



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A MICROALGAS  
CON POTENCIAL COMO BACTERIAS PROMOTORAS DE  
CRECIMIENTO EN *Chaetoceros calcitrans*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Gilberto González Tirado**

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2021.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:30 horas del día 27 del Mes de octubre del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**Evaluación de bacterias asociadas a microalgas con potencial como bacterias promotoras de crecimiento en *Chaetoceros calcitrans***

Presentada por el alumno:

**Gilberto González Tirado**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **ACUICULTURA**

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

### LA COMISIÓN REVISORA



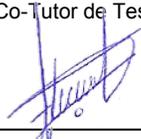
Dra. Paola Magallón Servín  
Co-Directora de Tesis



Dra. Luz Estela González de Bashan  
Co-Directora de Tesis



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas  
Co-Tutor de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Directora de Estudios de Posgrado y Formación  
de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 28 de octubre de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante GILBERTO GONZÁLEZ TIRADO del Programa de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
Plag.es
- Filtros utilizados:  
Excluyendo referencias bibliográficas.  
Se excluyo la portada de tesis.
- Porcentajes de similitud:  
6%  
Se muestra captura de pantalla

## INFORME DE DETECCIÓN DE PLAGIO

EL INFORME CERTIFICA QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO  
**Reporte\_antiplagio\_CIB**  
FUE REVISADO CON EL SERVICIO DE PREVENCIÓN DE PLAGIO MY.PLAG.ES Y TIENE:  
SIMILITUD

**6%**

RIESGO DE PLAGIO

**14%**

PARÁFRASIS

0%

CITAS INCORRECTAS

0%

Nombre del archivo: Tesis\_para\_antiplagio.docx  
Archivo verificado: 2021-10-28  
Informe generado: 2021-10-28

### Firmas del comité



Dra. Paola Magallón Servín



Dra. Luz Estela González de-Bashan



Dr. Fco. Javier Magallón Barajas

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Paola Magallón Servín  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dra. Luz Estela González de Bashan  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Paola Magallón Servín  
Dra. Luz Estela González de Bashan  
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

### **Jurado de Examen**

Dra. Paola Magallón Servín  
Dra. Luz Estela González de Bashan  
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

### **Suplente**

Dra. Melissa López Vela

## Resumen

Las bacterias son de gran importancia en la acuicultura, ya que participan en diferentes procesos como ciclo de nutrientes, la nutrición de organismos cultivados, en la calidad del agua, en el control de enfermedades, así como en el impacto ambiental de los efluentes. Las microalgas por su parte representan un importante soporte trófico para la acuicultura por su contenido de aminoácidos y la proteína, considerada como un producto de elevado valor biológico. Dentro de las microalgas, el grupo Bacillariophyceae (diatomeas), es el más abundante e importante en los océanos, estas algas unicelulares se encuentran protegidas en una pared celular hecha de sílice complejamente atada (frústula). *Chaetoceros calcitrans* es una diatomea ampliamente presente como especie dominante entre las diatomeas marinas en las zonas de estuarios y costeras. Considerada de importancia comercial, debido a que se utiliza como alimento acuícola, también ha sido considerada como una fuente potencial de lípidos y ácidos grasos esenciales y, ha demostrado tener capacidad para disminuir concentraciones de nitrógeno y fosforo de sistemas acuáticos. Las microalgas tienen la capacidad de crear un microambiente conocido como ficósfera, donde existen intercambios de metabolitos entre la microalga y las bacterias asociadas. Las interacciones en la ficósfera pueden tener un efecto de parasitismo, competitivo y mutualista, esta última interacción se ha demostrado ser eficiente para el reciclamiento de nutrientes como nitrógeno y fosforo en aguas residuales. El objetivo principal de este trabajo es evaluar la capacidad de bacterias asociadas a microalgas como promotoras de crecimiento en *Chaetoceros calcitrans*.

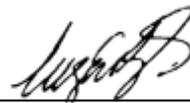
**Palabras clave:** bacterias, diatomeas, ficósfera, interacciones, mutualista

ORCID: 0000-0001-8262-6880



---

Dra. Paola Magallón Servín  
Co-Directora de Tesis



---

Dra. Luz Estela González de Bashan  
Co-Directora de Tesis

## Summary

Bacteria are of great importance in aquaculture, since they participate in different processes such as nutrient cycling, nutrition, water quality, disease control, as well as in the environmental impact of effluents. Microalgae represent an important trophic support for aquaculture due to their amino acid content and due to the protein generated, considered as a product of high biological value. There is a great diversity of microalgal species as an object of cultivation and study. The Bacillariophyceae group (diatoms), represent the more abundant group of microalgae and it is very important group in the oceans, these unicellular algae are protected in a cell wall made of complexly bound silica (frustule). *Chaetoceros calcitrans* is a microalgae widely present as a dominant species among marine diatoms in estuarine and coastal areas. *Chaetoceros calcitrans* has high commercial importance, because it is used as an aquaculture feed in hatcheries and can, also been considered as a potential source of lipids and essential fatty acids and has been shown to have the ability to reduce concentrations of nitrogen and phosphorus in aquatic systems. Microalgae can create a microenvironment known as phycosphere, where there are exchanges of metabolites between microalgae-bacteria. The interactions in the phycosphere can have a parasitic, competitive, and mutualistic effect, this last interaction has been shown to be efficient for the recycling of nutrients such as nitrogen and phosphorus in wastewater. The main objective of this work is to evaluate the capacity of bacteria associated with microalgae as growth promoters in *Chaetoceros calcitrans*.

**Keywords:** bacteria, diatoms, phycosphere, interactions, mutualist

ORCID: 0000-0001-8262-6880



---

Dra. Paola Magallón Servín  
Co-Directora de Tesis



---

Dra. Luz Estela González de Bashan  
Co-Directora de Tesis

## **Dedicatoria**

A mis padres Gilberto y Rosa, por haberme impulsado en cada una de las etapas de mi vida a continuar preparándome y por haberme enseñado ese amor a la Ciencia y la Investigación, a no quedarme quieto y continuar explorando el universo tan grande que hay por descubrir, se lo debo todo esto a ustedes y siempre les agradeceré lo incondicionales que son conmigo. Esto es por y para ustedes. Gracias por creer en mí, siempre.

