



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**“EFECTO DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO
PRODUCIDO POR *Azospirillum brasilense* EN LAS
ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO EN
Chlorella vulgaris, BAJO CONDICIONES DE CO-
INMOVILIZACIÓN.”**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Beatriz Meza Márquez

La Paz, Baja California Sur, Marzo del 2013.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15.00 horas del día 26 del Mes de Febrero del 2013, 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:

"Efecto del ácido indol-3-acético producido por *Azospirillum brasilense*, en las enzimas de asimilación de amonio de *Chlorella vulgaris*, bajo condiciones de co-inmovilización"

Presentada por el alumno:

Beatriz Meza Márquez

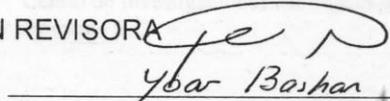
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

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


M. E. González de Barón

INSERTAR NOMBRE
DIRECTOR DE TESIS


Ybar Barón

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR



Beatriz Eugenia Baca
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité Tutorial

Dra. Luz Estela González de Bashan
Directora de tesis
Dra. Beatriz Eugenia Baca
Cotutora
Dr. Yoav Bashan
Cotutor

Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.
Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla
Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.

Comité Revisor de tesis

Dra. Luz Estela González de Bashan
Directora de tesis
Dra. Beatriz Eugenia Baca
Cotutora
Dr. Yoav Bashan
Cotutor

Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.
Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla
Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.

Jurado de Examen

Dra. Luz Estela González de Bashan
Directora de tesis
Dra. Beatriz Eugenia Baca
Cotutora
Dr. Yoav Bashan
Cotutor

Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.
Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla
Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.

Suplente

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C

RESUMEN

En el grupo de Microbiología Ambiental, CIBNOR La Paz B.C.S. México, se estableció un sistema de investigación para estudiar las interacciones entre la microalga *Chlorella vulgaris* y la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Azospirillum brasilense* así como sus implicaciones. Ha sido encontrado que *Azospirillum* promueve en *Chlorella* una mayor absorción de amonio y un incremento en la actividad específica de las enzimas de asimilación de amonio Glutamina Sintetasa (GS) y Glutamato Deshidrogenasa (GDH). El mecanismo es aún desconocido. Hoy en día, la explicación más común para algunos de los modos de acción de *Azospirillum* en plantas es la producción de varias fitohormonas que alteran la morfología y el metabolismo de la planta, principalmente, el Ácido Indol-3-Acético (AIA). En este estudio, se midió el efecto del AIA en el mecanismo de asimilación de amonio en *Chlorella*, se usaron varios mutantes atenuados en AIA de *A. brasilense*. Estos mutantes tienen bajas tasas de producción de AIA comparadas con las cepas silvestres. El contenido de amonio intracelular, así como leves cambios en la actividad enzimática de GS y GDH fueron medidos, después de la inmovilización conjunta de los microorganismos en esferas de alginato. Se encontró que cepas silvestres de *Azospirillum* tienen mayor efecto en *C. vulgaris* que las cepas atenuadas de AIA en el aumento del contenido de amonio intracelular, proteínas, tasa de crecimiento y en la actividad de las enzimas GS y GDH. Cuando se encuentran co-inmovilizados *C. vulgaris* y *A. brasilense* producen un efecto sinérgico. El Ácido Indol-3-acético producido por *A. brasilense* tiene un efecto en la asimilación de amonio y en las enzimas de asimilación de amonio (GS y GDH) de *C. vulgaris*, por lo que se propone como un posible mecanismo de acción que prevalece en esta interacción microalga-bacteria.

Palabras clave: *Azospirillum*, *Chlorella*, Ácido indol-3-acético (AIA), amonio, enzimas de asimilación de amonio (GS, GDH)

ABSTRACT

In the Environmental Microbiology group, CIBNOR La Paz B.C.S. México, a research system was established to study the interactions between the microalgae *Chlorella vulgaris* and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* and their implications. It has been found that *Azospirillum* promotes an increased uptake of ammonium in *Chlorella* spp. and an increase in the specific activity of the ammonium assimilation enzymes glutamine synthetase (GS) and glutamate dehydrogenase (GDH). The mechanism is still unknown. Today, the most common explanation for some of the effects of *Azospirillum* on plants is the production of several phytohormones that altering the morphology and metabolism of the plant. Mainly, indole-3-acetic acid (IAA). In this study, we measured the effect of the IAA on the ammonium assimilation in *Chlorella*, several IAA attenuated mutants were used. These mutants have lower production rates of IAA compared to wild-type strains. The intracellular content of ammonium and small changes in the enzymatic activity of GS and GDH were measured, after co-immobilization of the two microorganisms in alginate beads. It was found that wild-type strains of *Azospirillum* have greater effect on *C. vulgaris* than IAA attenuated strains by increased intracellular content of ammonium, proteins, growth rate and in the activity of GS and GDH enzymes. When they are co-immobilized together, *C. vulgaris* and *A. brasilense* produce a synergistic effect on all the above parameters. The indole-3-acetic produced by *A. brasilense* has an effect on the assimilation of ammonium and the ammonium assimilation enzymes (GS and GDH) of *C. vulgaris*, and it is proposed as a possible mechanism of action prevailing in this microalgae-bacteria interaction.

Key words: *Azospirillum*, *Chlorella*, indole-3-acetic acid (IAA), ammonium, ammonium assimilation enzymes (GS, GDH).

Este trabajo es dedicado a mis padres: Luis Meza Cordero, María Antonieta Márquez Ceseña, mi nana: Rosario Ceseña Aguilar y mis hermanas: María Antonieta Meza Márquez y Lilia Meza Márquez. Quienes siempre me han apoyado a lo largo de mi vida incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca Otorgada de Nivel Maestría.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR La Paz, B.C.S.) por las facilidades otorgadas, para la realización de este trabajo.

A la dirección de estudios de posgrado, CIBNOR, y su directora Dra. Elisa Serviere

A los proyectos: CONACyT – Ciencia Básica – 130656 y 164548.

A la Bashan Foundation

Al comité tutorial: Dra. Luz E. González de-Bashan (directora), Dra. Beatriz Eugenia Baca y Dr. Yoav Bashan (tutores).

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental

Al Grupo de Microbiología Ambiental

A Luis Alonso Leyva Soto

A Lilia Meza Márquez

A Mario Rojas Arzaluz

A Juan Pablo Hernández

A Arturo Sierra Beltrán

A Amaury Cordero Tapia

A Horacio Sandoval Gómez

ÍNDICE

2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	ANTECEDENTES	4
3.1.	EL GÉNERO <i>Chlorella</i>	4
3.1.1.	Asimilación de nitrógeno en <i>Chlorella</i>	4
3.2.	EL GÉNERO <i>Azospirillum</i>	8
3.2.1.	Modos de acción de <i>Azospirillum</i>	8
3.2.2.	Fitohormonas producidas por <i>Azospirillum</i>	10
3.2.3.	Acido indol-3acetico (AIA) como molécula señal	14
3.3.	INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS.....	15
3.3.1.	Inmovilización de microorganismos.....	16
3.3.2.	Co-inmovilización de <i>Chlorella</i> – <i>Azospirillum</i>	17
3.3.3.	Modelo <i>Chlorella</i> – <i>Azospirillum</i>	18
3.4.	EFFECTOS QUE PROMUEVE <i>Azospirillum</i> EN LA ASIMILACIÓN DE AMONIO EN MICROALGAS Y PLANTAS SUPERIORES.....	21
4.	PREGUNTA.....	22
5.	HIPÓTESIS	22
6.	OBJETIVOS.....	22
6.1.	OBJETIVO GENERAL	22
6.2.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
7.	METODOLOGÍA:	23
7.1.	EXPERIMENTO PRELIMINAR	23
7.1.1.	Concentraciones de Ácido Indol Acético	23
7.1.2.	Microorganismo y su condición de crecimiento.....	24
7.1.3.	Inmovilización de <i>Chlorella vulgaris</i> en esferas de alginato	24
7.1.4.	Condiciones de cultivo de los microorganismos inmovilizados, solubilización de esferas y conteo celular.....	24
7.1.5.	Análisis de amonio.....	25
7.1.6.	Diseño experimental y análisis estadísticos.....	25
7.2.	ESTRATEGIA BIOQUÍMICA.....	25

7.2.1.	Microorganismos y condiciones de crecimiento	25
7.2.2.	Condiciones de cultivo de los microorganismos inmovilizados.....	26
7.2.3.	Diseño experimental	26
7.2.4.	Extracción y medición amonio intracelular	27
7.3.	ESTRATEGIA ENZIMÁTICA	27
7.3.1.	Microorganismos y su condición de crecimiento	27
7.3.2.	Inmovilización de <i>Chlorella vulgaris</i> en esferas de alginato	28
7.3.3.	Condiciones de cultivo de los microorganismos inmovilizados, solubilización de esferas y conteo celular.....	28
7.3.4.	Extracción	29
7.3.5.	Proteínas.....	29
7.4.	ANÁLISIS ENZIMÁTICO.....	29
7.4.1.	Glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.3)	29
7.4.2.	Glutamina sintetasa (GS: EC 6.3.1.2).....	31
7.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
8.	RESULTADOS	32
9.	DISCUSIÓN.....	46
10.	CONCLUSIÓN.....	51
11.	REFERENCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas Bioquímicas (principal y menor) de asimilación de nitrógeno inorgánico en <i>Chlorella</i> spp.	5
Figura 2. Rutas para la biosíntesis de AIA dependiente de triptófano	13
Figura 3. Crecimiento y eliminación de amonio por <i>C. vulgaris</i> con diferentes concentraciones de AIA.	33
Figura 4. Acumulación de amonio intracelular.	34
Figura 5. Efecto de la acumulación de amonio intracelular en el co-inmovilizado a las 24 y 48 horas de cultivo.....	35
Figura 6. Relación del AIA, producido por <i>A. brasilense</i> , y el efecto neto en la acumulación de amonio intracelular de <i>C. vulgaris</i>	36
Figura 7. Acumulación de amonio por célula y crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> , <i>A. brasilense</i>	37
Figura 8. Tasa de crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	38
Figura 9. Relación del AIA, producido por <i>A. brasilense</i> , y la tasa de crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	39
Figura 10. Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> y <i>A. brasilense</i>	40
Figura 11. Contenido de proteínas y contenido de proteínas por célula de <i>Chlorella</i> en el sistema microalga-bacteria.	41
Figura 12. Actividad por cultivo de glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa.	43
Figura 13. Efecto neto de la Actividad por cultivo de glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa.	44
Figura 14. . Relación del AIA, producido por <i>A. brasilense</i> , y el efecto neto en la actividad de glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa.....	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Producción de AIA por cepas silvestres y mutantes de <i>Azospirillum</i>	24
Tabla 2. Cepas silvestres y mutantes de <i>Azospirillum</i>	26

1. INTRODUCCIÓN

La inmovilización de microorganismos en polímeros ha sido una técnica utilizada en extensas aplicaciones biotecnológicas y en varios estudios de ciencia básica (de-Bashan y Bashan, 2010); como muestra, las investigaciones realizadas en el Grupo de Microbiología Ambiental (CIBNOR, La Paz) donde, en el año 2000, se estableció un sistema *in vitro* empleando la técnica de inmovilización para estudiar las interacciones entre el alga verde *Chlorella* y la bacteria *Azospirillum* en una matriz de gel. Este sistema experimental fue creado artificialmente, es decir, no existe en la naturaleza pues involucra la inmovilización de microalgas y bacterias atrapadas en esferas de alginato (de-Bashan y Bashan, 2008). El sistema es fácil de manejar, es económico y produce resultados rápidos (de-Bashan *et al.*, 2003).

En el año 2008 el sistema *Chlorella - Azospirillum* fue propuesto como modelo de estudio para la interacción planta – bacteria, ya que puede ser útil para estudios básicos de la fisiología y la biología molecular de las interacciones planta-bacteria. Esto, debido a que el genoma de *Chlorella* es el más pequeño de los microorganismos eucariotas fotosintéticos, caracterizado hasta ahora, que lo convierte en una alternativa a las plantas superiores con grandes genomas interactuando con bacterias promotoras del crecimiento en plantas (por sus siglas en inglés PGPB), además de que *Chlorella* responde a la interacción con *Azospirillum* en formas que son muy similares a las respuestas de interacción de las plantas superiores, mejorando su crecimiento y cambiando su metabolismo.

A nivel experimental, se ha comprobado que cuando los dos microorganismos crecen en conjunto, proporcionan efectos mutuamente beneficiosos entre sí. Por ejemplo, *Chlorella* inmovilizada con *Azospirillum* produce mayores cantidades de lípidos, pigmentos (de-Bashan *et al.*, 2002) y un aumento en el crecimiento poblacional (de-Bashan *et al.*, 2002a, 2004, 2005, 2008a; Hernández *et al.*, 2006). Asimismo, se ha visto que *Azospirillum* promueve en *Chlorella* una mayor absorción de amonio (de-Bashan *et al.* 2002a, 2004, 2005; Hernández *et al.*, 2006) y un incremento en la actividad específica de las enzimas de asimilación de amonio Glutamina Sintetasa (GS) y Glutamato Deshidrogenasa (GDH) (de Bashan *et al.*, 2008b). Estos beneficios se pueden explicar de varias maneras. Las microalgas son conocidas por producir y liberar el oxígeno suficiente para cumplir las

exigencias de las bacterias más aeróbicas, y también pueden liberar compuestos orgánicos que puedan ser asimilados por las bacterias (Mouget *et al.*, 1995). A cambio, las bacterias pueden ser una fuente de CO₂, especialmente durante períodos de limitado carbono, o pueden estimular el crecimiento de algas por la liberación de vitaminas y hormonas vegetales (Mouget *et al.*, 1995; Gonzalez-Bashan *et al.*, 2000; Gonzalez y Bashan, 2000). No obstante, hasta ahora solo ha sido comprobado que la hormona vegetal AIA (Ácido Indol-3-acético) producida por *Azospirillum* es un posible mecanismo de acción por el cual promueve el aumento en el crecimiento poblacional en *Chlorella* (de-Bashan *et al.*, 2008a). Como se ha visto, este sistema se encuentra en una fase avanzada de ejecución sin embargo la gran mayoría de los mecanismos que están implicados en la interacción entre estos microorganismos son desconocidos desde el punto de vista científico. Para entender una parte del mecanismo de la interacción, necesitamos saber cómo funciona. Por lo cual, en el grupo se ha desarrollado una línea para conocer los mecanismos que están involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la interacción de *Azospirillum brasilense* con *Chlorella vulgaris*. Una pregunta a resolver es ¿qué papel tienen las fitohormonas producidas por *Azospirillum*, en el metabolismo del nitrógeno, fósforo y lípidos en *Chlorella*?

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo ver el efecto o papel que desempeña la fitohormona AIA producida por *Azospirillum brasilense* en el mecanismo de asimilación de amonio en *Chlorella vulgaris*, específicamente en las enzimas de asimilación de amonio (GS y GDH) de *C. vulgaris*. Esta propuesta fue establecida debido a que, con todos los antecedentes generados en el Grupo de Microbiología Ambiental, para conocer que el AIA producido por *Azospirillum* es el posible mecanismo responsable del aumento en la asimilación de amonio en *Chlorella*. El conocimiento que se genere será de importancia para aportar más pruebas de que este modelo microalga – bacteria sea aplicable a plantas superiores. Una forma de visualizar el efecto y como el AIA, producido por *A. brasilense*, puede estar involucrado en el mecanismo de asimilación de amonio por parte de *C. vulgaris*, es la utilización de cepas de *A. brasilense* comparando los resultados con sus mutantes atenuados en AIA.

2. ANTECEDENTES

2.1. EL GÉNERO *Chlorella*

Chlorella (Chlorophyceae) es una simple, inmóvil, unicelular, microalga verde acuática, fue una de las primeras algas en ser aisladas como cultivo puro por Beijerinck en 1980 (Oh-Hama y Miyachi, 1992), es esférica, mide de 2-10 μm de diámetro, carece de flagelo y posee un ciclo de vida simple. Su reproducción es exclusivamente asexual, cada célula madura produce de 4 a 8 autoesporas. La división celular se lleva a cabo en la noche, el incremento del volumen celular durante el día, estos ciclos dependen de la intensidad de la luz y la temperatura del ambiente (Richmond, 1986). Como característica importante *Chlorella* crece rápidamente, teniendo una tasa de crecimiento de hasta 0.2-h en cultivos fotoautotróficos (Lee, 2001). Una de las herramientas utilizadas para el conteo de células de *Chlorella* es utilizando un microscopio de luz con un hemocitómetro de Neubauer (de-Bashan *et al.*, 2008). Ha sido intensamente estudiada, fue utilizada como modelo de estudio biológico en fotosíntesis (Myers, 1974), estudios sobre síntesis de carbohidratos en microalgas y respiración (Ilangovan *et al.*, 1988).

2.1.1. Asimilación de nitrógeno en *Chlorella*

El nitrógeno (N) es un elemento esencial incorporado en muchas macromoléculas, incluyendo proteínas (aminoácidos y ácidos nucleicos) (Lobban y Harrison, 1994). *Chlorella* spp., puede utilizar una gran variedad de compuestos de nitrógeno orgánico e inorgánico. Sin embargo, las fuentes principales para el crecimiento de *Chlorella* son el amonio y sales de nitrato, y a veces urea. Cuando el amonio y nitrato se suministran juntos, las microalgas preferentemente utilizan en primer lugar el nitrógeno del amonio, que se incorpora en los compuestos orgánicos producidos por la microalga. La absorción de los iones NO_3^- conduce a un aumento en el pH del medio, mientras que el consumo de iones NH_4^+ conduce a una disminución en el pH (Oh-Hamma y Miyachi, 1992). Las vías enzimáticas implicadas en la asimilación de nitrógeno se describen en la Figura 1.

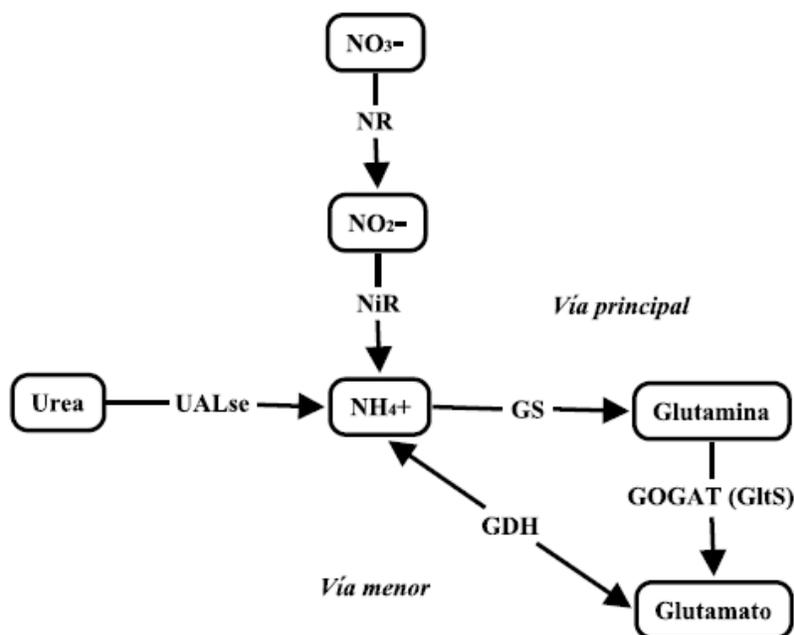


Figura 1. Rutas Bioquímicas (principal y menor) de asimilación de nitrógeno inorgánico en *Chlorella* spp.

