilizadas para la detección de *A. brasilense* utilizando microscopía óptica fluorescente y microscopía laser confocal fueron lavadas con agua destilada estéril y

después con 1X PBS para después realizar el procedimiento de la técnica de Hibridación fluorescente *in situ* (Rothballer *et al.*, 2003; Daims *et al.*, 2005):

Fijación: Una vez lavadas las raíces con 1x PBS, fueron resuspendidas en 1 mL de PFA al 4% en frío, y se dejaron en incubación a 4 °C por 3 horas como mínimo. Las muestras que se encontraban en refrigeración se lavaron 3 veces con 1x PBS para eliminar el PFA, luego se resuspendieron en una mezcla de etanol al 90% y 1x PBS en proporción 1:1. Las raíces se almacenaron en congelador a -20°C hasta su posterior análisis.

Selección de muestras de raíz: De toda la raíz, se seleccionaron tres zonas para llevar a cabo la hibridación: 1) la zona de la cofia, 2) la zona de pelos radicales, y 3) la zona de elongación de raíces (Rothballer *et al.*, 2003). Una vez seleccionadas las zonas, se cortaron muestras con una longitud de 1cm aproximadamente, las cuales fueron adheridas a portaobjetos de vidrio con agarosa al 2%. Las laminillas fueron previamente preparadas y limpiadas y con una solución de KOH etanólico, y cubiertas con una solución de gelatina (0.1 % p/v de gelatina y 0.01% p/v de sulfato crómico de potasio).

Deshidratación: Las raíces se deshidrataron usando tres concentraciones de etanol: 50, 80 y 96 % subsecuentemente, y se dejaron por tres minutos en cada solución de etanol. Una vez culminado este tiempo, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20-30 minutos.

Hibridación: A las muestras deshidratadas se agregaron 3 tipos de sondas, la sonda EUB338 con especificidad para *Bacteria* (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT- 3') (posición 16S, 338-355), la sonda AZO 440a (5'-GTCATCATCGTCGCGTGC- 3') (posición 16S, 440-457) con especificidad para *Azospirillum* spp. y la sonda Abras 1420 con especificidad para *Azospirillum brasilense* (5'-CCACCTTCGGGTAAAGCCA- 3')

(16S, 1420-1438) (Stoffels *et al.*, 2001). 4 μL de sonda se mezclaron con 40 μL de buffer de hibridación (Tabla III) y se agregaron a la muestra. Una vez finalizado el proceso, las muestras fueron puestas en tubos de 50 ml que contenían papel secante, y se llevaron a una cámara de hibridización VWR (Modelo 5430) por 1.5-3 horas a una temperatura de 46°C.

Tabla III Composición de buffer de lavado y buffer de hibridación. (El porcentaje mostrado en la parte superior de la tabla indica la concentración de formamida correspondiente en el buffer).

| % formamida | 35% | |
|---------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | Buffer de hibridación | Buffer de lavado |
| 5M NaCl | 360 | 700 |
| 1M Tris-HCl | 40 | 1 |
| 0,5 M EDTA, pH 8,0 | - | 0,50 |
| Formamida | 900 | - |
| 10% SDS | 2 | 0,050 |
| ddH₂O | 900 | Completar a 50 |
| Volúmen | μL | ml |

Lavado de la hibridización: Después de mantener las muestras en la cámara de hibridización, las laminillas fueron lavadas con un buffer de lavado (Tabla III, preparando 50 ml de buffer por muestra) el cual se calentó previamente en baño maría a 48°C. Fue necesario dejar las laminillas sumergidas en el buffer de lavado durante 10 minutos. Posteriormente, se detuvo la hibridización agregando a las laminillas agua desionizada a una temperatura de 4°C; después las laminillas se secaron y se guardaron en una caja hermética para almacenarse en congelador a -20°C hasta su posterior uso. Previo a su observación en el microscopio, se adicionó una gota de protector de fluorescencia Citrifluor AF-1 (Electron Microscopy Sciences, Hattfield, PA), tanto para la observación en

microscopio óptico de epifluorescencia como en el microscopio láser confocal. Cabe mencionar que las muestras que fueron visualizadas utilizando microscopía óptica epifluorescente sólo se les agregó la sonda AZO 440a con especificidad para *Azospirillum* spp., mientras que a las muestras visualizadas con microscopía láser confocal fueron agregadas la sonda EUB338 con especificidad para *Bacteria*, la sonda AZO 440a con especificidad para *Azospirillum* spp. y la sonda Abras 1420 con especificidad para *Azospirillum brasilense*.

6.3.5. Detección de Azospirillum brasilense en raíz por Microscopía óptica fluorescente

La detección de *A. brasilense* en las muestras de raíz se llevó a cabo empleando un microscopio óptico de epifluorescencia (OLYMPUS BX41), realizando la observación con un lente de inmersión en aceite con una magnificación de 100x. La fluorescencia fue detectada por un canal o filtro de los tres que componen el microscopio: (CY3) con un rango máximo de excitación de luz de 552nm y un rango máximo de emisión de luz de 565 nm, que manifiesta la fluorescencia detectada en color rojo. Asimismo se capturaron imágenes con cámara digital (Evolution VF) integrada al microscopio, y las micrográficas se procesaron con el apoyo de un analizador de imágenes (Image Pro Plus 6.3.1.542), las cuales sirvieron como evidencia de la colonización de la bacteria en la raíz de sorgo.

Se realizaron observaciones en las siguientes secciones: i) zona apical de la raíz; ii) zona de elongación; y iii) raíces laterales. El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR, México.

6.3.6. Detección de *Azospirillum brasilense* en raíz por Microscopía láser confocal

La detección de *A. brasilense* en las muestras de raíz se llevó a cabo empleando un microscopio laser confocal (Zeiss LSM 510, Jena, Germany) (argon ion y helium neon laser), con un rango de excitación de 488, 543 y 633 nm que corresponde a los filtros FLUOS, CY3 y CY5, respectivamente. Se utilizó además un lente de inmersión en agua con una magnificación de 63x.

La fluorescencia fue detectada por tres canales o filtros que componen el microscopio: el filtro FLUOS que manifiesta la fluorescencia detectada en color verde, el filtro CY5 que manifiesta la fluorescencia detectada en color azul, y el filtro CY3 que manifiesta la fluorescencia detectada en color rojo. Esta característica permite conocer y diferenciar la fluorescencia que detecta el microscopio laser confocal y que corresponde, ya sea a la fluorescencia emitida por la sonda utilizada en la hibridación (*Bacteria*, *Azospirillum* spp. y *Azospirillum brasilense*) o la autofluorescencia emitida por la raíz de sorgo. Para el caso de la sonda para *Bacteria*, la fluorescencia que detectó el microscopio laser confocal es de color rojo, mientras que en el caso de la sonda para *Azospirillum* spp. y *Azospirillum brasilense*, la fluorescencia que se detecta es de color azul. Asimismo, la autofluorescencia detectada en color verde corresponde a la fluorescencia emitida por la raíz. De esta manera se obtuvieron imágenes de dos tipos: 1) imágenes de la fluorescencia detectada por el microscopio por división de canales (canal CY3, CY5 y FLUOS), y 2) imágenes de la fluorescencia detectada por el microscopio a partir de la sobreposición de los canales.

Para almacenar las imágenes escaneadas en el microscopio, se ocupó un analizador de imágenes (LSM 5 IMAGEN BROWSER). De esta manera se capturaron micrografías de

la fluorescencia detectada por el microscopio. Asimismo se tomaron animaciones en 3D que muestran la detección de *A. brasilense* en la raíz.

Se realizaron observaciones en las siguientes secciones: i) zona apical de la raíz; ii) zona de elongación; y iii) extremo superior de la zona apical (1 cm después de la zona apical). El análisis se llevó a cabo en el Department of Plant-Microbe Interactions del Helmholtz Centre, German Research Centre for Environmental Health, Alemania.

6.3.7. Detección de *Azospirillum brasilense* en raíz por Microscopía electrónica de barrido

Se utilizó además microscopía electrónica para establecer la detección de *A. brasilense* en raíz, para lo cual se utilizó un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-3000N). Se analizaron tres diferentes tipos de muestras: set 1): muestras de raíz de sorgo utilizadas inicialmente para observación en microscopio láser confocal. Las muestras se encontraban fijadas con PFA/etanol y fueron adheridas a la superficie del portaobjetos utilizando agarosa al 2%. Posteriormente fueron deshidratadas con etanol al 50, 80 y 96%. Las muestras se ocuparon para realizar Hibridación fluorescente *in situ* y después llevar a cabo la visualización de bacteria utilizando un microscopio láser confocal. Una vez finalizada la visualización, fueron lavadas con agua desionizada y mantenidas en refrigeración a 4°C hasta su uso en microscopía electrónica; set 2): muestras de raíz de sorgo de los experimentos que no se les realizó Hibridación fluorescente *in situ*. Las muestras fueron fijadas con PFA/etanol y fueron adheridas a la superficie del portaobjetos utilizando agarosa al 2%. Posteriormente fueron deshidratadas con etanol al 50, 80 y 96%. A estas muestras no se les realizó FISH y no fueron visualizadas con microscopio confocal;

set 3): muestras de raíz de sorgo del experimento, las cuales al finalizar el tiempo de crecimiento de las plantas en invernadero, fueron retiradas del suelo, eliminando el suelo adherido y posteriormente fueron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su uso en microscopía electrónica.

En cada uno de los sets analizados se tomaron micrografías obtenidas con el software Quartz PCI (V 5.5). En los tres tipos de muestras de raíz se realizaron observaciones en las siguientes secciones: i) zona apical de la raíz; ii) zona de elongación; 3) extremo superior de la zona apical (1 cm después de la zona apical). Las muestras fueron observadas en el laboratorio de Microscopía electrónica del CIBNOR, México.

6.4. Efecto del sistema microalga-bacteria en el suelo

6.4.1. Determinación de materia orgánica y carbono en suelo

Después de los 20 días en invernadero, se retiraron muestras de suelo de las macetas, y una parte fue utilizado para la determinación de materia orgánica y carbono por el método de Walkey y Black, tal como se describe en la NOM-021 (NOM-021-RECNAC, 2002). En resumen, se pesó 0.5 g de suelo y se colocó en matraz erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente se agregó 5 mL de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_4$) 1N y después se agregó 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. La muestra se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos. Pasando este tiempo, se agregó 100 mL de agua destilada y 5 mL de ácido fosfórico. Una vez terminado este procedimiento se llevó a cabo una titulación con sulfato ferroso ($FeSO_4$) 0.5N (hasta que cambia la coloración de la muestra a verde esmeralda). Para ello además fueron agregadas a la muestra 5 gotas de indicador bariosulfonato de difenilamina.

Los cálculos para conocer el porcentaje de materia orgánica en el suelo fueron los siguientes:

$$\% \text{ de M.O.} = \frac{5 - (\text{ml de FeSO}_4 \text{ (N real)})}{\text{peso de la muestra (g)}} \cdot 0.69$$

donde:

5 = mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ agregados

N = Normalidad real del FeSO_4

0.69 = Constante

$$\text{N real} = \frac{10}{\text{ml de FeSO}_4 \text{ (gastados en el blanco)}} (0.5)$$

Donde:

10 = Volumen teórico del FeSO_4 , utilizado en el blanco

0.5 = Normalidad teórica del FeSO_4

Asimismo, para la determinación de carbono orgánico en el suelo se llevó a cabo la siguiente operación:

$$\% \text{ C} = \% \text{ M.O.} / 1.724 \quad \text{ó} \quad \% \text{ C} = \% \text{ M.O.} (0.58)$$

Se utilizó además una guía para la interpretación de los resultados de materia orgánica y carbón orgánico en el suelo, la cual se muestra en la Tabla IV:

Tabla IV. Guía para la interpretación de los resultados de materia orgánica y carbón orgánico en el suelo (NOM-021 RECNAC, 2002).

| MATERIA ORGÁNICA (%) | CARBÓN ORGÁNICO (%) | CLASIFICACIÓN |
|----------------------|---------------------|---------------|
| < 0.60 | < 0.35 | MUY BAJO |
| 0.60 - 1.80 | 0.35 - 1.05 | BAJO |
| 1.81 - 3.50 | 1.05 - 2.30 | MEDIANO |
| 3.50 - 6.0 | 2.31 - 3.50 | ALTO |
| > 0.60 | > 3.50 | MUY ALTO |

Los porcentajes de materia orgánica y carbono orgánico fueron posteriormente convertidos a mg/kg suelo x 10³.

El análisis de materia orgánica se llevó a cabo en el Laboratorio de Edafología del CIBNOR, México.

6.4.2. Determinación de biomasa microbiana del suelo

La biomasa microbiana se determinó por el método de fumigación-extracción descrito por Vance *et al.*, (1987) y Joergensen y Brookes (2005). En esta determinación, se utilizan dos métodos: Fumigación-extracción y oxidación de dicromato. En resumen, después de 20 días de duración del experimento, 25 g de suelo se mezclaron con 100 mL de solución 0,5M K₂SO₄ y se agitaron por 30 minutos a 200 rpm. Las muestras fueron fumigadas utilizando un desecador, donde las muestras se sometieron a una atmósfera con 25mL de cloroformo libre de etanol. En el desecador además se agregó cal sodada (soda

lime en inglés) y un pañuelo húmedo. El cloroformo debe de hervir para poder formar la atmósfera dentro del desecador, para lo cual fue necesario incluir perlas de borosilicato al cloroformo calentadas previamente. Una vez que se comienza a evaporar el cloroformo, se retira el aire dentro del desecador, para que se forme el vacío y con ello el funcionamiento de la atmósfera de cloroformo. El desecador posteriormente fue incubado en oscuridad durante 24 hrs a 25°C. Al concluir el tiempo de incubación, el cloroformo fue removido de las muestras. Finalmente, el extracto que se formó es filtrado con papel watman 41 y se almacenó en tubos a una temperatura de -20°C hasta su posterior análisis. En el método de fumigación-extracción es necesario tener como control muestras de suelo no fumigadas. Para ello se realizó el método anteriormente descrito, pero sin adicionar el cloroformo en el desecador.

Para el método de oxidación de dicromato (Joergensen y Brookes, 2005) se descongeló el extracto generado de la fumigación con cloroformo. Posteriormente, 8 mL fueron agregados a matraces de 250 mL; además se adicionaron 2 mL de dicromato de potasio 0.4N ($K_2Cr_2O_7$) y 15 mL de una mezcla de digestión, la cual está elaborada con dos partes de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y una parte de ácido fosfórico (H_3PO_4) (v/v). La mezcla fue calentada a 150°C durante 30 minutos y después se dejó reposar a temperatura ambiente, para agregar 25 mL de agua destilada. La muestra se dejó nuevamente a reposar hasta enfriarse. Finalmente se realizó una titulación con la muestra a partir del uso de una solución de tritación (40 mM de sulfato de amonio hierro II $[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \times 6H_2O]$, disolver en agua destilada y agregar 20 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4), aforar hasta 1L con agua destilada), donde además en la muestra fueron agregadas 5 gotas de una solución indicadora ferrantrolina (0.1% Aldrich (Milwaukee) solución de ferroina (1,10-

phenanthroline-iron II sulfate complex)). El viraje de la muestra al realizar la titulación debe de ser de violeta a verde oscuro. Para tener preliminares del método de oxidación de dicromato, fue necesario realizar diversas pruebas en el laboratorio que no incluyeron muestras del experimento, para reducir el riesgo al desperdicio de muestras. Para ello se utilizó una muestra con una concentración de C conocida. Una vez establecida la técnica, se procedió a trabajar con las muestras del experimento.

La estimación de carbono de la biomasa microbiana se realizó con la siguiente operación (Joergensen y Brookes, 2005):

$$C(\mu\text{g/g suelo}) = \frac{(HB - S) \times N \times E \times VD \times (VK + SW) \times 1000}{CB \times VS \times DM}$$

Donde:

HB: Consumo de solución de tritación en el blanco a calor (mL)

S: Consumo de la solución de tritación de la muestra (mL)

N: Normalidad de la solución del dicromato (0.4)

E: 3; Conversión de Cr (+VI) a Cr (+III) asumiendo a todo el carbono orgánico en porcentaje como [C(0)]

VD: Volumen agregado de dicromato (mL)(2mL)

VS: Volumen agregado de la muestra (mL) (8 mL)

VK: Volumen del sulfato de potasio (mL) (100 mL)

CB: Consumo de solución de tritación del blanco en frío (mL)

SW: Cantidad total de agua en la muestra de suelo (g)

DM: Masa total de la muestra de suelo (g) (25 g)

El cálculo final del carbono de biomasa microbiana se hace con la siguiente ecuación:

$$C \text{ de Biomasa} = EC / kEC$$

Donde:

EC (Extracto de c orgánico de suelo fumigado) – (Extractos de C orgánico de suelo no fumigado)

$kEC = 0.38$, constante (Vance *et al.* 1987).

La cantidad de carbono microbiano fue posteriormente convertido a mg/kg suelo $\times 10^3$.

6.5. Diseño experimental

Para la eliminación de amonio de agua, se prepararon 12 g de esferas con microorganismos inmovilizados y se resuspendieron en 300 mL de MRS durante 96 hrs. Los cultivos se llevaron a cabo en lote por cuadruplicado, donde cada matraz equivale a una réplica, y se repitió 3 veces el cultivo. Para la viabilidad y cuantificación de *A. brasilense* después de la eliminación de amonio realizando tinción con FDA, se disolvieron 2 esferas al azar de cada matraz y de cada una se realizaban 10 conteos en el campo del microscopio. Se utilizó como control el conteo de células en esferas sin deshidratar para las dos técnicas

de conteo y se registró que las esferas no estuvieran contaminadas al disolver esferas y realizar conteo de CFU por placa. Los conteos fueron hechos en esferas deshidratadas durante los siguientes lapsos: 1 día, 5 días, 15 días, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses.

Para llevar a cabo los 2 objetivos siguientes, se realizó un experimento utilizando semillas de sorgo en macetas que contenían 120 g de suelo. El experimento tuvo una duración de 60 días y se conformó por 6 tratamientos (para un mejor entendimiento, cada tratamiento es representado por una clave):

- i) Tratamiento con el sistema microalga-bacteria (**COIN**)
- ii) Tratamiento con *Azospirillum brasilense* inmovilizado (**AZO**)
- iii) Tratamiento con planta (**PL**)
- iv) Tratamiento con *Chlorella sorokiniana* inmovilizada (**CHLO**)
- v) Tratamiento con esferas sin microorganismos (**ALG**)
- vi) Tratamiento sin esferas y sin planta (**CONTROL**)

Al inicio del experimento, se agregaron esferas y plantas al suelo, dependiendo del tipo de tratamiento. Después de 20 días, cada tratamiento se retiraba planta o suelo para realizar los diversos análisis, todo ello en las proporciones anteriormente descritas. Posteriormente, se volvió a agregar esferas y plantas al mismo suelo. Esta estrategia se llevó a cabo 3 veces, considerando como un ciclo a la acción de agregar esferas y planta en el mismo suelo, por lo que en el experimento se llevaron a cabo 3 ciclos (Figura 2).