A mi futura esposa Mary, por estar desde los inicios de esta aventura, por acompañarme en ella, estar a mi lado en las noches de desvelo y por esperarme después de mis jornadas experimentales, gracias por impulsarme cada mañana.

A mi hijo, Gilbertito. Tu llegaste en el momento indicado a llenar mis días de emociones interminables. Te amo hijo. Para ti con todo mi cariño.

## **Agradecimientos**

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz B.C.S., por abrirme sus puertas como mi Institución académica formadora, por facilitar el uso de las instalaciones y Laboratorios, al Departamento de Posgrado por brindarme siempre atención oportuna y por su amabilidad en cada proceso, a Tania Verónica Núñez Valdez, Ing. Horacio Sandoval Gómez y Lic. Osvelia Ibarra Morales.

Al CONACyT por la beca otorgada (#929972) durante los dos años de mi formación.

A mis Co-Directoras Dra. Luz Estela González de Bashan y Dra. Paola Magallón Servín, por dirigir este trabajo, por compartir conmigo su conocimiento y sus experiencias.

A la Dra. Melissa López Vela, por las técnicas enseñadas en el laboratorio y por ser parte importante de este proyecto.

Al grupo de Microbiología Ambiental por todo el apoyo, asesorías, experiencias compartidas, seminarios y reuniones de retroalimentación, sin duda alguna me llevo mucho de ustedes, siempre se aprende algo nuevo, y eso es muy grato para mí.

Al Laboratorio de Eco-fisiología, por el apoyo brindado para el conteo de Microalgas: M.C Gilberto González Soriano y M.C Rosa Isela Vázquez.

A la Dra. Bertha Olivia Arredondo por el equipo prestado y por sus consejos.

A todos y cada uno de mis compañeros de generación, gracias por ser parte de este camino, por todos los momentos que pasamos durante los inicios de esta aventura.

<b>Contenido</b>	
<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	ix
<b>Nomenclatura y unidades</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	5
2.1 Las diatomeas .....	5
2.2 <i>Chaetoceros Calcitrans</i> .....	6
2.3 Interacciones entre bacterias y microalgas .....	7
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	8
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	9
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	10
5.1 Objetivo general.....	10
5.2 Objetivos particulares .....	10
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	11
6.1 Aislamiento de bacterias asociadas a microalgas.....	11
6.2 Caracterización de cepas bacterias como potenciales promotores de crecimiento en microalgas .....	11
6.2.1 Preparación de suspensiones bacterianas .....	11
6.2.2 Solubilizadoras de fosforo .....	11
6.2.3 Producción de amilasas .....	12
6.2.4 Producción de sideróforos.....	12
6.2.5 Producción de auxinas.....	12
6.2.6 Motilidad .....	13
6.2.7 Producción de biopelículas.....	13
6.3 Obtención de la microalga <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	14
6.3.1 Cinética de crecimiento .....	14
6.4 Bioensayos para la evaluación del efecto de la inoculación de bacterias con potencial de promoción de crecimiento en <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	15
6.4.1 Evaluación de la densidad celular.....	17

6.4.2 Evaluación de la concentración de pigmentos .....	17
6.4.3 Evaluación de la concentración de carbohidratos .....	18
6.4.4 Evaluación de la concentración de lípidos .....	18
6.5 Análisis estadísticos .....	18
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
7.1 Selección de bacterias con potencial de promover el crecimiento en microalgas .....	19
7.2 Concentración celular de <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	27
7.3 Pigmentos .....	32
7.4 Lípidos .....	35
7.5 Carbohidratos .....	35
7.6 Diatomeas .....	35
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
8.1 Selección de bacterias con potencial de promover el crecimiento en microalgas .....	36
8.2 Concentración celular y pigmentos de <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	37
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>41</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Rol de las bacterias en la acuicultura.....	2
<b>Figura 2.</b> Célula de la microalga <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	3
<b>Figura 3.</b> Interacciones microalga-bacteria. En la imagen <b>a</b> , se muestran las diferentes interacciones que se pueden dar entre las diatomeas-bacterias, como los son interacciones competitivas en donde ambas compiten por las nutrientes disponibles en el medio. Interacción de parasitismo cuando ambas pueden secretar metabolitos que puedan inhibir el crecimiento de la otra o dañarla. Interacción mutualismo ocurre cuando la diatomea y las bacterias intercambian metabolitos benéficos para promover su desarrollo. En la imagen <b>b</b> , se muestra el intercambio de metabolitos entre una diatomea y bacteria (interacción mutualista), como lo es triptófano por parte de la diatomea y AIA por parte de las bacterias.....	4
<b>Figura 4.</b> Cámara de Neubauer .....	14
<b>Figura 5.</b> Diagrama del diseño experimental .....	16
<b>Figura 6.</b> La imagen <b>a</b> se muestran placas de Petri con bacterias aisladas y purificadas. Imagen <b>b</b> suspensiones bacterianas de cada una de las cepas. ....	20
<b>Figura 7.</b> Prueba de solubilización de fosfato. La imagen a una placa de Petri con medio NRIPB y como fuente de fosforo TPC, se puede apreciar un halo alrededor de la colonia (flecha roja). En la imagen b placa de Petri con medio NRIPB y como fuente de fosforo PHY, se puede apreciar un halo alrededor de la colonia (flecha roja). ....	20
<b>Figura 8.</b> Prueba de producción de amilasas, al colocar gotas de Lugol sobre las colonias que viran a color azul se consideran como negativas (línea roja) a la prueba, y las que no viran se consideran como positivas (cruz verde).....	22
<b>Figura 9.</b> Prueba para la producción de auxinas. <b>a)</b> se observa las muestras obtenidas antes de añadir el reactivo de Salkowski la llave (color rojo) abarca el blanco (medio cultivo YEGA, sin bacterias). <b>b)</b> Cambio de color en las muestras al añadirse el reactivo de Salkowski (Medio YEGA). <b>c)</b> Curva estándar de AIA de concentraciones de $50\mu\text{g mL}^{-1}$ (color rojo) a 0 (color amarillo) en medio YEGA. <b>d)</b> Muestras en medio 2216. ....	22
<b>Figura 10.</b> Graficas de las producciones de auxinas en bacterias. La imagen <b>a</b> son los resultados obtenidos en medio YEGA. La imagen <b>b</b> concentraciones obtenidas en medio 2216. Se utilizo ANOVA, posteriormente prueba de Tukey a $p < 0.05$ , $n=6$ . No se observaron diferencias significativas entre tratamientos y control. ....	23
<b>Figura 11. a)</b> Curva estándar de AIA en medio YEGA utilizada para la obtención de las concentraciones de auxinas. <b>b)</b> Curva estándar de AIA en medio 2216 para la obtención de las concentraciones. ....	24
<b>Figura 12.</b> Prueba de motilidad. a) cepa <i>A. halopraeferens</i> a las 24 y 48. b) cepa 32br a las 24 y 48 horas. c) cepa 35b a las 24 y 48 horas.....	25
<b>Figura 13.</b> Grafica de la prueba de motilidad en bacterias. Se muestran las barras del crecimiento radial de las colonias, a las 24 horas (color gris oscuro) y a las 48 horas (color gris claro).....	25
<b>Figura 14.</b> Prueba de producción de biopelículas. <b>a)</b> bacterias adheridas en la pared del pozo de la microplaca teñido con cristal violeta 0.3%. <b>b)</b> Extracción del cristal violeta con Etanol al 95% (Et-OH 95%). ....	26
<b>Figura 15.</b> Grafica de la prueba de índice de formación específico de biopelículas. Se analizaron mediante ANOVA, posteriormente con prueba de Tukey $p < 0.05$ . Se observaron diferencias significativas (*) con respecto al control.....	26