2.1.1.1. Reducción de nitrato y nitrito

Cuando el nitrato es la fuente de nitrógeno, las células de *Chlorella* lo transportan a través de su membrana para posteriormente ser reducido a amonio, antes de la incorporación en compuestos orgánicos (Crawford *et al.*, 2000). Estudios realizados en plantas superiores y microalgas sugieren que sólo dos enzimas, la nitrato reductasa (NR; EC 1.6.6.1-3) y nitrito reductasa (NiR; EC 1.7.7.1) trabajan de forma secuencial para catalizar la reducción total de nitrato a amonio (Kaplan *et al.*, 1986; Fernández y Galván, 2007). La asimilación de NR cataliza la reducción de nitrato a nitrito, utilizando nucleótidos piridina reducidos como donadores de electrones (Gewitz *et al.*, 1981; Nakamura y Ikawa, 1993). NiR cataliza el segundo paso de la asimilación de nitrato, la reducción de nitrito a amonio, con ferredoxina como donador de electrones en una reacción que implica la transferencia de seis electrones (López-Ruiz *et al.*, 1991). NiR es una enzima de los cloroplastos, mientras que NR se encuentra específicamente en el citoplasma (Fernández y Galván, 2007; Inokuchi *et al.*, 2002). En la mayoría de las microalgas, la nitrato reductasa (NR) se expresa plenamente en cultivos de células que crecen en nitrato como única fuente de nitrógeno, y es reprimida en las células que crecen en medios que contienen exceso de amonio o una mezcla de amonio

más nitrato (Gewitz *et al.*, 1981; Di Martino Rigano *et al.*, 1982; Sherman y Funkhouser, 1989; Canones y Pendleton, 1994).

2.1.1.2. Asimilación de urea

Algunas especies de *Chlorella* spp., también puede utilizar la urea como única fuente de nitrógeno, y suele ser hidrolizada, en amoníaco y bicarbonato, antes que su nitrógeno se incorpore en las células algales. En microalgas, hay dos enzimas que metabolizan la urea, la ureasa (EC: 3.5.1.5) y la urea amidoliasa (también llamada urea carboxilasa, UALse, EC: 6.3.4.6), pero la mayoría de *Chlorella* spp., al parecer, carecen de ureasa (Kaplan *et al.*, 1986; Oh-Hama y Miyachi, 1992) y metaboliza la urea por UALse. La vía catabólica UALse es seguida por alofano liasa (EC: 3.5.1.54) que cataliza la síntesis de alofano, resultando en la hidrólisis de la urea a amoníaco y bicarbonato (Morris, 1974). Independientemente de la actividad, la utilización de la urea es de menor importancia en el ciclo de crecimiento de *Chlorella* spp. que el amonio y nitrato. De los datos obtenidos hasta el momento, es evidente que el orden de uso de una fuente de nitrógeno por la mayoría de especies de microalgas es, en orden decreciente: amonio › nitrato › nitrito › urea, donde un especial cuidado con la concentración de amonio es una consideración importante (Perez-García *et al.*, 2011).

2.1.1.3. Asimilación de amonio

Amonio es la fuente de nitrógeno más preferido por la microalgas. También es la fuente más eficiente energéticamente, ya que requiere menos energía para su captación (Syreth y Morris, 1963; Golydman, 1976; Kaplan *et al.*, 1986; Shi *et al.*, 2000; Grobbelaar, 2004; Wilhelm *et al.*, 2006). La asimilación de amonio es un proceso bioquímico fundamental para el crecimiento así como el desarrollo (Lu *et al.*, 2005), y están implicadas dos rutas enzimáticas. La más importante es la Glutamina Sintetasa (GS, EC 6.3.1.2) y la ruta Glutamato Sintasa (GOGAT o GltS EC 1.4.1.14) (Vanoni y Curti, 2005). Otra ruta implicada es la aminación reductiva reversible de α -oxoglutarato, catalizada por la Glutamato Deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2), que funciona como ruta auxiliar (Zaliha *et al.*, 1997; Habash y Miflin, 2002; Lu *et al.*, 2005). La vía GS / GltS es considerada como la

principal vía de asimilación de amonio, mientras que la función de la vía GDH sigue siendo oscura, y se cree que se activa bajo condiciones de estrés (Lu *et al.*, 2005).

Glutamina sintetasa (glutamato-amonio-ligasa-GS) es conocida por su gran afinidad por el amonio y por incorporar de manera eficiente el amonio en aminoácidos. Esta enzima juega un doble papel al proporcionar glutamina para la biosíntesis y la asimilación de amonio. La glutamina se forma mediante la adición de NH_4^+ en el grupo carboxilo γ del ácido glutámico en una reacción catalizada por esta enzima. GS es ampliamente distribuida en las plantas y se produce en dos formas principales, uno en el cloroplasto y otra en el citosol. La forma GS de plásmidos está ampliamente distribuida en el cloroplasto y es generalmente considerado como universal.

Glutamato sintasa (GltS) son enzimas esenciales en la asimilación de amonio en las plantas y las bacterias, en los que catalizan la formación de dos moléculas de L-glutamina y α -oxoglutarato. Se distinguen 3 clases distintas de GltS: Una GltS ferredoxina-dependiente (Fd-GltS), una enzima hierro-azufre y que contiene FMN-detectado en los cloroplastos de plantas superiores, cianobacterias y algas. Una GltS dependiente de NADPH (NADPH-GltS), en su mayoría se encuentra en las bacterias. Por último un mal caracterizado NADH-dependiente GltS se encuentra principalmente en hongos, animales inferiores, y los tejidos no verdes, como las semillas y raíces. Esta vía es esencial también en bacterias diazotróficas, que dependen de GS y GltS para asimilar de manera eficiente el amoniaco producido por la nitrogenasa en glutamina y glutamato. GS puede ser inhibida por la MSX (metionina sulfoximina).

En la vía alternativa, la **glutamato deshidrogenasa (GDH, NADH oxidoreductasa)** cataliza la formación de glutamato directamente de NH_4^+ y α -oxoglutarato. *Chlorella sorokiniana* contiene dos isoenzimas de deshidrogenasa en glutamato: NADH-GDH y NADP-GDH. Que son similares y están regulados por la concentración de NH_4^+ y α -oxoglutarato. NADP-GDH se localiza en el cloroplasto, dependiente de la inducción de luz, y amonio, mientras que el NAD-GDH es constitutivo y localizado en la mitocondria. De acuerdo con Bascomb *et al.* (1986), NADP-GDH se somete a la inactivación rápida después de la eliminación de amonio a partir de células inducidas por completo.

Glutamina sintetasa tiene una mayor afinidad por el amonio (30 mM), comparada con la glutamato deshidrogenasa (40 mM), lo que significa que las funciones de GS son mayores, incluso a niveles muy bajos de amonio (Tischer, 1984)

2.2. EL GÉNERO *Azospirillum*

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias (Garrity, 2005), comprende bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que viven en la rizosfera, que proporcionan efectos benéficos sobre el crecimiento de las plantas; por lo anterior, son denominadas Bacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (por sus siglas en inglés PGPB) (Döbereiner *et al.*, 1976), además, actúan como promotor de crecimiento en *Chlorella* spp. (González y Bashan, 2000). *Azospirillum* son bacterias Gram negativas heterotróficas, generalmente se presentan en forma de bacilo, como un bastón gordo curvilíneo, entre 0.8-a.0x25 μm de tamaño (Hartman y Baldani, 2006). Características útiles en la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad espiral (Caballero-Mellado, 2001). Una de las herramientas utilizadas para identificación fenotípica y conteo de células de *Azospirillum* es la tinción fluorescente con Fluorescein Diacetate (FDA) (Chrzanowski *et al.*, 1984; Clarke *et al.*, 2001; Wanady *et al.*, 2005). Al menos 15 especies de *Azospirillum* han sido descritas, pero en términos de fisiología y genética las más estudiadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Massena Reis *et al.*, 2011). En adición a su fijación de N_2 bajo condiciones microaerobias, desnitrifica bajo condiciones anaeróbicas o microaerofílicas y puede asimilar NH_4^+ , NO_3^- o NO_2 . En medios de cultivo deficientes en nitrógeno *A. brasilense* y *A. lipoferum*, tienen una captación de amonio muy alta. La captación de CH_3NH_3^+ tiene una afinidad de 50 μM (K_M) y es inhibida competitivamente por el amonio ($K_i=5\mu\text{M}$) indicando que el acarreador tiene un sitio de unión común. Esta actividad recolectora de amonio (que requiere energía) tiene el propósito de asegurar la absorción de pequeñas cantidades de amonio (Hartman y Zimmer, 1994).

2.2.1. Modos de acción de *Azospirillum*

Hasta ahora, el modo preciso de acción de *Azospirillum* en plantas no ha sido totalmente esclarecido. Los principales modos de acción propuestos incluyen: fijación de N_2 , actividad hormonal, actividad de la membrana y una hipótesis aditiva (de-Bashan *et al.*, 2008). La

fijación del nitrógeno fue el primer mecanismo en ser propuesto, esto, debido a que todas las cepas silvestres de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico y se ha presentado un incremento en el N total de brotes, así como granos de plantas inoculadas. Este mecanismo está fundamentado en el hecho de que la actividad nitrogenasa en raíces, mediada a través de la técnica de reducción de acetileno, se ve significativamente incrementada. Sin embargo, estudios con ^{15}N revelaron que la contribución real del nitrógeno de la bacteria fue de 5% del nitrógeno acumulado. No obstante, hacer caso omiso de la fijación del nitrógeno como un mecanismo de *Azospirillum*, es prematuro. Pues es factible que la cantidad de nitrógeno proporcionado pueda ser acumulativo a otros mecanismos para así producir un efecto final (Bashan *et al.*, 1993; Bashan y de-Bashan, 2010). Otro mecanismo propuesto, quizás el más substancial, es la **actividad hormonal**. Las hormonas existen en la naturaleza como moléculas que regulan el crecimiento, desarrollo, diferenciación de células y tejidos, etc., ellas actúan como mensajeros químicos estando presentes en pequeñas cantidades, en plantas las llamamos fitohormonas (Baca y Elmerich, 2007). La habilidad de producir fitohormonas de plantas es una propiedad de muchos organismos, en general de PGPB y específicamente, especies de *Azospirillum* que estimulan y facilitan el crecimiento de la planta (Massena-Reis *et al.*, 2011). Ha sido persistentemente propuesto, que el mecanismo de *Azospirillum* está basado en cambios de las hormonas inducidas a la planta por la bacteria. Esta teoría está basada en varios hechos (Bashan y de-Bashan, 2010). Esta bacteria produce varias fitohormonas de la planta en cultivo, especialmente ácido indol-3-acético (AIA), un hecho conocido desde los primeros años de investigación en esta bacteria (Spaepen y Vanderleyden, 2010). La aplicación de hormonas sintéticas a plantas produce efectos que imitan el efecto de la inoculación de *Azospirillum*. Las hormonas mutantes sobreproductoras causan más efectos pronunciados en el crecimiento de la planta que las cepas de tipo silvestre. Esto provee evidencia indirecta que *Azospirillum* está involucrado en la regulación de hormonas en plantas. (Bashan *et al.*, 1993; Bashan y de-Bashan, 2010). Un mecanismo distinto es la **Actividad de membrana**, en donde, debido a que *Azospirillum* afecta el metabolismo de la pared celular desde fuera de la célula, el presente mecanismo sugiere que estas bacterias son capaces de excretar protones y transmitir una señal que atraviesa la pared celular de la planta la cual es reconocida por las membranas de las mismas. Esta interacción puede iniciar una cadena de eventos resultando

en un metabolismo alterado de las plantas inoculadas y la proliferación de raíces (Bashan *et al.*, 1993). A pesar de esto, hasta el momento no han sido identificadas las señales moleculares bacterianas que pueden afectar la membrana y tampoco se han estudiado la movilización de iones que afectan la membrana (Bashan y de-Bashan, 2010). Finalmente, en el mecanismo denominado **hipótesis aditiva** se señala que aunque las propuestas anteriores son basadas en evidencia experimental, existen insuficientes datos cuantitativos que puedan soportar la idea de que uno de estos mecanismos sea el único responsable de los cambios en las plantas. Por lo tanto, se propone que probablemente más de un mecanismo participa en la asociación, simultáneamente, o es sucesión de otro (Bashan *et al.*, 1993), en ese sentido, la suma de las actividades de los demás mecanismos opera en conjunto. En resumen, la fijación de N₂ contribuye con nitrógeno a la planta, la actividad hormonal promueve el metabolismo y crecimiento vegetal, en la actividad de membrana su alteración interfiere en el metabolismo de la planta y la hipótesis aditiva propone la suma de las actividades de los mecanismos trabajando en conjunto (de-Bashan *et al.*, 2008). Sin embargo, la contribución de fijación de nitrógeno es controversial y los otros mecanismos propuestos (excepto actividad hormonal) son menos establecidos. Hoy en día, la explicación más común para algunos de los modos de acción de *Azospirillum* en plantas es la producción de varias fitohormonas que alteran la morfología y el metabolismo de la planta, dando lugar a una mejor absorción de nutrientes y agua, por lo tanto plantas más grandes y saludables. (Bashan *et al.*, 2004; Bashan y de-Bashan, 2010).

2.2.2. Fitohormonas producidas por *Azospirillum*

Especies de *Azospirillum* son enormemente conocidas por su capacidad de producir hormonas de plantas *in vitro*, entre los que se encuentran, giberelinas, citocininas, auxinas (principalmente Ácido Indol-3-Acético (AIA)) y posiblemente otras hormonas vegetales (Caballero-Mellado, 2001; Bashan *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2005). Seguidamente, se describen las particularidades más notables de estas fitohormonas:

Las **Giberelinas** (GA) son moléculas complejas de diterpenos tetracarboxílicos (Cassán *et al.*, 2008). Afectan el desarrollo de la planta promoviendo la división celular, la elongación y están involucradas en romper la dormancia. GA son sintetizadas y metabolizadas por *Azospirillum in vitro* (Massena-Reis *et al.*, 2011) y, de igual manera, son producidas en la

planta por *Azospirillum*. Aunque la inoculación de mutantes de arroz enano (deficientes de GA) con *Azospirillum* productor de GA, invirtieron el enanismo, hasta el momento, existe evidencia insuficiente para el involucramiento de GA bacteriano en la promoción del crecimiento (Cassán, *et al.*, 2008; Bashan y de-Bashan, 2010).

Las **Citocininas** son una clase de fitohormonas de tipo purina (Cassán *et al.*, 2008) que promueven la división celular, la morfogénesis de brotes y raíces, la maduración del cloroplasto, agrandamiento de las células. Citocininas son producidas por *Azospirillum in vitro*, no obstante hay datos insuficientes y no existe evidencia directa en las plantas (Bashan y de-Bashan, 2010).

Las **Auxinas** (del griego “auxein”, significa crecimiento) (Spaepen y Vanderleyden, 2010) son fitohormonas que regulan el proceso de desarrollo de la planta. Como ejemplo tenemos a *Azospirillum*, la cual, es una bacteria ampliamente conocida por producir *in vitro* altas cantidades de auxinas. El miembro más abundante de esta familia de auxinas es el AIA (compuesto heterocíclico que contiene un grupo carboximetilo (Massena-Reis *et al.*, 2011), además, es la fitohormona más estudiada, la mejor caracterizada, y participa en numerosos mecanismos en la fisiología de la planta. Al AIA se le puede atribuir el afectar numerosas funciones y alteraciones en el rendimiento de la planta, eventualmente, en promoción del crecimiento (Bashan *et al.*, 1993). Por otro lado, es sabido que muchas cepas de *Azospirillum* pueden producir AIA *in vitro*. Según diversos estudios, se ha visto que la aplicación de AIA imita la inoculación de *Azospirillum* en la morfología de la raíz, en la promoción de crecimiento de plantas y de singulares células algales. En varios casos, mutantes atenuados en AIA fueron inefectivos comparados con sus cepas silvestres, en este sentido, mutantes sobre productores de AIA mostraron fuertes efectos en las plantas, aunque, hasta el momento no existen mutantes que no produzcan AIA (Bashan y de-Bashan, 2010). Aparte de esto, se tiene significativo conocimiento acerca del metabolismo y mecanismos moleculares de AIA en *Azospirillum*, debido al gran interés en la elucidación de las rutas de biosíntesis, o producción, de AIA (Spaepen y Vanderlyeden, 2010).

2.2.2.1. Producción de AIA en *Azospirillum*

Estudios anteriores de la producción de AIA por varias cepas de *Azospirillum* muestran que la producción depende del tipo de medio de cultivo y la disponibilidad de triptófano como precursor (de-Bashan *et al.*, 2008b). El triptófano (Trp) se considera generalmente como un

precursor de AIA porque la adición de este aminoácido a cultivos de bacterias productoras de AIA, se traduce en una mayor producción de AIA (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). En un estudio, *Azospirillum* produjo AIA en ausencia de triptófano. Esto sugiere que hay al menos una vía independiente de triptófano presente en *Azospirillum*, sin embargo, los autores no pudieron identificar al precursor o intermediario de esa vía (de-Bashan *et al.*, 2008b). En la actualidad, tres vías dependientes de triptófano son conocidas en *Azospirillum*: la vía del indol-3-acetonitrilo (IAN), vía indol-3-acetamida (IAM), y la vía del indol-3-acido pirúvico (IPyA) (Figura 2). En la vía del **Indol-3-acetronitrilo (IAN)** la conversión de IAN en IAA puede llevarse a cabo por dos vías. Mediante la actividad de la nitrilasa que lo convierte en IAA y amonio; o bien por la vía alterna que incluye la actividad de una nitril hidratasa que lo convierte en IAM, posteriormente la enzima amidasa transforma IAM en IAA. Las enzimas nitril hidratasa y amidasa acontecen en varias cepas de *Agrobacterium*, *Rhizobium leguminosarum* y *Sinorhizobium melilot* (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). La vía más estudiada para la biosíntesis del AIA es la **Indol-3-acetamida (IAM)**, implica la descarboxilación oxidativa del Trp en IAM y la posterior hidrólisis de IAM para obtener AIA. Dos diferentes enzimas están involucradas en estas dos etapas de conversión, respectivamente la triptófano-2-monooxigenasa (TMO, codificado por el gen *iaaM*) y la indol-3-acetamida hidrolasa (IAM-hidrolasa, codificada por el gene *iaaH*) (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Aguilar-Piedras *et al.*, 2008; Spaepen y Vanderlyeden, 2010). La ruta de síntesis del **Ácido Indol-3-pirúvico (IPyA)** se inicia con la transaminación del Trp, en la que participan las enzimas aromático aminotransferasas para formar el IPyA, éste es transformado en indol-3-acetaldehído (IAld), por la acción de la indol piruvato descarboxilasa (*ipdC*), el cual a su vez es convertido en IAA por una aldehído deshidrogenasa (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). El gen *ipdC* es el único que se ha aislado y secuenciado, se encontró un mutante *ipdC* de *A. brasilense* que sintetiza menos del 10% de la producción de AIA de una especie nativa, indicando que el IPyA descarboxilasa es una enzima clave para la biosíntesis de AIA en esta bacteria. Por lo tanto, se concluyó que el 10% de AIA se produce a partir de Trp en una vía no dependiente, mientras que la síntesis de trp-independientes cuentan con aproximadamente 90% de AIA, en caso de que no se suministre AIA exógeno. La adición de triptófano a cultivos

bacterianos mejora notablemente las vías triptófano-dependientes para la producción de AIA (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

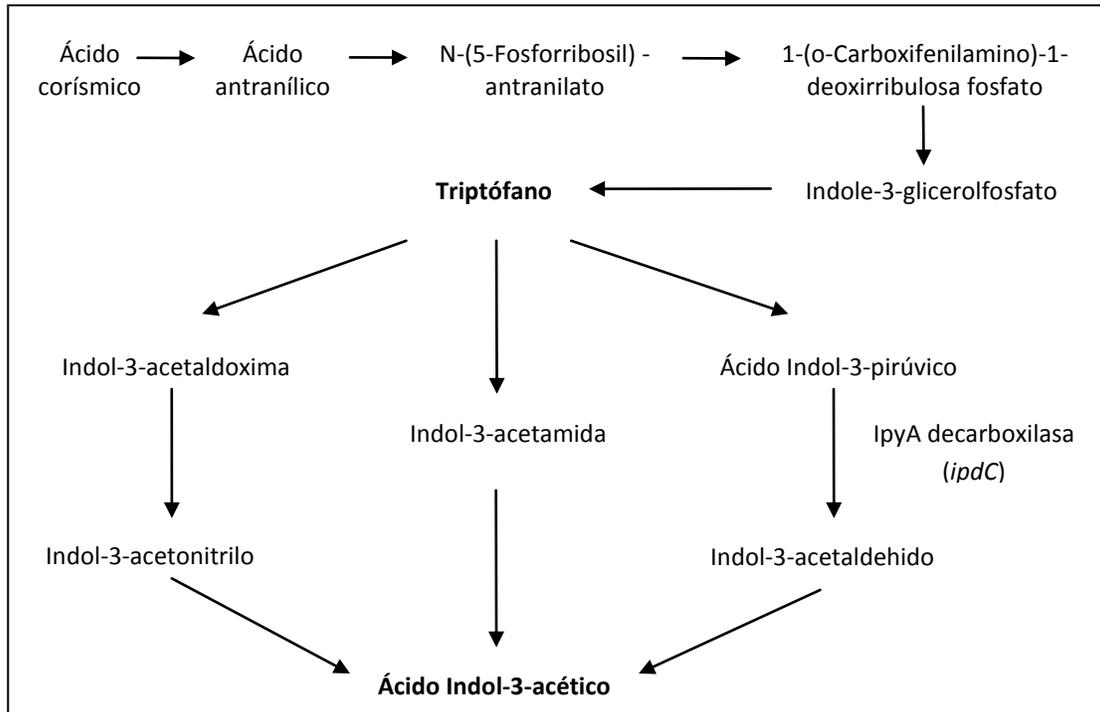


Figura 2. Rutas para la biosíntesis de AIA dependiente de triptófano (Modificado de Zakharova *et al.*, 1999).