Para evaluación de los parámetros de crecimiento se utilizaron 10 réplicas en cada tratamiento, y se utilizaron 0.2 g de esferas deshidratadas como inoculante en cada una de las plantas de sorgo. Para la detección de *A. brasilense* en raíz por FISH, se utilizaron 10 réplicas en cada tratamiento, y la hibridización se llevó a cabo en cada una de las zonas seleccionadas (zona de la cofia, zona de pelos radicales y zona de elongación radicular) considerando a tales zonas como una réplica de cada raíz. Para la visualización de *A. brasilense* en raíz utilizando microscopía óptica fluorescente y microscopía láser confocal, se utilizaron secciones de raíz de los tratamientos COIN y AZO de cada uno de los tres ciclos. En el caso de la microscopía electrónica, las muestras utilizadas fueron únicamente de secciones de raíces del ciclo 3 de los tratamientos COIN y AZO, respectivamente.

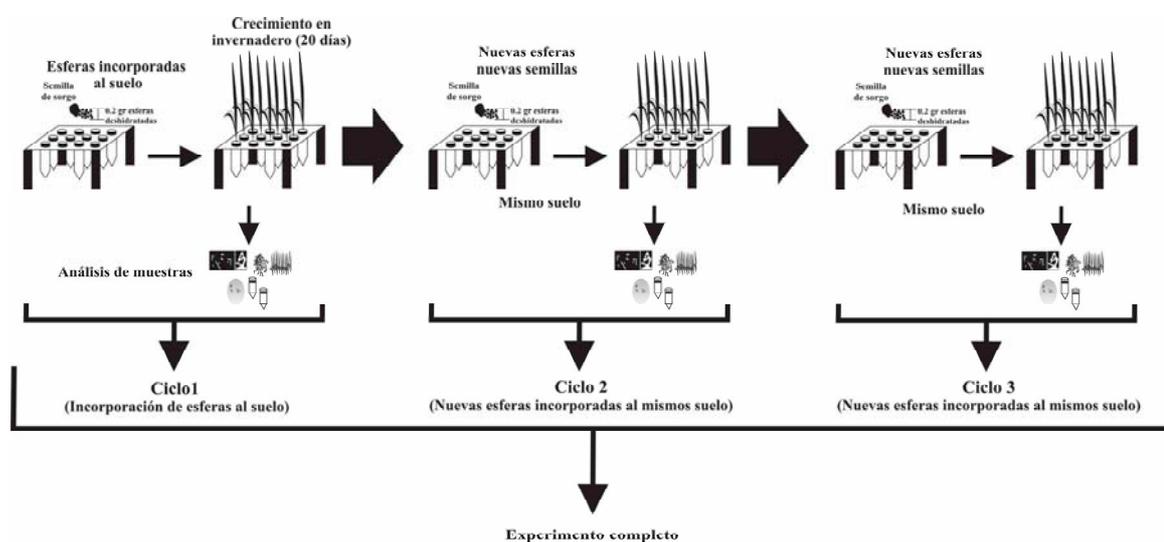


Figura 2. Incorporación de esferas en el mismo suelo durante tres ciclos.

Para la determinación de materia orgánica y carbono del suelo, se utilizaron 5 réplicas de cada uno de los tratamientos, incluyendo dos controles (glucosa y suelo

estandar) y el análisis se repitió dos veces. Debido a que el análisis de C microbiano utiliza una cantidad de suelo considerable, no fue posible hacerlo en cada uno de los 3 ciclos, sino únicamente al finalizar el experimento. De esta manera se utilizaron 6 réplicas de suelo de cada tratamiento, incluyendo la muestra de suelo no fumigado, y el análisis se repitió 3 veces.

6.6. Análisis estadístico

Para cada resultado, es decir, para la cuantificación *A. brasilense*, determinación de parámetros de crecimiento (longitud de raíz, longitud de parte aérea, peso seco de raíz y peso seco de la parte aérea) de la planta, análisis de materia orgánica de suelo y determinación de biomasa microbiana de suelo, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ y una prueba de Tukey *a Posteriori*. Para ello se utilizó el software ESTATISTICA 6.0 de Windows, mientras que para la realización de las gráficas se utilizó el programa SIGMA PLOT 10.0. En los resultados se presenta el promedio y se agregó el error estándar.

7. RESULTADOS

7.1. Deshidratación y almacenamiento del sistema microalga-bacteria

La deshidratación por secado en horno a 40-43 °C se completa a las 24 hrs, mientras que en el secado en campana en 28-30 °C, completándose la deshidratación después de 48 hrs (Figura 3). En cada deshidratación, las esferas reducen su tamaño hasta un 90% de su

tamaño actual (3mm) (Figura 4, a-c), provocado por la liberación del agua de la esfera, la cual representa un mayor porcentaje de su tamaño. Además se observó que en los dos tipos de deshidratación las esferas presentan una forma distinta. En el caso de la deshidratación en horno, las esferas presentan una forma plana y en ocasiones irregular (Figura 3, a); también en algunos casos se forma una membrana entre las esferas, debido a que se adhieren entre ellas y a la superficie de la charola, motivo por el cual fue necesario utilizar una cuchara de plástico para retirar las esferas de la charola; esto ocasiona que cierta parte de las esferas no puedan ser desprendidas. En el caso de la deshidratación a 28-30 °C las esferas presentan una forma irregular, generalmente circular, y a esta temperatura las esferas no son adheridas entre si, y además es fácil retirarlas de la charola (Figura 3, b).

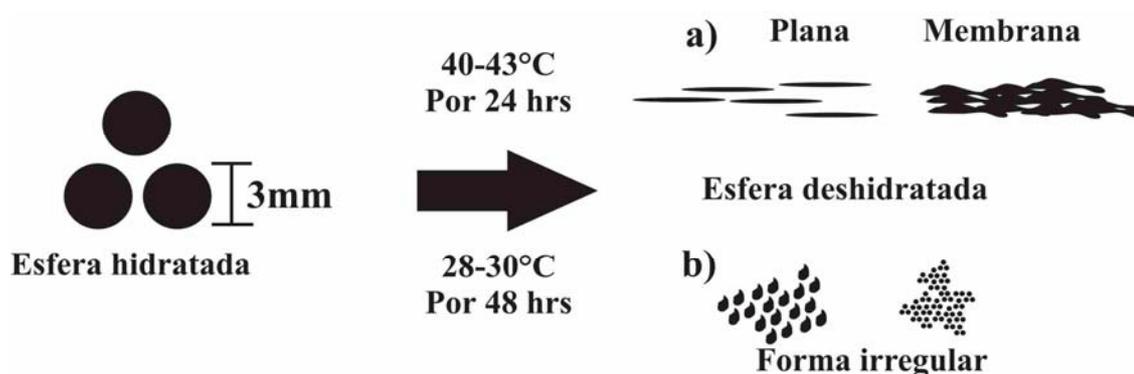


Figura 3. Representación de la deshidratación del sistema microalga-bacteria. a) Secado a 40-43°C por 24 hrs, forma plana y en membrana de las esferas, b) secado a 28-30°C por 48 hrs, forma irregular ó circular de las esferas.

Por otro lado, el almacenamiento de las esferas se llevó a cabo durante 12 meses, durante los cuales se realizaron conteos eventuales de las esferas en 5 días, 15 días 2, 3, 6, 9 y 12 meses. El almacenamiento fue a 28-30 °C en pequeños frascos transparentes no mayor

a 5 cm, en los cuales se les agregó silica-gel (Figura 4, d). Cada lote de esferas fue agregado a un distinto frasco. Con base en tales resultados, el almacenamiento del sistema microalga-bacteria y para los conteos de células de *A. brasilense* se seleccionó la deshidratación a 28-30 °C, ya que las esferas únicamente reducen su tamaño, sin tener otra alteración física ó que se manifieste en adhesión entre las esferas, aunque cabe mencionar que la forma irregular que toma la esfera es permanente hasta que se disuelve.

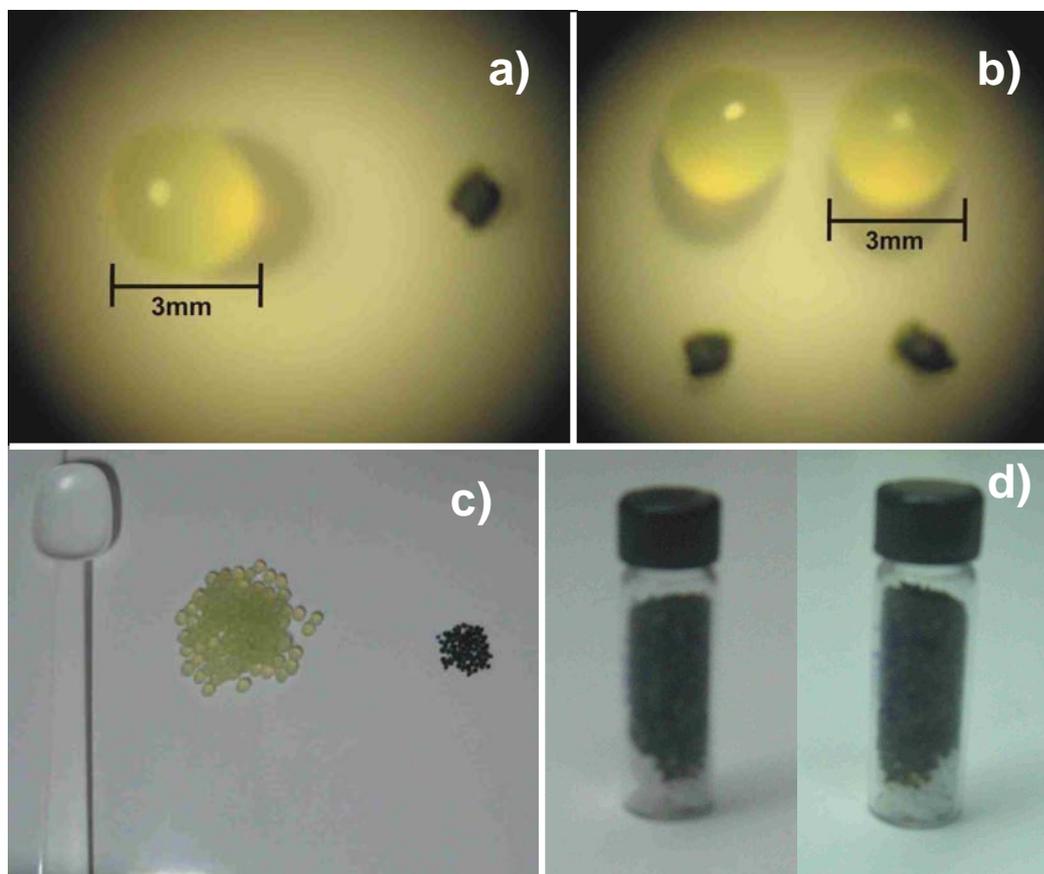


Figura 4. Presentación de esferas hidratadas y deshidratadas. a) Comparación de 1 esfera hidratada vs deshidratada; b) comparación de tamaño de 4g de esferas antes y después de deshidratarse, y c) tamaño homogéneo de esferas.

7.2 Cuantificación de células viables de *Azospirillum brasilense* a través del tiempo

En la Figura 5 se muestra el número de células/esfera de *Azospirillum brasilense* obtenidas por la técnica de tinción con FDA para un período de 12 meses. La Figura 5 muestra el número de células desde el primer día de deshidratación (conteo inicial) hasta el último que fue después de 12 meses (conteo final).

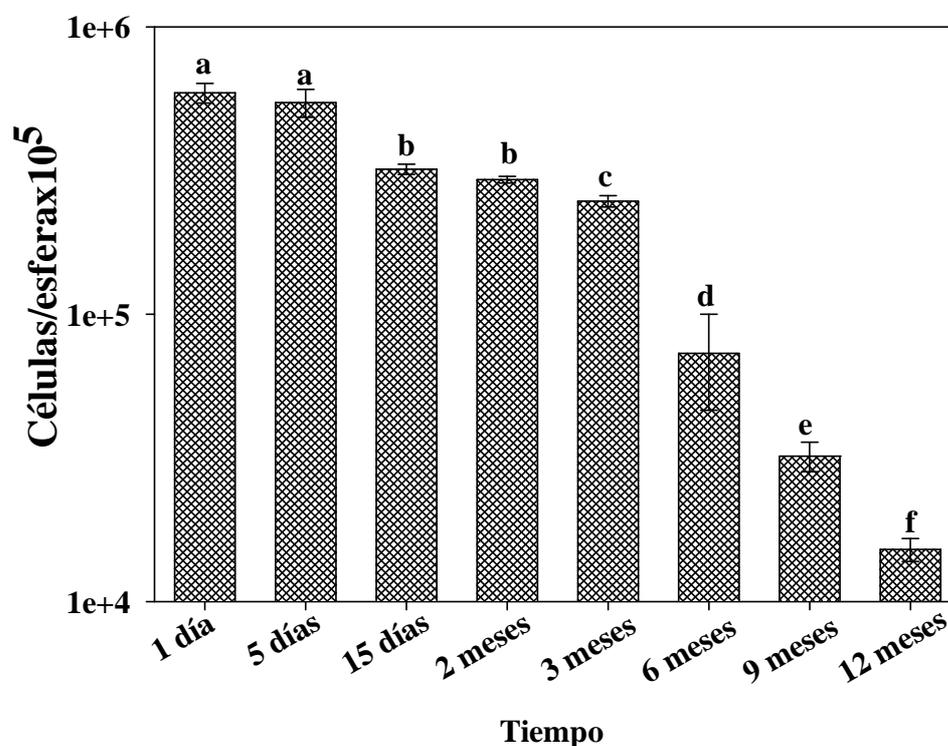


Figura 5. Número de células/esfera de *A. brasilense* durante 12 meses en preservación. Las letras arriba de cada columna corresponden a la diferencia significativa entre cada conteo a partir de un análisis de varianza de una vía a $p \leq 0.05$.

El número de células del conteo inicial fue de 5.89×10^5 células/esfera, mientras que el conteo final tuvo una densidad de 1.51×10^4 células/esfera. Como se puede observar en la figura, en los primeros 5 días de almacenar las esferas, el número de células de *A.*

brasiliense no tiene diferencia significativa respecto al número de células inicial, sin embargo, a los 15 días de almacenar las esferas, el número disminuyó de 5.45×10^5 células/esfera a 3.19×10^5 células/esfera y esta tendencia se observa de igual manera al realizar conteos de esferas almacenadas durante dos y tres meses, de este último alcanzando un número de 2.47×10^5 células/esfera. En los siguientes conteos el número de células/esfera fue disminuyendo progresivamente, y finalmente a los 12 meses se registró la menor densidad de células con respecto a los conteos realizados en meses anteriores comprobando con ello una disminución de células a lo largo del período de almacenamiento.

Asimismo, al realizar los conteos en cada una de las muestras se tomaron diversas micrografías con el apoyo del analizador de imágenes (Figura 6). En las micrografías se observa dos tipos de fluorescencia, una emitida por la *C. sorokiniana* (color rojo) y la emitida por *A. brasiliense* (color verde). En ellas además se pueden observar dos características: 1) que los microorganismos se mantienen juntos formando un aglomerado, y 2) que este aglomerado fue apareciendo más pequeño y con menor frecuencia en cada uno de los períodos de almacenamiento cuando se realizaba el conteo.

Como se mencionó en la metodología para determinar el conteo de células por FDA, la esfera se disuelve y se homogeniza con el empleo de un vortex; esto con la intención de separar y mezclar la muestra, de tal manera que las células se puedan contar satisfactoriamente. Sin embargo en los conteos realizados se observaban este tipo de aglomerados aún después de someter a los microorganismos a este tipo de acción física para separarlos.

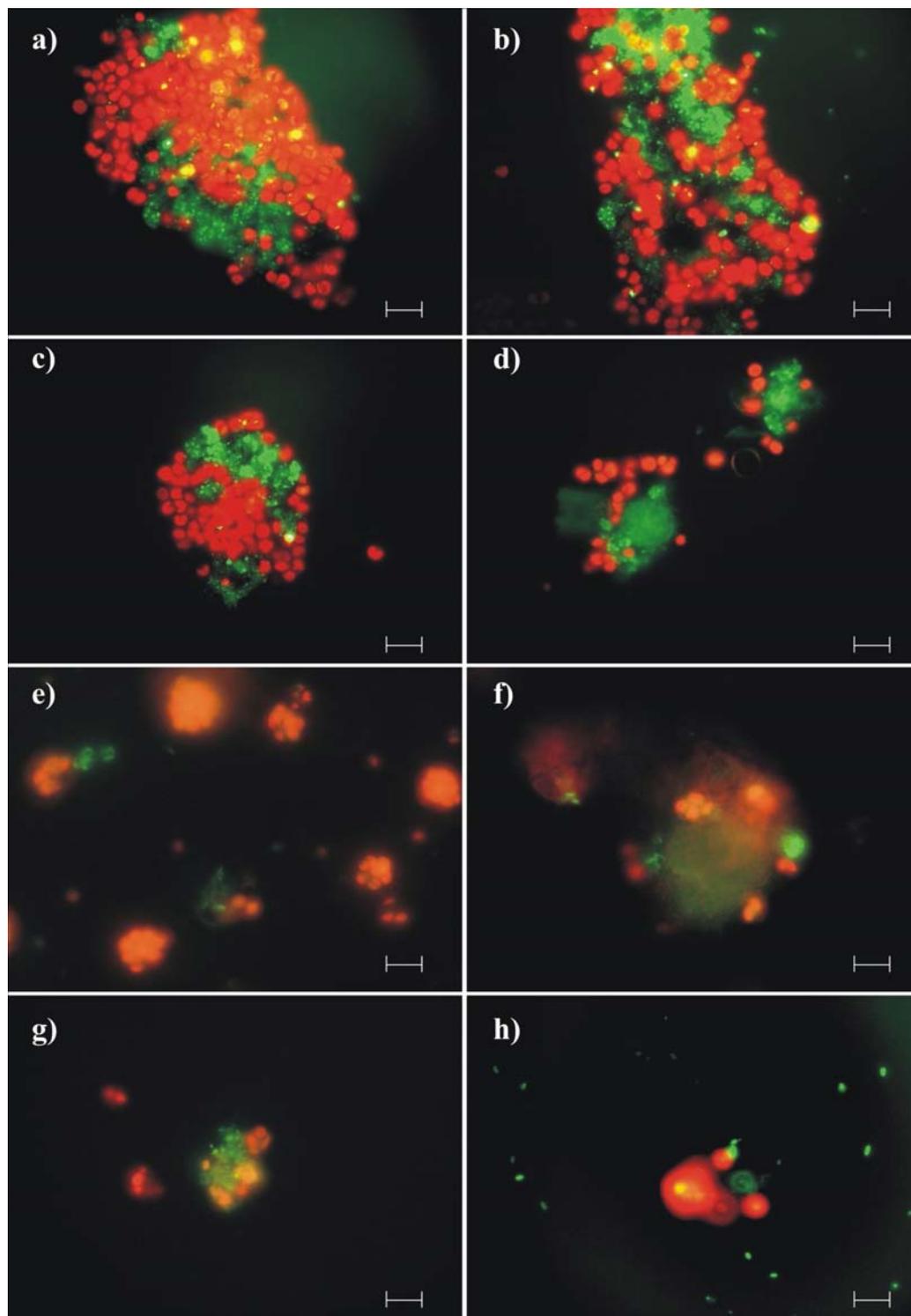


Figura 6. Micrografías del conteo de células de *A. brasilense* por FDA y microscopía óptica fluorescente en diversos períodos de tiempo. a) conteo inicial, b) 5 días, c) 15 días, d) dos meses, e) 3 meses, f) 6 meses, g) 9 meses, h) 12 meses. Fluorescencia verde= *A. brasilense*. Fluorescencia roja= *C. sorokiniana*.