<b>Figura 16.</b> Células de <i>Chaetoceros calcitrans</i> viables en cámaras de Neubauer. Imagen <b>a</b> muestra de 1 día de cultivo del <b>T1</b> . Imagen <b>b</b> muestra de 5 días de cultivo de <b>T1</b> .	27
<b>Figura 17. a)</b> bioensayo con los 4 tratamientos al Día 0. <b>b)</b> Bioensayo al día 3, se aprecia un cambio de color debido a la densidad celular.	28
<b>Figura 18.</b> Concentraciones celulares de <i>C. calcitrans</i> en <b>T1</b> (circulo), <b>T2</b> (rombo), <b>T3</b> (cruz) y <b>T4</b> (Triangulo), desde el tiempo 0 hasta el día 7. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos por ANOVA y prueba de comparación de promedios de Tukey con $p \leq 0.05$ , N.S.=No significancia, n=6	29
<b>Figura 19.</b> Densidades celulares de <i>C. calcitrans</i> de cada uno de los tratamientos, expresados en logaritmo natural (Ln) con una tendencia lineal. No se observaron diferencias significativas con respecto al control. $P < 0.05$ , n=6.	29
<b>Figura 20.</b> Grafica de las densidades celulares de <i>Chaetoceros calcitrans</i> durante 7 días. La gráfica <b>a</b> , muestra el comportamiento de la concentración entre <b>T1</b> ( <i>C. calcitrans</i> como control) y <b>T2</b> ( <i>C. calcitrans</i> + <i>A. halopraeferens</i> ). la gráfica <b>b</b> muestra el comportamiento de la densidad celular entre <b>T1</b> (control) y <b>T3</b> ( <i>C. calcitrans</i> + cepa 32br). La grafica <b>c</b> muestra el comportamiento entre <b>T1</b> (control) y <b>T4</b> ( <i>C. calcitrans</i> + 35b).	31
<b>Figura 21.</b> Extracción de pigmentos con acetona al 90%, y determinación de la concentración de pigmentos en microplacas.	32
<b>Figura 22.</b> Concentraciones de Chl a de cada uno de los tratamientos los tiempos (Días) 0, 3, 5 y 7. Se utilizo ANOVA, posteriormente prueba de Tukey $p < 0.005$ , (n=6). No se observaron diferencias significativas (N.S.) entre los tratamientos y con respecto al control.	33
<b>Figura 23.</b> Concentración de Chl c $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En los tiempos (Días) 0, 3, 5 y 7 días. Se utilizo ANOVA, posteriormente prueba de Tukey $p < 0.005$ , (n=6). Se observo una diferencia significativa (*) con respecto al tratamiento control (T1).	33
<b>Figura 24.</b> Concentración de carotenos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). En los tiempos 0, 3, 5 y 7 días. Se utilizo ANOVA, posteriormente prueba de Tukey $p < 0.005$ , (n=6). No se observaron diferencias significativas (N.S.) entre los tratamientos y control.	34
<b>Figura 25.</b> Concentraciones de pigmentos totales ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). En los tiempos 0, 3, 5 y 7 días. Se utilizo ANOVA, posteriormente prueba de Tukey $p < 0.005$ , (n=6). No se observaron diferencias significativas (N.S.) entre los tratamientos y control.	34
<b>Figura 26.</b> La asimilación de compuestos con N y P, promueven el crecimiento celular, aumenta la concentración de pigmentos, lípidos y carbohidratos.	35

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Solubilización de fosfatos.....	21
<b>Tabla 2.</b> Densidades celulares de cada uno de los tratamientos durante 7 días.....	28
<b>Tabla 3.</b> Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ ) y tiempo de generación promedio (Tg) de C. calcitrans para el control y cada uno de los tratamientos.....	30