Ya que la producción de auxinas es uno de los principales modos de acción de *A. brasilense*, ha existido gran interés en el desarrollo de fitohormonas mejoradas (Baudoin *et al.*, 2010). En ese sentido, mutantes de *Azospirillum* han sido inducidos por sustancias químicas, radiación, mutagénesis Tn5 y por sustitución de genes (también llamado cambio de marcador) (Holgin *et al.*, 1999). Por medio de mutagénesis con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, se obtuvieron mutantes de *A. brasilense* Cd (con altas tasas de producción de AIA), seleccionados por resistencia al 5-fluoro-triptófano (Katzy *et al.*, 1999). Aunque la mejor capacidad de producción de AIA, se ha obtenido de *A. brasilense* Sp245, al menos bajo condiciones de invernadero simplificados, mediante la introducción de copias de plásmido recombinante basados en el gen *ipdC* de Sp245 (codificando un indol-3-piruvato descarboxilasa recientemente reclasificado como fenilpiruvato) bajo el control de diferentes promotores (Baudoin *et al.*, 2010). Por otro lado, para entender el papel del AIA producido por PGPB en plantas, se han desarrollado mutantes con baja producción de AIA que fueron seleccionados después de una mutagénesis TN5, a partir de

A. lipoferum y *A. brasilense* Sp6, o en seguida de un “plasmid curing” para *A. brasilense* Sp245 (Katzy *et al.*, 1999). Una cepa de *A. irakense* se encontró que libera 10 veces menos de AIA en el medio que *A. brasilense* Sp7, los otros dos mutantes de *A. brasilense* estaban produciendo sólo 2-5% de AIA, en comparación con las cepas parentales y mutantes adicionales de *A. brasilense* que fueron modificados para albergar el gen de la proteína verde fluorescente y producir menos del 0.25% de AIA, en reacción a su cepa parental. Sin embargo, hasta el momento ninguna de las selecciones realizadas ha logrado dejar a los mutantes de *Azospirillum* incapaces de sintetizar AIA, aunque en algunos casos sólo sea en mínimas cantidades. Esto, debido a que *Azospirillum* posee más de una copia de los genes involucrados en la biosíntesis de AIA, o bien, tiene más de una ruta biosintética para AIA (Holguín *et al.*, 1999).

2.2.3. Ácido indol-3acético (AIA) como molécula señal

Alternativamente de los modos de acción propuestos para *Azospirillum*, se ha sugerido que el AIA puede actuar como una molécula señal. Siguiendo la lógica de este asunto, como parte de una estrategia de actividad hormonal, las bacterias usan sus fitohormonas para interactuar con plantas (Spaepen *et al.*, 2007). Cuando estos microorganismos interactúan con plantas como parte de su hábitat ecológico, llega a ser obvio que un proceso de señalización recíproco mediado por el AIA en las interacciones planta-microorganismo es probable que ocurra. Nuestra comprensión de las interacciones planta-bacteria, ya sea patógena o beneficiosa, necesita estudios detallados que examinen la dinámica hormonal a lo largo del curso de la interacción (Spaepen y Vanderlyeden, 2010). Se han reportado informes sobre señalización de AIA en otros microorganismos, por ejemplo, en *Agrobacterium tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Escherichia coli*, ya que el AIA induce respuestas específicas. (Van-Puyvelde *et al.*, 2011). En el caso de *A. brasilense*, además de producir AIA, también es capaz de detectar AIA y alterar la expresión génica (primeramente descrita para el gen *ipdC*) en presencia de AIA (Spaepen y Vanderlyeden, 2010; Van-Puyvelde *et al.*, 2011). En consecuencia, hay un incremento en la evidencia hacia el AIA como una molécula de señalización en microorganismos, debido a que afecta la expresión de genes en algunos microorganismos como bacterias, y, además puede tener un efecto directo en la fisiología bacteriana (Spaepen *et al.*, 2007). Igualmente, otros

dedicados estudios genómicos funcionales sobre la ruta de transducción de señales en el AIA de *A. brasilense* nos debe ayudar a desentrañar aún más el mecanismo de señalización del AIA durante las diferentes etapas de las interacciones planta-bacteria (Lambrecht *et al.*, 2000; Spaepen *et al.*, 2007). Por lo cual, considerando que la cascada de señalización en *A. brasilense* causado por el AIA todavía tiene que ser descifrado, se ha postulado que el AIA es un detonante importante para que *A. brasilense* entre en una interacción con plantas (Van-Puyvelde *et al.*, 2011).

Es evidente que fitohormonas, especialmente AIA, juegan un papel importante en varios aspectos del metabolismo de la planta; sucintamente, la evidencia de la producción AIA de *Azospirillum* es la más completa y documentada de todas las hormonas o los mecanismos propuestos, y, debido a que es casi nulo el conocimiento del modo de acción para muchos aspectos de la interacción, ésta es una herramienta de investigación útil para sondear dicho mecanismo de acción (Bashan y de-Bashan, 2010). Por otra parte, aunando los antecedentes del GMA acerca de los efectos benéficos que, durante la interacción, *Azospirillum* proporciona a *Chlorella* (por ejemplo, el aumento en la asimilación de amonio y el incremento en la actividad de las enzimas de asimilación de amonio), en este trabajo de investigación se tiene como propósito fundamental determinar el papel que desempeña el AIA producido por *Azospirillum* (mecanismo de actividad hormonal) como posible mecanismo principal en la asimilación de amonio en *Chlorella*.

2.3. INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS

Durante las últimas décadas, la inmovilización de células ha presentado grandes avances en el campo científico, particularmente en el campo de la biotecnología, además, ha sido utilizada para una amplia variedad de aplicaciones, entre éstas, en la industria de alimentos, agricultura, biomedicina y aplicaciones ambientales (de-Bashan y Bashan, 2008, 2010; Junter y Jouenne, 2004; Zohar-Perez, 2004). La inmovilización es una técnica que describe varias formas para atrapar o encapsular células en diferentes matrices (Cassidy *et al.*, 1996). Precisamente, el término “célula inmovilizada” es definido como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, se le ha limitado el movimiento de su locación original y que preserva la deseada actividad catalítica (Karel *et al.*, 1985; Tampion y Tampion, 1987).

Por lo que, dentro de los objetivos de la inmovilización celular se tiene el aumentar la concentración celular, incrementar la estabilidad biológica y del producto, separación de células del medio, fácil recuperación del producto, ventajas por la proximidad entre las células, entre otras (Karel *et al.*, 1985). Para esto, se han definido seis diferentes tipos de inmovilización: de enlaces covalentes, afinidad de inmovilización, adsorción, confinamiento en emulsiones líquido-líquido, captura detrás de membranas semipermeables y atrapamiento en polímeros (Mallick, 2002). De los cuales, el método de confinamiento en gel es el más ampliamente estudiado, y para su uso, se han empleado diversas matrices como polímeros sintéticos (acrilamida, poliuretano, polivinilo, resinas), polímeros naturales derivados de polisacáridos algales (alginato, carragenina, agar, agarosa), además del quitosano, un polisacárido derivado de la quitina (de-Bashan y Bashan, 2010). En términos generales, independientemente del polímero que se utilice, la mayoría de las inmovilizaciones comparten el mismo protocolo de producción. Esto se hace mezclando la suspensión celular con monómeros del polímero, luego la mezcla se solidifica para producir un gel polimérico dejando las células dentro de la matriz. La solidificación se puede hacer mediante la unión de los monómeros con cationes di y multivalentes, como se realiza con alginato (Cohen, 2001; de-Bashan y Bashan, 2010).

2.3.1. Inmovilización de microorganismos

La inmovilización de células puede ser abordada con diversos intereses y aplicaciones, uno de estos es la inmovilización de células microbianas ya que ha adquirido bastante atención en la investigación científica; actualmente se pueden encontrar estudios en varios campos con un sinnúmero de microorganismos (por ejemplo: bacterias, levaduras, hongos, microalgas, cianobacterias, entre otros) donde alguno de estos estudios eventualmente alcanzan su aplicación (de-Bashan y Bashan, 2010). Como ejemplo práctico tenemos la inmovilización de microorganismos atrapados en esferas de alginato, la cual, es una técnica ampliamente estudiada y utilizada para células microbianas viables (de-Bashan y Bashan, 2008a). Este método ha sido investigado y es utilizado en varios campos biotecnológicos como una forma práctica de producir metabolitos secundarios de valor comercial; también se utiliza como herramienta de manipulación genética para inmovilizar las bacterias recombinantes ya que mejoran la estabilidad de plásmidos; para inmovilizar microalgas con

el fin de eliminar compuestos inorgánicos y metales pesados de aguas residuales, donde su mayor ventaja es que facilita significativamente la recolección de producción masiva de microalgas del agua después del tratamiento (de-Bashan y Bashan, 2008b).

2.3.1.1. Alginato

El alginato es el polímero más utilizado para la encapsulación de células microbianas, también llamada inmovilización. Es obtenido a partir de algas caféas como *Macrocystis pyrifera* (sargazo), siendo ésta la más frecuentemente empleada para la inmovilización de células, puesto que los geles obtenidos son de mejor resistencia y estabilidad que los producidos a partir de otros alginatos. Es comercializado como ácido algínico de alta y media viscosidad (Yabur *et al.*, 2007). La cadena polimérica del alginato está compuesta de ácidos manurónico (M) y gulurónico (G) en proporciones variables y arreglos secuenciales. Los monómeros pueden estar ligados por iones calcio constituyendo bloques consecutivos de ácido gulurónico, para formar el gel (McHugh, 2003). Esta conformación dicta las propiedades del alginato, tales como la solubilidad, la viscosidad y la capacidad de intercambiar iones con metales divalentes (King, 1983). Es el material de encapsulación más común para el inmovilizado de células algales ya que el método es versátil y compatible con la mayoría de las células vivientes. Por mencionar algunas de las características importantes del alginato para la encapsulación de microalgas y bacterias tenemos que, el alginato es lo suficientemente transparente para que la luz penetre y la microalga pueda desarrollar sus procesos fotosintéticos; por otro lado, los poros son lo adecuadamente pequeños para permitir la difusión de oxígeno y admitir la difusión de nutrientes dentro de la esfera, además, permite la estrecha proximidad e interacción de los microorganismos (de-Bashan *et al.*, 2003).

2.3.2. Co-inmovilización de *Chlorella* – *Azospirillum*

Cuando se inmovilizan dos o más organismos en una misma matriz, esto se puede definir como co-inmovilización ó inmovilización conjunta. Donde una de las principales ventajas es la complementación de las actividades catalíticas de estos organismos ó el aumento de la actividad de uno en presencia del otro (O'Reilly y Scott, 1995). La inmovilización, y especialmente, la inmovilización de dos microorganismos es un campo muy técnico y el

éxito o el fracaso puede ser determinado en parte por pequeños aspectos técnicos o la tecnología elegida (de-Bashan y Bashan, 2010). Por ejemplo, se tiene la propuesta abordada por el Grupo de Microbiología Ambiental (GMA) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz B.C.S. México, en la cual se estableció un sistema experimental, que no existe en la naturaleza, pues involucra la co-inmovilización de dos microorganismos de orígenes diferentes (la microalga *Chlorella* y la bacteria *Azospirillum*) atrapados en esferas de alginato. Las investigaciones de este sistema van encaminadas al estudio, como posible aplicación biotecnológica, en el tratamiento de aguas residuales cargadas de amonio y fosfatos, y, también para estudios básicos de la interacción entre *Chlorella* y *Azospirillum* mientras se encuentran atrapados en la esfera de alginato (de-Bashan y Bashan, 2008) . El sistema es fácil de manejar, es económico y produce resultados rápidos (de-Bashan *et al.*, 2003). Aunado a esto, este sistema no solo se limita a las interacciones *Chlorella-Azospirillum*, sino que se pueden realizar distintos estudios con éxito utilizando otras PGPB, como *B. pumilis*, y microalgas, como *C. sorokiniana*, por lo que, estas opciones pueden crear un sinnúmero de combinaciones entre microalgas y PGPB

2.3.3. Modelo *Chlorella* – *Azospirillum*

El sistema *Chlorella* - *Azospirillum* fue propuesto como modelo de estudio para la interacción planta – bacteria, ya que, un modelo experimental simple es útil para estudios básicos de interacciones complejas entre plantas y bacterias (de-Bashan y Bashan, 2008a). Generalmente los estudios básicos de las interacciones entre la PGPB *Azospirillum* y plantas son difíciles debido a que existen múltiples funciones de tejido, numerosas interacciones posibles con las raíces de las plantas y la interferencia con la matriz del suelo. Habitualmente, la planta modelo *Arabidopsis thaliana* es utilizada en múltiples estudios por tener el genoma más pequeño (125 Mb) que ha sido secuenciado y por la disponibilidad de numerosos mutantes de la mayoría de sus vías metabólicas. Sin embargo, se decidió proponer a *Chlorella* como una alternativa potencial para interactuar con PGPB, puesto que su genoma (40 Mb) es el de menor tamaño entre las plantas, siendo el más pequeño de los organismos eucarióticos fotosintéticos caracterizado hasta el momento (de-Bashan y Bashan, 2008a). La lógica de elegir a una microalga como el socio de plantas es simple. La definición más básica de una planta verde es que contiene clorofila A y B, el almidón como

material de almacenamiento en el interior del cloroplasto, y una pared celular de celulosa (de-Bashan y Bashan, 2008). Sistemáticamente, las plantas superiores y algas forman parte del mismo grupo (Chlorobionta) (Bhattacharya y Medlin, 1998). Hay de un 70 a 98% de similitud genética entre las plantas terrestres y las algas. El tamaño del organismo, el número de células, y la diferenciación en órganos no definen los parámetros de una planta. En consecuencia, las microalgas unicelulares son consideradas plantas. De esta manera, considerando que el genoma de *Chlorella* es el más pequeño de los microorganismos eucariotas fotosintéticos lo convierte en una alternativa a las plantas superiores con grandes genomas interactuando con PGPB (Eckardt, 2010; de-Bashan y Bashan, 2008b). Por otro lado, las microalgas se reproducen más rápido que las plantas superiores. El socio bacteriano, *Azospirillum*, fue elegido porque, a pesar de su origen y de sus principales efectos estudiados en relación con las plantas agrícolas, también afecta el crecimiento de las microalgas, por lo que se ha designado una bacteria para promover el crecimiento de microalgas. Es probable que estas bacterias puedan tener un efecto significativo en muchas vías metabólicas durante su interacción con microalgas. La inmovilización, dentro de una matriz de gel de alginato inocua y no tóxica, asegura la unión artificial de *Chlorella* y *Azospirillum*, limita el movimiento de las cepas de *Azospirillum*, en consecuencia facilita la interacción y que los dos microorganismos se afecten entre sí (de-Bashan y Bashan, 2008b).

Durante la interacción entre los dos microorganismos dentro de la esfera polimérica se produce la siguiente secuencia de eventos. Los nutrientes en el medio circundante se difunden libremente en el gel poroso. Después de 6- 48 horas de ser cultivados, ambos microorganismos se encuentran en la misma cavidad dentro de la esfera (estudio realizado por microscopía electrónica), sobre todo justo debajo de la periferia de la esfera (Lebsky *et al.*, 2001). Las bacterias excretan AIA (y posiblemente otras hormonas vegetales) que mejora el crecimiento de las microalgas (de-Bashan *et al.*, 2008a). A partir de 48 horas después de la co-inmovilización; los nutrientes del medio se difunden en la esfera, la actividad de la glutamina sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) aumentan (de-Bashan *et al.*, 2008b), así como la producción de lípidos fotosintéticos (de-Bashan *et al.*, 2002), se incrementa la absorción de nitrógeno y fósforo en los organelos microalgales (de-Bashan *et al.*, 2002; 2004), lo que lleva a un aumento de la biomasa de la población y el

sistema libera el oxígeno producido por *Chlorella* spp. como un subproducto de la fotosíntesis (González y Bashan, 2000). El efecto más notable de la co-inmovilización es que la población de microalgas aumenta de 2 a 3 veces más que las microalgas inmovilizadas, además, se mejora la absorción de amonio a nivel cultivo y a nivel celular. Debido a esto, la búsqueda de la causa de los efectos sinérgicos de bacterias en microalgas se ha concentrado en la producción de fitohormonas por *Azospirillum* (efecto común en la producción de campos de cultivo), y si las enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno en las microalgas son inducidas o potenciadas por la asociación artificial forzada de microalgas con PGPB (Bashan *et al.*, 2008). A continuación se detallan los estudios realizados para estos casos.

En una publicación realizada por de-Bashan *et al.* (2008b) fue estudiado el AIA, producido por *A. brasilense* y *A. lipoferum*, en promoción del crecimiento de *C. vulgaris*. Cuatro cepas silvestres de *Azospirillum* (*A. brasilense* Cd, Sp6 y Sp245 y *Azospirillum lipoferum* JA4) y sus mutantes atenuados en la producción de AIA, *A. brasilense* SpM7918 (modificada de *A. brasilense* Sp6), *A. brasilense* FAJ0009 (modificada de *A. brasilense* Sp245), y *A. lipoferum* JA4::ngfp15 (modificada de *A. lipoferum* JA4) fueron co-inmovilizados con *C. vulgaris* en esferas de alginato. Los cultivos crecieron en medio de crecimiento suplementado con triptófano. Los resultados mostraron un crecimiento significativamente mayor en los cultivos de *Chlorella* co-inmovilizados con cualquiera de las cuatro cepas tipo silvestre de *Azospirillum*, pero un crecimiento mucho menor cuando los cuatro mutantes atenuados en AIA estuvieron presentes, en comparación con *C. vulgaris* inmovilizada sin bacteria. También se realizó un experimento de complementación, donde un mutante atenuado de AIA (*A. brasilense* SpM7918) fue suplementado con AIA producido por la cepa de tipo mutante (*A. brasilense* Sp6), restaurando de esta manera la promoción del crecimiento en el cultivo de microalga-mutante. Se concluye que el AIA, producido por *Azospirillum*, es un posible mecanismo del crecimiento de la microalga *C. vulgaris*.