En este sentido, se observa que los aglomerados cambian su tamaño en cada uno de los conteos de aquellas esferas que han sido almacenadas durante todo el período de tiempo que duró el experimento.

Como se muestra en la Figura 6 (a-e), en las primeras etapas de almacenamiento, los aglomerados lo componen una mayor cantidad de células tanto de *C. sorokiniana* como de *A. brasilense*, y en los conteos estos aparecen con mayor frecuencia, mientras que en las etapas de dos y tres meses de almacenamiento de esferas, los aglomerados son compuestos por una menor cantidad de microorganismos, y además aparecen con menor frecuencia en los conteos.

Para los conteos de 6, 9 y 12 meses los aglomerados fueron observados escasamente y con una reducción de su tamaño, sin embargo las células tanto de *Chlorella* como de *Azospirillum* continuaban emitiendo fluorescencia, lo que indica que las células de la microalga y la bacteria se encuentran vivas (Figura 6, f-h).

7.3. Incorporación del sistema microalga-bacteria a suelo y planta

La cantidad de esferas agregadas al suelo está relacionada con la cantidad de *Azospirillum* que se encuentre viable dentro de las esferas 24 horas después de la deshidratación, por lo que el posible aporte de materia orgánica es un resultado adicional. A lo largo del experimento y en todos los tratamientos en los cuales se agregaron esferas, se observó que el proceso de degradación de las esferas en el suelo no se completa. Después de 20 días, se observaban esferas aun sin degradar. De acuerdo al índice de degradación utilizado, las esferas alcanzaron una degradación de 1 al finalizar los 20 días. Ante tal situación, se decidió dejar un tiempo más las esferas en el suelo para que se alcanzara el

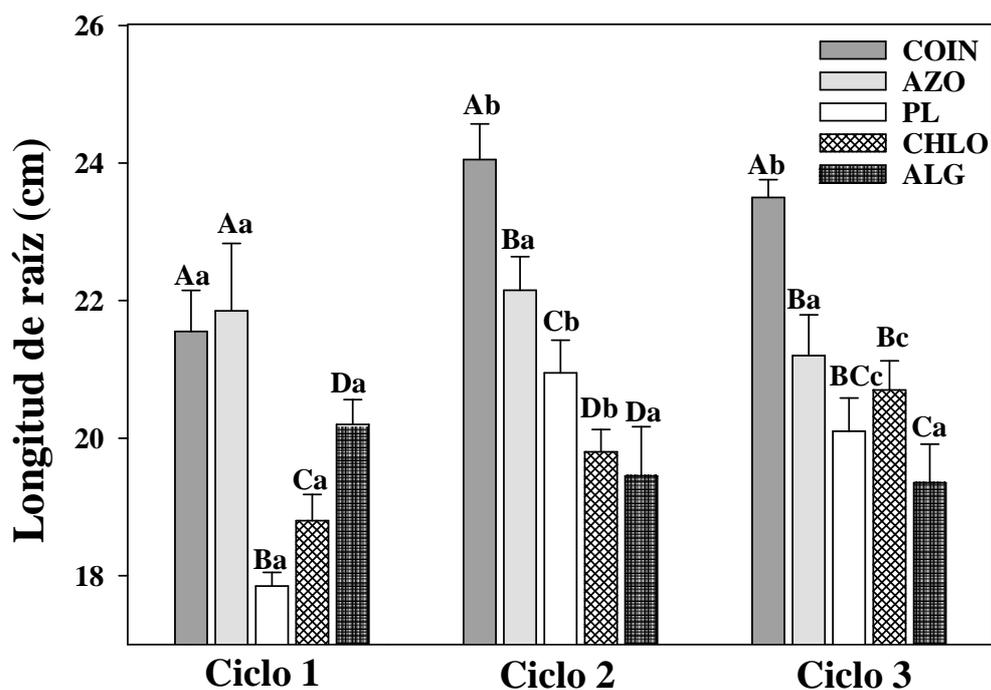
nivel de degradación de 2. Para ello, después de retirar las plantas del suelo, las macetas se dejaban en el invernadero durante 10 días; después de este tiempo las esferas se degradaron completamente, y se procedió a agregar nuevamente esferas y semillas de sorgo para completar el siguiente ciclo. Otro resultado que se pudo observar fue que las esferas agregadas al suelo se vuelven a hidratar, como resultado del aporte de agua por riego a las macetas. La hidratación de las esferas se completa tres horas después de haberse agregado al suelo.

*7.4. Promoción de crecimiento y detección de *Azospirillum brasilense* en raíces de sorgo*

En la Figura 7 se observa el crecimiento de la raíz en cada uno de los tratamientos durante los ciclos. En el ciclo 1, los tratamientos AZO y COIN fueron los que más crecimiento de raíz alcanzaron, además de que su crecimiento es similar, mientras que el tratamiento PL tuvo el menor crecimiento con 17.85 cm. Para el ciclo 2, el tratamiento COIN tuvo mayor crecimiento de raíz, con 24.05 cm en 20 días, mientras que el tratamiento ALG tuvo el menor crecimiento de raíz con 19.45 cm. En lo que se refiere al ciclo 3, los resultados obtenidos son similares al ciclo 2, es decir, el tratamiento COIN tuvo el mayor crecimiento de raíz y el menor lo tuvo el tratamiento CONTROL.

En la Figura 7 también se puede observar el crecimiento de la raíz de cada uno de los tratamientos durante los ciclos. En este sentido, el tratamiento COIN, se presenta el mayor crecimiento en los ciclos 2 y 3, alcanzando una longitud de 24.05 cm y 23.5cm respectivamente. En el tratamiento AZO, el mayor crecimiento se encuentra en el ciclo 2 alcanzando 22.15 cm de longitud. Sin embargo, el crecimiento entre cada uno de los ciclos no aumenta. En el tratamiento PL, el mayor crecimiento se muestra en el ciclo 2,

alcanzando una longitud de 20.95 cm. En este tratamiento se puede observar un aumento en el crecimiento del ciclo 1 al ciclo 2, y una ligera disminución al ciclo 3.

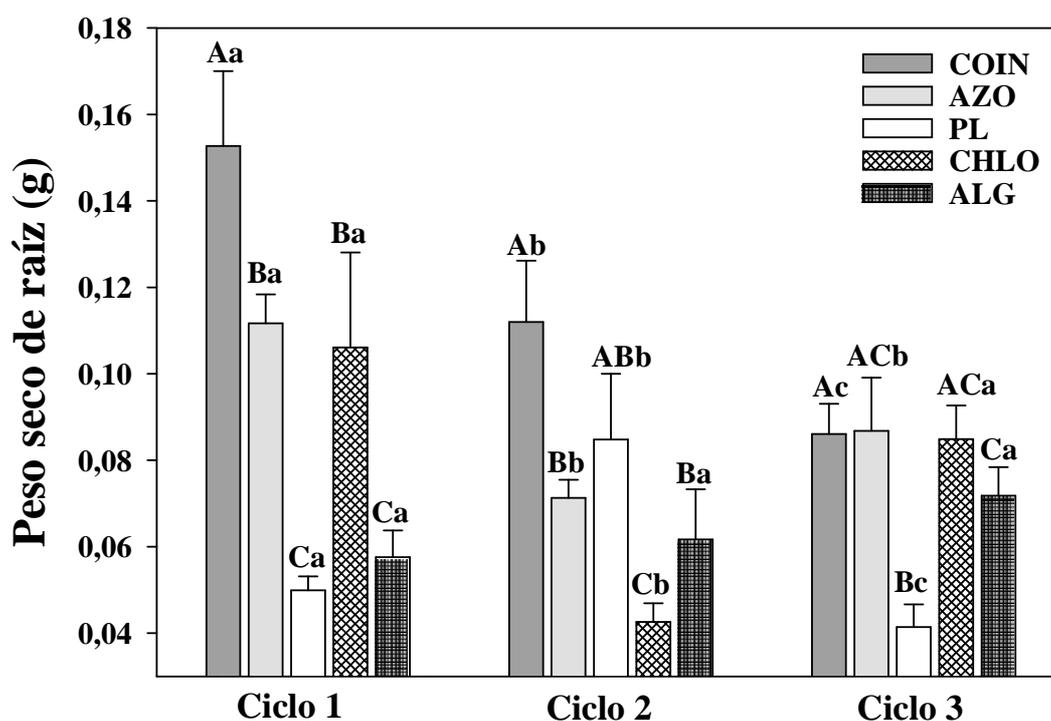


Resiembra en suelo

Figura 7. Longitud de la raíz en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento. Las letras en mayúscula corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de cada ciclo. Las letras en minúscula corresponden a las diferencias de cada tratamiento entre los ciclos mediante un análisis de varianza con una $p \leq 0.05$ para los dos casos.

En el tratamiento CHLO, el mayor crecimiento se presenta en el ciclo 3 con 20.70 cm de longitud. Además durante cada ciclo este tratamiento presentó un crecimiento progresivo de la raíz. Contrario a ello, para el tratamiento ALG, el mayor crecimiento se observa en el ciclo 1, con una longitud de raíz de 20.20 cm, por lo que en la Figura se puede observar que el crecimiento disminuye del ciclo 1 al ciclo 3.

En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos del peso seco de la raíz en los tratamientos en cada ciclo. En el ciclo1, el tratamiento COIN presentó el mayor peso seco con 0.15 g mientras que el tratamiento PL tuvo el menor peso seco con 0.05 g. Para el ciclo 2, el tratamiento COIN nuevamente presentó el mayor peso seco con 0.11 g, mientras que el tratamiento CHLO tuvo el menor peso seco con 0.04 g. En el tercer ciclo, este parámetro fue similar entre los tratamientos COIN y AZO, mientras que el tratamiento PL tuvo el menor peso seco con 0.04 g.



Resiembra en el suelo

Figura 8. Peso seco de la raíz en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento. Las letras en mayúscula corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de cada ciclo. Las letras en minúscula corresponden a las diferencias de cada tratamiento entre los ciclos mediante un análisis de varianza con una $p \leq 0.05$ para los dos casos.

En la Figura 8 se muestra también como respondieron los tratamientos al aumento o disminución de peso seco a través de los ciclos. En el caso del tratamiento COIN, el mayor peso seco lo obtuvo en el ciclo 1, y disminuye en los siguientes ciclos. Para el tratamiento AZO, el mayor peso seco se obtuvo en el ciclo 1, y al igual que el tratamiento anterior, se observa una disminución del peso en los siguientes ciclos. Para el tratamiento PL, el mayor peso seco se obtuvo en el ciclo 2, sin embargo no hubo un aumento de peso ya que en el ciclo 3 disminuye y muestra el menor peso entre los ciclos.

El mismo resultado se observó para el tratamiento CHLO, en el cual el mayor peso seco se obtuvo en el ciclo 1, pero disminuye en los siguientes ciclos. Finalmente en el tratamiento ALG, el mayor peso seco se observa en el ciclo 3. El análisis estadístico no mostró una tendencia a un aumento del ciclo 1 al ciclo 3.

En lo que se refiere al crecimiento de la parte aérea de la planta en los tratamientos durante los 3 ciclos, los resultados se representan en la Figura 9. En el ciclo 1, se observa que los tratamientos COIN y AZO obtuvieron el mayor crecimiento, mientras que el menor crecimiento lo tuvo el tratamiento PL con 16.00 cm. En el segundo y tercer ciclo el tratamiento COIN tuvo el mayor crecimiento con 21.30 y 22.05 cm respectivamente, mientras que el tratamiento ALG tuvo menor crecimiento de la parte aérea con 17.05 y 16.95 cm.

En cuanto a los resultados del crecimiento de cada tratamiento a lo largo de los ciclos, en lo que se refiere al tratamiento COIN, el mayor crecimiento se puede observar en el ciclo 3. Este resultado refleja que el crecimiento fue progresivo del ciclo 1 al ciclo 3. En el tratamiento AZO, se observa un crecimiento similar entre los ciclos 1 y 2, el cual

disminuye en el ciclo 3. Para el tratamiento PL y CHLO, el mayor crecimiento se observó en el ciclo 3, mientras que en el tratamiento ALG los ciclos 1 y 2 presentaron un crecimiento similar, el cual fue mayor al crecimiento del ciclo 1.

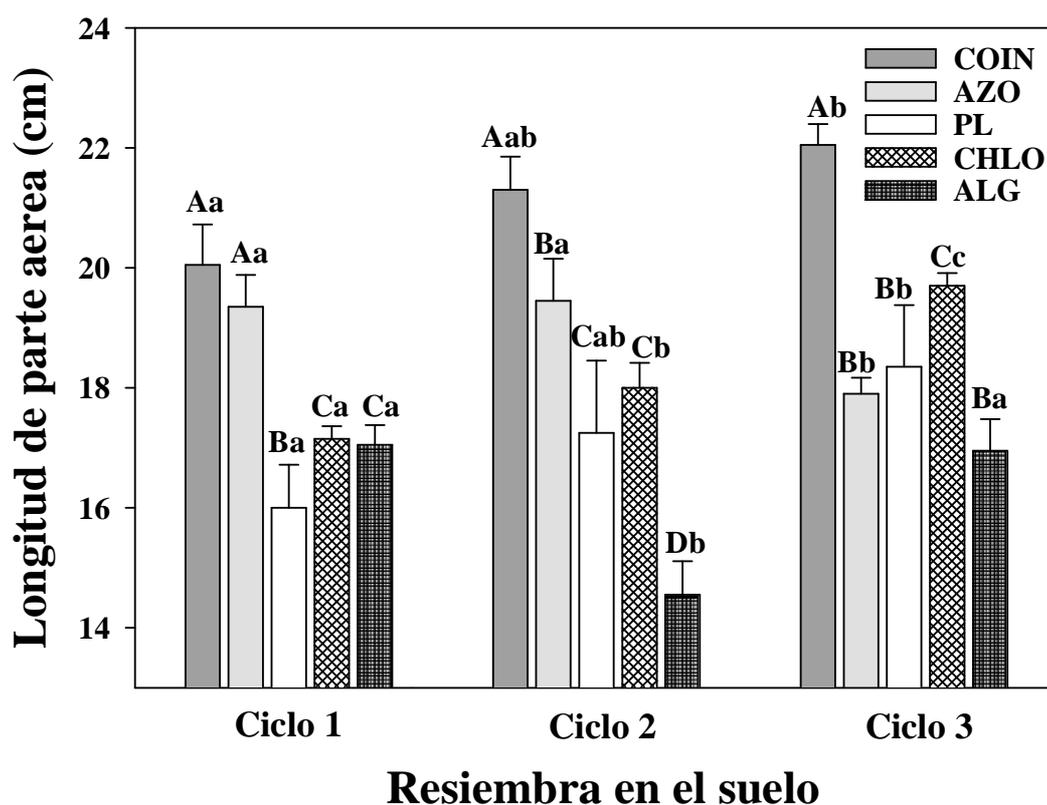
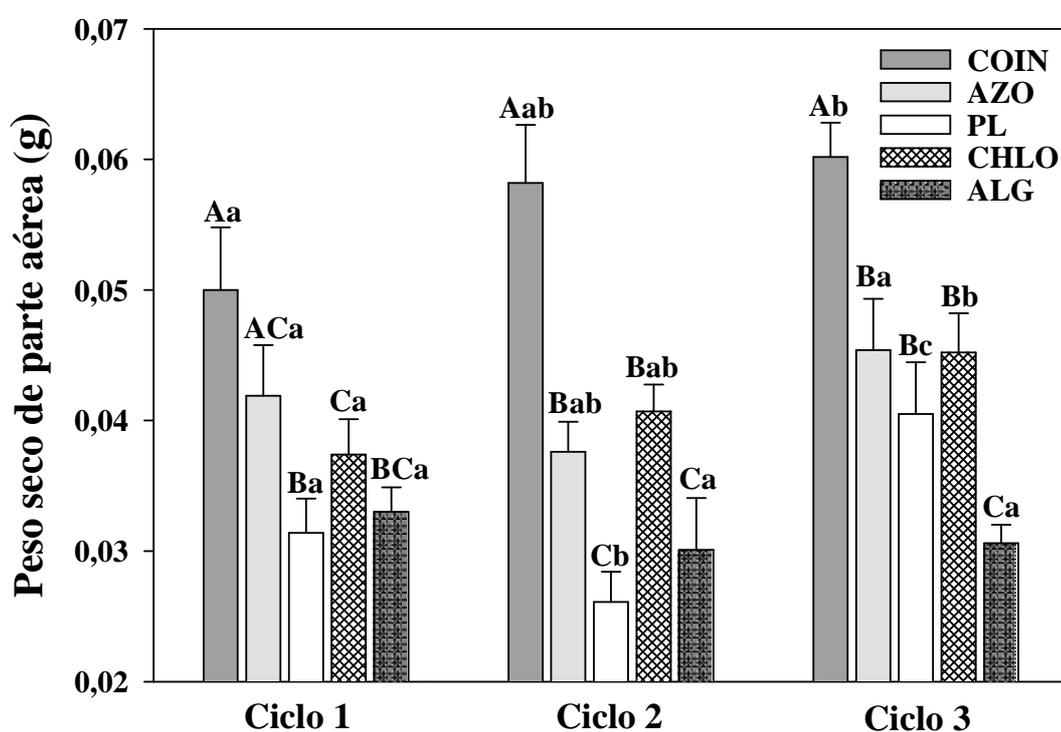


Figura 9. Crecimiento de la parte aérea de la raíz en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento. Las letras en mayúscula corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de cada ciclo. Las letras en minúscula corresponden a las diferencias de cada tratamiento entre los ciclos mediante un análisis de varianza con una $p \leq 0.05$ para los dos casos.

Los resultados del peso seco de la parte aérea en cada uno de los tratamientos durante los ciclos se muestran en la Figura 10. En ella se observa que el tratamiento COIN tuvo un mayor peso seco de la parte aérea en los tres ciclos, con 0.050 g, 0.058 g y 0.060 g. Asimismo, en los ciclos 1 y 2 el menor peso seco lo obtuvo el tratamiento PL con 0.031 g y

0.026 g y en el ciclo 3 lo obtuvo el tratamiento ALG con 0.030 g. Finalmente, los resultados del peso seco en cada uno de ciclos muestra todos los ciclos presentaron su mayor peso en el ciclo 3, excepto el tratamiento ALG, en el cual se observó una disminución de peso del ciclo 1 al ciclo 3.



Resiembra en el suelo

Figura 10. Peso seco de parte aérea de la raíz en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento. Las letras en mayúscula corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de cada ciclo. Las letras en minúscula corresponden a las diferencias de cada tratamiento entre los ciclos mediante un análisis de varianza con una $p \leq 0.05$ para los dos casos.

7.5. Detección y visualización de *Azospirillum brasilense* en raíz

La detección y visualización de *A. brasilense* en raíz se pudo efectuar en los tres tipos de microscopía, en dos de las cuales fue necesario previamente realizar la hibridación fluorescente *in situ* a las células de la bacteria a nivel de raíz.

7.5.1. Hibridación fluorescente *in situ*

La aplicación del método de hibridación fluorescente *in situ* para la detección de *A. brasilense* proporcionó una información preliminar, detallada y evidente de la colonización de la bacteria en la raíz; dicha herramienta fue realizada con éxito. Al inocular plantas de sorgo con el sistema microalga-bacteria durante 20 días, se consiguió observar la colonización de *A. brasilense* en las muestras de raíz no solo en los tratamientos inoculados, sino en cada uno de los 3 ciclos, encontrándose principalmente una colonización en aquellas muestras correspondientes a la zona apical de la raíz principal y de las raíces laterales.