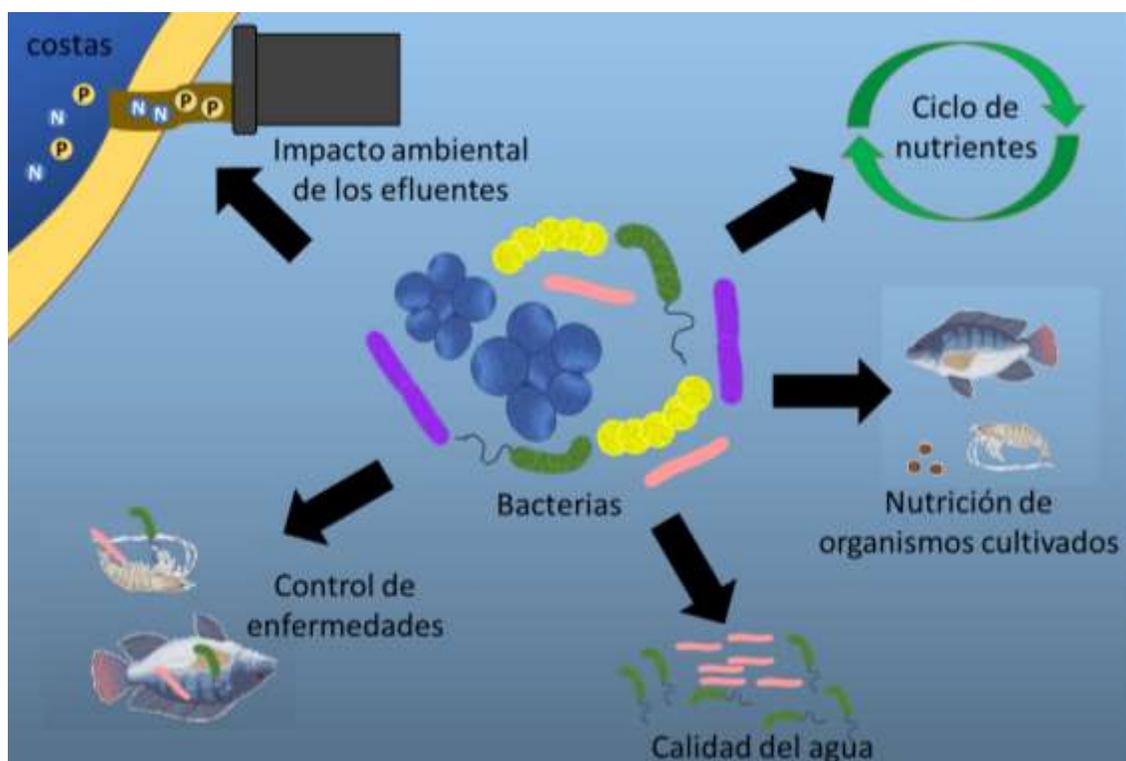
## Nomenclatura y unidades

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Micromoles por metro cuadrado por segundo (número de fotones por unidad de área por unidad de tiempo)
$\mu\text{L}$	Microlitros
AIA	Acido indol 3 acético
<i>Chl a</i>	Clorofila a
<i>Chl c</i>	Clorofila c
Hxa	Hidroxiapatita
$\text{mg L}^{-1}$	Miligramos por litro
mL	Mililitros
MGPB	Microalgae growth promoting bacteria
N	nitrógeno
NaOH	hidróxido de sodio
rpm	Revoluciones por minuto
p	Fosforo
PGPB	Plant growth promoting bacteria
PHY	Acido fítico
Si	sílice
TPC	Fosfato tricálcico

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha demostrado ser una de las actividades más exitosas en la generación de alimentos a nivel mundial, pero este incremento ha traído retos ambientales, debido al impacto de los residuos ricos en material disuelto y suspendido como nitrógeno, fósforo y carbono, ya que causan cambios en el hábitat donde estos se vierten. Por lo que es recomendando utilizar estrategias para el desarrollo de una acuicultura sostenible (FAO, 2020; Lezama-Cervantes *et al*, 2010).

Las bacterias tienen importantes roles en la acuicultura, ya que participan en el ciclo de nutrientes, nutrición de organismos, en la calidad del agua, el control de enfermedades y en el impacto de los efluentes sobre el medio ambiente (Figura 1) (Moriarty, 1997). Muchas de estas bacterias se encuentran de forma natural o pueden ser agregadas de manera artificial a los sistemas de cultivo. Por tal motivo la manipulación de las comunidades bacterianas en la acuicultura tiene un gran potencial (Bentzon-Tilia *et al.*, 2016). Se sabe que algunas bacterias tienen la capacidad de promover el desarrollo de diferentes parámetros de las microalgas, como en lípidos, pigmentos, carbohidratos, su estructura celular, entre otros; a este tipo de bacterias se les ha denominado bacterias promotoras de crecimiento en microalgas o, MGPC de sus siglas en inglés (de-Bashan *et al*, 2004). Estas, se caracterizan por tener diferentes mecanismos de acción, facilitando la adquisición de recursos como fósforo, vitaminas y secuestro de hierro. Por otro lado, también pueden modular los niveles de fitohormonas como ácido indolacético (AIA) (Gilck, 2012; Orozco *et al.* 2018).