Debido que la inmovilización de *C. vulgaris* con *A. brasilense* afecta la absorción de amonio en las microalgas, en la publicación de-Bashan *et al.* (2008c) se evaluaron los mecanismos de conversión de amonio a glutamato por dos vías posibles, con las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamina sintetasa (GS). A concentraciones iniciales

de 3, 6, y 10 mgL⁻¹ de NH₄⁺ no se aumenta la capacidad de absorción de amonio de la microalga pero si el número de células cuando se encuentra co-inmovilizada con *A. brasilense*. Sin embargo, a concentraciones de 8 mgL⁻¹ de NH₄⁺, si se ve afectada la absorción de amonio de la microalga pero no el tamaño poblacional. Se encontraron correlaciones lineales entre la toma de amonio a partir de diferentes concentraciones (3, 6 y 10 mgL⁻¹) con el tamaño poblacional de la microalga, pero no a concentraciones iniciales de 8 mgL⁻¹ de NH₄⁺, donde ocurrió la mayor absorción de amonio. En todos los cultivos con ambos organismos co-inmovilizados se registró un aumento en la actividad enzimática GS, pero solo a concentraciones de iniciales de 8 mgL⁻¹ de amonio en el medio de cultivo se registró un aumento en la actividad de la enzima GDH. Se concluye que la presencia de *A. brasilense* incrementa el tamaño poblacional, la actividad de la enzima GS y la toma de amonio en el medio excepto a 8 mgL⁻¹ donde se observó la mayor toma de amonio del medio y un incremento en la actividad de la enzima GDH pero no un aumento en la población. Se concluye que la co-inmovilización de *C. vulgaris* con *A. brasilense* afecta la actividad específica de GS y GDH en *C. vulgaris*, las cuales afectan la asimilación de amonio por parte de la microalga, y ambas a 8 mg/L de amonio son concentraciones dependientes y óptimas. Los resultados indican que la actividad mayor de GS y GDH aumenta la absorción de amonio por *C. vulgaris*.

2.4. EFECTOS QUE PROMUEVE *Azospirillum* EN LA ASIMILACIÓN DE AMONIO EN MICROALGAS Y PLANTAS SUPERIORES.

Dentro de los efectos que promueve *Azospirillum* en plantas y microalgas se ha comprobado que el AIA producido por *Azospirillum* es un mecanismo de acción por el cual promueve el aumento en el crecimiento poblacional en *Chlorella* (de-Bashan *et al.* 2002a, 2004, 2005; Hernández *et al.*, 2006), y plantas superiores. También se ha visto que *Azospirillum* promueve en *Chlorella* una mayor asimilación de amonio (de-Bashan *et al.*, 2002a, 2004, 2005, 2008a, Hernández *et al.*, 2006), no obstante se desconoce el mecanismo de acción. Por otra parte, *Azospirillum* promueve un incremento en la actividad de GS y GDH de *C. vulgaris* (de Bashan *et al.*, 2008b) y plantas superiores (Ribaudó *et al.*, 2001). Además se ha comprobado que el AIA afecta la actividad de GS y GDH en plantas superiores (Chakrabarti y Mukherji, 2003; Gangwar *et al.*, 2011). Sin embargo, no hay

reportes que digan que el AIA producido por *Azospirillum* afecte la actividad de GS y GDH en plantas o en microalgas.

Una forma de visualizar el efecto del AIA en el mecanismo de asimilación de amonio en *Chlorella* es la utilización de mutantes con diferentes tasas de producción de AIA de varias especies de *Azospirillum*. Leves cambios en la actividad enzimática de la GS y GDH podrían ser medidos con precisión, después de la inmovilización conjunta de los dos microorganismos así como la expresión de los genes que codifican para estas enzimas (de-Bashan *et al*, 2008).

3. PREGUNTA

¿La absorción de amonio y la actividad de las enzimas involucradas en la utilización de nitrógeno en *Chlorella vulgaris* se ve afectada por la producción de AIA de *Azospirillum brasilense*?

4. HIPÓTESIS

Si la actividad de las enzimas de asimilación de amonio (GS y GDH) en plantas superiores es afectada por el AIA, entonces la actividad enzimática de GS y GDH en *Chlorella vulgaris* estará afectada por la producción de AIA de *Azospirillum brasilense*.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de Ácido Indol-3-Acético producido por *Azospirillum brasilense* en la absorción de amonio por *Chlorella vulgaris* bajo condiciones de co-inmovilización.

5.2.OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de diferentes cepas de *Azospirillum brasilense* con diferente capacidad de producción de AIA en la absorción de amonio de *Chlorella vulgaris*.
2. Determinar el efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* con diferente capacidad de producción de AIA en la actividad de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) en *Chlorella vulgaris*.

6. METODOLOGÍA

Para poder investigar como el AIA, producido por *Azospirillum* spp., puede estar involucrado en la asimilación de amonio por parte de *C. vulgaris*, fue necesario de un experimento preliminar en donde se agregaron concentraciones de AIA exógeno al medio para saber si tenía algún efecto en la asimilación de amonio en *Chlorella*.

6.1. EXPERIMENTO PRELIMINAR

En esta prueba se evaluaron concentraciones de AIA, correspondientes a las producidas por 2 cepas silvestres de *Azospirillum*, y se compararon los resultados con las concentraciones de AIA que corresponden a sus mutantes atenuados en la producción de AIA. Mediante esta prueba preliminar se esperó ver si el AIA agregado al medio tenía algún efecto en la absorción de amonio en *Chlorella*.

6.1.1. Concentraciones de Ácido Indol Acético

Se preparó una solución stock de AIA sintético para cada una de las concentraciones de AIA (correspondientes a las producidas por 2 cepas silvestres de *Azospirillum* y sus mutantes atenuadas en AIA) reportadas por de-Bashan *et al.* (2008b) presentadas en la Tabla 2, disolviendo en etanol absoluto y manteniéndolo en oscuridad.

Tabla 1. Producción de AIA por cepas silvestres y mutantes de *Azospirillum* (de Bashan *et al.*, 2008 b).

#	Cepa Bacteriana	HPLC (ng * μL^{-1})	Cepa mutante	HPLC (ng * μL^{-1})
1	<i>A. brasilense</i> Sp245	44.53 \pm 0.78	<i>A. brasilense</i> FAJ0009	6.96 \pm 0.01
2	<i>A. brasilense</i> Sp 6	51.18 \pm 0.81	<i>A. brasilense</i> SpM7918	15 \pm 0.4

6.1.2. Microorganismo y su condición de crecimiento

C. vulgaris fue cultivada, siguiendo la metodología descrita por de-Bashan *et al.* (2004), en medio C30 estéril conteniendo macronutrientes (g/L): KNO_3 , 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.5; KH_2PO_4 , 1.25; K_2HPO_4 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.028 y micronutrientes (mg/L) H_3BO_3 , 2.86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.11; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.09; NaMoO_4 , 0.021), por 6 días, con agitación continua (150 rpm) a $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ y a una temperatura de $27^\circ\text{C} - 30^\circ\text{C}$.

6.1.3. Inmovilización de *Chlorella vulgaris* en esferas de alginato

C. vulgaris fue inmovilizada según la metodología descrita por de-Bashan *et al.* (2005) con la modificación de utilizar una bomba peristáltica MasterFlez® (Mod. No. 7523-30. Bamant 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 1/4") para realizar las esferas. Debido a que normalmente en la inmovilización se reduce el número de células en las esferas, fue necesaria una segunda incubación de las esferas toda la noche en caldo nutritivo diluido (NB, SIGMA) al 10%.

6.1.4. Condiciones de cultivo de los microorganismos inmovilizados, solubilización de esferas y conteo celular.

Después de la segunda incubación, las esferas fueron lavadas tres veces en solución salina. Para los experimentos, las esferas se incubaron en medio de crecimiento sintético (MCS, González y Bashan, 2000) conteniendo lo siguiente (en mg/L): NaCl , 7; CaCl_2 , 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2; K_2HPO_4 , 21.7; KH_2PO_4 , 8.5; NaHPO_4 , 33.4; la concentración de

nitrógeno añadida al MCS fue 25 mg/L de NH_4Cl . La concentración de AIA sintético se tomó de la solución stock y se adicionó al MCS para cada tratamiento.

De esta manera se tuvieron como tratamientos: *C. vulgaris* + concentración AIA de *Azospirillum* y *C. vulgaris* + concentración AIA de *Azospirillum* mutante. Como controles: *C. vulgaris* y alginato solos. Los experimentos se realizaron con cinco replicas cada uno, en matraces Erlenmeyer a 28 – 30 °C, a 150 rpm e intensidad de luz de $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

Para el conteo celular, se tomó una esfera cada 24 horas y se disolvió en 1 mL de bicarbonato de sodio al 4%. Para el conteo de *C.vulgaris*, se tomó esta solución y se hicieron conteos directos con cámara de Neubauer (Bright line counting chamber, Hausser Scientific Company Harsham, PA. USA).

6.1.5. Análisis de amonio

Iones amonio fueron determinados por el método colorimétrico del fenato (Solórzano, 1969) adaptado a microplaca por Hernández-López y Vargas-Albores (2003).

6.1.6. Diseño experimental y análisis estadísticos

Cada experimento se repitió idénticamente tres veces. 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 también a $P \leq 0.05$. Para ello se utilizó el software ESTATISTICA, mientras que para la realización de las gráficas el programa SIGMA PLOT 10.0.

6.2.OBJETIVO 1

Evaluar el efecto de diferentes cepas de *A. brasilense* con diferente capacidad de producción de AIA en la absorción de amonio de *C. vulgaris*

6.2.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento

Las cepas de *Azospirillum* utilizadas en este estudio (Tabla 2) fueron crecidas en caldo nutritivo (NB, Sigma) por 17 horas. Para las cepas mutantes, NB fue suplementado con 25 $\mu\text{g/L}$ de kanamicina.

C. vulgaris (UTEX 2714) fue cultivada, siguiendo la metodología descrita por de-Bashan *et al.* (2004), en medio C30 estéril, por 6 días, con agitación continua (150 rpm) a $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ y a una temperatura de $27^\circ\text{C} - 30^\circ\text{C}$.

Tabla 2. Cepas silvestres y mutantes de *Azospirillum* (de-Bashan *et al.*, 2008b).

Cepa de la Bacteria	Descripción	Cepa mutante	Descripción	Referencias
A. <i>brasilense</i> Sp245	Tipo de cepa salvaje de A. <i>brasilense</i> (Brasil)	A. <i>brasilense</i> FAJ0009	Mutante de A. <i>brasilense</i> Sp245 llevando la inserción Tn5 en el gen <i>ipdc</i> (Bélgica)	EMBRAPA- Rio de Janeiro, Brazil / Vande Broek <i>et al.</i> (1999)
A. <i>brasilense</i> Sp 6	Tipo de cepa salvaje de A. <i>brasilense</i> (Italia)	A. <i>brasilense</i> SpM7918	Derivado de A. <i>brasilense</i> Sp6, llevando otra inserción Tn5 en el gen <i>ipdc</i> (Italia)	Barbieri y Galli (1993)

6.2.2. Condiciones de cultivo de los microorganismos inmovilizados

La co-inmovilización fue realizada siguiendo la metodología descrita en el experimento preliminar. Para los experimentos, 40 g de esferas fueron incubadas durante 3 días en 200 mL de medio sintético de crecimiento (MSC, González y Bashan, 2000) conteniendo lo siguiente (en mg/L): NaCl, 7; CaCl₂, 4; MgSO₄·7H₂O, 2; K₂HPO₄, 21.7; KH₂PO₄, 8.5; NaHPO₄, 33.4; la concentración de nitrógeno añadida al MSC fue 25 mg/L de NH₄Cl (correspondientes a 8 mg/L de NH₄) y 200 µg/mL de triptófano.

6.2.3. Diseño experimental

De esta manera se tuvieron 5 tratamientos (*C. vulgaris*, *Azospirillum*, *Azospirillum* mutante, *C. vulgaris* + *Azospirillum*, *C. vulgaris* + *Azospirillum* mutante), con tres replicas cada uno.

Los experimentos fueron realizados en matraces Erlenmeyer a $28 - 30^\circ\text{C}$, a 150 rpm e intensidad de luz de $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

A las 0, 24 y 48 horas se tomó muestra para medición de parámetros como crecimiento celular de la microalga (conteos directos con cámara de Neubauer en el microscopio) y bacteria (conteos de células viables teñidas con Fluoroscein diacetato (FDA) en microscopio con lámpara de fluorescencia equipado con analizador de imágenes

(Chrzanowski *et al.*, 1984)). Cada experimento fue repetido idénticamente dos o tres veces. Se realizó un análisis estadístico de varianza de una vía (ANDEVA) y pruebas a Posteriori correspondientes.

El efecto de la co-inmovilización de *Chlorella* con *Azospirillum* en el contenido de amonio intracelular fue estudiado de la siguiente manera:

6.2.4. Extracción y medición amonio intracelular

A las 0, 24 y 48 horas se tomó 1 matraz de cada tratamiento, las esferas fueron disueltas en 50 mL de solución de bicarbonato de sodio al 4%. Las células fueron lavadas con solución salina 0.85% y centrifugadas 14 min 4500 g por 10 veces para eliminar restos de triptófano, el botón celular fue almacenado a -80°C. Las muestras fueron maceradas con perlas de vidrio (lavadas con ácido) con ayuda de un pistilo, se añadió buffer H₂SO₄ 0.03 mM (pH 3.5) y se maceró nuevamente.

Las suspensiones fueron centrifugadas en una ultracentrífuga a 19,500 g por 15 minutos, y el pellet fue descartado. El sobrenadante se transfirió en tubos limpios y a partir de este se realizó la determinación de amonio por el método colorimétrico del fenato (Solórzano, 1969) adaptado a microplaca por Hernández-López y Vargas-Albores (2003).

6.3.OBJETIVO 2

Determinar el efecto de cepas de *A. brasilense* con diferente capacidad de producción de AIA en la actividad de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) en *C. vulgaris*.

6.3.1. Microorganismos y su condición de crecimiento

Chlorella vulgaris fue cultivada, siguiendo la metodología descrita por de-Bashan *et al.* (2004), en medio C30 estéril conteniendo macronutrientes (g/L): KNO₃, 5; MgSO₄.7H₂O, 3.5; KH₂PO₄, 1.25; K₂HPO₄ 0.1; FeSO₄.7H₂O, 0.028 y micronutrientes (mg/L) H₃BO₃, 2.86; MnCl₂.4H₂O, 1.81; ZnSO₄.7H₂O, 0.11; CuSO₄.5H₂O, 0.09; NaMoO₄, 0.021), por 6 días, con agitación continua (150 rpm) a 80 Me m⁻² sec⁻¹ y a una temperatura de 27°C – 30 °C.

Todas las cepas de *Azospirillum* fueron crecidas en caldo nutritivo (NB, Sigma) a 35 ± 2 °C y agitación (120 r.p.m.) por 17 horas. Para las cepas mutantes, NB fue suplementado con 25 µg/L de kanamicina.

6.3.2. Inmovilización de *C. vulgaris* en esferas de alginato

C. vulgaris fue inmovilizada según la metodología descrita por de-Bashan *et al.* (2005) con la modificación de utilizar una bomba peristáltica MasterFlez® (Mod. No. 7523-30. Bamant 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. Debido a que normalmente en la inmovilización se reduce el número de células en las esferas, es necesaria una segunda incubación de las esferas toda la noche en caldo nutritivo diluido al 10%.

6.3.3. Condiciones de cultivo de los microorganismos inmovilizados, solubilización de esferas y conteo celular.

Después de la segunda incubación, las esferas fueron lavadas tres veces en solución salina. Para los experimentos, 40 g de esferas se incubaron en 200 mL de medio sintético de crecimiento (MSC, González y Bashan, 2000) conteniendo lo siguiente (en mg/L): NaCl, 7; CaCl₂, 4; MgSO₄·7H₂O, 2; K₂HPO₄, 21.7; KH₂PO₄, 8.5; NaHPO₄, 33.4; la concentración de nitrógeno añadida al MSC fue 25 mg · L⁻¹ de NH₄Cl (correspondientes a 8 mg · L⁻¹ de NH₄), y suplementado con 200 µg · mL⁻¹ de triptófano.

De esta manera se tienen 5 tratamientos (*C. vulgaris*, *Azospirillum*, *Azospirillum* mutante, *C. vulgaris* + *Azospirillum*, *C. vulgaris* + *Azospirillum* mutante). Los experimentos fueron realizados en matraces Erlenmeyer a 28 – 30 °C, a 150 rpm e intensidad de luz de 80 µE m⁻² sec⁻¹. Los experimentos fueron repetidos tres veces.

Para el conteo celular, se tomaron cinco esferas cada 24 horas y se disolvieron en 5 mL de bicarbonato de sodio al 4%. Para el conteo de *C. vulgaris*, se tomó esta solución y se hicieron conteos directos con cámara de Neubauer (Bright line counting chamber, Hausser Scientific Company Harsham, PA. USA). Para el conteo de *Azospirillum* se realizaron

conteos de células viables teñidas con Fluoroscein diacetato (FDA) en microscopio con lámpara de fluorescencia equipado con analizador de imágenes (Chrzanowski *et al.*, 1984).

El efecto de la co-inmovilización de *Chlorella* con *Azospirillum* en las rutas enzimáticas glutamina sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) fue estudiado de la siguiente manera:

6.3.4. Extracción

Cada 24 horas fueron tomadas 13.3 g de esferas, mismas que fueron disueltas en 67 mL de solución de bicarbonato de sodio al 4%. Las células fueron centrifugadas, el botón celular se re-suspendió en tubos eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de solución salina 0.85% para hacer lavado y se centrifugó por 15 segundos. El botón celular se almacenó a -80 °C.

Las muestras se maceraron en frío con ayuda de un pistilo y perlas de vidrio, se añadió 1 mL buffer HEPES 100 mM (pH 7.5) conteniendo 10 mM ditioneol (Sigma) y se maceró nuevamente.

Las suspensiones fueron centrifugadas a 10,500 g por 30 minutos (Hartman y Burris, 1988), y el pellet fue descartado. El sobrenadante se transfirió en tubos limpios y a partir de este se realizó la determinación de proteínas, actividad de GS y GDH.

6.3.5. Proteínas

A los extractos de las células se les analizó el contenido de proteínas por el método de dye-binding (Bradford, 1976), utilizando el kit para análisis de proteínas de Bio RadTM. La reacción se cuantificó en un lector de microplaca a 595 nm.

6.4. ANÁLISIS ENZIMÁTICO

6.4.1. Glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.3)

La actividad de GDH fue medida en dirección de aminación y se determinó la tasa de disminución de la absorbancia a 340 nm, que resulta de la oxidación del NADH en presencia de los iones α -cetoglutarato y iones amonio (Frieden, 1963). Este análisis enzimático se llevó a cabo de acuerdo con la metodología adaptada a microplaca descrita por de-Bashan *et al.* (2008b).

Reactivos (todos de grado analítico):

0,1 M de tampón de fosfato de sodio a pH 7,5,
0,005 M α -cetoglutarato sal monosódica, recién preparada en tampón de fosfato,
0,004 M NADH sal disódica, recién preparada en carbonato de sodio 0,001 M,
3,0 M de cloruro de amonio en tampón fosfato,
0,0025 M EDTA sal disódica en agua destilada.

Procedimiento:

1. La mezcla de reacción (para microplaca)

5,4 ml de tampón fosfato

200 μ L α -cetoglutarato

200 μ L NADH

400 μ L de cloruro de amonio

200 μ L EDTA

2. 300 μ L mezcla de reacción se mezcló con 10 μ L extracto de enzima y se incubaron en la microplaca a 25 ° C durante 10 minutos.

3. La reacción se monitorizó en un lector de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 340 nm a 27 ° C durante 10 minutos.

4. La pendiente se calculó (V_{max} / min), usando el programa SoftMax Pro software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

5. Para validar el método, y como un control adicional, un ensayo paralelo con un estándar de la enzima se realizó. Para esto, una glutamato deshidrogenasa comercial (de hígado bovino, Calzyme, San Luis Obispo, CA, EE.UU.) se preparó en tampón fosfato a una concentración final de 0,11 unidades / ml y a continuación se ensayaron de manera similar a los extractos de las microalgas.