7.5.2. Microscopía óptica fluorescente

La visualización de la bacteria en las muestras de raíz con el microscopio óptico de fluorescencia tuvo éxito y se lograron obtener diversas imágenes para argumentar esta condición (Figura 11). Las principales zonas donde se logró detectar a *A. brasilense* fueron en los pelos radicales de raíces laterales. En la Figura 11 se observan 8 micrográficas en las cuales se muestra la colonización de la bacteria en pelos radicales. La colonización se manifestó en la parte superficial de los pelos radicales y se logra distinguir la fluorescencia en las células hibridadas. Si bien la identificación de *A. brasilense* en raíz tuvo éxito, el uso de este tipo de microscopía para obtener una buena detección de la bacteria es limitada, debido a que el filtro CY3 que contiene el microscopio no solo permite visualizar la

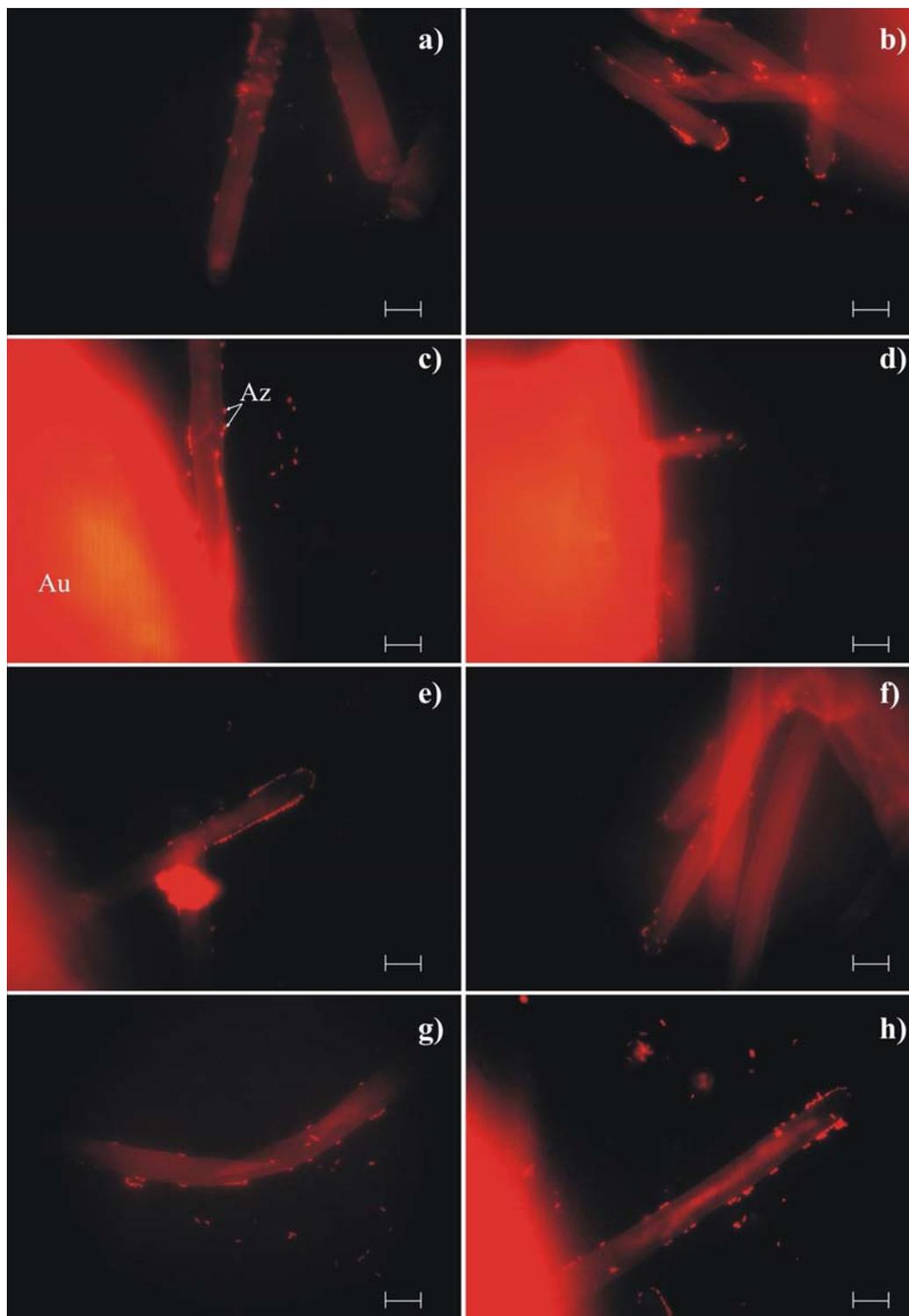


Figura 11. Localización de células de *A. brasilense* en raíz utilizando microscopio óptico de fluorescencia. Las micrografías corresponden muestras de raíz de de pelos radicales de raíces laterales. Az= *Azospirillum*. Au= autofluorescencia.

fluorescencia emitida por la sonda añadida a las células de *A. brasilense*, sino además visualiza la fluorescencia emitida por la raíz (autofluorescencia); los dos tipos de fluorescencia son proyectadas por el microscopio con una misma coloración (color rojo), por lo que no es posible diferenciarlas. Este detalle en ocasiones desfavoreció la búsqueda de buenos campos de visualización. Otras desventajas que se manifestaron fueron, primero, la intensidad de autofluorescencia que emite la raíz, lo cual provoca una saturación de fluorescencia en la imagen y por consecuencia disminuye la visualización de diversos campos de la raíz, además de disminuir la visualización de células hibridizadas (Figura 11, c, d), y segundo, la incapacidad del microscopio óptico de epifluorescencia de visualizar objetos tridimensionales.

Debido a que la raíz presenta una forma tridimensional no es posible ajustar con certeza el contraste del microscopio, a pesar de que la muestra está deshidratada y esto disminuye su tamaño, de tal manera que la imagen diseñada el microscopio no siempre resultó con buena calidad de resolución. Aún con estas dos desventajas, la detección de células hibridizadas en la raíz fue exitosa (Figura 11, e, f). Por otro lado, la visualización de la bacteria en muestras de raíz resultó en un bajo número y generalmente fue necesario realizar una búsqueda extensa de la colonización (Figura 11, g, h). Si bien la colonización de *A. brasilense* en raíz no fue evaluado por cuantificación de células, fue evidente la baja detección de células hibridizadas en las muestras de raíz. Como se mencionó anteriormente, la detección de *A. brasilense* se mostró generalmente en espacios intercelulares de la raíz, y como células aisladas, sin embargo en pocas ocasiones se llegó a detectar células de *A. brasilense* agrupadas. Cabe resaltar que las micrografías tomadas muestran manchones rojos más luminosos respecto a la coloración provocada por la raíz y el fondo oscuro

provocado por la ausencia de luz en el campo; los manchones que resaltan en la micrografía corresponden a las células de *A. brasilense*, y a lo largo de la visualización no hubo confusión respecto a la fluorescencia que emiten también partículas del suelo o de la propia raíz.

7.5.3. Microscopía láser confocal

Además de la detección de *A. brasilense* hibridizadas en raíz utilizando microscopía óptica fluorescente, la visualización de la bacteria fue exitosa también cuando se utilizó como herramienta microscopía laser confocal. En la Figura 12 y 13 se muestran algunas imágenes. En este sentido, la detección se realizó principalmente en la zona apical de la raíz principal, y raíces laterales (Figura 12, a y b), pero también se logró detectar la bacteria en zonas de elongación de raíz (Figura 12, c y d), principalmente de raíces laterales.

La detección de *Azospirillum* en pelos radicales fue mínima y en la mayoría de las muestras analizadas no se llegó a detectar. En las 2 Figuras se observa que la detección de la fluorescencia por el escaneo del microscopio confocal, lo cual produce una imagen formada por varios colores. En este sentido, la formación de la imagen es a partir de la detección de la fluorescencia que emite la raíz y las sondas utilizadas en la hibridación para la bacteria. En la Figura 12 se puede observar la separación de canales de la fluorescencia detectada por el microscopio, mientras que en la Figura 13 se observa la sobreposición de los canales para formar una sola imagen. Ya que el microscopio laser confocal contiene filtros especiales que permiten diferenciar en diferentes colores la fluorescencia emitida por un cuerpo o molécula, fue posible obtener imágenes que visualizaran la fluorescencia que detecta el microscopio para *Azospirillum* (color azul), la fluorescencia que detecta el microscopio para *Bacteria* (color rojo) y la autofluorescencia de la raíz (color verde).

Cuando los canales se sobreponen, o bien cada fluorescencia se sobrepone formando una sola imagen, se puede distinguir una coloración rosa. Aquella coloración rosa que se observa en la imagen, corresponde a la detección de *Azospirillum*, debido a la sobreposición de la fluorescencia para la sonda de *Bacteria* con la fluorescencia para la sonda de *Azospirillum* sp.

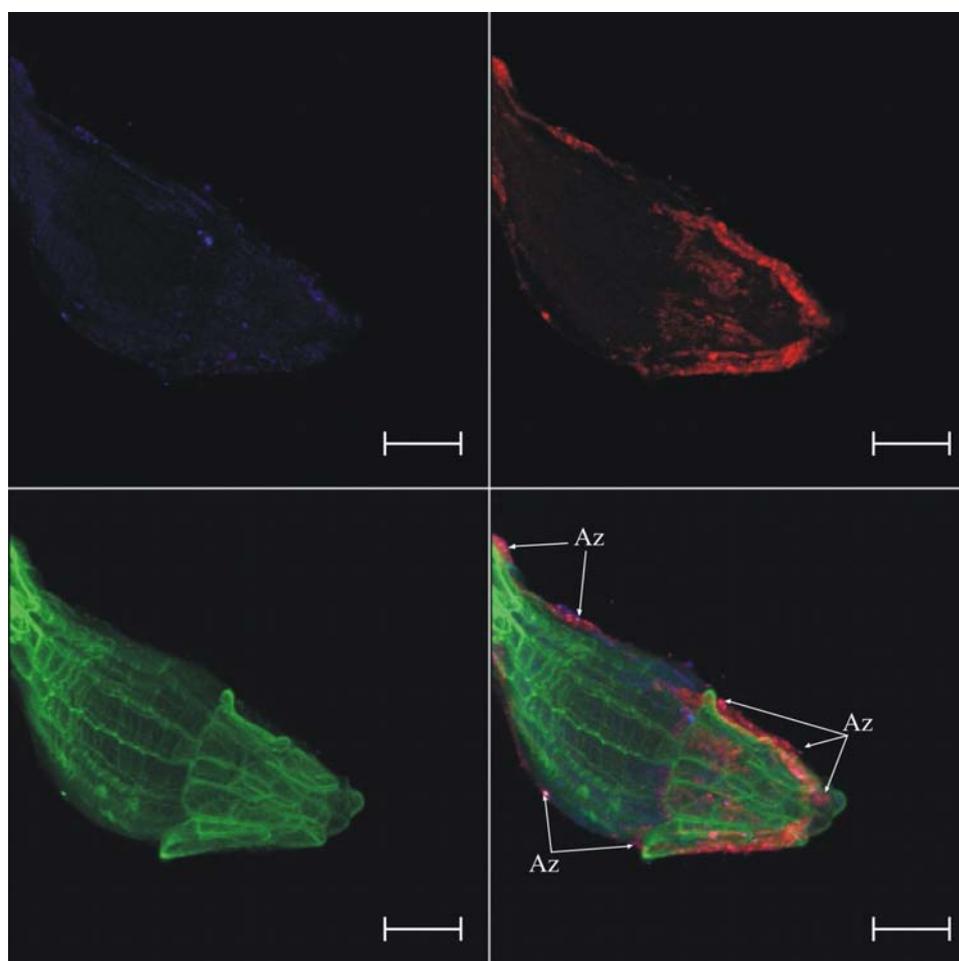


Figura 12. Detección de *A. brasilense* en raíz por FISH y LSCM en separación de canales. La micrografía muestra la fluorescencia emitida por la la sonda con especificidad para *A. brasilense* sp. (color azul), la fluorescencia emitida por la sonda con especificidad para *Bacteria* (color rojo) y la autofluorescencia emitida por la raíz (color verde). Los manchones rosas se forman como resultado de la sobreposición de los canales en azul y rojo. Az= *Azospirillum*. (—= 10 μ m).

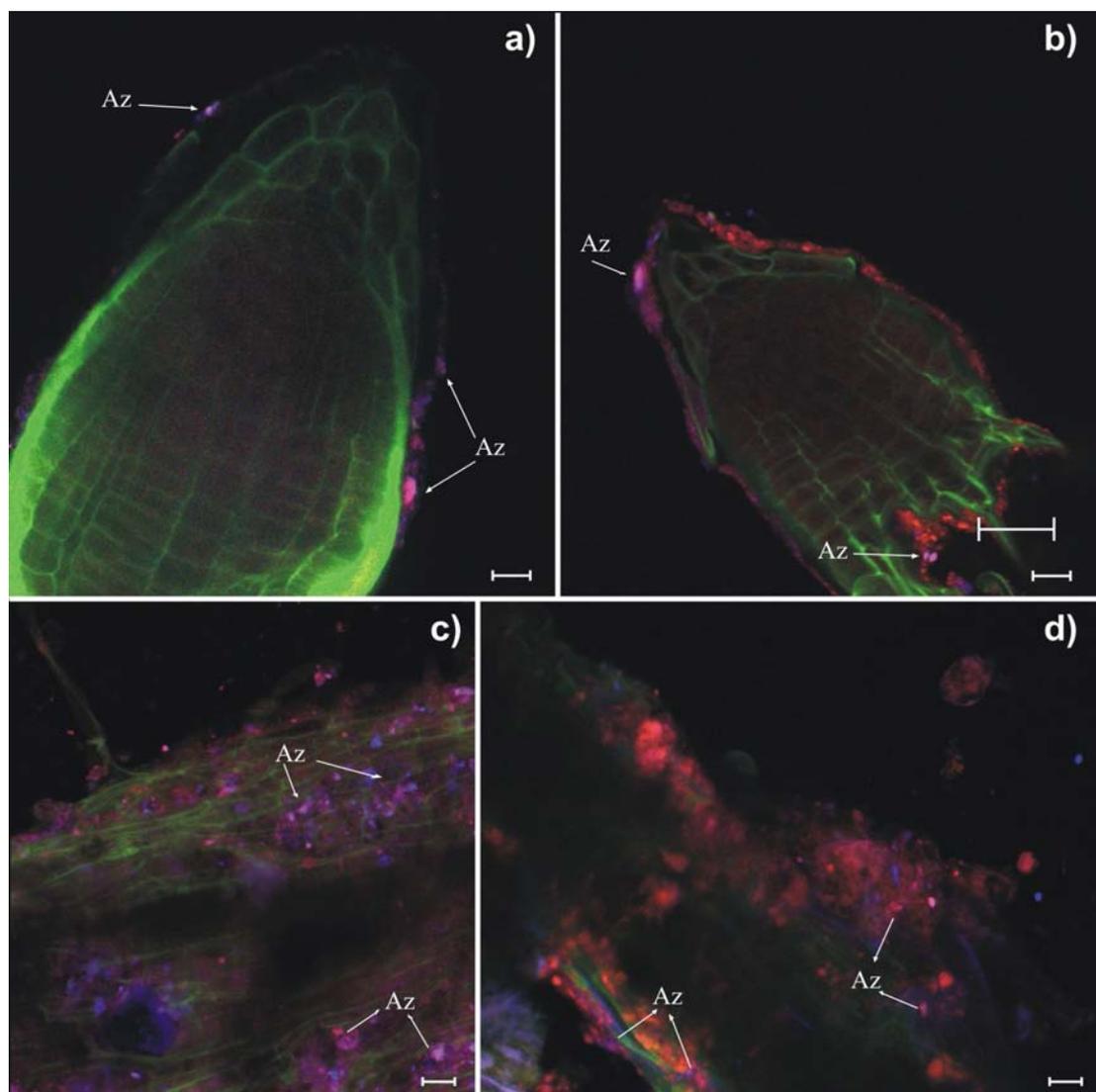


Figura 13. Detección de *A. brasilense* en raíz por FISH y LSM. La imagen muestra 4 micrografías: a y b: zona apical de la raíz, donde se muestran manchones rosas correspondientes a la colonización de *A. brasilense*; c y d: zona de elongación de raíces laterales. Az= *Azospirillum*. (—= 10 μ m).

También se detectó *A. brasilense*, por un lado, en la periferia de zona apical de la raíz, en forma de manchas de color rosa y esta detección es mínima a lo largo de la zona (Figura 13, a y b). Se puede observar la detección en la superficie de la raíz, como una especie de corona. Por otro lado, no se llegó a detectar *Azospirillum* intracelular o dentro de células radicales. La detección de *A. brasilense* en la zona de elongación de raíces laterales

se presentó también, y en esa zona se llegaron a visualizar una mayor cantidad de manchones, de los cuales se pudieron apreciar aquellos de color rosa (Figura 13, c y d).

7.5.4. Microscopía electrónica de barrido

La observación de imágenes obtenidas del microscopio electrónico de barrido se muestran en las figuras 14, 15 y 16 respectivamente. Como se mencionó en la metodología, se llevaron a cabo tres tipos de observación, todas ellas en función de la condición de la muestra de raíz, es decir, si estaba hibridizada o no, o bien tener las muestras sin ningún manejo previo al análisis. Para el set 1 (Figura 14) se puede observar que la raíz tiene una apariencia arrugada y aparentemente deteriorada. Se sugiere que hay visualización de *Azospirillum* en la raíz, la cual es poco frecuente ó escasa, encontrando únicamente células dispersas.

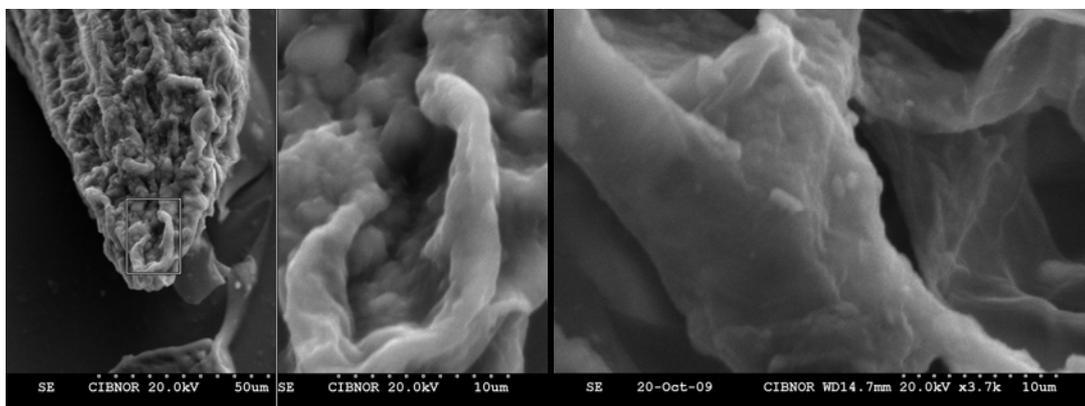


Figura 14. Micrografías de muestras de raíz de sorgo del set 1, utilizando microscopía electrónica de barrido.

Una observación general de este set de muestras es que se las raíces presentan no solo un deterioro físico, sino que además pueden estar cubiertas por alguna matriz o bien algún material. Ante esta situación, se presume que exista una capa encima de la raíz, la

cual podría ser consecuencia de la agarosa que se utilizó para adherir la muestra al portaobjetos. Este resultado aparentemente impide obtener imágenes donde se manifieste la colonización de *Azospirillum* o bien de cualquier otro microorganismo.