**Figura 1.** Rol de las bacterias en la acuicultura

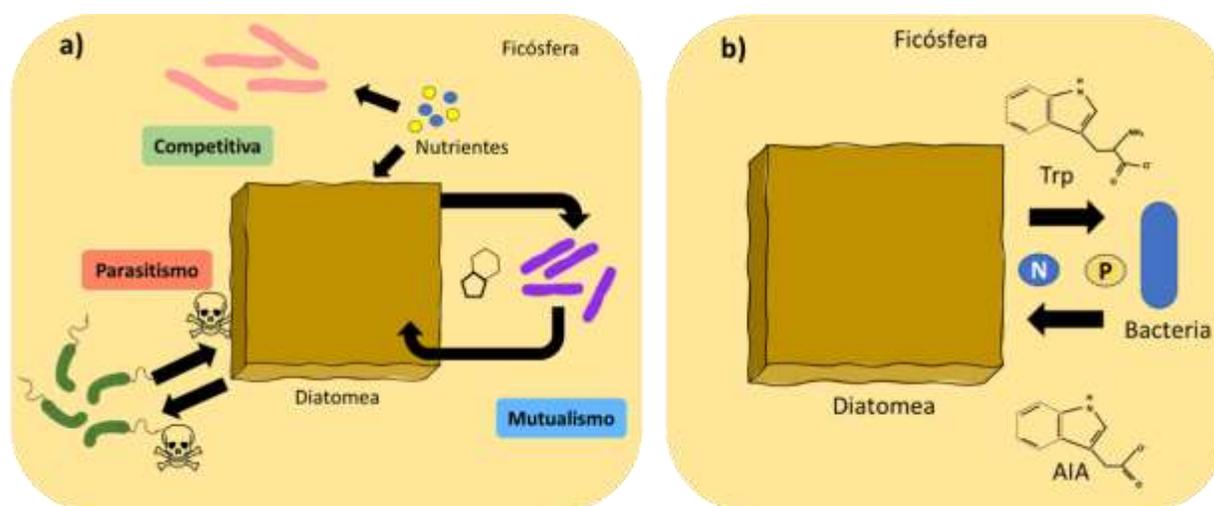
Uno de los grupos principales de microalgas que destacan entre el fitoplancton, son las diatomeas (Bacillariophyceae). Estas algas unicelulares se encuentran protegidas en una pared celular hecha de sílice complejamente atada (frústula). Los macronutrientes esenciales que se reconocen que producen su crecimiento y abundancia, son las formas inorgánicas de nitrógeno (N), fósforo (P), y sílice (Si) (D'Costa *et al.*, 2010; Anu *et al.*, 2016). Una de las diatomeas marinas ampliamente utilizada en la acuicultura es *Chaetoceros calcitrans* (Figura 2) (Seraspe *et al.*, 2014; Anu *et al.*, 2016), la cual es considerada de importancia por su valor comercial, ya que se utiliza como alimento en cultivos de bivalvos, crustáceos y peneidos, adicionalmente es una fuente potencial de lípidos y ácidos grasos esenciales (Zhang *et al.*, 2017; Brodie *et al.* 2017). Esta diatomea ha demostrado ser eficiente al remover y asimilar eficazmente nutrientes como nitrógeno, fosforo y carbono en altas concentraciones (Tantanasarit *et al.* 2013).



**Figura 2.** Célula de la microalga *Chaetoceros calcitrans*

Las bacterias y las diatomeas han coexistido en diferentes hábitats durante millones de años, promoviendo sus interacciones con el paso del tiempo, por lo que probablemente estas intervinieron en la diversidad y éxito de las diatomeas (Amin *et al.*, 2012). La presencia de bacterias específicas en los cultivos de diatomeas sugieren que pueden cultivar su entorno mediante la secreción de metabolitos (triptófano) que las bacterias utilizan, y al mismo tiempo las bacterias producen metabolitos que están implicados en el crecimiento de las diatomeas (AIA, Vitamina B12, sideróforos) (Figura 3b). A esta zona en donde se llevan a cabo las interacciones se le conoce como ficósfera, que es la zona de exudación de la microalga, donde las bacterias pueden utilizar los nutrientes exudados por las microalgas para producir metabolitos secundarios (Kimbrel *et al.*, 2019). Los estudios en las interacciones microalga-bacteria son pocos en contraste con los estudios de interacciones entre plantas superiores-bacteria (Amin *et al.*, 2015; Fei *et al.*, 2020; Lépinay *et al.*, 2018). Esto debido a las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que pueden responder a la aplicación de bacterias promotoras de crecimiento o PGPB, por su siglas en inglés (de-Bashan, *et al.*, 2012).

Este tipo de interacciones positivas puede ser de gran relevancia en diferentes aspectos de la acuicultura, las microalgas pueden usarse para mejorar las interacciones entre el hospedero y diferentes bacterias con potencial probiótico. Así mismo, es posible establecer interacciones microalga-bacteria que mejoren la capacidad de producir nutrientes por parte de las microalgas, así como potenciar su capacidad de biorremediación y su crecimiento. Por estas razones, el objetivo principal de este trabajo es evaluar la capacidad de bacterias asociadas a microalgas como promotoras de crecimiento en *Chaetoceros calcitrans*.



**Figura 3.** Interacciones microalga-bacteria. En la imagen **a**, se muestran las diferentes interacciones que se pueden dar entre las diatomeas-bacterias, como los son interacciones competitivas en donde ambas compiten por las nutrientes disponibles en el medio. Interacción de parasitismo cuando ambas pueden secretar metabolitos que puedan inhibir el crecimiento de la otra o dañarla. Interacción mutualismo ocurre cuando la diatomea y las bacterias intercambian metabolitos benéficos para promover su desarrollo. En la imagen **b**, se muestra el intercambio de metabolitos entre una diatomea y bacteria (interacción mutualista), como lo es triptófano por parte de la diatomea y AIA por parte de las bacterias.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Las diatomeas

Las diatomeas son algas microscópicas unicelulares que constituyen un grupo muy común de fitoplancton. Estas se encuentran en ambientes acuáticos, principalmente marinos. Constituyen la clase de los Bacillariophyceae con rangos de tamaño de 2 a 200  $\mu\text{m}$  (Godhe *et al.*, 2008). Se han descubierto 200.000 especies de diatomeas en el planeta (Sanchez *et al.*, 2019). Poseen una característica peculiar que es su pared celular compuesta de sílice, la cual se conoce como frústulas (Marella *et al.*, 2020). Estas habitan generalmente en zonas fóticas y son candidatas para el seguimiento ecológico, debido a su sensibilidad ante los cambios mínimos en las características fisicoquímicas de sus entornos (Wasmund, 2017; Vasiljević *et al.*, 2017). Así mismo, son pieza clave en la fijación total de carbono y en la cadena trófica en el hábitat acuático. Son consideradas de interés biotecnológico por sus potenciales aplicaciones en diferentes áreas (Bozarth *et al.*, 2009) ya que pueden llegar a producir mayores cantidades de lípidos y biomasa en comparación con otras algas (Hildebrand *et al.*, 2012). Su gran adaptabilidad les permite soportar los gradientes ambientales, de nutrientes, de temperaturas, ambientes hipersalinos y diversas aguas residuales. Algunas ventajas competitivas de las diatomeas, en comparación con otros grupos, incluyen una tasa de crecimiento con bajos gradientes de luz y temperatura, crecer en sistemas de cultivo a gran escala, formación de biopelículas, asimilación eficiente de nutrientes, relaciones simbióticas con bacterias, alta acumulación de lípidos y presencia de moléculas de interés (Datta *et al.*, 2019). Las diatomeas pueden utilizar nitrato, fosfato, sílice entre otros metales de las diferentes aguas residuales, y la biomasa resultante puede ser utilizada para la obtención de diversos compuestos como nutracéuticos, biocombustibles, biomoléculas, biofertilizantes y pigmentos. (Tiwari *et al.*, 2019; Marella *et al.*, 2018).