La actividad enzimática fue representada como absorbancia/min/cultivo.

6.4.2. Glutamina sintetasa (GS: EC 6.3.1.2)

La actividad de GS se midió de acuerdo al método de Shapiro y Stadtman (1979) y fue adaptado a microplaca como sigue:

Reactivos (todas de grado analítico):

1 M imidazol-HCl a pH 7,0

0,12 M ATP solución a pH 7,0

2 M L-glutamato de solución a pH 7,0

1 M NH_4Cl solución

1,67 M MgCl_2 solución

29 mM de FeSO_4 disuelto en solución 0,3 N de H_2SO_4 (recién preparada)

53 mM de molibdato de amonio disuelto en 7,5 N de H_2SO_4

Procedimiento

1. Mezcla de reacción (para 60 reacciones):

168 μL de tampón de imidazol HCL

420 μL de solución de ATP

336 μL solución de L-glutamato

168 μL de solución de NH_4Cl

100.8 μL de solución de MgCl

1,327 μL de agua desionizada

2. La mezcla se equilibró (pre-incubado) a 37 ° C durante cinco minutos.

3. 14 μL de la muestra se añadió a la mezcla y se incubó a 37 ° C durante diez minutos.

5. 252 μL de solución de FeSO_4 se añadió para detener la reacción. 21 μL de reactivo de molibdato de amonio se añadió.

6. Se leyó la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Hach (4000).

7. Cada muestra tenía su propio espacio en blanco que se preparó como sigue: a 50 μL de la muestra, 400 μL FeSO_4 solución se añadió y la mezcla se sumergió en un baño caliente (100 ° C) durante 10 minutos. Entonces, todos los procedimientos se siguieron tal como se

describe anteriormente. Para validar el método y como un control adicional, la actividad de la GS comercial (de *E. coli*, Sigma) se determinó en paralelo a la enzima a partir de los extractos de *Chlorella*. Esta enzima se diluyó en agua destilada a una concentración final de 1,3 mg / ml.

La actividad se calcula con la siguiente fórmula:

Volumen de la Actividad (U / ml) = Absorbancia 0,719 × factor de dilución, donde una unidad de enzima (U) se define como la cantidad de enzima que produce 1 mol de fosfato μ (liberado de ATP) por minuto a 37 ° C y pH 7,0.

La actividad enzimática fue representada como absorbancia/min/cultivo.

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los objetivos se realizará 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, a $P \leq 0.05$. Para ello se utilizará el software ESTATISTICA, mientras que para la realización de las gráficas se utilizará el programa SIGMA PLOT 10.0.

7. RESULTADOS

EXPERIMENTO PRELIMINAR

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en el crecimiento poblacional y remoción de amonio de *C. vulgaris*, ambos con diferentes concentraciones de AIA exógeno (correspondientes a las producidas por cepas bacterianas de *A. brasilense* a utilizar en los sucesivos experimentos). En las gráficas de crecimiento (A, B) se aprecia que los tratamientos de *C. vulgaris* con AIA exógeno, a las 24 y 48 horas de cultivo, crecen más que cuando esta *C. vulgaris* sola. Además se observa que las concentraciones más altas de AIA (que simulan las concentraciones de AIA que producen las cepas silvestres de *A.*

brasiliense) tienen mayor efecto en el crecimiento de *C. vulgaris* que concentraciones menores de AIA (simulando a las cepas atenuadas en AIA de *A. brasiliense*). Respecto a las gráficas de eliminación de amonio (C, D) podemos ver que *C. vulgaris* remueve más amonio cuando se le añade AIA exógeno, asimismo se observa que la microalga remueve más amonio del medio cuando se encuentra con la mayor concentración de AIA exógeno (representando cepa silvestre) comparado la con concentración menor de AIA (representando cepa mutante). Por lo que, la aplicación de AIA exógeno incrementa significativamente la remoción de amonio del medio por parte de *Chlorella*, es decir, la microalga está absorbiendo más amonio del medio.

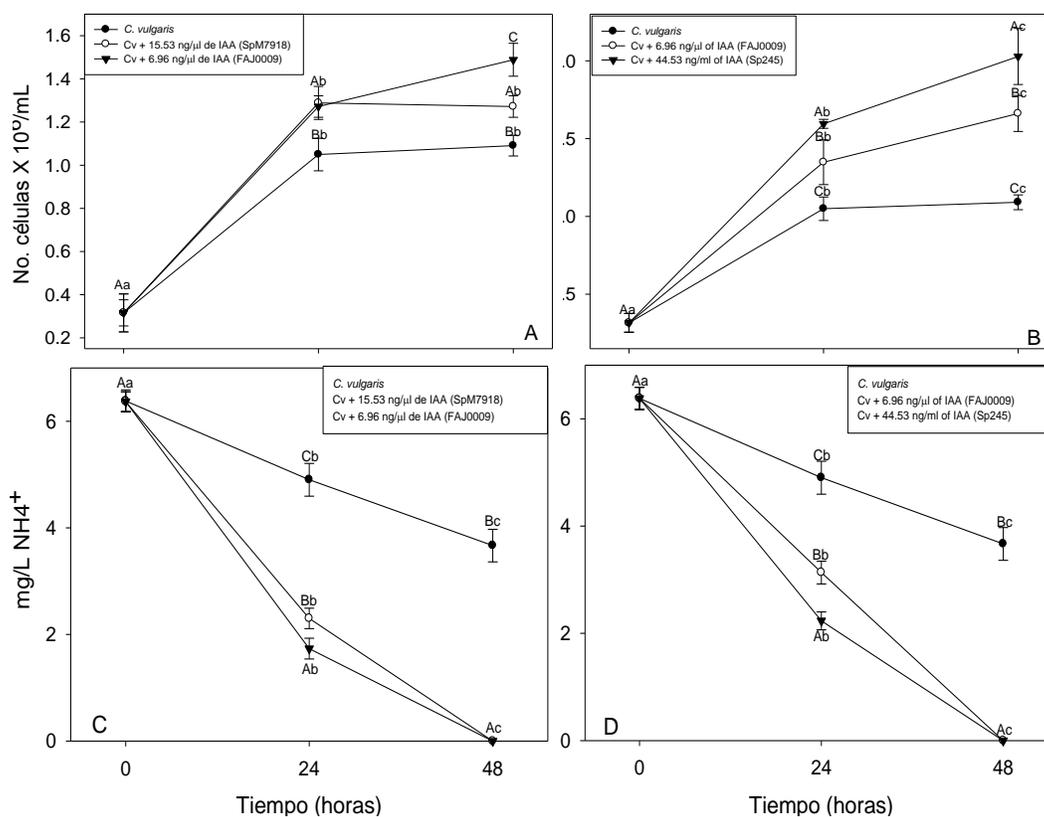


Figura 3. Crecimiento (A, B) y eliminación de amonio (C, D) del medio por *C. vulgaris* con diferentes concentraciones de AIA. Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.005$. La diferencia entre letras minúsculas sobre cada punto denota una diferencia significativa entre tratamiento para una prueba T de Student a $p \leq 0.05$.

Objetivo 1: Evaluar el efecto de diferentes cepas de *A. brasilense* con diferente capacidad de producción de AIA co-inmovilizadas con *C. vulgaris* en la acumulación de amonio intracelular.

En la Figura 4 se observa que a las 24 y 48 horas de cultivo los microorganismos co-inmovilizados (microalgas + bacterias) presentan mayor acumulación de amonio intracelular en comparación con la microalga y bacterias inmovilizadas solas, igualmente se muestra que la microalga inmovilizada sola tiene más amonio acumulado que cualquiera de las cepas bacterianas inmovilizadas.

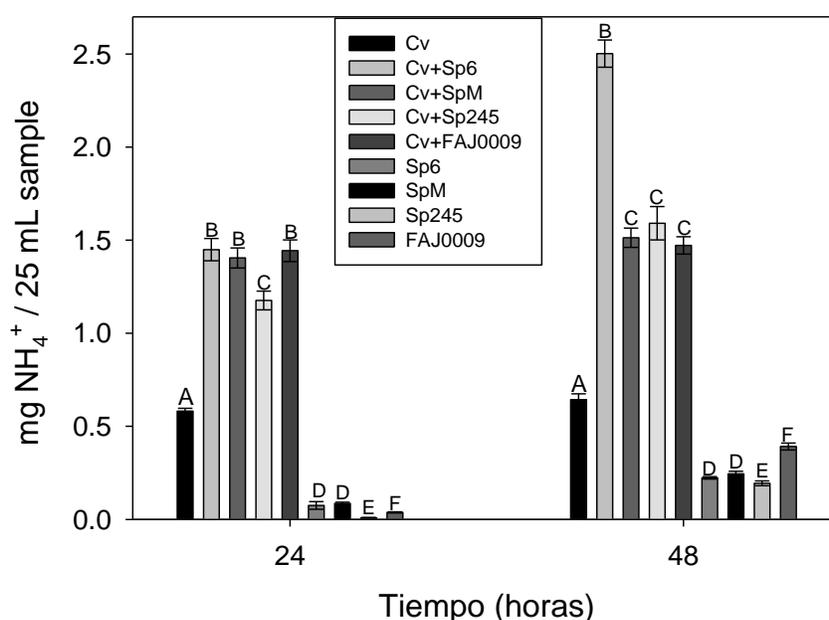


Figura 4. Acumulación de amonio intracelular por cultivo a las 24 y 48 horas. *C. vulgaris* (Cv) inmovilizada sola, *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* Sp6 (Cv+ Sp6), SpM (Cv + SpM), Sp245 (Cv+ Sp245), FAJ0009 (Cv+ FAJ0009), y cepas inmovilizadas solas de *A. brasilense* Sp6 (Sp6), SpM (SpM), Sp245 (Sp245), FAJ0009 (FAJ0009). En medio de crecimiento sintético (MCS) conteniendo 8 mg/L NH_4^+ y 200 mg/L triptófano. Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, las diferencias significativas son a $P \leq 0.05$, utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar; la ausencia indica que el error estándar es insignificante.

La Figura 5 representa el efecto neto de acumulación de amonio en la microalga co-inmovilizada. En ella se observa que a las 24 horas de cultivo no hay diferencias significativas entre los tratamientos a excepción del tratamiento con *A. brasilense* Sp6. A las 48 horas se distinguen diferencias significativas en todos los casos presentados. Podemos apreciar que las cepas silvestres tienen un efecto mayor de acumulación de amonio con respecto a sus cepas mutantes.

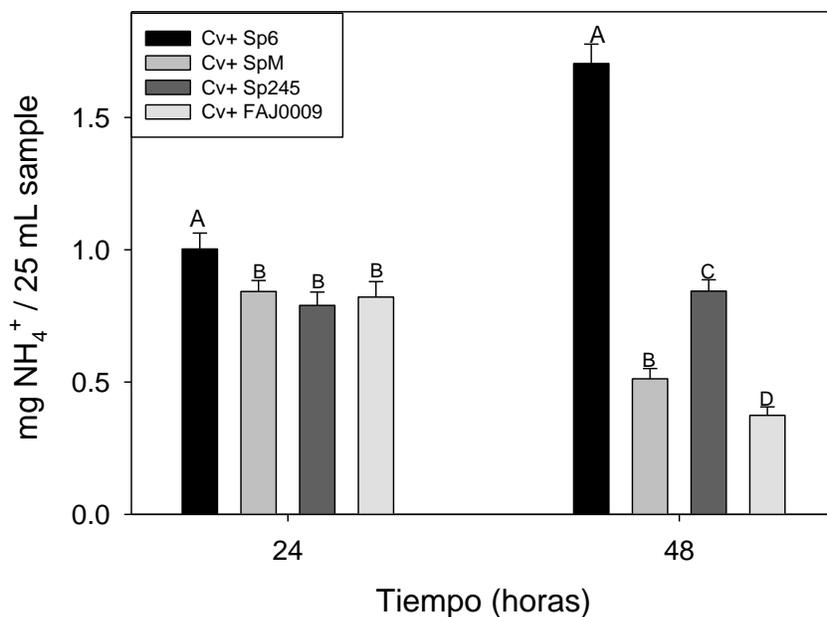


Figura 5. Efecto de la acumulación de amonio intracelular en el co-inmovilizado a las 24 y 48 horas de cultivo. *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* Sp6 (Cv+ Sp6), Sp245 (Cv+ Sp245), y sus respectivos mutantes, atenuados en la producción de AIA, *A. brasilense* SpM (Cv + SpM), FAJ0009 (Cv+ FAJ0009). En MCS con 8 mg/L NH_4^+ y 200 mg/L triptófano. Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, las diferencias significativas son a $P \leq 0.05$, utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar. Para calcular el efecto neto se hizo una resta de la acumulación NH_4^+ intracelular del co-inmovilizado (Fig. 1) menos la acumulación NH_4^+ de la microalga y la bacteria de ese mismo co-inmovilizado (obtenida al multiplicar la acumulación de NH_4^+ /cel de los microorganismos inmovilizados solos (Fig. 7C) por el número de células de esos microorganismos en el co-inmovilizado (Fig. 7D)).

Al comparar las concentraciones reportadas de AIA que produce cada una de las cepas de *Azospirillum* utilizadas (Tabla 2) para determinar la relación del efecto neto de la acumulación de amonio (Figura 6), se puede ver que a mayor concentración de AIA mayor es el efecto neto de la acumulación de amonio intracelular.

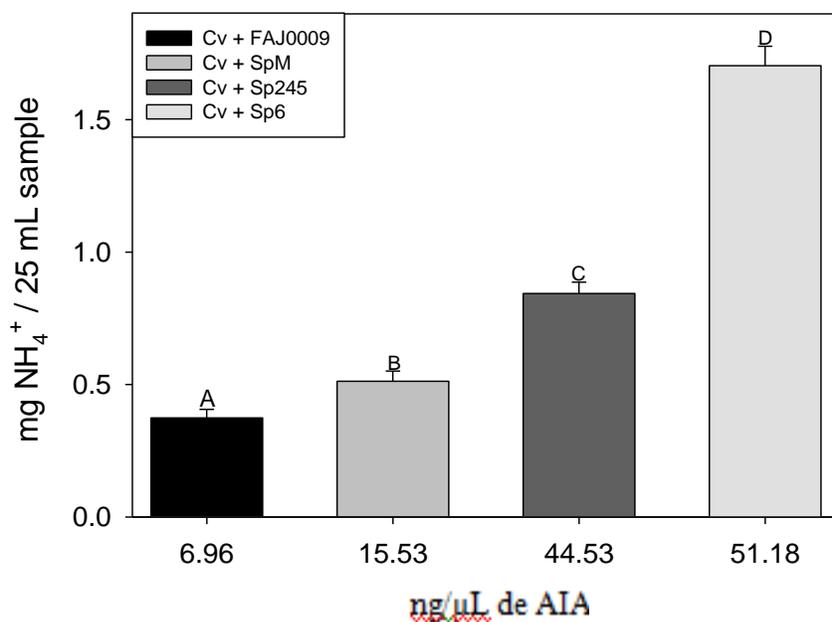


Figura 6. Relación de las concentraciones de AIA reportadas que produce *A. brasilense*, y el efecto neto en la acumulación de amonio intracelular de *C. vulgaris*. *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas silvestres *A. brasilense* Sp6 (Cv+ Sp6), Sp245 (Cv+ Sp245), y sus respectivos mutantes, atenuados en la producción de AIA, *A. brasilense* SpM (Cv + SpM), FAJ0009 (Cv+ FAJ0009) a las 48 horas de cultivo. En M-^U CS con 8 mg/L NH₄⁺ y 200 mg/L triptófano. Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, las diferencias significativas son a $P \leq 0.05$, utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar

En la Fig. 7 A y B se muestra el crecimiento poblacional de *C. vulgaris* y *A. brasilense*, donde se observa que a las 48 horas de cultivo los co-inmovilizados de cepas silvestres tienen una mayor acumulación de amonio por célula que los co-inmovilizados de cepas mutantes atenuadas en la producción de AIA.

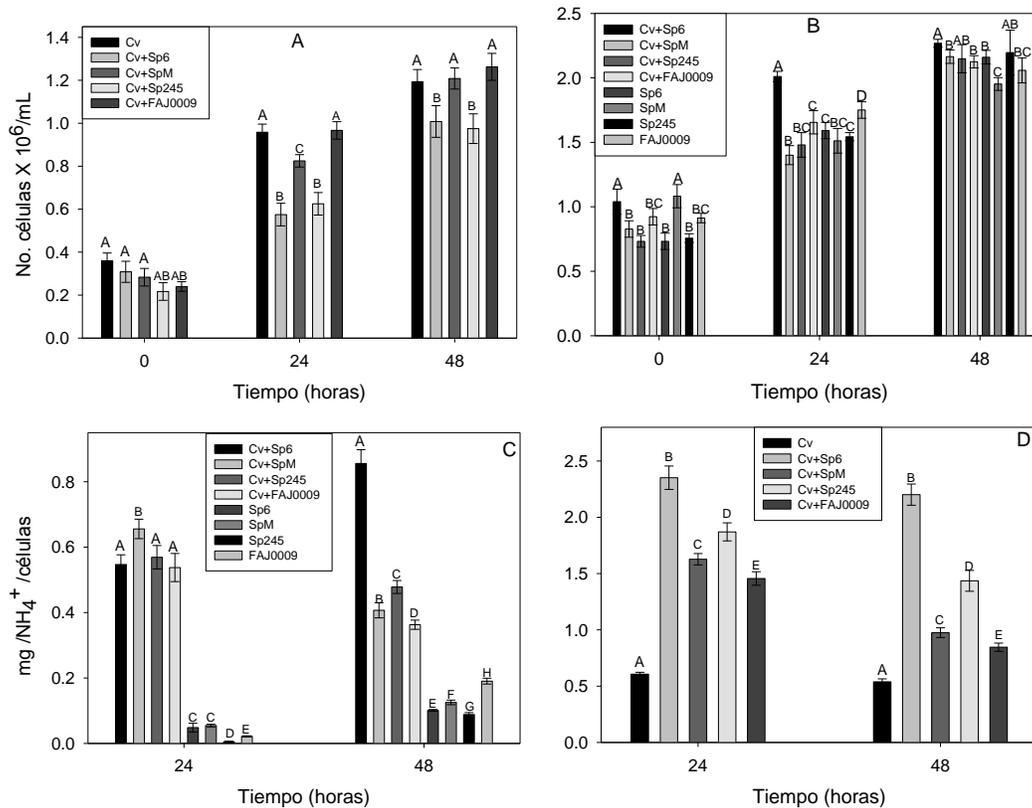


Figura 7. Acumulación de amonio por célula y crecimiento poblacional de *C. vulgaris*, *A. brasilense*. Acumulación de amonio por célula de *C. vulgaris* (A) y *A. brasilense* (C) a las 24 y 48 horas de cultivo. Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* (B) y *A. brasilense* (D) a las 0, 24 y 48 horas de cultivo. Microorganismos inmovilizados: *C. vulgaris* (Cv), cepas silvestres de *A. brasilense* Sp6 (Sp6), Sp245 (Sp245), cepas atenuadas en la producción de AIA *A. brasilense* SpM (SpM), FAJ0009 (FAJ0009), y microorganismos co-inmovilizados: *C. vulgaris* con cepas de *A. brasilense* Sp6 (Cv+ Sp6), SpM (Cv + SpM), Sp245 (Cv+ Sp245), FAJ0009 (Cv+ FAJ0009). En medio de crecimiento sintético (MCS) conteniendo 8 mg/L NH₄⁺ y 200 mg/L triptófano. En la grafica las diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos a P≤ 0.05, utilizando ANDEVA de una vía.