Asimismo, para muestras de raíz del set 2 (Figura 15) la observación es parecida a la del set 1, donde la raíz presenta un deterioro; se sugiere que hay escasa o nula visualización y no se logran identificar bacterias.

En este set, es también evidente una posible cubierta encima de la raíz, y que probablemente esté afectando la visualización. Cabe resaltar que tanto en el set 1 como en el set 2 se efectuó la fijación con PFA/etanol, la deshidratación con etanol y se adicionó agarosa al 2% a las muestras de raíz.

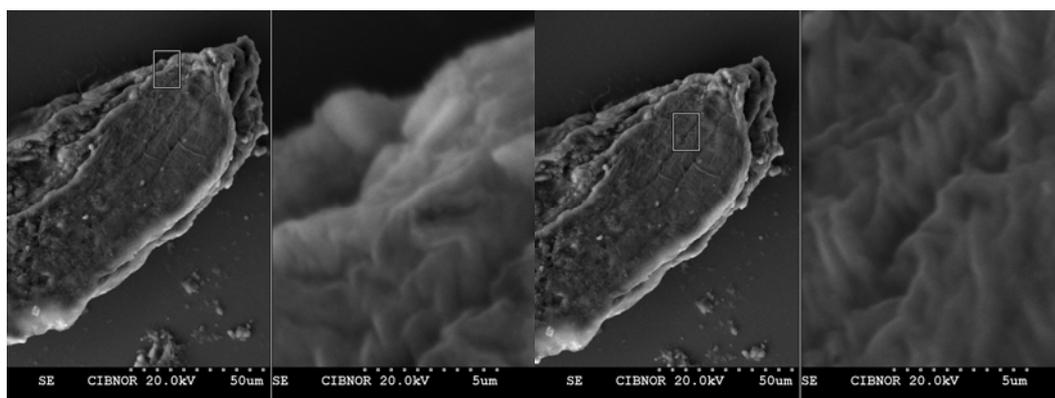


Figura 15. Micrografías de muestras de raíz de sorgo del set 2, utilizando microscopía electrónica de barrido. Las muestras corresponden a la zona apical de raíces laterales.

Estas características pueden estar involucrados en la observación en este tipo de microscopio, pues dependiendo de la herramienta que se utilice dependerá el tipo de tratamiento que presente la muestra. En este sentido, para muestras que se trabajen en microscopía electrónica, se recomienda que la fijación se realice con glutaraldehído al 5% durante 4 horas, y que la deshidratación se maneje con otras condiciones como incluir vacío

y diversas concentraciones de alcohol, ya que en el caso de las muestras del experimento no fue posible incluir este tratamiento.

Finalmente para el set 3 (Figura 16), las imágenes que se obtuvieron presentan una ligera diferencia con respecto a las imágenes del set 1 y 2. En este caso, se sugiere que fue posible identificar *Azospirillum* en las muestras de raíz de sorgo, incluyendo además una observación de otros materiales adheridos, posiblemente otras bacterias y diversos fragmentos (Figura 16). Para este set fue posible incluir el tratamiento de fijación con glutaraldehído al 4%, deshidratación a vacío y utilizando alcohol, por lo que las observaciones tienen mejor resolución, comparadas con las anteriores muestras. De acuerdo con ello, se puede sugerir que la identificación de *Azospirillum* se llevó a cabo en diversas partes de la raíz, como la zona apical, pelos radicales y en la parte superior de la zona apical, donde se observó en células independientes, pequeñas agrupaciones y aglomerados.

En la Figura 16 además se aprecia una mejor resolución de las imágenes, y en este sentido influyeron tres características. La primera, que se ocuparon muestras sin principios de degradación ó bien deterioradas por un manejo previo al análisis en el microscopio electrónico de barrido; la segunda característica está relacionada con la preparación específica de las muestras para el microscopio electrónico de barrido, pues solo se realizó la preparación necesaria para la identificación en el MEB; la tercera característica es que una vez que se comenzó la búsqueda de la bacteria, se observó que en la estructura de la raíz no se apreció algún material que limitara el bombardeo de electrones en la muestra, y esto favoreció enormemente la probable visualización de la bacteria. Cabe mencionar que el uso de este tipo de microscopía pretende solamente sugerir la identificación de *Azospirillum* en las muestras de raíz.

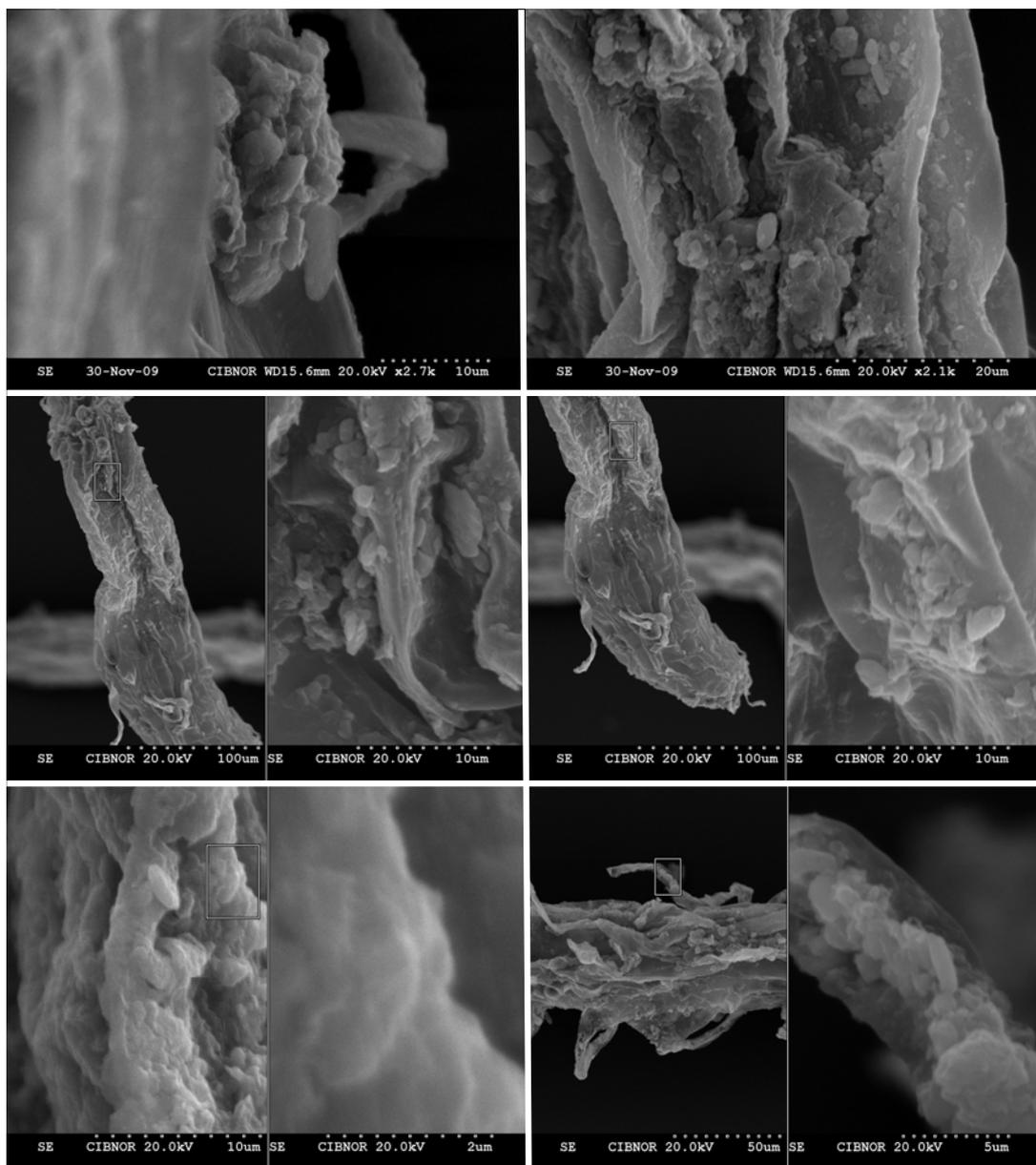


Figura 16. Micrografías de muestras de raíz de sorgo del set 2, utilizando microscopía electrónica de barrido.

7.6. Características del suelo

La capacidad de campo del suelo se determinó con el propósito de conocer la cantidad de agua que se debía de utilizar en los riegos. Dicha capacidad de campo fue de 38.4 mL por cada 120g de suelo. Asimismo, se midió el porcentaje de materia orgánica y

carbono orgánico del suelo durante los ciclos (considerando el primer ciclo como la medición inicial), y también se midió el pH. De acuerdo a la guía para la interpretación de la materia orgánica y carbono orgánico en el suelo (Tabla IV), el suelo utilizado para este experimento contiene muy bajo contenido de materia orgánica y carbono. Los resultados se muestran en la Tabla V.

Tabla V. Datos promedio de medición de Materia orgánica, carbono orgánico, pH y capacidad de campo del suelo utilizado en el experimento. \pm :Error estándar.

| | % Materia | | % Carbono | | pH | Capacidad de Campo (ml) |
|----------------|-----------|------------|-----------|------------|-----|-------------------------|
| | Orgánica | | Orgánico | | | |
| Ciclo 1 | 0.43a | ± 0.03 | 0,25a | $\pm 0,01$ | 7.8 | 38.4 |
| Ciclo 2 | 0,57b | $\pm 0,05$ | 0,28b | $\pm 0,02$ | 7.6 | 38.4 |
| Ciclo3 | 0,57b | $\pm 0,02$ | 0,29b | $\pm 0,03$ | 7.9 | 38.4 |

7.7. Determinación de materia orgánica y carbono en suelo

Los resultados de materia orgánica del suelo en cada tratamiento durante los ciclos están representados en la Figura 17. La Figura muestra tanto los tratamientos agrupados en cada uno de los tres ciclos. Para este análisis se incluye el tratamiento CONTROL que corresponde a suelo sin planta y sin esferas.

En lo que se refiere al ciclo 1, el mayor valor de materia orgánica lo obtuvo el tratamiento AZO con $9,06 \text{ mg/kg suelo} \times 10^3$, mientras que el menor porcentaje lo obtuvo el tratamiento CONTROL con $4,34 \text{ mg/kg suelo} \times 10^3$. En la Figura 17 se puede observar que entre los tratamientos COIN, AZO, CHLO y ALG y entre los tratamientos PL y CONTROL no hay diferencia significativa con respecto a su porcentaje de materia

orgánica, mientras que estos dos últimos tuvieron menor porcentaje que los tratamientos COIN, AZO, CHLO y ALG.

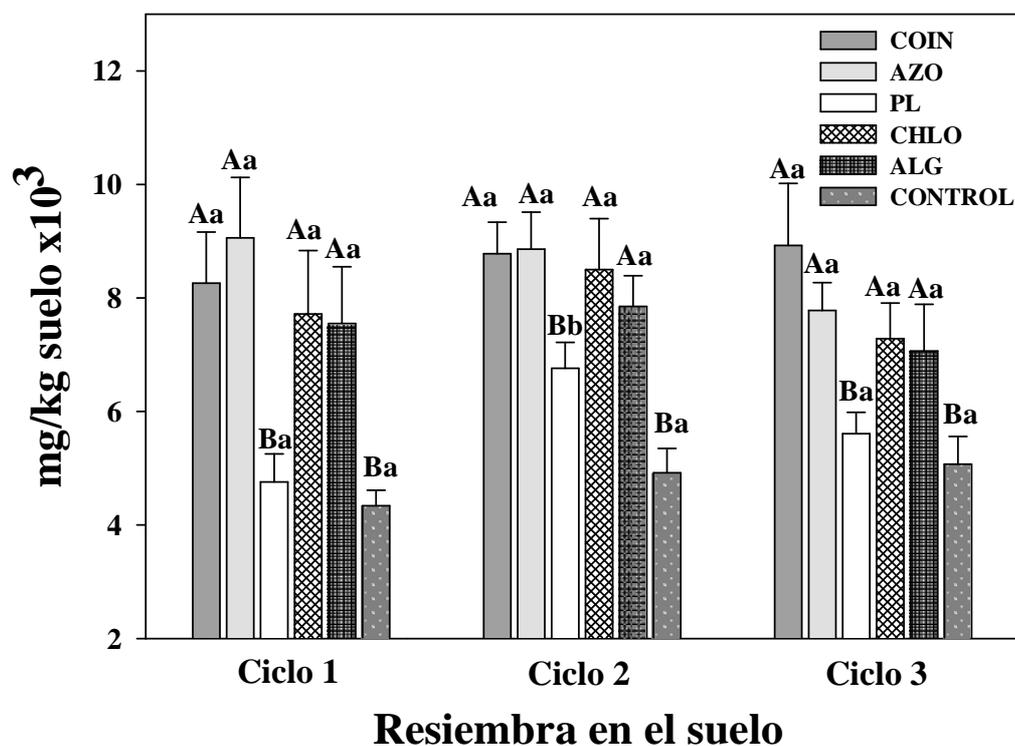


Figura 17. Materia orgánica en el suelo en cada tratamiento durante los tres ciclos de crecimiento. Las letras en mayúscula corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de cada ciclo mediante un análisis de varianza con una $p \leq 0.05$. Las letras en minúscula corresponden a las diferencias de cada tratamiento entre los ciclos.

Para el ciclo 2, el mayor porcentaje de materia orgánica se observa en el tratamiento AZO con $8,86 \text{ mg/kg suelo} \times 10^3$, ligeramente seguido del tratamiento COIN con $8,78 \text{ mg/kg suelo} \times 10^3$, mientras que el menor porcentaje lo tuvo el tratamiento CONTROL con $5,75 \text{ mg/kg suelo} \times 10^3$. Para el ciclo 3, el mayor porcentaje lo obtuvo el tratamiento COIN con $8,92 \text{ mg/kg suelo} \times 10^3$, mientras que el menor porcentaje de materia orgánica lo muestra el tratamiento CONTROL con $5,74 \text{ mg/kg suelo} \times 10^3$.

En la Figura 17 se puede apreciar además el porcentaje de materia orgánica obtenido por cada tratamiento durante los ciclos. Se puede observar que no se presentó un cambio de porcentaje en ninguno de los tratamientos a lo largo de los ciclos, excepto en el tratamiento PL, quien tuvo un aumento en el ciclo 2, el cual disminuyó en el ciclo 3. Se observa además que en los tres ciclos los tratamientos COIN, AZO, CHLO y ALG tuvieron un mayor porcentaje de materia orgánica que los tratamientos PL y CONTROL.

En lo que se refiere al carbono en el suelo, los resultados están representados en la Tabla VI. Estos resultados son totalmente similares a los presentados en el porcentaje de materia orgánica.

Tabla VI. Carbono orgánico en los tratamientos. Las letras en mayúscula corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de cada ciclo mediante un análisis de varianza con una $p \geq 0.05$. Las letras en minúscula corresponden a las diferencias de cada tratamiento entre los ciclos. \pm : error estándar.

| Tratamiento | C orgánico (mg/kg suelo x 10 ³) | | |
|-------------|---|-------------------|-------------------|
| | Ciclo1 | Ciclo 2 | Ciclo 3 |
| COIN | 4,79Aa $\pm 0,05$ | 5,09Aa $\pm 0,03$ | 5,18Aa $\pm 0,06$ |
| AZO | 5,25Aa $\pm 0,06$ | 4,51Aa $\pm 0,03$ | 5,14Aa $\pm 0,04$ |
| PL | 2,76Ba $\pm 0,02$ | 3,92Bb $\pm 0,03$ | 3,25Ba $\pm 0,02$ |
| CHLO | 4,48Aa $\pm 0,06$ | 4,93Aa $\pm 0,05$ | 4,22Aa $\pm 0,04$ |
| ALG | 4,38Aa $\pm 0,05$ | 4,55Aa $\pm 0,03$ | 4,10Aa $\pm 0,05$ |
| CONTROL | 2,52Ba $\pm 0,01$ | 2,85Ba $\pm 0,02$ | 2,94Ba $\pm 0,03$ |

7.8. Determinación de carbono microbiano del suelo

El resultado general en esta parte es que se logró realizar la técnica de determinación de carbono microbiano de suelo por el método de fumigación extracción y el método de oxidación de dicromato. En las pruebas iniciales se ocupó como muestra de

glucosa como estándar de carbono, la cual tuvo una concentración de 3,0081 g, equivalentes a 1.20% de carbono orgánico. La técnica de fumigación extracción con cloroformo mide cantidades muy bajas de carbono orgánico, y debido a ello, en estas primeras pruebas no fue posible conocer la cantidad de carbono en la muestra, por lo que se tuvo que diluir y nuevamente realizar el procedimiento.

El siguiente resultado parcial fue establecer el volumen ocupado de solución de titulación, el cual corresponde a la cantidad de carbono en la muestra. Se lograron identificar 4 tonalidades en el viraje, de los cuales la coloración verde oscuro fue la coloración indicada, de acuerdo con la metodología. Cabe mencionar que este resultado fue importante conocerlo, pues la transición de coloración que sufre la muestra cuando se le realiza la titulación es mínima. En este sentido, el cambio de coloración fue de amarillo/amarillo oscuro (al agregar las gotas de fenantrolina)-verde pardo/verde oscuro-azul claro/gris-y violeta. El cambio de viraje utilizado en este estudio fue realizada teniendo tres colores predominantes: amarillo (después de la digestión), amarillo oscuro (al agregar las gotas de fenantrolina) y verde oscuro (al agregar la solución titulante). Una vez estandarizada la titulación, se trabajó con las muestras del experimento; los datos obtenidos se les aplicó la fórmula descrita en la metodología para finalmente determinar el carbono microbiano. En la Tabla VII se muestran los resultados de carbono microbiano de las muestras de suelo de cada uno de los tratamientos del experimento. En ella se muestran 3 datos. El primero corresponde al suelo fumigado (SF), el segundo al suelo no fumigado (SNF) y el tercero al C microbiano de cada uno de los tratamientos (*Ec/KEc*), este último resultado se considera como el valor final de todo el proceso de determinación de carbono

microbiano por el método de fumigación-extracción y por el método de oxidación de dicromato.