Además, la capacidad de las diatomeas para disminuir las elevadas concentraciones de nutrientes y/o metales de aguas residuales, se han convertido en temas de estudio y de interés en la investigación de la biorremediación (Mishra *et al.*, 2020).

## **2.2 *Chaetoceros Calcitrans***

*C. calcitrans* es una de las diatomeas con mayor importancia ya que, es utilizada ampliamente como alimento vivo de moluscos, crustáceos y algunas larvas de peces. (Sirakov *et al.*, 2015). Su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (alrededor del 20% de lípidos totales), la hace candidata ideal para proveer de nutrientes esenciales a los organismos (Miller *et al.*, 2014). Además, tiene la capacidad de disminuir las concentraciones de nutrientes de las aguas residuales acuícolas (Khatoon *et al.*, 2016). Con el rápido crecimiento y desarrollo de la producción acuícola, se implementaron mejoras para la producción de *C. calcitrans*. Por lo tanto, se han realizado estudios sobre los factores que influyen en su crecimiento y rendimiento. Entre ellos destaca su amplia tolerancia a la temperatura que van desde los 10 a 35° C, como óptimo 25°C, salinidad desde 10‰ a 30‰, óptimo 25‰, (Akbarnejad *et al.*, 2020; Gireesh *et al.*, 2008), e intensidad de luz desde 40 a 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , óptimo 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Zhang *et al.*, 2017). La producción de lípidos y carbohidratos está regulada por la temperatura (menor temperatura mayor concentración). Por otra parte, al aumentar la intensidad de luz, la producción de lípidos es afectada significativamente disminuyendo la producción de lípidos (Kong *et al.*, 2021). Los pigmentos tienen un papel importante para su crecimiento, por lo que capturan y convierten la energía luminosa en energía bioquímica (Chen, *et al.*, 2013). Por lo que, la Intensidad de la luz y la temperatura son los factores más importantes sobre la regulación de sus procesos fisiológicos y bioquímicos (Akbarnejad *et al.*, 2020).

### 2.3 Interacciones entre bacterias y microalgas

En los sistemas acuícolas, las bacterias benéficas tienen un importante papel sobre la calidad biológica del agua y el bienestar de los organismos cultivados. Cumplen con funciones vitales dentro del ecosistema, como la nitrificación, desnitrificación y degradación de material orgánico (Netzer *et al.*, 2021). Además de promover el crecimiento de muchos parámetros de crecimiento de las microalgas (de-Bashan *et al.*, 2004), liberando factores para su desarrollo, sustancias poliméricas extracelulares, como auxinas (fitohormonas). Así mismo su presencia en los sistemas pueden controlar el crecimiento de bacterias no deseadas y biorremediar las aguas residuales disminuyendo la carga orgánica (Talapatra *et al.*, 2021).

Las interacciones entre bacterias y microalgas suelen ser más complejas que solo un intercambio de nutrientes (Mohsenpour *et al.*, 2021). Las microalgas promueven los procesos bacterianos mediante la producción de oxígeno disuelto (Muñoz *et al.*, 2006), por otro lado las bacterias proporcionan metabolitos secundarios necesarios y fuente de carbono inorgánico para el crecimiento de las microalgas (Wirth *et al.*, 2020).

La eliminación de los nutrientes de las aguas residuales a través de consorcios entre microalga-bacteria es una función de diversos factores, como la absorción y transformación de los nutrientes. Estos factores impulsan su interacción, mejorando las tasas de absorción de nutrientes (Del Rio-Chanona *et al.* 2019). Estas interacciones entre microalga-bacteria, proporcionan un beneficio mutuo al utilizar los nutrientes disponibles y disminuyéndolos de su entorno medio (Qu *et al.* 2021; Makut *et al.*, 2019). De tal manera, es esencial comprender los mecanismos de interacción entre la microalga-bacteria, para diseñar consorcios que permitan una eficiente degradación de los nutrientes (Mohsenpour *et al.*, 2021).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Chaetoceros calcitrans* es una diatomea cosmopolita, de importancia acuícola como alimento vivo por ser una fuente potencial de lípidos. Ha demostrado ser eficiente asimilando nitrógeno y fosforo en altas concentraciones en los sistemas acuáticos. Por otro lado las bacterias promotoras de crecimiento en microalgas (MGPB, siglas en inglés) potencian la producción de metabolitos como pigmentos, carbohidratos y lípidos en las microalgas.

Por esa razón es importante el estudio de bacterias con potencial de ser promotoras de crecimiento en microalgas, y su comportamiento en co-cultivos, para la identificación su efecto en variables como densidad poblacional, metabolitos, asimilación de compuestos del medio.

Históricamente, la acuicultura ha utilizado las microalgas exclusivamente como fuente de alimentos y/o control de ciertos nutrientes dentro de los sistemas, sin embargo, hacen falta muchos estudios para poder potenciar el crecimiento de las microalgas a través del uso de bacterias promotoras de crecimiento, especialmente en diatomeas. La mayoría de los estudios realizados entre microalgas y bacterias se han realizado en microalgas de origen dulceacuícola.

#### 4. HIPÓTESIS

Es posible inocular bacterias con potencial de promoción de crecimiento en cultivos de *Chaetoceros calcitrans*, esta inoculación propiciará, la interacción entre microalga-bacteria y tendrá un impacto en la producción de metabolitos de pigmentos, carbohidratos y lípidos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad de bacterias asociadas a microalgas como promotoras de crecimiento en *Chaetoceros calcitrans*

### **5.2 Objetivos particulares**

1. Caracterizar bacterias asociadas a microalgas con capacidad de ser promotoras de crecimiento
2. Evaluar el efecto de la inoculación de bacterias con potencial de promoción de crecimiento en la producción de pigmentos, carbohidratos y lípidos en cultivos de *Chaetoceros calcitrans*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Aislamiento de bacterias asociadas a microalgas

Se evaluaron 36 cepas de bacterias, aisladas por la Dra. Melisa López Vera (Grupo de Microbiología Ambiental, CIBNOR) de 5 cepas de microalgas, (*Chlorella sorokiniana* 2805, *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella capsulata*, *Chaetoceros muelleri* y *Isochrysis galbana*). Las bacterias fueron reactivadas en medios de cultivo agar marino 2216 y YEGA (Van Niels extracto de levadura agar con glutamato). Las características microscópicas fueron descritas con el empleo del microscopio óptico. Se determinaron las características morfológicas mediante la estructura de colonia (tamaño, color, superficie, consistencia, densidad, forma, elevación y margen).