En la figura 8 la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. Vemos que a las 24 horas de cultivo no se ve claro el efecto del AIA en el crecimiento de *C. vulgaris*, es hasta las 48 horas cuando se presenta el efecto y claramente puede observarse que las cepas silvestres tienen mayor tasa de crecimiento que sus mutantes atenuadas en la producción de AIA. En la figura siguiente (Fig .9) se observa una relación entre la concentración de AIA producida por las cepas de *Azospirillum* y la tasa de crecimiento de *C.vulgaris*, puesto que a mayor concentración de AIA mayor es la tasa de crecimiento de *Chlorella*.

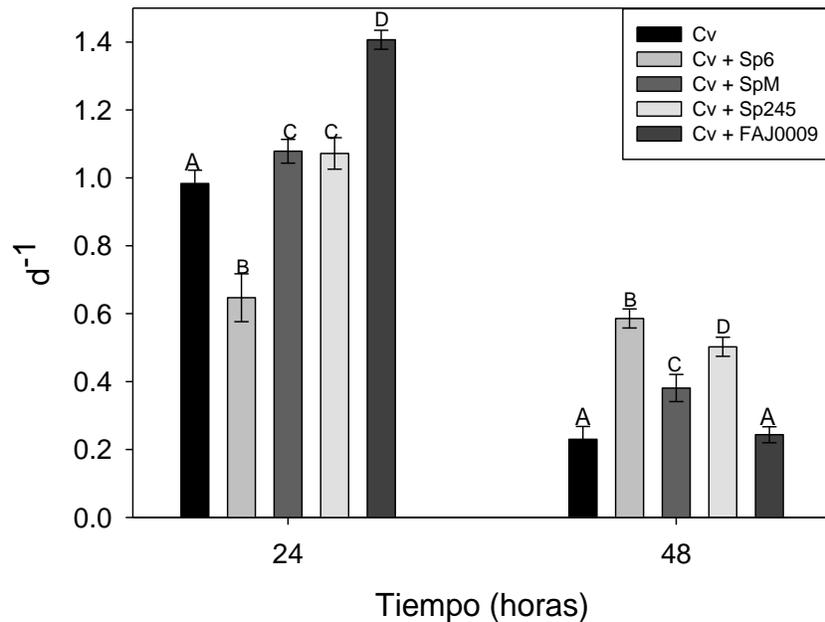


Figura 8. Tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. Cultivo a las 24 y 48 horas en MSC con 8 mg/L NH_4^+ y 200 mg/L triptófano. Diferentes letras indican diferencias significativas en las tasas de crecimiento de los tratamientos. Las tasas de crecimiento (μ) fueron calculadas con la siguiente fórmula $\mu = (\ln N_f - \ln N_0) / (T_f - T_0)$. Donde N_1 y N_2 son el número de células/mL al tiempo T_0 y T_f respectivamente, T_0 = tiempo inicial y T_f = tiempo final.

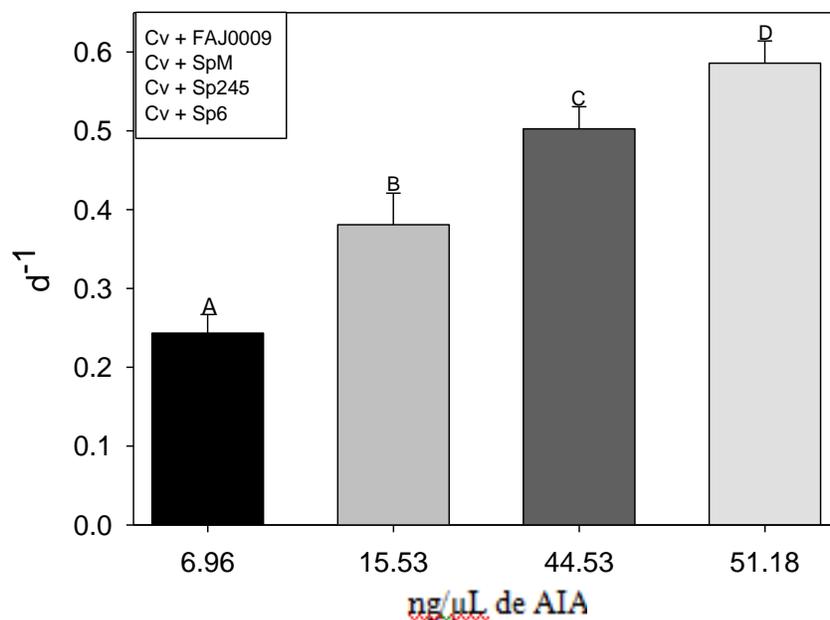


Figura 9. Relación del AIA, producido por *A. brasilense*, y la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. *A. brasilense* FAJ0009 (6.96 ng/mL), SpM7918 (15.53 ng/mL), Sp245 (44.53 ng·mL⁻¹), Sp6 (51.18 ng·mL⁻¹) (de-Bashan *et al.*, 2008). *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas silvestres *A. brasilense* Sp6 (Cv+ Sp6), Sp245 (Cv+ Sp245), y sus respectivos mutantes, atenuados en la producción de AIA, *A. brasilense* SpM (Cv + SpM), FAJ0009 (Cv+ FAJ0009) a las 48 horas de cultivo. En MCS con 8 mg/L NH₄⁺ y 200 mg/L triptófano. Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$), utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar.

ESTRATEGIA ENZIMÁTICA

Objetivo 2: Determinar el efecto del AIA producido por *Azospirillum* spp. en la actividad de GS y GDH en *Chlorella vulgaris*

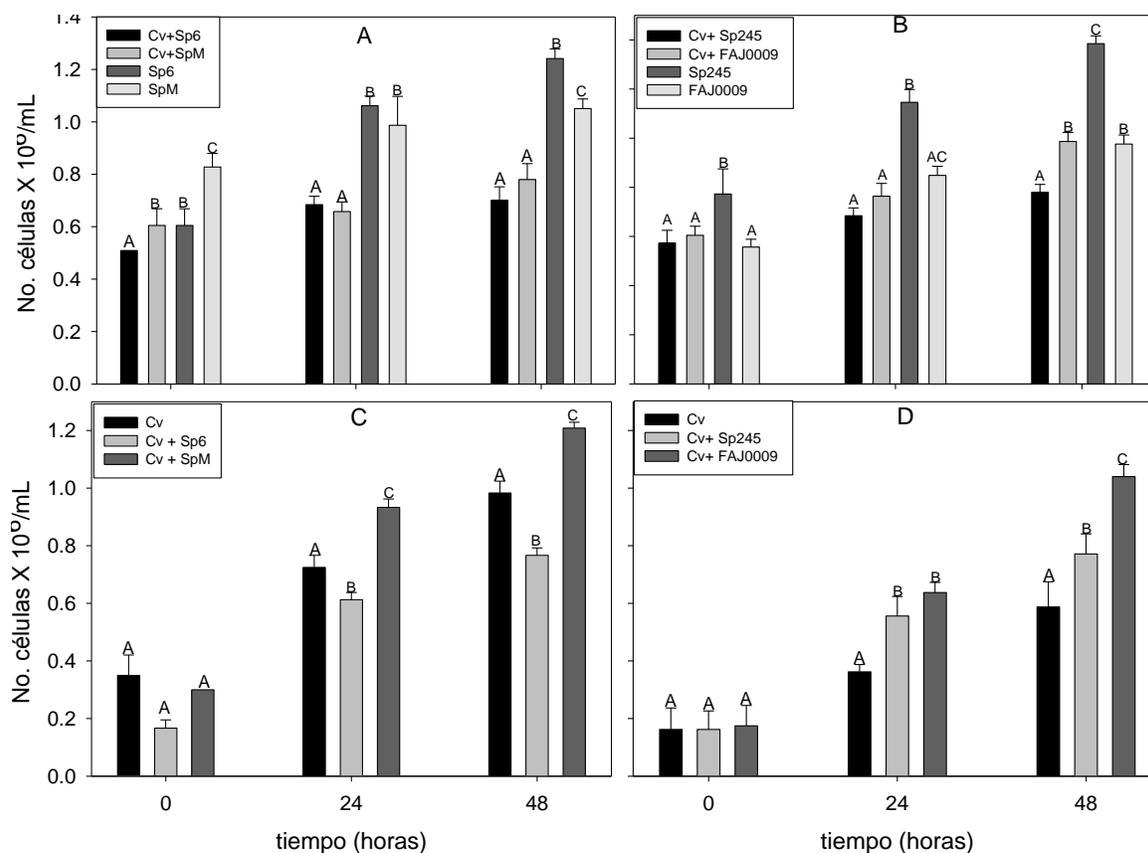


Figura 10. Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* y *A. brasilense*. (A, B) y (C, D). En los experimentos *C.vulgaris* co-inmovilizada sola y co-inmovilizada con las cepas de *A.brasilense* Sp245 y FAJ0009, en medio de crecimiento sintético (MCS) suplementado con 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de triptófano y 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de NH_4Cl . Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$), utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar.

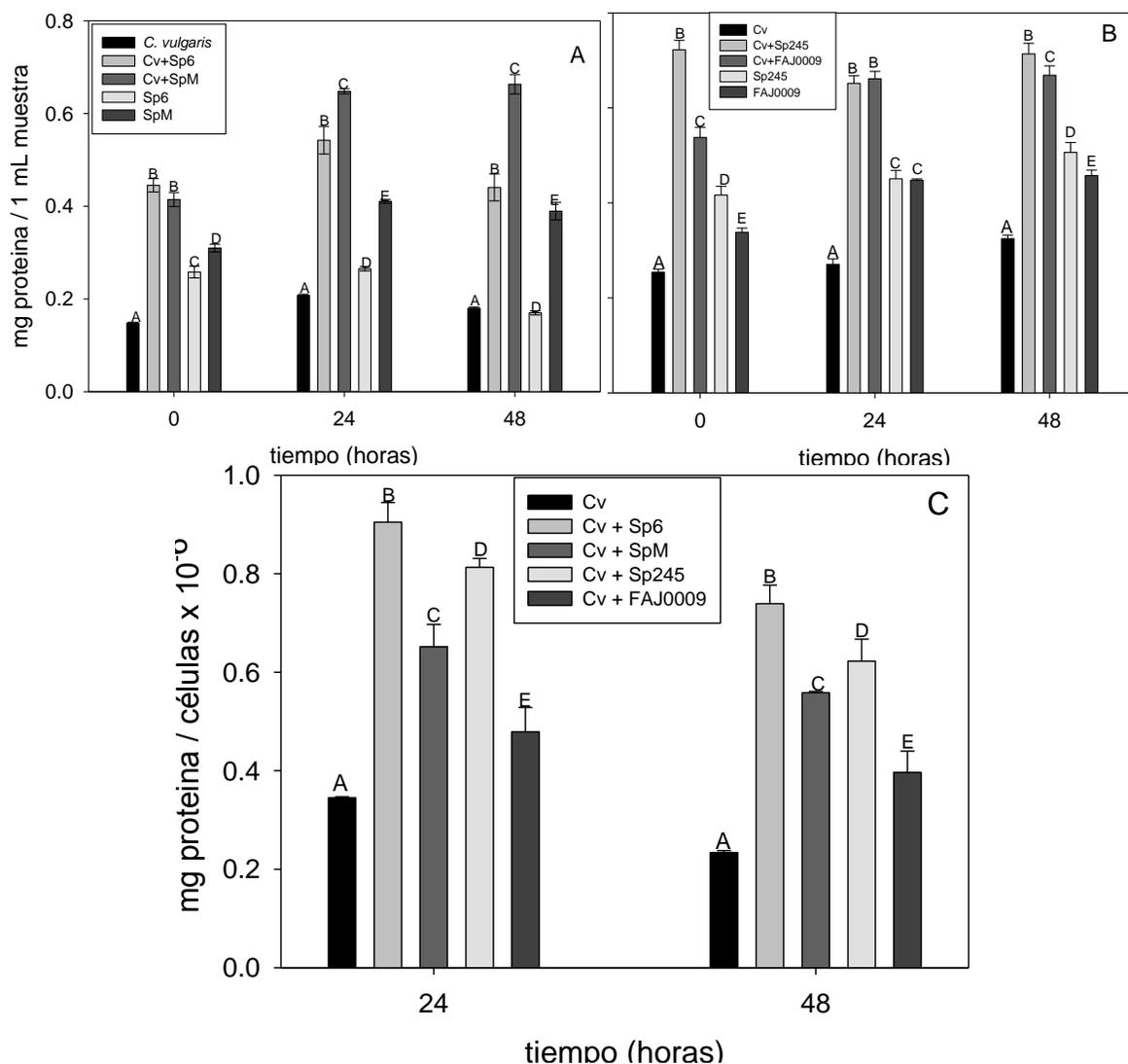


Figura 11. Contenido de proteínas y contenido de proteínas por célula de *Chlorella* en el sistema microalga-bacteria. En los experimentos *C. vulgaris* co-inmovilizada sola y co-inmovilizada con las cepas de *Azospirillum brasilense* Sp6, SpM, Sp245 y FAJ0009, así como la inmovilización de estas bacterias solas, en medio de crecimiento sintético (MCS) suplementado con $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de triptófano y $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de NH_4Cl . Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, las diferencias significativas son a $P \leq 0.05$, utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar; la ausencia indica que el error estándar es insignificante.

En la figura 10 (A, B) vemos el contenido de proteínas de *Chlorella* y *Azospirillum* inmovilizados ó en co-inmovilización. Los microorganismos co-inmovilizados (microalgas + bacterias) presentan mayor contenido de proteínas a comparación con la microalga y bacterias inmovilizadas solas, igualmente se muestra que las cepas bacterianas inmovilizadas solas tienen más contenido de proteína que la microalga inmovilizada. En

esta gráfica también podemos ver el efecto general en el co-inmovilizado del contenido de proteínas. La siguiente gráfica (Fig. 11 C) muestra el contenido de proteína por célula de microalga, donde podemos observar que las células de microalga inmovilizada tienen menor contenido de proteína. También se muestra claramente que las cepas silvestres tienen mayor contenido de proteína por célula que las cepas mutantes. Además el contenido de proteína por célula está relacionada con la concentración de AIA producido por las cepas de *Azospirillum*, puesto que a mayor concentración de AIA es mayor el contenido de proteína por célula de microalga ($Cv+ Sp6 > Cv+ Sp245 > Cv+ SpM > Cv+ FAJ0009 > Cv$).

En la figura 12 se muestra que para glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa, la actividad por cultivo en los microorganismos inmovilizados es superior a la de los inmovilizados.

En la figura 13 se observa el efecto neto de la actividad de las enzimas GS y GDH. Se observa que el efecto es más grande para las cepas silvestres que para las mutantes tanto para la GS como para la GDH.

Finalmente en la gráfica 14 se observa cómo está relacionado el AIA, producido por *Azospirillum*, con el efecto neto de las actividades enzimáticas GS y GDH. Se aprecia en la gráfica que a mayor concentración de AIA es mayor la actividad enzimática para GS y para GDH.

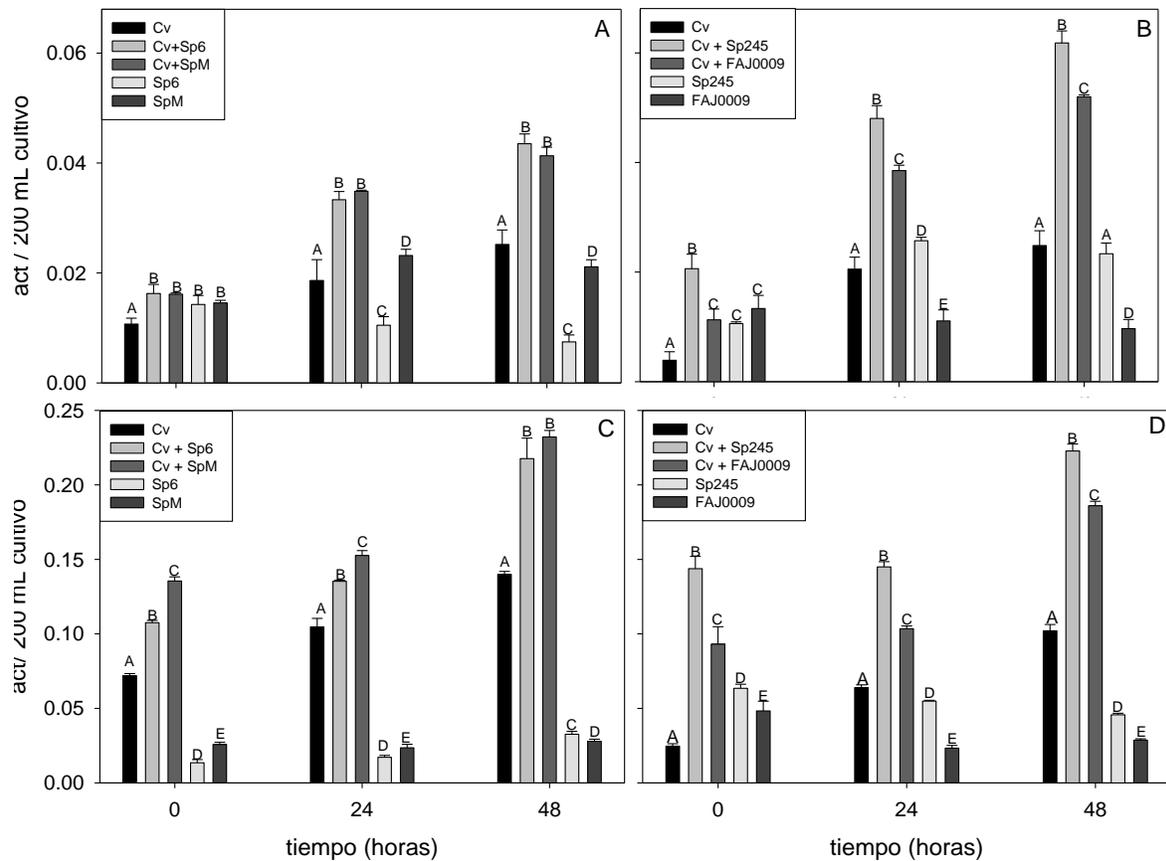


Figura 12. Actividad por cultivo de glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa. (A, B) y (C, D) en cultivos de *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola ó con *Azospirillum brasilense* Sp6, SpM, Sp245 y FAJ0009, así como la inmovilización de estas bacterias solas. Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, las diferencias significativas son a $P \leq 0.05$, utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar; la ausencia indica que el error estándar es insignificante.