Tabla VII. Carbono microbiano de suelo en los tratamientos. SF: suelo fumigado; SNF: suelo no fumigado; Ec :SF-SNF; KEc : 0.38 (constante, Vance *et al.*, 1987); Ec/KEc :C microbiano. \pm : error estándar.

| Tratamiento | C microbiano (mg/kg suelo x 10 ³) | | | | | |
|-------------|---|------------|------|------------|----------|-------------|
| | SF | | SNF | | Ec/KEc | |
| COIN | 1,95a | $\pm 11,3$ | 0,52 | $\pm 4,33$ | 1,43a | $\pm 11,43$ |
| AZO | 1,81a | $\pm 6,21$ | 0,52 | $\pm 4,33$ | 1,29a | $\pm 8,44$ |
| PL | 1,26bc | $\pm 4,76$ | 0,52 | $\pm 4,33$ | 0,73bc | $\pm 4,20$ |
| CHLO | 1,30b | $\pm 4,28$ | 0,52 | $\pm 4,33$ | 0,77b | $\pm 5,09$ |
| ALG | 1,17cd | $\pm 3,31$ | 0,52 | $\pm 4,33$ | 0,66cd | $\pm 5,27$ |
| CONTROL | 1,12d | $\pm 4,56$ | 0,52 | $\pm 4,33$ | 0,59d | $\pm 4,59$ |

En este sentido, el mayor valor de carbono microbiano lo tuvo el tratamiento COIN, con 1,42 mg/kg suelo x 10³, mientras que el tratamiento CONTROL tuvo el menor valor de carbono microbiano con 5,95021 mg/kg suelo x 10³. La secuencia del resultado de caarbono microbiano en cada uno de los tratamientos con base en el valor quedó de la siguiente manera (de mayor a menor): COIN>AZO>PL>CHLO>ALG>CONTROL. Al realizar el análisis de varianza se observó que los tratamientos COIN y AZO no muestran una diferencia significativa entre el valor de C microbiano; así como tampoco entre los tratamientos PL y CHLO, entre los tratamientos PL y ALG y entre los tratamientos ALG y CONTROL. Con la prueba estadística también se comprobó que los tratamientos COIN y AZO tuvieron una diferencia significativa con respecto a todos los demás tratamientos, pues se separan del resto al presentarse un mayor valor de C microbiano. Los tratamientos PL y ALG además presentaron una diferencia significativa con los tratamientos CHLO y

CONTROL respectivamente. Finalmente, el tratamiento CONTROL mostró también una diferencia significativa con todos los tratamientos, pues este tratamiento tuvo el valor más bajo de carbono microbiano.

8. DISCUSIÓN

Entre los retos que presenta el sistema microalga-bacteria como biotecnología se encuentra el de suprimir la polución una vez finalizado el proceso de eliminación de nitrógeno y fósforo del agua. En este trabajo, se estudió una alternativa de reuso de este sistema que incluye aplicar las esferas como material aditivo al suelo, apoyándose en la posibilidad de que exista una incorporación de biomasa ya sea como materia orgánica en el suelo o bien como un inoculante en plantas. Además se desarrolló una estrategia de preservación del sistema microalga-bacteria mediante su deshidratación. Después de 12 meses de mantener el sistema microalga-bacteria en conservación por deshidratación, células de *Azospirillum* presentan aún viabilidad. Este resultado es similar al reportado por Paul *et al.* (1993) quienes evaluaron la sobrevivencia de *A. lipoferum* después de deshidratar y almacenar el inmovilizado. Los autores observaron viabilidad a los 150 días con una supervivencia constante, y que la deshidratación provoca un período de estabilización en la densidad, donde inicialmente hay una disminución de células bacterianas pero al continuar en preservación el inmovilizado la pérdida de viabilidad es mínima. En este trabajo, la preservación del sistema microalga-bacteria se llevó a cabo durante 12 meses, y se manifestó una pérdida de viabilidad en cada uno de los períodos en

que se realizó en conteo de células. Hay reportes donde se observan períodos de almacenamiento hasta de 14 años (de Bashan y González, 1999) donde la sobrevivencia de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* inmovilizadas en alginato persiste y al ser utilizado como inoculante en plantas de trigo, llegan a colonizar la raíz y promover su crecimiento. Asimismo, Prabakaran y Hoti (2008) reportaron la inmovilización y deshidratación de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* como una técnica de preservación de la bacteria. Ellos evaluaron la viabilidad durante 10 años, comprobando que la bacteria puede continuar ejerciendo su actividad larvicida sobre un tipo de mosquito. Lo anterior, corrobora lo observado en esta tesis y respalda la idea de que la deshidratación de células de *A. brasilense* inmovilizadas en alginato es un buen método de almacenamiento por períodos prolongados. Se puede considerar además que la sobrevivencia de *A. brasilense* probablemente esté relacionado con las condiciones de secado de las células inmoviliadas (Paul *et al.*, 1993), lo cual puede ser un tema de estudio a futuro.

Se pueden identificar al menos 3 ventajas que presenta el sistema microalga-bacteria al someterse a la deshidratación: 1) permite mantener células viables en conservación por períodos prolongados; 2) disminuyen los problemas de contaminación, y 3) disminuye el volumen. Es importante mencionar que los procesos de preservación de microorganismos generalmente son costosos y no aseguran la viabilidad de las células. Por lo tanto utilizar este tipo de herramienta de almacenamiento generaría un beneficio adicional al sistema microalga-bacteria, pues en el proceso de deshidratación no es necesario incluir un esfuerzo mecánico o agregar un costo. Un resultado que también se puede mencionar es que durante las observaciones en el microscopio óptico epifluorescente se demuestra la fluorescencia de *Chlorella* durante los 12 meses; este resultado podría ser tema de estudio futuro, ya que hay

reportes de viabilidad y supervivencia hasta del 93% en la cianobacteria *Pseudanabaena galeata* empleando una técnica similar de preservación durante 14-18 meses (Romo y Pérez, 1997). Otra consideración en los resultados de este trabajo es la determinación de la viabilidad de *Azospirillum* a partir del empleo de fluoroscein diacetato. De acuerdo con Chrzanowski (1984), el fluoroscein diacetato normalmente es una molécula no fluorescente y no polar que fácilmente penetra membranas de microorganismos como bacterias y hongos. Al encontrarse intracelularmente, el FDA es hidrolizado por esterases no específicas, dando como resultado la liberación del fluoroscein, molécula que tiene la propiedad de emitir fluorescencia de color verde cuando es irradiada con luz azul. Esto permite su observación por microscopía epifluorescente. Así, el fluoroscein diacetato es pasivamente transportado por la bacteria, y su acumulación se realiza sobre la membrana intacta y un metabolismo activo. Cabe resaltar que el FDA se disocia a fluoroscein por acción de esterases que son producidas por microorganismos metabólicamente activos (Wanandy *et al.*, 2005), por lo tanto sólo células vivas emiten fluorescencia cuando se aplica FDA en ellas. Bajo este fundamento, las células de *Azospirillum* que mostraron fluorescencia corresponden a células que permanecieron vivas durante los 12 meses de almacenamiento, y en este sentido la técnica fue de gran ayuda.

Dentro de los resultados que se pueden mencionar también en este apartado es que al realizar las observaciones en el microscopio óptico epifluorescente se identificaron aglomerados o agrupaciones formadas por *Chlorella* y *Azospirillum*. Tales agrupaciones fueron disminuyendo su tamaño y su frecuencia de los períodos iniciales de almacenamiento (agrupaciones con mayor número de células de microalga y de bacteria) a los finales (agrupaciones poco frecuentes y con menor número de células de microalga y

bacteria) y durante los 12 meses se observó que los dos microorganismos se mantuvieron juntos. Este resultado podría ser tema de estudio futuro, si se considera la idea de interacción de la microalga y la bacteria.

La deshidratación de las esferas, su almacenamiento, la viabilidad de *Azospirillum* y *Chlorella*, así como la formación de aglomerados por los microorganismos después de la deshidratación de las esferas, son elementos que pueden incorporarse a la secuencia de eventos que suceden durante la interacción entre los dos microorganismos dentro de la esfera polimérica, el cual es mencionado por de-Bashan y Bashan (2008). Estos eventos son: inmovilización de los microorganismos y toma de nitrógeno y fósforo por parte de la microalga; en este sentido, los eventos observados en la presente tesis corresponderían a la posible dirección que tomaría el sistema microalga-bacteria después de la eliminación de nitrógeno y fósforo del agua.

Los resultados de este trabajo indican que la incorporación de esferas en el suelo tuvo principalmente tres efectos positivos: un incremento en el crecimiento del sorgo, la incorporación de materia orgánica en suelo, y un incremento en la biomasa microbiana del suelo. El crecimiento del sorgo en el experimento se relaciona principalmente con la disponibilidad de *Azospirillum* en las esferas, lo que permitió colonizar la raíz al aplicarse el sistema como inoculante. La idea de aplicar el sistema microalga-bacteria como inoculante en plantas después de utilizarse en la eliminación de nitrógeno de agua se respalda con los resultados obtenidos de la viabilidad de *A. brasilense*, pero además con la información que se ha generado sobre *Azospirillum* y su papel como PGPB, donde esta bacteria ha sido estudiada y utilizada como inoculante en plantas (Bashan, 1986). Para entender el concepto de inoculante, Bashan (1998) menciona el término “inoculante

bacteriano”, el cual se refiere a una formulación que contiene una o varias cepas bacterianas y que son transportados en un material, sea orgánico ó inorgánico, sintético ó en medio líquido. Un inoculante es utilizado para: fijación de nitrógeno, biocontrol, toma de nutrientes por la planta, mejoramiento de su crecimiento, y para crear efectos benéficos hormonales. Desde este punto de vista, el sistema microalga-bacteria puede ser considerado como inoculante. Entre los efectos que se observan directamente en la planta al inocularse con *Azospirillum* se pueden mencionar diversos cambios morfológicos del sistema radicular, como el incremento en la longitud de la raíz (zona de elongación), en el número y longitud de raíces laterales, en el peso seco de la raíz, en el área del sistema radicular, y estimulación de exudados de la raíz (Hadas y Okon, 1987; Levanony y Bashan, 1989; Bashan, 1998). En la presente tesis, se evaluaron dos parámetros del crecimiento de la planta: longitud (raíz y parte aérea) y peso seco; éstos aumentaron en aquellos tratamientos con *Azospirillum* (COIN y AZO) en comparación con tratamientos sin *A. brasilense*, (PL y CONTROL). Los posibles mecanismos que explican este efecto han sido estudiados previamente (Okon y Kapulnik, 1986; Bottini *et al.*, 1989; Levanony y Bashan, 1989; Hartmann, 1998; Dobbelaere *et al.*, 1999; Bashan *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2008). Es importante resaltar la trayectoria de *Azospirillum* en el estudio de este trabajo, la cual comienza en la inmovilización en esferas de alginato, y continúa en el proceso de deshidratación de las esferas, la liberación de células de la matriz de alginato y la colonización de raíz, ya que *Azospirillum* no sólo sobrevivió a cada uno de estos eventos sino además tuvo la capacidad de beneficiar a dos organismos en diferente tiempo. Este resultado se relaciona con el de Bashan (1986) quien propuso el uso de *A. brasilense* inmovilizado en esferas alginato como matriz de transporte para la inoculación de trigo,

donde a partir de la liberación de células de la bacteria fue posible alcanzar la colonización, o bien con el reportado por Bashan *et al.* (2002) quienes muestran la inmovilización de *A. brasilense* y su uso como inoculante en plantas de trigo a partir de una nueva técnica de inmovilización en microesferas de alginato; incluso hay estudios como el de Yabur *et al.* (2007) quienes al evaluar el uso de alginato producido por *Sargassum sinicola* como material para inmovilizar microorganismos observaron la colonización de *Azospirillum brasilense* en plantas de tomate con el alginato producido por la macroalga. En esta tesis se logró demostrar que es posible dar continuidad al uso de *Azospirillum brasilense* inmovilizada con *Chlorella sorokiniana* en esferas de alginato después de actuar en la eliminación de nitrógeno del agua, mediante su uso posterior como inoculante en planta de sorgo.

Los resultados en la tesis muestran que las 3 veces que se aplicó el sistema microalga-bacteria como inoculante en plantas de sorgo, es decir, en cada uno de los 3 ciclos del experimento, hubo un aumento en la longitud de la raíz, parte aérea, así como aumento del peso seco, contrario a lo que se observó en los tratamientos donde no se agregaron esferas, como es el caso del tratamiento PL y el tratamiento CONTROL. El único parámetro que no incrementó fue el peso seco de la raíz, el cual disminuyó. Al respecto, Bashan y Levanony (1990) mencionan que a pesar de que se ha demostrado los efectos positivos que *Azospirillum* produce en varios parámetros de la raíz, se puede observar en algunos casos que no hay ningún cambio a nivel morfológico, o bien se manifiesta una disminución en cualquiera de los parámetros de crecimiento. Los autores mencionan que factores ambientales como la irrigación y nutrición de la planta, y (o) el genoma de la planta puede significativamente determinar el tipo y magnitud de efectos en

la asociación *Azospirillum*-planta. Lo anterior podría explicar la disminución del peso seco de la raíz durante los tres ciclos, aun cuando se comprobó el efecto positivo del sistema microalga-bacteria como inoculante en plantas de sorgo en los otros parámetros de crecimiento, y no sólo ello, sino que el efecto aumentó cada vez que las esferas fueron aplicadas en el mismo suelo.

El efecto de *A. brasilense* sobre el crecimiento de la planta se corroboró con la presencia de la bacteria en la raíz. De los diferentes métodos empleados, la aplicación de hibridación fluorescente *in situ* favoreció la identificación de la bacteria en la raíz. Esta técnica se ha aplicado en la identificación de microorganismos en ambientes marinos, en el campo de la limnología, en el tratamiento de aguas, en la determinación de simbiosis, o bien como pruebas rutinarias de conteo de miembros del dominio *Bacteria* (Amann *et al.*, 2001). Se ha reportado su aplicación en conjunto con microscopía láser confocal para la identificación y conteo de bacterias en muestras de suelo (Bertaux *et al.*, 2007), y la identificación de *A. brasilense* Sp245 y Sp7 en raíces de 3 diferentes variedades de trigo (Rothballer *et al.*, 2003). Para los resultados de la presente tesis, la primera identificación de *A. brasilense* se realizó con microscopía óptica fluorescente, en la cual se logró visualizar a la bacteria colonizando la raíz, básicamente en zonas de pelos radicales. Con esta primera identificación, se pudo relacionar el aumento de crecimiento y de peso seco de la planta con la colonización de *A. brasilense* en raíz. El mayor obstáculo que tiene esta herramienta es la alta incidencia de autofluorescencia que pueda tener la propia muestra, y que en este caso lo presentó la raíz. Para la segunda identificación, utilizando microscopía láser confocal, *A. brasilense* no se observó en zonas de pelos radicales, pero si en la zona apical de raíces laterales y en zonas de elongación radicular. Además de que con esta

herramienta se puede localizar a la bacteria con mejores resultados, ya que es posible tener una mayor seguridad de que la visualización corresponderá a células hibridizadas de *A. brasilense*, debido al uso de la sonda específica para el dominio *Bacteria* y la sonda con especificidad para *Azospirillum*, además de que el uso de la microscopía láser confocal da una mayor resolución de imágenes que la microscopía óptica epifluorescente y así sea posible trabajar con muestras tridimensionales. En este sentido, Schmith *et al.* (2006) refieren que la microscopía láser confocal ha sido utilizada en combinación con técnicas de marcaje fluorescente ya que permite contrarrestar los problemas de autofluorescencia en la muestra observada cuando se lleva a cabo un escaneo por secciones ópticas. La información contenida en tales escaneos es la base para la reconstrucción tridimensional de una imagen. Además de escanear secciones ópticas a través de la muestra, el microscopio láser confocal permite mostrar el espectro de emisión de fluorescencia por separación digital de canales ó sobrepuestos, formando una sola distribución. Para los resultados de la presente tesis, se logró identificar *A. brasilense* en raíz utilizando FISH y microscopía láser confocal. Es importante considerar que la colonización de la bacteria en la raíz se observó en la periferia de la zona apical de la raíz principal (ó raíces laterales), y que no se identificaron bacterias a nivel intracelular. Al respecto, Bashan y Levanony (1990) mencionan que la colonización de *Azospirillum* en raíz generalmente se observa externa ó internamente. En la colonización externa, la bacteria forma principalmente agregados, aunque muchas células pueden además encontrarse aisladas en la superficie de la raíz. En una colonización interna, las células pueden colonizar la raíz por penetración de los espacios intercelulares de la raíz (Levanony *et al.*, 1989). Aunque *Azospirillum* puede colonizar externamente el sistema radicular entero, tiene preferencia por la zona de elongación y de pelos radicales (Bashan,

1986; Okon y Kapulnik, 1989). Un trabajo donde se da este resultado similar es el reportado por Hadas y Okon (1987), quienes observaron que la colonización *A. brasilense* en tomate se encontró principalmente en zonas de elongación. En los resultados de la presente tesis se pudo observar la colonización de *A. brasilense* en zonas de pelos radicales en forma de células aisladas principalmente por medio de microscopía óptica epifluorescente, mientras que por medio de microscopía láser confocal la colonización se observó en zona apical de la raíz ó raíces laterales, así como en zonas de elongación en forma de células agregadas. Los dos tipos de microscopía fueron complementarios y favorecieron la visualización de *Azospirillum* en raíz de sorgo. De igual forma, fue posible visualizar a *A. brasilense* en raíz en cada uno de los ciclos en los tratamientos COIN y AZO; esta identificación fue similar en cada uno de ellos, es decir, no se observó colonización en otras zonas de la raíz y se continuó observando células aisladas (en la microscopía óptica epifluorescente) o bien manchones que asemejan agregados de células de *Azospirillum* (en la microscopía láser confocal).

Para complementar la identificación de *A. brasilense* en raíz, se analizaron muestras utilizando microscopía electrónica de barrido. Si bien la microscopía electrónica de barrido ha sido ocupada para la identificación de *A. brasilense* en diversos estudios (Bashan, 1986; Hadas y Okon, 1987; Bashan *et al.*, 1991b; Holguín y Glick, 2003; Bacilio *et al.*, 2001) para los resultados obtenidos en este trabajo tesis se sugiere no considerar el análisis como una posible evidencia de la colonización de *Azospirillum* en la raíz. Como se mencionó anteriormente, estudios de colonización de esta bacteria han indicado que el modo de colonización involucra pequeños agregados o células individuales concentradas principalmente en la superficie del ápice de la raíz, en la zona de elongación y en pelos

radicales, con relativamente pocas células en los pelos radicales (Bashan *et al.*, 1991b). Este modo de colonización se pudo observar en este estudio. Se ha mencionado que *A. brasilense* utiliza mecanismos de adhesión para colonizar la planta, la cual presenta dos fases: Fase primaria de adsorción (llamada anclaje) dura poco tiempo (2 horas), débil, y probablemente facilitada por proteínas bacterianas. La segunda fase, llamada anclaje, es larga (8 a 16 horas), es fuerte e irreversible, y probablemente es basada en los polisacáridos bacterianos extracelulares de la superficie (Bashan y Holguín, 1997). La fase de anclaje, se caracteriza por la producción de fibrillas y una larga cantidad de mucigel (Levanony y Bashan, 1991). Hay al menos 2 diferentes tipos de anclaje en la bacteria: un anclaje débil y realizado en una superficie no biológica, y el anclaje fuerte en raíces (Bashan y Holguín, 1997). Además de esto, es sabido que todas las especies de *Azospirillum* tienen movilidad gracias a la presencia de flagelos; el tipo y número de flagelos depende principalmente de su presencia en ambientes líquidos, viscosos ó sólidos (Borisov *et al.*, 2009). La producción de flagelos está relacionada con los procesos de adhesión de *Azospirillum*, al igual que se ha sugerido que las lectinas están relacionadas con dicho proceso, y por consecuencia, con la colonización en la raíz (Castellanos *et al.*, 1998; Schelud'ko *et al.*, 2009). De esta manera, se vuelve a retomar la trayectoria de *A. brasilense* desde su inmovilización con una microalga en esferas de alginato, su uso intrínseco en la interacción con *Chlorella* para la eliminación de nitrógeno de agua, el sobrellevar un proceso de deshidratación de la matriz donde se encuentra inmovilizada, su liberación de esta matriz al agregarse al suelo, y su capacidad para colonizar una planta, pues todo ello tiene una gran importancia biotecnológica.