### 6.2 Caracterización de cepas bacterias como potenciales promotores de crecimiento en microalgas

#### 6.2.1 Preparación de suspensiones bacterianas

Se cultivaron las bacterias para su reactivación, 26 cepas en agar marino 2216 y 11 cepas en YEGA, durante 48 horas a 30°C. Las células bacterianas se cosecharon con un asa estéril de plástico para realizar suspensiones bacterianas en solución salina al 0.8%. La densidad óptica (OD) de las suspensiones fue ajustada a  $0.400 \pm 0.005$ , a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de  $620_{nm}$ . Estas fueron inoculadas en diferentes medios para su caracterización.

#### 6.2.2 Solubilizadoras de fosforo

Se cultivaron las cepas de bacterias en placas de Petri utilizando medio de cultivo NBRIP doble capa (Glucosa  $10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.25 \text{ g L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$   $0.1 \text{ g L}^{-1}$ , fuente fosforo, extracto de levadura  $2 \text{ g L}^{-1}$ , agar  $20 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizando tres fuentes de fosforo, fosfato tricálcico (TPC), ácido fítico (PHY) e hidroxapatita (Hxa). El pH de los medios se ajustó utilizando hidróxido de Sodio (NaOH) (Misra *et al*, 2012). Las placas de Petri fueron inoculadas con  $100 \mu\text{l}$  de suspensión bacteriana y colocadas en la incubadora a una temperatura de 30°C, durante 5 días. Finalmente las placas fueron analizadas para observar la aparición (positivo) o

no aparición (negativo) de halos en alrededor de las colonias. En el caso de los cultivos con ácido fítico, se utilizó una solución reveladora de cobalto. La prueba se realizó por triplicado.

### 6.2.3 Producción de amilasas

Para evaluar la capacidad de producir amilasas, las bacterias fueron cultivadas en medio amilasas (almidón  $5 \text{ gL}^{-1}$ , peptona  $1 \text{ gL}^{-1}$ , extracto de levadura  $2 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{SO}_4$   $0.1 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $\text{gL}^{-1}$ , agar  $20 \text{ gL}^{-1}$ ). El pH fue ajustado a 7 con NaOH 1M. Las placas fueron inoculadas con 100  $\mu\text{l}$  de suspensión bacteriana, posteriormente incubadas a  $30^\circ\text{C}$ , durante 5 días. Finalmente las placas se revelaron con una solución de Lugol 0.1N, se analizó la presencia halos transparentes (positivo) y la no presencia de halos (negativo) (Vaseekaran *et al.* 2010). La prueba se realizó por triplicado.

### 6.2.4 Producción de sideróforos

La evaluación de producción de sideróforos se realizó en medio sólido CAS agar (Schwyn *et al.*, 1987) modificado utilizando los medios 2216 y YEGA. Las placas fueron inoculadas con 100  $\mu\text{l}$  de suspensión bacteriana de cada cepa, se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  por 5 días. Transcurrido el tiempo se evaluó la presencia de halos color anaranjado-amarillo (positivo) y la no presencia de estos (negativos). La prueba se realizó por triplicado.

### 6.2.5 Producción de auxinas

Se prepararon tubos cónicos de 50 mL conteniendo 20 mL de medio YEGA y 2216, los dos medios suplementados con  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  de L-Triptófano. Tres tubos cónicos por cepa fueron inoculados con 100  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana. Los cultivos fueron incubados 4 días a  $30^\circ\text{C}$ , con agitación de 150 rpm. 2 mL de cada cultivo se cosecharon en tubos de microcentrífuga y centrifugados ( $10000\times g$ , por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ ). El sobrenadante se separó para su determinación en microplacas de 96 pozos, colocando 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante con 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Salkowski (Glickmann *et al.*, 1995), se dejó incubando 30 min. Posteriormente se realizó la lectura en un lector de microplacas a  $530_{nm}$ . La curva estándar fue preparada con medios YEGA y 2216 con concentraciones de 0 –  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA.

### 6.2.6 Motilidad

La prueba de motilidad se realizó de acuerdo con Barahona *et al.* (2010) cada suspensión bacteriana se inoculó con un picadientes de madera estéril en el centro de la placa de cultivos YEGA y 2216 con agar al 0.3%. Las placas fueron incubadas por 48 horas a 30°C. El crecimiento radial de las colonias fueron medidas con un vernier a las 24 y 48 horas.

### 6.2.7 Producción de biopelículas

Se determinó la formación de biopelículas como describe Naves *et al.* (2008) en microplacas de 96 pozos, 200  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo (YEGA y 2216) fueron inoculados con 10  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana por cada cepa. Las microplacas fueron incubadas a 30°C por 48 horas. El crecimiento bacteriano fue determinado utilizando un lector de microplacas a una densidad óptica de  $620_{nm}$ . La producción de biopelículas se determinó añadiendo una solución de cristal violeta al 0.3% a cada pozo durante 15 minutos para la tinción de las células adheridas, los pozos se enjuagaron 4 veces con agua, la microplaca se dejó secar durante 4 horas. Posteriormente se le añadió a cada pozo 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% con agitación de 60 rpm durante la noche para la extracción del cristal violeta de las células. Después del desteñido celular se utilizó un lector de microplacas a una densidad óptica de  $540_{nm}$ . La formación de biopelícula fue estimada aplicando la formula descrita por Naves *et al.* (2008).

$$SBF = \left( \frac{AB - CW}{G} \right) \quad (1)$$

*SBF = Índice de formacion especifico de biopeliculas*

*AB = Densidad optica a  $540_{nm}$  de las bacterias adehridas teñidas*

*CW = Densidad optica a  $540_{nm}$  de las bacterias adehridas teñidas*

*G = Densidad optica a  $620_{nm}$  del crecimiento celular en el cultivo*

### 6.3 Obtención de la microalga *Chaetoceros calcitrans*

La microalga *Chaetoceros calcitrans* CIB36 fue otorgada por el laboratorio de microalgas del centro de investigaciones biológicas del Noroeste S.A. de C.V.