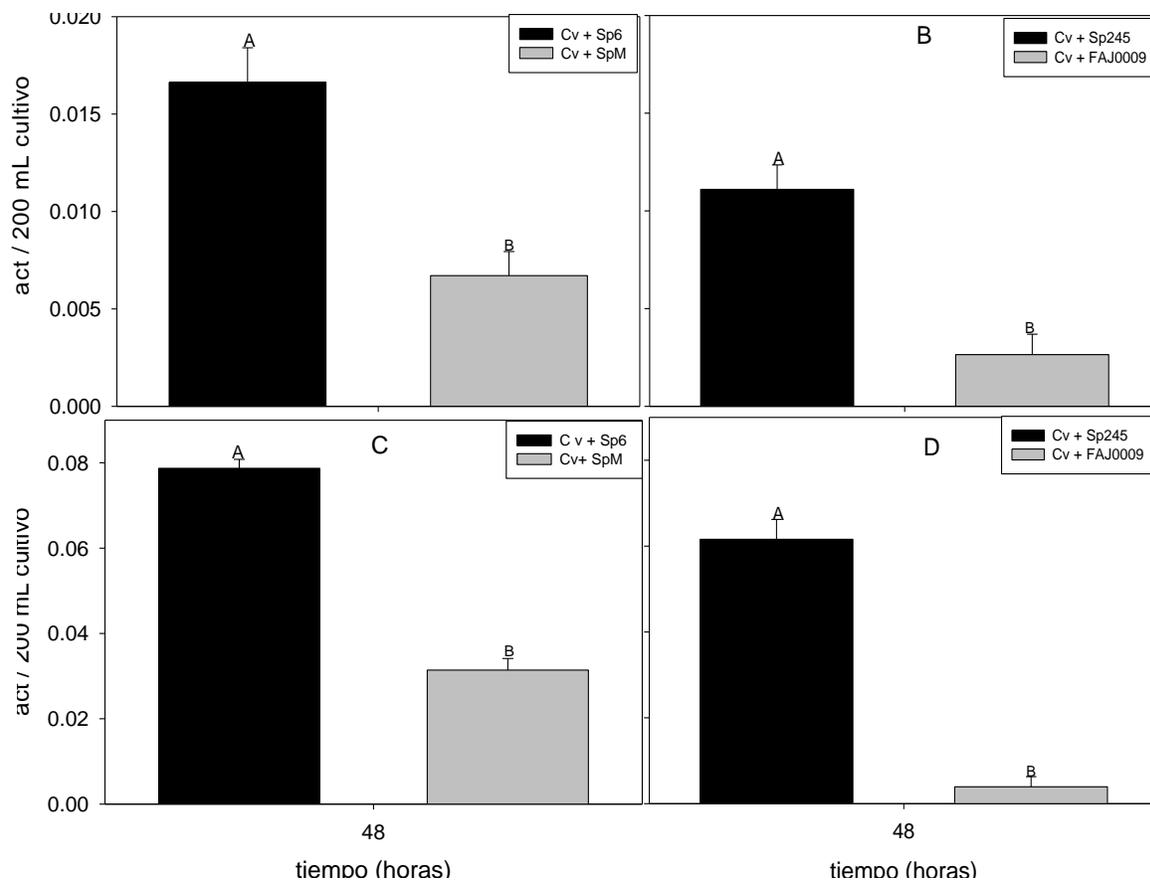


Figura 13. Efecto neto de la Actividad por cultivo de glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa. (A, B) y (C, D) en cultivos de *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola ó con *Azospirillum brasilense* Sp6, SpM, Sp245 y FAJ0009, así como la inmovilización de estas bacterias solas. Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, las diferencias significativas son a $P \leq 0.05$, utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar; la ausencia indica que el error estándar es insignificante.

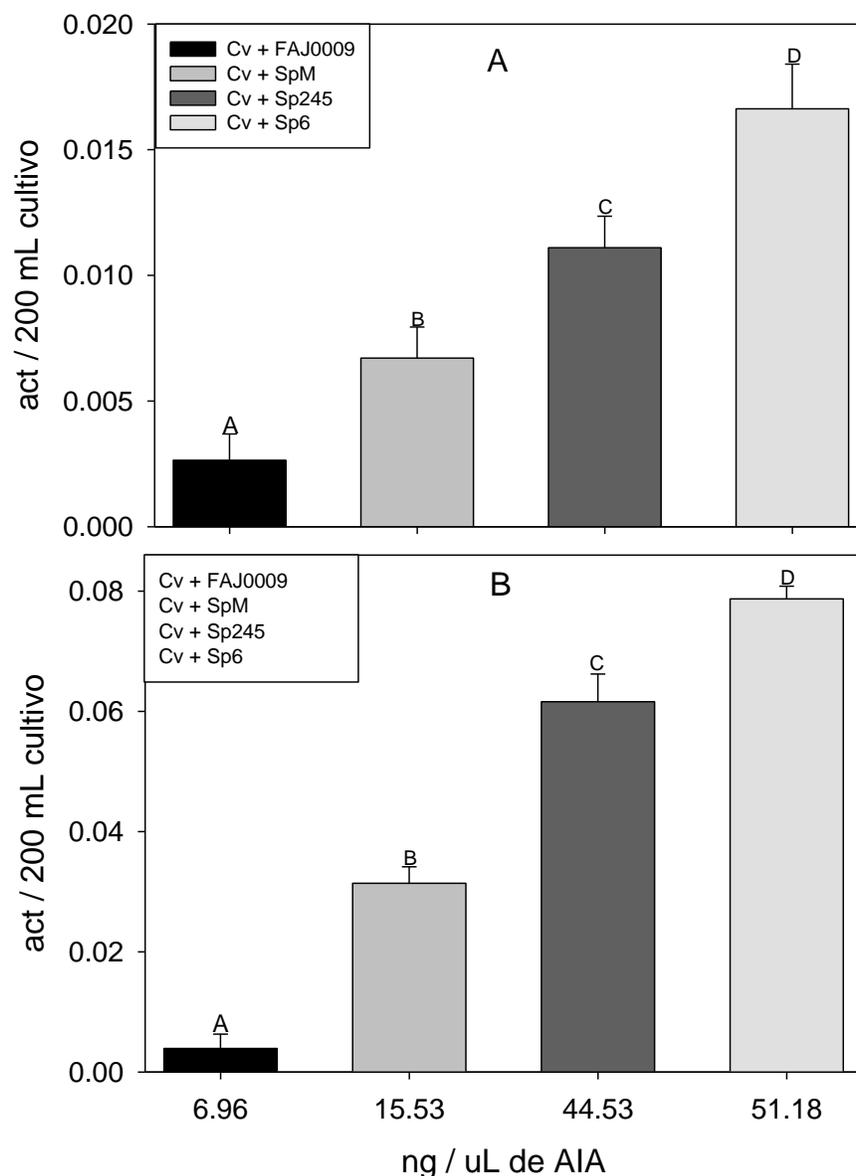


Figura 14. Relación del AIA, producido por *A. brasilense*, y el efecto neto en la actividad de glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa. (A y B). *A. brasilense* FAJ0009 (6.96 ng/mL), SpM7918 (15.53 ng/mL), Sp245 (44.53 ng/mL), Sp6 (51.18 ng/mL) (de-bashan *et al.*, 2008 *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas silvestres *A. brasilense* Sp6 (Cv+ Sp6), Sp245 (Cv+ Sp245), y sus respectivos mutantes, atenuados en la producción de AIA, *A. brasilense* SpM (Cv + SpM), FAJ0009 (Cv+ FAJ0009) a las 48 horas de cultivo. En MCS con 8 mg/L NH_4^+ y 200 mg/L triptófano. Cada columna se indica con una letra mayúscula diferente, las diferencias significativas son a $P \leq 0.05$, utilizando ANDEVA de una vía. Las barras representan el error estándar.

8. DISCUSIÓN

El nitrógeno es una parte integral de las proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas importantes como las clorofilas (Gangwar *et al.*, 2011), siendo la asimilación de amonio un proceso bioquímico crítico para el crecimiento y desarrollo en plantas (Lu *et al.*, 2005). El metabolismo del nitrógeno en *Chlorella* no es diferente de otras eucariotas fotosintéticas (Huppe y Turpin, 1994). El amonio es la fuente de nitrógeno más preferida por microalgas (Wilhelm *et al.*, 2006). Se ha visto que cuando la microalga *Chlorella* está junto con la bacteria *Azospirillum* en co-inmovilización, *Azospirillum* promueve en *Chlorella* una mayor remoción de amonio del medio de cultivo a comparación de cuando se encuentra la microalga inmovilizada sola (de-Bashan *et al.*, 2002a, 2004, 2005, 2008a; Hernández *et al.*, 2006). El amonio está presente en todos los compartimentos de la célula (Howitt y Udvardi, 2000). En este trabajo de investigación se midió el amonio intracelular de los microorganismos co-inmovilizados *Chlorella* - *Azospirillum* y se encontró que los microorganismos co-inmovilizados tienen mayor acumulación de amonio intracelular a comparación de la microalga inmovilizada sola, siendo demostrado que efectivamente el amonio suministrado en el medio es tomado por estos microorganismos y se está acumulando como amonio intracelular. Sin embargo, no hay mayor cantidad de NH_4^+ en el co-inmovilizado por el hecho de que al estar juntos estos microorganismos se sumen sus contenidos de amonio intracelular, ya que, al restar en el co-inmovilizado el amonio intracelular correspondiente al de la bacteria y al de la microalga se obtuvo una cantidad de amonio intracelular extra, lo cual nos indica claramente que *Azospirillum* promueve en *Chlorella* una mayor absorción de amonio. De acuerdo con Gómez-Oreo (2002) el reforzamiento de efectos simples que se producen cuando la coexistencia de efectos simples supone un efecto mayor que su suma simple, se define como efecto sinérgico. Por lo tanto podemos decir que la asociación entre *Chlorella* y *Azospirillum* produce un efecto sinérgico, ya que se potencian sus actividades cuando trabajan en conjunto. No es nuevo que microorganismos en asociación con *Azospirillum* produzcan efectos sinérgicos, un ejemplo clásico es la interacción microbiana de *Azospirillum* y *Rhizobium*, su inoculación en leguminosas da como resultado incremento en la fijación de nitrógeno, mayor número de nódulos, incremento en el contenido de aminoácidos de raíces, brotes y eventualmente, un incremento en rendimiento (Andreeva *et al.*, 1991; Andreeva *et al.*, 1993; Del Gallo y

Fabri, 1991; Elmokaden y Badawi, 1992; Iruthayathas *et al.*, 1983; Hassouna *et al.*, 1994; Rai, 1983; Yadav *et al.*, 1992).

Cuando se encuentran en co-inmovilización, la presencia de muchas células de *Azospirillum* cercanamente próximas en la esfera puede ser considerada una condición estresante para la microalga (Lebsky *et al.*, 2001, de-Bashan *et al.*, 2008). La aplicación exógena de hormonas de plantas tales como AIA puede aliviar los efectos adversos de los factores de estrés (Chakbarti y Mukherji, 2003; Tuna *et al.*, 2008; Gangwar *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios han demostrado que si se aplica AIA en exceso provoca la inhibición en el crecimiento y el daño tisular (de Melo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). Estudios tempranos de la adición de auxinas en el medio de crecimiento de *C. vulgaris* notaron que la auxina fue consumida por las células y resultó en el alargamiento de células (Yin, 1937). Sin embargo, altas concentraciones de la auxina se encontró que tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento (Pratt, 1938). La aparición de auxinas a concentraciones de 10^{-8} a 19.4 M se ha visto que estimula el crecimiento y el conteo de células de *Chlorella* sp., con los efectos más estimulatorios observados a concentraciones de 10^{-5} a 10^{-4} M (Czerpak *et al.*, 1999). Cuando se le añade una concentración de 2.85×10^{-4} M de AIA al medio de crecimiento de *Chlorella vulgaris*, se incrementó el conteo celular por unidad de volumen de 11 a 19 veces después de 26 días de crecimiento (Pratt, 1938). La adición de AIA al medio de crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* estimuló su crecimiento, resultando en un incremento de peso fresco de 184-297% comparado con el control (Czerpak *et al.*, 1994). Por último la adición exógena de AIA a cultivos de *C. vulgaris* aumentó significativamente la multiplicación celular (González y Bashan, 2000). Esto concuerda con los resultados de este estudio, pues se vio en el experimento preliminar que el AIA exógeno agregado al medio de cultivo tiene un efecto en el crecimiento de la microalga *Chlorella*, sobre todo con las concentraciones más altas de AIA añadido (correspondientes a la concentración de AIA reportada que produce cepas silvestres de *A. brasilense* (de-Bashan *et al.*, 2008b).

Dentro de los efectos que promueve *Azospirillum* en plantas y microalgas se ha propuesto que el AIA producido por *Azospirillum* es un mecanismo de acción por el cual promueve el aumento en el crecimiento poblacional en *Chlorella* (de-Bashan *et al.* 2002, 2004, 2005; Hernández *et al.*, 2006). En este estudio se vio que el efecto sinérgico en la tasa de

crecimiento de los organismos co-inmovilizados, muestra un mayor efecto en los co-inmovilizados con cepas silvestres y un menor efecto en los co-inmovilizados con cepas mutantes de *Azospirillum*. Asimismo se demostró una relación entre la concentración de AIA producida por las cepas de *Azospirillum* y la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*, puesto que a mayor concentración de AIA mayor es la tasa de crecimiento de *Chlorella*. Solo existen unos pocos reportes donde señalan que *Azospirillum* promueve un incremento en la asimilación de amonio y en la actividad de GS y GDH. En plantas superiores, Ribaudó *et al.* (2001) demostraron que maíz inoculado con *Azospirillum* mostraba un incremento en la actividad GS y GDH en células de raíz. Por su parte en microalgas, de Bashan *et al.* (2008b) probaron diferentes concentraciones de amonio y observaron que con 8 mg de amonio en el medio de cultivo de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* se alcanza una mayor absorción de amonio por parte de los microorganismos, además se demostró que a esa concentración de amonio había una mayor actividad en las enzimas de asimilación de amonio (GS y GDH). También se ha comprobado que el AIA afecta la actividad de GS y GDH en plantas superiores, Chakbarti y Mukherji (2003) encontraron que el AIA redujo la actividad de GS, GDH y GOGAT en hojas, raíces y nódulos de frijol mungo (*Vigna radiata*) sometidos a estrés salino; Gangwar *et al.* (2011) mostraron que la aplicación de ácido indol acético con Mn protegieron a plántulas de chícharo (*Pisum sativum*) de la toxicidad del manganeso mediante el control del contenido de amonio y de las actividades de las enzimas de asimilación de amonio (glutamina sintetasa y glutamato sintasa). Sin embargo, no hay reportes que digan que el AIA producido por *Azospirillum* afecte la actividad de GS y GDH en plantas o en microalgas. Hoy en día, la explicación más común para algunos de los modos de acción de *Azospirillum* en plantas es la producción de varias fitohormonas que alteran la morfología y el metabolismo de la planta, dando lugar a una mejor absorción de nutrientes y agua, por lo tanto plantas más grandes y saludables. (Bashan *et al.*, 2004; Bashan y de-Bashan, 2010). Especies de *Azospirillum* son bien conocidas por su habilidad de producir hormonas de plantas *in vitro*, principalmente AIA (Steenjoudt y Vanderleyden, 2000). La producción de AIA *in vitro* en *Azospirillum* es inducida por la presencia de triptófano (Fallik *et al.*, 1989; Katzy *et al.*, 1990, Zimmer *et al.*, 1991; de-Bashan *et al.*, 2008). *A. brasilense* puede promover el crecimiento de *C. vulgaris* sin la adición de triptófano exógeno (González y Bashan, 2000). En esos casos, el

AIA exógeno no medible puede ser detectado en el medio de crecimiento. Se asume que todo el AIA producido por la bacteria es consumido por la microalga. Al añadir triptófano al medio de cultivo, como se demostró en el estudio de-Bashan *et al.* (2008), la detección de AIA exógeno es posible. Para demostrar el involucramiento del AIA producido por *A. brasilense* en la asimilación de amonio de la microalga *C. vulgaris*, es preferible el uso de mutantes que no produzcan AIA, pero ha sido posible aislar mutantes de *Azospirillum* que sean incapaces de sintetizar AIA. Solo unos pocos mutantes atenuados en la producción de AIA han sido producidos. Estos mutantes conocidos producen 0.2-5% del nivel de AIA producido por la cepa silvestre. Por lo que dos mutantes atenuados en la producción de AIA (Barbieri y Galli, 1993; Vande Broek *et al.*, 1999) fueron empleados en este estudio. Este estudio demostró que cepas silvestres de *A. brasilense* (Sp6 y Sp245) mejoran la acumulación de amonio intracelular, así como aumentan la actividad de las enzimas de asimilación de amonio GS y GDH de *C. vulgaris*, cuando están co-inmovilizadas con la microalga. En contraste, cuando *C. vulgaris* fue co-inmovilizada con mutantes atenuados de AIA tuvo un insignificante efecto en la acumulación de amonio de la microalga y en actividad de las enzimas de asimilación de amonio GS y GDH. Fluctuaciones en la asimilación de amonio de la microalga cuando los mutantes son usados puede ser explicada por el hecho que esas cepas producen 2%-5% AIA de la cepa silvestre; concentraciones variables de AIA afectan la asimilación de amonio microalgal (de-Bashan *et al.*, 2008). Al comparar estos efectos con la concentración de AIA producida por las cepas de *Azospirillum*, se observa que el efecto tiene que ver con la concentración de AIA, puesto que el mayor efecto se observa con las cepas silvestres con mayor producción de AIA, en términos de acumulación de amonio intracelular así como en las enzimas de asimilación de amonio. Sin embargo, los datos mostraron que hay límite superior de AIA, esta concentración es aún desconocida, a la que la microalga puede responder.

GS funciona como la mayor enzima de asimilación de amonio, pero también para volver a asimilar amonio resultando del rompimiento de proteínas. En este estudio para todos los casos (diferentes tratamientos con cepas silvestres y mutantes de *Azospirillum*) la actividad de GS fue alta, según de-Bashan *et al.* (2008) la actividad de GDH en el sistema co-inmovilizado es importante para mejorar la absorción de amonio en *C. vulgaris*. *Chlorella* es conocida por activar la ruta GDH para asegurar la asimilación de amonio (Tischner y

Lorenzen, 1980). GDH participa en el mantenimiento del balance entre el carbono y el nitrógeno en la célula (Miflin y Habash, 2002), actúa cuando el carbono es limitado y el nitrógeno abundante (Lu *et al.*, 2005), en casos como este estudio cuando el carbón es limitado y el nitrógeno está en exceso, el balance entre el carbono y el nitrógeno requiere la operación de la GDH porque hay una fuerte demanda para obtener carbono de los aminoácidos. Este estudio demuestra que la concentración de 8 mg de amonio (tal como lo propuso de-Bashan *et al.*, 2008) es dependiente de la actividad, puesto que todas los microorganismos en co-inmovilización presentaron alta actividad de GS y GDH, concordando con Miflin y Habash, (2002) puesto que en algunos casos las dos rutas actúan conjuntamente pudiendo proveer un mecanismo que responda a las diferentes necesidades de la célula para compuestos de nitrógeno y carbono.

El papel de auxinas sobre el contenido de proteínas *Chlorella* ha sido poco estudiando. Czerpak *et al.* (1999) encontraron una fuerte estimulación de AIA en el contenido de proteínas y aldohexosas en *Chlorella pyrenoidosa*. La actividad estimulante de las auxinas estudiada a nivel molecular en las células, en relación con análisis de parámetros bioquímicos (proteínas solubles en agua, monosacáridos, y clorofilas (a y b) en *C. pyrenoidosa* aumentó con la aplicación de auxinas (AIA) en 675-1050%. En este estudio se mostró que *Azospirillum* tiene un efecto en la acumulación de proteínas en *Chlorella*, que además las cepas silvestres de *Azospirillum* tienen mayor efecto que las cepas atenuadas en la producción de AIA, y que el contenido de proteína por célula está relacionado con la concentración de AIA producido por las cepas de *Azospirillum*, puesto que a mayor concentración de AIA es mayor el contenido de proteína por célula de microalga. Lo que nos muestra evidencia de que el AIA, producido por *Azospirillum* tiene un papel en la acumulación de proteínas en *C. vulgaris*.

Se ha reportado AIA en microalgas verde como *Chlorella* (Dibb-Fuller y Morris 1992; Mazur *et al.*, 2001) sin embargo, las algas verdes no producen altos niveles de componentes exógenos como auxinas (Stirk *et al.*, 2002), y solo limitada información está disponible sobre los mecanismos de transporte de auxinas en microalgas (Czerpak y Bajguz 1993; Czerpak *et al.*, 1999, González y Bashan, 2000). Genes ortólogos para auxinas a receptores de fitohormonas en *Arabidopsis* fueron encontrados en el genoma de *Chlorella variabilis* NC64A (Blanc *et al.*, 2010). La presencia de fitohormonas en algas así como

los genes ortólogos para estos receptores de fitohormonas en *Arabidopsis* sugiere que estas sustancias tienen un efecto en algas.

El contenido en proteínas y nitrógeno puede ser considerado como importantes indicadores para evaluar el desempeño del crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés. La síntesis de proteínas está estrechamente relacionada con la producción de tejido nuevo y se considera como un sumidero principal de los compuestos de nitrógeno. Una disminución de enzimas del metabolismo de nitrógeno puede ser considerado como una etapa limitante en la incorporación de nitrógeno inorgánico en el esqueleto de carbono para producir aminoácidos para la síntesis de proteínas (Boussama *et al.*, 1999).