El segundo efecto positivo que se observó al aplicar el sistema microalga-bacteria al suelo fue el aumento en la cantidad de materia orgánica. Dicho aumento, al igual que el de carbono orgánico se observó en los 3 ciclos del experimento; en contraste, aquellos tratamientos en los que no se aplicó esferas con microalgas y bacterias no se presentó un aumento. La idea de incorporar el sistema microalga-bacteria después de la eliminación de nitrógeno para aumentar la cantidad de materia orgánica en suelo fue planteada debido a la aportación de biomasa de *Chlorella* y alginato y su posible incorporación en el suelo. Algunos autores manejan la idea de agregar microalga como aditivo al suelo. Tal es el caso de Shaaban (2001a) quien estudió el efecto de utilizar extractos de *C. vulgaris* en plantas de trigo (*Triticum aestivum*), observando que tales aditivos de microalga favorecen el crecimiento de la planta, el peso seco, y un aumento hasta de 40% del peso del grano, comparado con plantas adicionadas con fertilizante comercial. Asimismo, Faheed y Fattah (2008) observaron que al agregar *Chlorella vulgaris* en *Lactuca sativa* durante su etapa de germinación, favorece la cantidad de clorofila (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides), longitud y peso seco (raíz y parte aérea, de los dos parámetros). De igual manera Shaaban (2001b) observó que el estatus nutricional y crecimiento de la raíz de plantas de maíz (*Zea mays*) mejoran cuando son adicionadas con extractos de *C. vulgaris*. Lo interesante en estos tres trabajos es que la cantidad de microalga que utilizan como aditivo en los experimentos es mayor a los reportados en la presente tesis. Por ejemplo, Shaaban (2001a) reportan diversas cantidades de extractos de *C. vulgaris* (v/v) como son 25, 50, 75 y 100% de extractos de microalga; a su vez, Faheed y Fattah (2008) reportaron cantidades de 1/2, 1, 2 y 3 g/kg⁻¹ suelo tanto de peso seco de microalga como de microalga húmeda, mientras que Shaaban (2001b) reportó cantidades de 50, 100, 150 y 200 kg/fed (1 feddan=0.42

hectáreas) de peso seco de microalga por cada tratamiento. A pesar de que en la presente tesis la cantidad de *C. sorokiniana* incorporada al suelo fue mucho menor que la reportada en los estudios anteriormente mencionados (aproximadamente un 2% del peso total de las esferas) se puede sugerir que una parte del aumento en el porcentaje de materia orgánica del suelo fue incorporada por la biomasa de *Chlorella sorokiniana* al agregar las esferas al suelo, principalmente por los componentes de *Chlorella*. Los tres mayores componentes de la biomasa de *Chlorella* son carbohidratos, proteínas y lípidos, constituyendo cerca de un 80% del peso seco de la biomasa (Kitano *et al.*, 1998). En este sentido, la aportación de *Chlorella* como biomasa puede considerarse directamente hacia el suelo, y en respuesta a ello, la planta posiblemente llegue a utilizarla como fuente de energía cuando sea degradada, tal y como se ha observado en los estudios donde se aplicó *Chlorella* como aditivo en el suelo para favorecer el crecimiento de plantas (Shaaban, 2001a; 2001b; Faheed y Fattah, 2008). Hay estudios como el de Kitano *et al.* (1998) sobre la degradación de *Chlorella* a través de un proceso de compostaje. Los autores examinaron la descomposición de compuestos orgánicos durante la degradación de la biomasa microalgal, observando CO_2 y NH_3 como productos finales de degradación (proteínas $\rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$; carbohidratos $\rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$; lípidos $\rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), encontrándose además en la descomposición moléculas como carbohidratos y aminoácidos. Asimismo, estos autores mencionan que no necesariamente una mayor cantidad de *Chlorella* puede beneficiar el crecimiento de una planta, pues una mayor cantidad de microalga tardará más tiempo en degradarse, y la mayor cantidad de NH_3 , producto de la degradación de la microalga, puede causar inhibición en el crecimiento, como se observó en sus resultados. En la degradación de biomasa participan una serie de eventos en los

cuales están relacionados diversos microorganismos y un conjunto de factores ambientales que determinan su velocidad ó disminución del proceso.

Asimismo, también se sugiere que una parte del aumento en el porcentaje de materia orgánica y carbono del suelo en los resultados de esta tesis fue además por la aportación de alginato, el cual es considerado como un material orgánico debido a la procedencia natural del polímero. En general, el alginato puede originarse de dos fuentes, de macroalgas ó de microorganismos como bacterias y hongos (Wong *et al.*, 2000; Sabra *et al.*, 2001; Yabur *et al.*, 2007); el alginato es utilizado como matriz de transporte en la inmovilización microbiana debido principalmente a su naturaleza no tóxica, su biodegradabilidad, y su lenta liberación de microorganismos en el suelo (Bashan 1986; Bashan y Holguín, 1998). Sin embargo en la mayoría de los casos el interés por su uso finaliza cuando los microorganismos han sido aplicados ya sea a la planta o al suelo. En este trabajo, además de utilizar el alginato como material de inmovilizado de microalgas y bacterias para una aplicación biotecnológica, se describe una utilidad posterior, la cual se basa en el almacenamiento de los microorganismos viables. Además de esto, se propone considerar al alginato como una fuente de carbono en el suelo, y considerar los mecanismos en los cuales el alginato es degradado y por consecuencia se lleve a cabo la liberación de *Azospirillum* para poder colonizar a la planta, ya que uno de los resultados que se observó fue que en 20 días de haber sido aplicado el sistema microalga-bacteria en el suelo y la planta, las esferas no se degradaron completamente. Así como existen organismos que producen alginato ya sea como componente de la pared celular en macroalgas (Wong *et al.*, 2000) o como polisacárido exopolimérico microbiano para diferentes aplicaciones en condiciones adversas (Remminghorst y Rehm, 2006) también existen microorganismos con

capacidad de degradar alginato, aunque también hay reportes de que el alginato puede ser degradado por otros mecanismos como irradiación por rayos gamma (Hien *et al.*, 2000) y depolimerización por temperatura (Holme *et al.*, 2003). La degradación del alginato por microorganismos es atribuida a enzimas encargadas de depolimerizar este material. Dichas enzimas han sido aisladas de muchas fuentes, incluyendo algas marinas, moluscos marinos y un amplio rango de microorganismos (Wong *et al.*, 2000). En este sentido, para la presente tesis, se sugiere la posibilidad de que la liberación de *Azospirillum* del alginato en el suelo sea realizada por microorganismos del suelo con capacidad de degradar este polímero, y que a su vez esta condición se relacione al porcentaje de carbono del suelo. Gu (2003) menciona que los microorganismos están involucrados con el deterioro y degradación de polímeros tanto orgánicos e inorgánicos, y que además se pueden identificar al menos dos categorías de enzimas que están activamente involucradas en su degradación biológica: depolimerasas intracelulares y extracelulares. Durante la degradación, exoenzimas de microorganismos disocian los complejos poliméricos en pequeñas cadenas ó pequeñas moléculas, por ejemplo oligómeros, dímeros y monómeros, los cuales son lo bastante pequeñas para atravesar la membrana bacteriana semipermeable y de esta manera ser utilizados como carbono ó como fuente de energía. Por otra parte, Wong *et al.* (2000) menciona también la participación de enzimas llamadas alginato lyasas en la depolimerización del alginato, y que el tipo de enzima dependerá del tipo de estructura que presente el alginato, el cual a su vez dependerá del tipo de microorganismo que lo produzca y de las condiciones ambientales. De esta manera, se pueden encontrar bacterias de suelo con capacidad de degradar alginato. Por ejemplo Wong *et al.* (2000) hace referencia a algunos tipos de bacterias del suelo que presentan alginato lyasas. Entre ellas se pueden

mencionar, para el caso de bacterias gram-negativas, especies como *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Sphingomonas* y *Streptomyces*, mientras que para el caso de bacterias gram-positivas, especies como *Bacillus*, *Clostridium* y *Corynebacterium*. Con lo anterior, se puede apoyar la idea de relacionar a microorganismos con la degradación de alginato y con ello la liberación de *Azospirillum*.

En los resultados de este trabajo se logró comprobar el aumento de la materia orgánica y carbono en el suelo al aplicar el sistema microalga-bacteria. Si bien se ha discutido la relación de *Chlorella* y el alginato con este aumento, vale la pena referir que el interés en establecer la conexión de la biomasa incorporada al suelo con el aumento en el porcentaje de materia orgánica no es estrictamente con un punto de vista agronómico, por el contrario, solo es posible elucidar que se manifestó un incremento en tal porcentaje. Incluso se debe aclarar que el aumento en el porcentaje de materia orgánica encontrado no es dependiente de la biomasa de la microalga y el alginato, por el contrario, sólo se sugiere que este aumento es favorecido cuando se aplica el sistema microalga-bacteria al suelo. Lo que si se tiene claro es que la microalga y el alginato pueden considerarse como un material orgánico que puede aplicarse al suelo y afectar su cantidad de materia orgánica y carbono. De acuerdo al concepto de materia orgánica del suelo citado por Manlay *et al.* (2007), la materia orgánica del suelo es entendida como el producto no vivo de la descomposición de sustancias de plantas y animales. Ya que ahora se reconoce que la materia orgánica del suelo controla muchas propiedades del suelo y ciclos biogeoquímicos, su estatus es frecuentemente tomado como un fuerte indicador de fertilidad y degradación. Asimismo, Baldock *et al.* (2004) menciona que la materia orgánica encontrada en suelos y sedimentos marinos existe como una mezcla heterogénea de partículas y moléculas con variables

físicas (por ejemplo tamaño y porosidad) y propiedades químicas (como contenido de grupos funcionales y solubilidad). La diversidad de materia orgánica en estos ambientes es que sus componentes se acumulan y descomponen a diferentes tasas; además, el cambio en la materia orgánica a través del tiempo representa el cambio en el porcentaje del contenido de cada componente. Una forma de representar las relaciones entre la materia orgánica del suelo y su fertilidad es mostrado por Manlay *et al.* (2007) quienes mencionan que la materia orgánica del suelo puede considerarse como un acervo de nutrientes, de carbono, de energía y un componente orgánico asociado a materiales arcillosos, los cuales a su vez confieren un estatus químico, físico y biológico al suelo. De esta manera, se puede entender que la materia orgánica en el suelo está compuesta por diferentes fracciones de sustancias y materiales como producto de la degradación no solamente de plantas y animales, sino también de microorganismos, o como es mencionado por Kuzyakov *et al.* (2009) la descomposición de materia orgánica del suelo es consecuencia no sólo de factores bióticos sino también abióticos. Bajo esta perspectiva, se sugiere que la microalga y el alginato pudieron aportar algún componente, sustancia ó material al suelo, la cual se dio posterior a su aplicación. Un planteamiento similar lo refiere Kögel (2002), quien hace referencia a la cantidad, proporción, y distribución de residuos en el suelo provenientes de la descomposición de plantas (raíces, proteínas, celulosa y ciertos polisacáridos, lignina, almidón, pigmentos y lípidos, entre otros), hongos (quitina, heteropolisacáridos, melanina, glucano, etc.), bacterias (componentes de su pared celular, ácido murámico, glucosamina, galactosamina y diversos polisacáridos) entre otros.

El tercer efecto positivo que se observó al aplicar el sistema microalga-bacteria al suelo fue el aumento en el carbono microbiano, donde los valores ($\text{mg/Kg de suelo} \times 10^3$)

fueron superiores a los observados en muestras de suelo sin incorporación del sistema microalga-bacteria. Se sugiere que este resultado pueda ser un efecto más de la aplicación de las esferas al suelo. Algunos autores mencionan que la biomasa microbiana es el componente activo de la materia orgánica del suelo, el cual es responsable de la dinámica de la materia orgánica y de la disponibilidad de nutrientes para la planta (Gregorich *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 2007). También se ha mencionado que el carbono microbiano responde más rápidamente al cambio en las condiciones del suelo, particularmente a un aumento ó disminución de residuos de plantas y animales, por lo que un cambio en la biomasa microbiana puede reflejar cambios en la fertilidad del suelo (Brookes, 2001; Joergensen y Brookes, 2005; Miltner *et al.*, 2009). En este sentido, el análisis de carbono microbiano del suelo ha sido utilizado principalmente por dos razones, porque es una forma de medir la biomasa microbiana, la cual determina la dinámica de la materia orgánica, y porque puede dar una aproximación de la calidad del suelo y de su fertilidad. Uno de los métodos más exitosos, rápidos y confiables para la cuantificación directa de biomasa microbiana de suelo es el método de fumigación con cloroformo, en el cual los suelos son fumigados con cloroformo induciendo una lisis de la membrana celular microbiana, y con ello la subsecuente liberación de componentes que pueden ser extraídos y cuantificados como carbono microbiano (Witt *et al.*, 2000). En la presente tesis, se utilizó este método de fumigación acompañado con una extracción por medio de la oxidación de dicromato con la intención de complementar el análisis de carbono orgánico del suelo por el método de Walkley-Black donde además de conocer el carbono disponible en el suelo, se puede dar una referencia de la fracción de carbono que se encuentra en el suelo que corresponde a microorganismos. Acerca de la cantidad de biomasa microbiana en diversos tipos de suelo,

Brookes (2001) menciona que la biomasa microbiana en el suelo usualmente comprende entre 1 a 4% del carbono orgánico del suelo, con grandes proporciones en zonas de praderas y bosques. Ross (1991) reportó valores de $1240 \mu\text{g}^{-1}/\text{g}$ de suelo para muestras de suelos con pastura permanente y $758 \mu\text{g}^{-1}/\text{g}$ de suelo para muestras que recibieron tratamiento de residuos de cultivo, observando que cuando son almacenados durante 14 meses los valores disminuyeron a 1184 y $748 \mu\text{g}^{-1}/\text{g}$ de suelo respectivamente. Asimismo, Joergensen (1996) reporta valores de 202, 292 y $325 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}\text{suelo}$ para muestras de suelos arables, de praderas y de bosques, mencionando diferentes valores en estos suelos en función de la temperatura. Martikainen y Palojärvi (1990) reportan para suelos de bosque de coníferas valores de 376, 214, 226 y $438\text{g cm}^{-3}\text{suelo}$, bosque caducifolio 619, 892, 158, 518, 288 y $563\text{g cm}^{-3}\text{suelo}$, mientras que para suelos arables 54 y $83\text{g cm}^{-3}\text{suelo}$. En otro estudio, Reyes *et al.* (2007) reporta valores para suelos semiáridos (islas de recurso, bajo la cobertura de huisache, de mezquite, fuera de la cobertura de los árboles y en suelo de cultivo) 320, 373, 207 y $122 \text{mg C kg}^{-1}\text{suelo}$, respectivamente. En general el método de fumigación-extracción es uno de los métodos más utilizados para determinar la biomasa microbiana de suelo, sin embargo se pueden encontrar otros métodos indirectos que permiten hacer una estimación de esta variable; entre ellos se pueden mencionar el conteo directo de microorganismos por microscopía, el método de fumigación-incubación y el método de extracción de ATP. Además se puede incluir en el análisis la determinación de nitrógeno y fósforo del suelo (Brookes, 2001; Joergensen y Brookes, 2005). En este estudio la determinación de carbono orgánico del suelo incluye el análisis de carbono por el método de Walkley-Black y el método de fumigación-extracción, y tales metodologías tuvieron resultados diferentes pero complementarios, al igual que el análisis de materia orgánica. Al

observar los resultados de materia orgánica, carbono orgánico y biomasa microbiana, se puede conocer cuál de ellos tuvo mayor cantidad de carbono. La relación es la siguiente: M.O.>C orgánico>C microbiano, lo que indica que cada metodología permite conocer una fracción del carbono en el suelo, la cual puede estar disponible, acumulable ó formando parte de materia viva en el suelo.

Los resultados de este estudio fundamentan la alternativa de reutilizar el sistema microalga-bacteria como inoculante, observando su efecto al ser aplicado en suelo, lo cual es un logro importante desde un punto de vista biotecnológico, además se complementa la información sobre la inmovilización de microalgas y bacterias en esferas de alginato para la eliminación de nitrógeno y fósforo de aguas residuales domésticas. Un evento que también se logró identificar es la trayectoria que sigue la bacteria *Azospirillum brasilense*, en la cual están involucradas al menos dos sucesos importantes: 1) el uso de *Azospirillum brasilense* en dos aplicaciones biotecnológicas, es decir para biorremediación de agua, mediante la interacción artificial con una microalga en esferas de alginato, y uso como inoculante microbiano en plantas y suelo con poca materia orgánica; y 2) la capacidad de *Azospirillum brasilense* para sobrevivir a diversas condiciones que le pueden causar estrés, como son la interacción artificial con *Chlorella*, la deshidratación del alginato, la liberación lenta de la matriz de alginato en el suelo, y la colonización de la raíz de la planta. La trayectoria de *A. brasilense* observada en el presente estudio ejemplifica el potencial de esta bacteria y su uso en biotecnología.

9. CONCLUSIONES

El sistema microalga-bacteria contiene células viables de *Azospirillum brasilense* Cd (DMS1843) después de usarse para la eliminación de nitrógeno de agua, y al someterse a condiciones de deshidratación, la viabilidad disminuye durante 12 meses de almacenamiento.

Los parámetros de crecimiento (longitud y peso seco de raíz y parte aérea) de sorgo fueron afectados positivamente cuando se aplicó el sistema microalga bacteria.

Se logró detectar *Azospirillum brasilense* en raíz de sorgo utilizando Hibridación fluorescente *in situ*, Microscopía óptica epifluorescente y microscopía láser confocal las tres veces que se aplicó el sistema microalga-bacteria al suelo.

El sistema microalga-bacteria favoreció un cambio en la cantidad de materia orgánica/carbono y en la biomasa microbiana del suelo durante tres ciclos de resiembra.

Como una alternativa de reuso, el sistema microalga-bacteria puede aplicarse como inoculante en plantas y favorecer el aumento de materia orgánica, carbono orgánico y biomasa microbiana de suelo de zonas áridas.

10. LITERATURA CITADA

1. Alexandre, G., Rohr, R y Bally, R. 1999. A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4701-4704.
2. Amann, R. I. 1995. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology*. 4: 543-554.
3. Amann, R., Krumholz, L y Stahl, D. A. 1990. Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. *Journal of Bacteriology*. 172: 762-770.
4. Amann, R., Ludwig, W y Schleifer, K. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *ASM Microbiology Reviews*. 59: 143-169.
5. Amann, R., Fuchs, B. M y Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Current Opinion in Biotechnology*. 12:231–236 p.
6. Assmuss, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, G., Lawrence, J. R y Hartmann, A. 1995. In Situ Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. *Applied Environmental Microbiology*. 61:1013-1019.
7. Bacilio, J. M., Aguilar, F. S., del Valle, M. V., Pérez, A., Zepeda, A y Zenteno, E. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 167-172.

8. Bacilio, M., Rodríguez, H., Moreno, M., Hernández, J. P y. Bashan, Y. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biology and Fertility of Soils*. 40: 188–193.
9. Baldock, J. A., Masiello, C.A., Gelinas, Y y Hedges, J. I. 2004. Cycling and composition of organic matter in terrestrial and marine ecosystems. *Marine Chemistry* 92: 39-64.
10. Bashan, Y y González, L. E. 1999. Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 262-266.
11. Bashan, Y y Holguín, G. 1998. Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*. 30: 1225-1228.
12. Bashan, Y y Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*. 36: 591-608.
13. Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 51: 1089-1098.
14. Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16: 729-770.
15. Bashan, Y. y Holguin, G. 1997. *Azospirillum* -plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 103-121.