El AIA, producido por *Azospirillum brasilense*, es un mecanismo de acción en *C. vulgaris*. Ya que se tuvieron efectos en la tasa de crecimiento, contenido de amonio intracelular, proteínas y actividad de las enzimas de asimilación de amonio GS y GDH.

9. CONCLUSIÓN

Cuando se encuentran juntos *C. vulgaris* y *A. brasilense* se produce un efecto sinérgico positivo en la microalga.

El Ácido Indol-3-acético producido por *Azospirillum brasilense* tiene un efecto en la asimilación de amonio y en las enzimas de asimilación de amonio (GS y GDH) de *Chlorella vulgaris*.

El AIA producido por *A. brasilense* es un mecanismo de acción en *Chlorella vulgaris*.

10. REFERENCIAS

1. Aguilar-Piedras, J.J., Xiqui-Vasquez, M., Garcia-Garcia. S. y Baca, B. E. 2008. Indole-acetic acid production in *Azospirillum*. Revista Latinoamericana Microbiología 50: 29-37
2. Andreeva, I., Mandkhan K., Redkina T., Mishustin E. y Izmailov S.. 1991. Effect of *Azospirillum brasilense* on formation and nitrogen-fixing activity of bean and soybean nodules. Soviet Plant Physiol. 38: 646-651.
3. Andreeva, I., Red'kina T. y Smailov S. 1993. The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium*-legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. Russian J. Plant Physiol. 40: 901-906.
4. Baca, B. y Elmerich, C. 2007. Microbial production of plants hormones by microorganisms. In: Associative Nitrogen-fixation Bacteria and Cyanobacteria. IV. 2007. Series: Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, Vol. 2007. pp 113-137. C. Elmerich, y W. Newton (Eds). Springer Life Science. The Netherlands. ISBN:1-4020-3541-1.
5. Barbieri, P. y Galli, E. 1993. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. Res. Microbiol. 144:69-75.
6. Bascomb, N.F., Turner, K.J., and Schmidt, R.R. 1986. Specific polysome immunoadsorption to purify an ammonium-inducible glutamate dehydrogenase mRNA from *Chlorella sorokiniana* and sintesis of full length double-stranded cDNA from the purified mRNA. Plant Physiol. 81: 527-532.
7. Bashan, Y., Holguin, G. y de-Bashan, L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and enviromental advances (1997 - 2003). Can. J.Microbiol. 50: 521 - 577.
8. Bashan, Y., Holguin, G., Puente, M. E., Carrillo, A., Alcaraz-Melendez, L., Lopez-Cortes, A., y Ochoa, J.-L. 1993. Critical evaluation of plant inoculation with beneficial bacteria from the genus *Azospirillum*. En: Agroecology Sustainability and Education. (Eds). R. Ferrera-Cerrato y R. Quintero Lizaola. Publicado por Centro de Edafologia, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp. 115-126.

9. Bashan, Y., Puente M. E., de-Bashan L.E., y Hernandez J.-P. 2008. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. En: Plant-Microbe interactions. (Ed). E. Ait Barka and C. Clément. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India. Capítulo 4. pp. 69-93.
10. Bashan, Y., y de-Bashan, L.E. 2005. Bacteria / Plant growth-promotion. En: Encyclopedia of soils in the environment. (Ed.) D. Hillel, Elsevier, Oxford, U.K.. Volume 1. pp.103-115.
11. Bashan, Y., y de-Bashan, L.E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. *Advances in Agronomy* 108: 77-136
12. Baudoin E., Lerner A., Sajjad M., Zemrany H., Prigent-Combaret C., Jurkevich E., Spaepen S., Vanderleyden J., Nazaret S., Okon Y., Moëgne-Loccoz Y. 2010. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere
13. Bhattacharya D. y Medlin L. 1998. Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants, *Plant Physiol.* 116: 9-15.
14. Blanc G., Duncan G., Agarkova I., Borodovsky M., Gurnon J., Kuo A., Lindquist E., Lucas S., Pangilinan J., Polle J., Salamov A., Terry A., Yamada T., Dunigan DD., Grigoriev I.V., Claverie J-M., Van Etten J.L. (2010) The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell* 22:2943–2955
15. Boussama, N., Ouariti, O., Ghorbal, M.H., 1999. Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. *J. Plant Nutr.* 22, 731–752.
16. Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-257.
17. Caballero-Mellado, J. 2001. El género *Azospirillum*. En: *Microbios en línea*. E. Martínez-Romero y J. Martínez-Romero (Eds). Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 177-198.

18. Cannons, A., y Pendleton, L.C. 1994. Possible role for mRNA stability in the ammonium-controlled regulation of nitrate reductase expression. *Biochem. J.* 297: 561-565.
19. Cassán, F., Sgroy, V., Perrig, D., Masciarelli, O. y Luna, V. 2008. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal En: *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Cassan F. D. y García I. de Salamone (Eds.). Publicado por: Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Cap.4. pp. 61-86.
20. Cassidy, M. B., Lee, H., Trevors, J. T., 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J. Appl. Phycol.* 5: 593-604.
21. Chakbarti, N. y Mukherji S., 2003. Effect of phytohormone pretreatment on nitrogen metabolism in *Vigna radiata* under salt stress. *Biologia Plantarum* 46 (1): 63-66.
22. 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.
23. 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. *J. Microbiol. Methods:* 46: 261-267.
24. Cohen, Y., 2001. Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 257–274.
25. Czerpak R., Bajguz A., Bialecka B., Wierzcholowska LE. y Wolanska M.M. (1994). Effect of auxin precursors and chemical analogues on the growth and chemical composition in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Acta Soc Bot Pol* 63:279–286
26. Czerpak, R. & Bajguz, A. 1993. Effect of auxins and cytokinins on protein and saccharides extracellular excretion in *Chlorella pyrenoidosa*. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 40:249–54.

27. Czerpak, R., Krotke, A. & Mical, A. 1999. Comparison of stimulatory effect of auxins and cytokinins on protein, saccharides and chlorophylls content in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Pol. Arch. Hydrobiol. 46:71–82.
28. de Melo, M.P., de Lima, T.M., Pithon-Curi, T.C., Curi, R. 2004. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. Toxicol. Lett. 148, 103–111.
29. de-Bashan L.E., Antoun H., Bashan Y. 2008b. Involvement of índole-3-acetic acid produced by the growth promoting bacterium *Azospirillum spp.* In promoting growth of *Chlorella vulgaris*. J. Phycol. 44:938-947
30. de-Bashan, L. E. y Bashan, Y. 2003. Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. Rev. Colom. Biotecnol.5: 85-90.
31. de-Bashan, L. E., Antoun, H. y Bashan, Y. 2005. Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Ecol. 54:197–203.
32. de-Bashan, L. E., Antoun, H. y Bashan, Y. 2008a. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.* in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. J. Phycol. 44:938–47.
33. de-Bashan, L.E. y Bashan Y., 2008b. Plant growth-promoting bacteria and green microalgae: a convenient model for basic studies of plant-bacterium interactions. En: *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. F. D. Cassan and I. Garcia de Salamone (Eds.). Publicado por: Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Cap. 2. pp. 37-48.
34. 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. Appl. Environ. Microbiol. 21:6797-6802.
35. de-Bashan, L.E. y Bashan, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. Bioresource Technology. 101:1611-1627.

36. de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Morey, T., y Bashan, Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38: 466-474.
37. de-Bashan, L.E., Magallón, P. y Bashan, Y. 2008. 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.
38. de-Bashan, L.E., Moreno, M., Hernandez, J.P., y Bashan, Y. 2002. 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 Res.* 36: 2941-2948.
39. del Gallo, M. y P. Fabbri. 1991. Effect of soil organic matter on chickpea inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *ciceri* . *Plant Soil* 137: 171-175.
40. Di Martino Rigano, V., Vona, V., Fuggi, V., Di Martino, C., y Rigano, C. 1982. Regulation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris* nitrate reductase requirement for the appearance of nitrate reductase activity. *Plant Sci. Lett.* 28: 265-272.
41. Dibb-Fuller, J. y Morris, D. A. 1992. Studies on the evolution of auxins carriers and phytochrome receptors: transmembrane auxin transport in unicellular and multicellular Chlorophyta. *Planta* 186:219–26.
42. Döbereiner, J., Marriell, I. E. y Nery, M., 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck, *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 22, p. 1464-1473.
43. Elmokadem, M.T., y A.M. Badawi. 1992. Effect of *Azospirillum* inoculation on the amino acid content in roots and shoots of wheat, barley, peas and lupin. *Z. Mikrobiol.* 147: 119-125.
44. Fallik, E., Okon, Y., Epstein, E., Goldman, A. y Fischer, M. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21:147–53.
45. Fernandez, E. y Galvan, A., 2007. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Biol.* 58, 2279e2287.

46. Frieden, C.J. 1963. Glutamate dehydrogenase assay. *Biol. Chem.* 238: 3286-3288.
47. Gangwar S., Singh V. y Maurya J., 2011. Responses of *Pisum sativum L.* to Exogenous Indole Acetic Acid Application Under Manganese Toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol* 86: 605-609.
48. 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.
49. Gewitz, H.S., Piefke, J., y Vennesland, B. 1981. Purification and characterization of demolybdo nitrate reductase EC-1.6.6.1 NADH cytochrome *c* oxido reductase of *Chlorella vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 256: 11527-11531.
50. Goldman, J.C., 1976. Biomass production in mass cultures of marine phytoplankton at continuous culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 23, 31e43.
51. Gómez-Orea, D., 2002. Evaluación de impacto ambiental. Ediciones mundi-prensa. Madrid España.
52. Gonzalez LE y Bashan Y. 2000. Growth promotion of the microalgae *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growthpromoting bacteria *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol*; 6:1537-41.
53. Gonzalez-Bashan LE, Lebsky V, Hernandez JP, Bustillos JJ y Bashan Y. 2000. Changes in the metabolism of the microalgae *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Can J Microbiol*;46:653-9.
54. Grobbelaar, J.U., 2004. Algal nutrition: mineral nutrition. En: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 97e115.
55. 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.
56. Hartmann, A. y Zimmer, W., 1994. Physiology of *Azospirillum*, in *Azospirillum/Plant associations*, Okon, Y., Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p. 15-39.

57. Hartmann, A., Singh, M. y Klingmuller, W. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.
58. Hassouna, M.G., M.T. Hassan y M.A. Madkour. 1994. Increased yields of alfalfa (*Medicago sativa*) inoculated with N₂-fixing bacteria and cultivated in a calcareous soil of Northwestern Egypt. *Arid Soil Res. Rehabilit.* 8: 389-393.
59. Hernández –López J. y Vargas-Albores, F. 2003. A microplante technique to quantify nutrients (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺ and PO₄³⁻) in seawater. *Aqueaculture Research* 34, 1201-1204.
60. 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 Microb. Technol.* 38:190-198.
61. Holguin G., Patten C.L. y Glick B.R., 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biol Fertil Soils* 29:10-23.
62. Huppe, H.C. y Turpin, D.H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:577–607.
63. Ilangovan, K., Cañizares-Villanueva, R. O., González-Moreno, S. y Voltolina, D. 1998. Effect of cadmium and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60:936–43.
64. Inokuchi, R., Kuma, K.-I., Miyata, T. y Okada, M., 2002. Nitrogenassimilating enzymes in land plants and algae: phylogenic and physiological perspectives. *Physiol. Plantarum* 116, 1e11.
65. Iruthayathas, E., S. Gunasekaran y K. Vlassak. 1983. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N₂- fixation of winged bean and soybean. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 20: 231-240.
66. 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.

67. Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. y Aaronson, S., 1986. Algal nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook for Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, FL., USA, pp. 147e198.
68. Karel, F. S., Libicki, S. B. y Robertson R., 1985. The immobilization of whole cells: engineering principles. Chemical Engineering Science. 40: 1321-1354.
69. Katzy, E., Iosipenko, A. D., Egorenko, D. A., Zhuravleva, E. A., Panasenko, V. I. y Ignatov, V.V. (1990). Involvement of *Azospirillum brasilense* plasmid DNA in the production of indole acetic acid. FEMS Microbiol. Lett. 72:1-4.
70. Katzy, E.I., Iosipenko, A.D., Egorenkov, D.A., Zhuravleva, E.A., Panasenko, V.I. y Ignatov, V.V. 1990 Involvement of *Azospirillum brasilense* plasmid DNA in the production of indole acetic acid. FEMS Microbiol. Lett. 72, 1^4.
71. King, A. H., 1983. Brown seaweed extracts (alginates). In: Glicksman, M. (ed). Food hydrocolloids. CRC Press, Boca Raton, FL. 115-188.
72. Lambrecht Marck, Okon Yaacov, Vande Broek Ann y Vanderleyden Jos. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. pp. 288-300.
73. Lebsky, V. K., L. E. Gonzalez-Bashan, y Y. Bashan. 2001. Ultrastructure of co-immobilization of the microalga *Chlorella vulgaris* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* and with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* in alginate beads. Can. J. Microbiol. 47:1-8.
74. Lee, Y.-k., 2004. Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. En: Richmond, A. (ed.). Handbook of microalgal cultura, biotechnology and applied phycology. Blackwell publishing. Oxford. P. 116.
75. Lopez-Ruiz, A., Verleben, J.P., Bocanegra, J.A. y Diez, J. 1991. Immunocytochemical localization of nitrite reductase in green algae. Plant Physiol. 96: 699-704.
76. Lu, B., Yuan, Y., Zhang, C., Ou, J., Zhou, W. y Lin, Q. 2005. Modulation of key enzymes involved in ammonium assimilation and carbon metabolism by low temperature in rice (*Oryza sativa* L.) roots. Plant Sci. 169:295-302.

77. Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*, 15:377-390.
78. Massena-Reis, V., Teixeira, K. R. y Pedraza, R. O. 2011 What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant Growth-Promoting Bacteria? In: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Ed.: D.K. Maheshwari. Springer Berlin Heidelberg Chapter: 6 pp: 123-138.
79. Mazur, A., Konop, A. y Synak, R. 2001. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* 13:35–42.
80. McHugh, D., 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper 441. Rome, FAO. 105 pp.
81. Mifflin, B. J. y Habash, D. Z. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* 53:979–87.
82. Morris, I., 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. In: Stewart, W.D.P. (Ed.), *Algal Physiol. Biochem.*
83. Mouget JL, Dakhama A, Lavoie MC y De la Noue J. 1995. Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiol. Ecol*;18:35–44.
84. Myers, J., 1974. Conceptual developments in photosynthesis, 1924-1974. *Plant Pgyiol.* 54:420-426.
85. Nakamura, Y., y Ikawa, T. 1993. Purification and properties of HADH: Nitrate reductase from red alga *Porphyra yezoensis*. *Plant Cell Physiol.* 34: 1239-1249.
86. O'Reilly, A. M. y Scott J. A., 1995. Defined commobilization of mixed microorganisms cultures. *Enzyme and Microbial Technology.* 17:636-646.
87. Oh-Hama, T., y S. Miyachi. 1992. *Chlorella*, p. 3–26. In M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka (ed.), *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
88. Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan L.E., y Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45: 11-36.

89. Pratt R. (1938). Influence of auxins on the growth of *Chlorella vulgaris*. Am J Bot 25:498–501
90. Rai, R. 1983. Efficacy of associative N₂-fixation by streptomycin-resistant mutants of *Azospirillum brasilense* with genotypes of chick pea *Rhizobium* strains. *J. Agric. Sci. Camb.* 100: 75-80.
91. Ribaudó, C.M., Rondanini, DP., Cura, J.A., y Frascina, A.A. 2001. Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. *Biol. Plant.* 44: 631-634.
92. Richmond, P. D. A., 1986. CRC Handbook of microalgal mass culture. Ed Richmond A. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. 584 pp.
93. S. M. Howitt y M. K. Udvardi. 2000. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants , *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1465: 152-170
94. Shapiro, B.M., y Stadtman, E.R. 1972. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). In: Tabor, H., and Tabor, W.C. (eds.). *Methods in Enzymology*. Vol. 17A. Academic Press. New York and London. pp. 910-912.
95. Sherman, T.D., y Funkhouser, E.A. 1989. Induction and synthesis of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 274: 525-531.
96. Shi, X.-M., Zhang, X.-W. y Chen, F., 2000. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 312e318.
97. Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography.* 14:799.
98. Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M. y Vanderleyden, J., 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1803e1810.
99. Spaepen S. y Vanderleyden J. 2010. Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10:1101
100. Spaepen Stijn y Vanderleyden Jos, 2010. Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*

101. Spaepen Stijn, Vanderleyden Jos y Remans Roseline, 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. Federation of European Microbiological Societies. 1-24.
102. Steenhoudt, O. y Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. 24:487–506.
103. Stirk, W. A., Ordog, V., Van Staden, J. y Jager, K. 2002. Cytokinin and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. J. Appl. Phycol. 14:215–21.
104. Syreth, P.J. y Morris, I., 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. Biochem. Biophys. Acta 67, 566e575.
105. Tampion, J. y Tampion, M. D. (1987). Immobilized cells: Principles and Applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 257 pp.
106. Tischner, R. y Lorenzen, H. 1980. Changes in the enzyme pattern in synchronous *Chlorella sorokiniana* caused by different nitrogen sources. Z. Pflanzen physiol. 100:333–41.
107. Tischner, R. 1984. Evidence for the participation of NADP glutamate dehydrogenase in the ammonium assimilation of *Chlorella sorokiniana*. Plant Sci. Lett. 34: 73-80.
108. Tuna AL, Kaya C, Dikilitas M y Higgs D. 2008. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. Environ Exp Bot 62:1–9
109. Van Puyvelde S, Cloots L, Engelen K, Das F, Marchal K, Vanderleyden J y Spaepen S. 2011. Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. Microb Ecol. 61(4):723-8.
110. Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K. y Vanderleyden, J. 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 181:1338–42.
111. Vanoni, M.A., y Curti, B. 2005. Structure-function studies on the iron-sulfur flavoenzyme glutamate synthase: an unexpectedly complex self-regulated enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 433: 193-211.

112. Wanandy, S., Brouwer, N., Liu, Q., Mahon, A., Cork, S. Karuso, P., Vemulpad, S. y Jaime, J. 2005. Optimisation of the fluorescein diacetate antibacterial assay. *J. Microbiol. Methods.* 60:21-30.
113. Wang, H., Shan, X., Wen, B., Owens, G., Fang, J., Zhang, S. 2007. Effect of indole acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and relevant antioxidant response. *Environ. Exp. Bot.* 61, 246–253.
114. Wilhelm, C., Büchel, C., Fisahn, J., Goss, R., Jakob, T., LaRoche, J., Lavaud, J., Lohr, M., Riebesell, U., Stehfest, K., Valentin, K., Kroth, P.G., 2006. The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist* 157, 91e124.
115. 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. *J.Appl. Phycol.* 19:43-53.
116. Yadav, K., V. Prasad, K. Mandal y N. Ahmad. 1992. Effect of co-inoculation (*Azospirillum* and *Rhizobium* strains) on nodulation, yield, nutrient uptake and quality of lentil in calcareous soil [*Lens culinaris*]. *LENS-Newsletter* 19: 29-31.
117. Yin H.C. (1937). Effect of auxin on *Chlorella vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci USA* 23:174–176
118. Zakharova, E., Shcherbakov, A., Brudnik, V., Skripko, N., Bulkhin, N., y Ignatov. V. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. *Euro. J. Biochem.* 259: 572-576.
119. Zaliha, R.N., Rahman, A., Jongsareejit, B., Fujiwara, S., y Imanaka, T. 1997. Characterization of recombinant glutamine synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. strain KOD1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2472-2476.
120. Zhao Yunde. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Ann. Rev.Plant Biol.* 61:49-64.
121. Zimmer, W., Aparicio, C. y Elmerich, C. 1991. Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*: identification and sequencing of a trpGDC cluster. *Mol. Gen. Genet.* 229:41–51.

122. Zohar-Perez C., Chet I. y Nussinovich A. 2004. Unexpected distribution of immobilized microorganism within alginate beads. *Biotechnol Bioeng* 88:671-674.