16. Bashan, Y., Bustillos, J. J., Leyva, L. A., Hernández, J. P y Bacilio, M. 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils*. 42, 279–285.
17. Bashan, Y., Davis E. A., Carrillo, G. A y Linderman, R. G. 2000. Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran Desert. *Applied Soil Ecology*. 14: 165–175.
18. Bashan, Y., Hernández, J. P., Leyva, L. A. y Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 35: 359-368.
19. Bashan, Y., Holguin, G y de-Bashan, L. E. 2004. *Azospirillum*– plant relations: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 50:521–577.
20. Bashan, Y., Levanony, H. H, y Whitmoyer, R. E. 1991b. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Journal of General Microbiology*. 137: 187-196.
21. Bashan, Y., Mitiku, G., Ziv-Vecht, O, y Levanony, H. 1991a. Estimation of minimal numbers of *Azospirillum brasilense* using time limited liquid enrichment combined with enzyme-linked immunosorbent assay. *Soil Biology and Biochemistry*. 23: 135-138.
22. Benemann, J. R. 2000. Hydrogen production by microalgae. *Journal of Applied Phycology* 12: 291–300 p.
23. Bertaux, J., Gloger, U., Schmid, M., Hartmann, A. y Scheu, S. 2007. Routine fluorescence in situ hybridization in soil. *Journal of Microbiological Methods*: 69: 451–460 p.

24. Borisov, I. V., Schelud'ko, A. V., Petrova, L. P y Katsy, E. I. 2009. Changes in *Azospirillum brasilense* motility and the effect of wheat seedling exudates. *Microbiological Research*. 164: 578-589.
25. Bottini, R., Cassán, F. y Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology Biotechnology*: 65: 497-503.
26. Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D, y Pharis, R. P. 1989. Identification of Gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in Cultures of *Azospirillum lipoferum*l. *Plant Physiology*. 90: 45-47.
27. Brookes, P. 2001. The soil microbial biomass: Concept, measurement and applications in soil ecosystem research. *Microbes and Environments*. 16:131-140.
28. Carrillo-García, A., Bashan, Y. y Bethlenfalvay, G. J. 2000a. Resource-island soils and the survival of the giant cactus, cardon, of Baja California Sur. *Plant and Soil*. 218: 207-214.
29. Carrillo-García, A., Bashan, Y., Diaz-Rivera, E. y Bethlenfalvay, G. J. 2000b. Effects of resource - island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran Desert. *Restoration Ecology*. 8: 65-73.
30. Castellanos, T., Ascencio, F y Bashan, Y. 1998. Cell-Surface Lectins of *Azospirillum* spp. *Current Microbiology*. 36: 241-244.
31. Chevalier, P. y de la Noüe, J. 1987. Behavior of algae and bacteria co-immobilized in carrageenan, in a fluidized bed. *Enzyme and Microbial Technology*. 10: 19-23.

32. Chibata, I. y Tosa, T. 1981. Use of immobilized cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 10:197-216.
33. Chrzanowski, T. H., Crotty, R. D., Hubbard, J. G. y Welch, R. P. 1984. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microbial Ecology*. 10:179-185.
34. Clarke, J. M., Gillings M. R., Altavilla, N. y Beattie, A. J. 2001. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*. 46: 261–267.
35. Cohen, A. C. Bottini, R. y Piccoli, P. N. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation*. 54: 97–103 p.
36. Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P. y Del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*. 48: 1146–1151.
37. Croizer, A., Arrunda, P., Jasmin, J. M., Montero, A. M. y Sandberg, G. 1998. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 2833-2837.
38. Daims, H., Stoecker, K. y Wagner, M. 2005. Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of prokaryotes. En: *Molecular microbiol ecology*. Osborn, A. M. y Smith, C. J. 2005. Editorial Cromwell press, Trowbridge, UK. 381 pp.

39. de-Bashan, L. E., Antoun, H. y Bashan, Y. 2008a. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 44: 938–947.
40. de-Bashan, L. E., Magallón, P. y Bashan, Y. 2008b. Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology*. 44: 1188–1196.
41. de-Bashan, L. E. y Bashan, Y. 2008a. 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: 6797-6802.
42. de-Bashan, L. E. y Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101: 1611–1627.
43. de-Bashan, L. E., Antoun, H. y 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.
44. de-Bashan, L. E., Hernández, J. P., Morey, T. y Bashan, Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*. 38:466-474.
45. de-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernández, J. P. y Bashan, Y. 2002b. 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*. 36:2941-2948.

46. de-Bashan, L. E., Trejo, A., Volker, A. R., Hernández, J. P. y Bashan, Y. 2008c. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*. 99: 4980–4989.
47. de-Bashan, L. E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V.K. y Bustillos, J. J. 2002a. 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 brasilenses*. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 514-521.
48. de la Noüe, J. y de Pauw, N. 1988. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*. 6:725-770.
49. de la Noüe, J., Laliberte, G. y Proulx, D. 1992. Algae and wastewater. *Journal of Applied Phycology*. 4: 247-254.
50. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A. y Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*: 212: 155–164.
51. Egener, T., Hurek, T. y Reinhold-Hurek, B. 1998. Use of green fluorescent protein to detect expression of nif genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11: 71–75.
52. Ertesvåg H., Erlien, F., Skjåk-Bræk, G., Rehm, B. H. A., y Valla, S. 1998. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *Journal of Bacteriology*. 180: 3779-3784.

53. Ertuğrul, S., Bakyr, M. y Dönmez, G. 2007. Treatment of dye-rich wastewater by an immobilized thermophilic cyanobacterial strain: *Phormidium* sp. *Ecological Engineering*. 32: 244–248.
54. Faheed, F.A. y Fattah, Z. A. 2008. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. *Journal of Agriculture and Social Sciences*. 4: 165–69.
55. Feng, F. Y., Yang, W., Jiang G. Z., Xu N. Y. y Kuang, T. Y. 2005. Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. *Process Biochemistry*. 40: 1315–1318.
56. Garrity, G. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology: the proteobacteria. Springer; 2nd ed. Edition. Vol. 2: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. 2816 pp.
57. González, 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.
58. González, L. E., Cañizares, R. O. y Baena, S. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*. 60: 259-262.
59. González-Bashan, L. E., Lebsky, V., Hernández, J. P., Bustillos, J. J. y 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: 653-659.

60. Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Rema, P. y Empis, J. 1998. Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for rainbow trout: effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and retention in the muscle tissue. *Aquaculture International*. 6: 269–279.
61. Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A. P., Sousa, I. y Empis, J. 2006. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*. 222: 362–367.
62. Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernández, H., Novais, J. y Empis, J. 1996. *Chlorella vulgaris* used to colour egg yolk. *Journal of the Science and Food Agriculture*. 70: 167-172.
63. Gregorich, E. G., Liang, B. C., Drury, C. F., Mackenzie, A. F y McGill, W. B. 2000. Elucidation of the source and turnover of water soluble and microbial biomass carbon in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 581-587.
64. Gu, J. D. 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 52: 69-91.
65. Günter, A., Raff, J., Geipel, G. y Bernhard, G. 2007. Spectroscopic investigations of U(VI) species sorbed by the green algae *Chlorella vulgaris*. *Biometals*. 21:333-341.
66. Hadas, R. y Okon, Y. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils*. 5:241-247.

67. Hartmann, A. y Baldani, A. J. 2006. The Genus *Azospirillum*. In: the Prokaryotes. A Handbook of the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Alpha and Beta subclasses. Third Edition. Section 3.1. Springer New York 115-140.
68. Hartmann, A. 1998. Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. *Plant and Soil*: 10: 225-238.
69. Hernández, J. P., de-Bashan, L. E., Rodríguez, D. J., Rodríguez, Y. 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.
70. Hernández, J.-P., de-Bashan, L. E. y Bashan, Y. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology* 38:190-198.
71. Hesham, M. A y EI-Komy, 2005. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technology and Biotechnology*. 43: 19-27.
72. Hien, N. Q., Nagasawa, N., Tham, L. X., Yoshii, F., Dang, V. H., Mitomo, H., Makuuchi, K. y Kume, T. 2000. Growth-promotion of plants with depolymerized alginates by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 59: 97-101.
73. Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S. y Ogushi, Y. 1997. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*. 22: 137-142.
74. Holguin, G., Patten, C. L. y Glick, B. R. 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biology and Fertility of Soils*. 29:10-23.

75. Holguín, G. y Bashan, Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biology and Biochemistry*. 28: 1651-1660.
76. Holguín, G. y Glick, B. R. 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the tetr gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microbial Ecology*. 46:122-133.
77. Holme, K. H., Lindmo K., Kristiansen, A. y Smidsrød, O. 2003. Thermal depolymerization of alginate in the solid state. *Carbohydrate Polymers*. 54: 431-438.
78. Hyde, F. W., Hunt, G. R. y Errede, A. 1991. Immobilization of bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in poly(Tetrafluoroethylene) membranes. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 219-222.
79. Kitano, M., Yoshida, T., Maeda, K., Matsukawa, R., Hasebe, Y., Uchiyama, S y Karube, I. 1998. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. *Journal of Biotechnology*. 66: 187-193.
80. Joergensen, R. G. 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the K_{ec} value. *Soil Biology Biochemistry*. 28: 25-31 p.
81. Joergensen, R. G y Brookes, P. C. 2005. Quantification of soil microbial biomass by fumigation-extraction. In: Manual for soil analysis: monitoring and assessing soil bioremediation. Chapter 14. Volume 5. Manual of Soil analysis. 281-295.
82. Junter, G. A. y Jouenne, T. 2004. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome. . . or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*. 22: 633-658.

83. Jung, G. y Mugner, J. 1982. Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. *Plant and Soil*. 65: 219-231.
84. Karakashev, D., Thomsen, D. B. y Angelidaki, I. 2007. Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass. *Biotechnology Letters*. 29: 1005-1012.
85. King, A. H. 1983. Brown seaweed extracts (alginates). In: Glicksman, M. (ed). Food hydrocolloids. CRC Press, Boca Raton, FL. 115–188.
86. Kögel, I. K. 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 139-162.
87. Kuzyakov, K., Blagodatskaya, E y Blagodatsky, S. 2009. Comments on the paper by Kemmitt *et al.* (2008) ‘Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass – A new perspective’ [Soil Biology & Biochemistry 40, 61–73]: The biology of the Regulatory Gate. *Soil Biology and Biochemistry*. 41: 435-439.
88. Larrainzar, E., O’Gara, F. y Morrissey, J. P. 2005. Applications of autofluorescent proteins for In situ studies in microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*. 59: 257–77.
89. Lebsky, V. K., González-Bashan, L. E. y Bashan, Y. 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*. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 1-8.
90. Lerner, A., Herschkovitz, Y., Baudoin, E., Nazaret, S., Moenne-Loccoz, Y., Okon, Y. y Jurkevitch, E. 2006. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial

- communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 1212–1218.
91. Levanony, H y Bashan, Y. 1989. Enhancement of cell division in wheat roots tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany*. 69: 2213-2216.
92. Levanony, H. y Bashan, Y., Romano, B. y Klein, E. 1989. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immunogold labeling. *Plant and Soil*. 117: 207-218.
93. Levanony, H y Bashan, Y. 1991. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant and Soil*. 137: 91-97.
94. Li, X., Xu, H. y Wu, Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 98: 764-771.
95. Mallick, N. 2006. Immobilization of microalgae. In: *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Second Edition. 373-391pp.
96. Manlay, R. J., Feller, C y Swift, M. J. 2007. Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 119: 217-233.
97. Martikainen, P. J y Palojarvi, A. 1990. Evaluation of the fumigation-extraction method for the determination of microbial C and N a range of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 22: 797-802.

98. Martínez, L. J., Soto, L., Baca, B. E. y Sanchez, J. A. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*. 228: 167-173p.
99. Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I., Ando, Y. y Hirayama, K. 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the massculture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*: 358: 133–138 p.
100. Meena, K. y Raja, T. 2006. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells by gel entrapment using various metal alginates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 651–652.
101. Mehnaz, S., Weselowski, B y Lazarovits, G. 2007. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 620–624.
102. Miao, X. y Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97: 841–846.
103. Miltner, A., Kindler, R., Knicker, H., Richnow, H. H y Kästner M. 2009. Fate of microbial biomass-derived amino acids in soil and their contribution to soil organic matter. *Organic Geochemistry*. 40: 978-985.
104. Moen, E. y Østgaard, E. 1997. Aerobic digestion of Ca-alginate gels studied as a model system of seaweed tissue degradation. *Journal of Applied Phycology*. 9: 261–267.
105. Moreno, I. G. 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*. 99: 3949–3964.

106. Muyzer, G. y Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* . 73: 127–141.
107. Muyzer, G., De Wall, E. C. y Uiterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. 59: 695-700.
108. Muyzer, G., Hottenträgen, S., Teske, A. y Wawer, K. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3: 1-23.
109. Myers, J. 1974. Conceptual developments in photosynthesis, 1924-1974. *Plant Physiology*. 54: 420-426.
110. Norma oficial mexicana NOM-021 SEMARNAT. Diario oficial. Segunda sección 2002. 85 pp.
111. O'Reilly, K. T. y Crawford, R. L. 1989. Kinetics of p-cresol degradation by an immobilized *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 866-870.
112. O'Donnell, A. G. y Whiteley, A. S. 1999. Fluorescent *in situ* hybridization and the analysis of the single cell. En: *Methods in Biotechnology*. 12: Environmental Monitoring of Bacteria. Humana Press Inc. 221-235.
113. O'Reilly, A. M. y Scott, J. A. 1995. Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 17: 636–646.

114. Okon, Y. y Kapulnik, Y. 1986. Development and function of *Azospirillum-inoculated* roots. *Plant and Soil*. 90: 3-16.
115. Okon, Y., Albrecht S. L. y Burris R. H. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*. 127:1248–125.
116. Orive, G., Hernández, R. M., Gascón, A., Calafaire, R., Chang, T., De Vos, P., Hortelano, G., Hunkeler, D., Lacík, I., Shapiro, J. y Pedraz, J. L. 2003b. Cell encapsulation: Promise and progress. *Nature Medicine*. 9: 104-109.
117. Orive, G., Hernández, R. M., Rodríguez, A. y Pedraz, J. L. 2003a. Encapsulation of cells in alginate gels. In: methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells. Second Edition. 345-355 pp.
118. Osawa, T., Matsubara, Y., Muramatsu, T., Kimura, M y Kakuta, Y. 2005. Crystal structure of the alginate (Poly *a*-L guluronate) lyase from *Corynebacterium* sp. at 1.2 Å^o Resolution. *Journal of Molecular Biology*. 345: 1111–1118.
119. Park J. K. y Chang, H. N. 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*. 18: 303–319.
120. Paul, E., Fages, J., Blanc, P., Goma, G. y Pareilleux, A. 1993. Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40:34-39.
121. Prabakaran, G. y Hoti, S. L. 2008. Immobilization in alginate as a technique for the preservation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for long-term preservation. *Journal of Microbiological Methods*. 72:91–94.
122. Ramos, H. J. O., Roncato-Maccari, L. D. B., Souza, E. M., Soares-Ramos, J. R. L., Hungria, M. y Pedrosa, F. O. 2002. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using

- the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology*. 97: 243–252.
123. Rehm, B. H. A. y Valla, S. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48: 281-288.
124. Rekha, P. D., Lai, W., Arun, A. B. y Young, C. 2007. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology*. 98:447-451.
125. Remminghorst, U. y Rehm, B. H. A. 2006. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*. 28: 1701–1712.
126. Reyes, R. B. G., Rocío Alcántara, H. R. A., Rodríguez, V., Olalde, P. V y Dendooven, L. 2007. Microbial biomass in a semi arid soil of the central highlands of Mexico cultivated with maize or under natural vegetation. *European Journal of Soil Biology*. 43. 180-188.
127. Richmond, P. D. A. 1986. CRC Handbook of microalgal mass culture. Ed Richmond A. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. 584 pp.
128. Romo, S. y Pérez, M. C. 1997. The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. *Journal of Phycology*. 33: 1073-1076.
129. Ross, D. J. 1991. Microbial biomass in a stored soil: A comparison of different estimation procedures. *Soil Biology and Biochemistry*. 23: 1005-1007.
130. Rothballer, M., Schmid, M. y Hartmann, A. 2003. *In situ* localization and PGPR-Effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis*. 34:261-279.

131. Sabra, W., Zeng, A. P. y Deckwer, W. D. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56:315–325.
132. Schelud'ko, A. V., Makrushina, K. V, Tugarovab, A. V., Krestinenkoc, V. A., Panasenkoa, V. I., Antonyuk, L. P y Katsya, E. I. 2009. Changes in motility of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* in the presence of plant lectins. *MicrobiologicalResearch*. 164:149-156.
133. Schloter, M., Moens, S., Crees, C., Reidel, G., Esquenet, M., De Mot, R., Hartmann, A y Michiels, K. 1994. Characterization of cell surface components of *Azospirillum brasilense* Sp7 as antigenic determinants for strain-specific monoclonal antibodies. *Microbiology*. 140: 823-828.
134. Schmid, M., Selesi, D., Rothballer, M., Schloter, M., Lee, N., Kandeler, E., y Hartmann, A. 2006. Localization and visualization of microbial community structure and activity in soil microhabitats. En: Soil Biology, Volumen 6. Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates (eds.: H. König, A. Varma). New York, USA: Springer Verlag, 439-461 pp.
135. Shaaban, M. M. 2001a. Green microalgae water extract as foliar feeding to wheat plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 6: 628-632.
136. Shaaban, M. M. 2001b. Nutritional status and growth of maize plants as affected by green microalgae as soil additives. *Journal of Biological Sciences*. 6: 475-479.
137. Shi, J., Podola, B. y Melkonian, M. 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *Journal of Applied Phycology*. 19:417–423.

138. Shrivastava, S., D'Souza, S. F. y Desa, P. D. 2008. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. *Current Science*. 94: 1595-1604.
139. Singhal, R. K., Joshi, S., Tirumalesh, K y Gurg, R. P. 2004. Reduction of uranium concentration in well water by *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) a fresh water algae immobilized in calcium alginate. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 261: 73-78.
140. Tam, N. F. y Wong, Y. S. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*. 107: 145-151.
141. Tampion, J. y Tampion, M. D., 1987. Immobilized Cells: Principles and Applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 257 pp.
142. Tripathy, P. P., Ayyappan, S. 2005. Evaluation of *Azotobacter* and *Azospirillum* as biofertilizers in aquaculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:1339–1343.
143. Vance, E. D., Brookes, P. C. y Jenkinson D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*. 19:703–707.
144. Wanandy, S., Brouwer, N., Liu, Q., Mahon, A., Cork, S., Karuso, P., Vemulpad, S. y Jamie, J. 2005. Optimisation of the fluorescein diacetate antibacterial assay. *Journal of Microbiological Methods*. 60:21– 30.
145. Widjaja, A., Chien, C. C. y Ju, Y. H. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 40: 13–20.

146. Witt C., Gaunt J. L., Galicia C.C., Ottow J. C. G y Neue H. U. 2000. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. *Biology of Fertility Soils*. 30:510–519 p.
147. Wong, T. Y., Preston, L. A. y Schiller, N. L. 2000. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Review of Microbiology*. 54:289–340.
148. Xu, H., Miao, X. y Wu, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 126: 499–507.
149. Yabur, R., Bashan, Y. y Hernández-Carmona, G. 2007. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material for wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Phycology*. 19:43-53.
150. Zwirgmaier, K. 2005. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) - the next generation. *FEMS Microbiology Letters*. 246: 151–158.