#### 6.3.1 Cinética de crecimiento

A partir de una muestra de 50 mL de *C. calcitrans* CIB36 con una concentración  $5.6 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ , se realizó una curva de crecimiento. En matraces Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 15 mL del inóculo inicial y 85 mL de medio de cultivo F/2 de Guillard, con un volumen de 100 mL a una concentración inicial de  $8.7 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ . Se le dio seguimiento por 7 días, a 28°C, con agitación de 128 rpm, luz continua de  $1.35 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ , con toma de muestra cada 24 horas. Los conteos se realizaron en cámaras de Neubauer en los cuadros de  $1 \text{ mm}^2$ , se determinó la concentración del cultivo aplicando la siguiente fórmula:

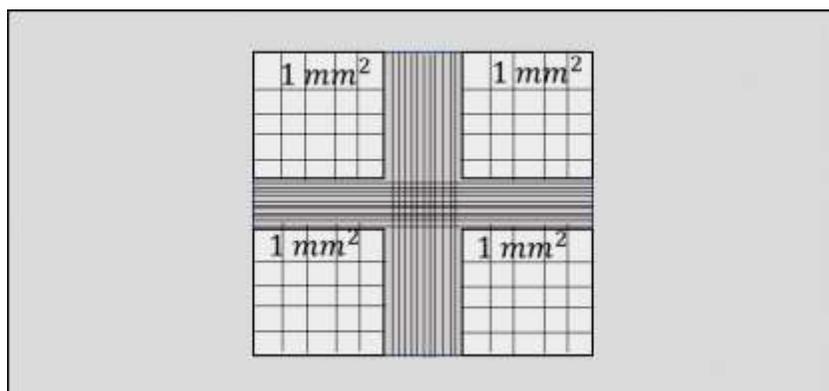
$$C = N * 10^4 * dil \quad (2)$$

Donde:

$C = \text{cel mL}^{-1}$

$N =$  promedio de células presentes en  $1 \text{ mm}^2$  ( $0.1 \mu\text{L}$ )

$dil =$  Factor de dilución (Cuando se considera necesario diluir la muestra)



**Figura 4.** Cámara de Neubauer

La tasa de crecimiento se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\mu = \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

**Donde:**

$\mu$  = Tasa de crecimiento (dia<sup>-1</sup>)

$x$  = Concentración de la biomasa (cel mL<sup>-1</sup>)

$t$  = tiempo en dias

El tiempo de generación se calculó mediante la siguiente ecuación

$$Tg = \frac{Ln2}{\mu} \quad (4)$$

Donde:

$Tg$  = Tiempo de generacion (dias)

$Ln2 = 0.6931$

$\mu$  = Tasa de crecimiento en dias

#### **6.4 Bioensayos para la evaluación del efecto de la inoculación de bacterias con potencial de promoción de crecimiento en *Chaetoceros calcitrans***

Las bacterias 32br y 35b fueron seleccionadas debido al potencial de producción de AIA, formación de biopelículas, solubilización de fosforo y motilidad. Se sabe que *Azospirillum Halopraeferens* es una bacteria promotora de crecimiento, con la capacidad de sobrevivir en ambientes marinos (hasta 3.5% de salinidad) (Puente *et al.* 1999). Por tal motivo, fue escogida para su evaluación.

Para este bioensayo se realizaron 5 tratamientos, Para el tratamiento 1 (**T1**) se tomaron matraces de 500 mL, se añadieron 120 mL de medio de cultivo F/2 de Guillard con agua de mar esterilizada a salinidad de 35 ppm, 30 mL de inculo de *Chaetoceros calcitrans*, el volumen final fue 150 mL, con una concentración celular de  $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  como control. Para el tratamiento 2 (**T2**) en matraces Erlenmeyer de 500 mL se colocaron 120 mL de medio de cultivo F/2 de Guillard con agua de mar esterilizada a salinidad de 35 ppm, 30 mL de cultivo de *Chaetoceros calcitrans* y 1.5 mL de suspensión bacteriana con la cepa *Azospirillum halopraeferens*, con un volumen total de 150 mL con concentración celular de *C. calcitrans*

$1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ , y concentración de *A. halopraeferens* de  $1 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ . Para el tratamiento 3 (T3) en matraces de 500 mL se colocaron 120 mL de medio de cultivo F/2 de Guillard con agua de mar esterilizada a salinidad de 35 ppm, 30 mL de inoculo de *C. calcitrans* y 150  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana de la cepa 32br, volumen de 150 mL con concentración celular de  $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ , y una concentración celular de  $1 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$  de la cepa 32br. Para el tratamiento 4 (T4) se tomaron matraces de 500 mL, se añadieron 120 mL de medio de cultivo F/2 de Guillard con agua de mar esterilizada a salinidad de 35 ppm, 30 mL de *C. calcitrans* y 150  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana de la cepa 35b. Las concentraciones celulares fueron de  $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  de *C. calcitrans* y  $1 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$  de la cepa 35b. Para el tratamiento 5 (T5) se utilizaron matraces de 500 mL, se añadieron 150 mL de medio de cultivo F/2 de Guillard con agua de mar esterilizada con salinidad de 35 ppm, 1.5 mL de suspensión bacteriana de la cepa *A. halopraeferens*. La concentración celular fue de  $1 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ . Cada uno de los tratamientos se realizaron bajo las mismas condiciones de cultivo, agitación continua a 128 rpm, luz continua de  $1.08 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ , a temperatura de  $28^\circ\text{C}$ .

Se realizaron 3 réplicas por tratamiento. El bioensayo se realizó por duplicado (Figura 5)..

## Diseño experimental

### 5 tratamientos

Cultivos de *Chaetoceros calcitrans* (cepa CIB36, cepario CIBNOR)

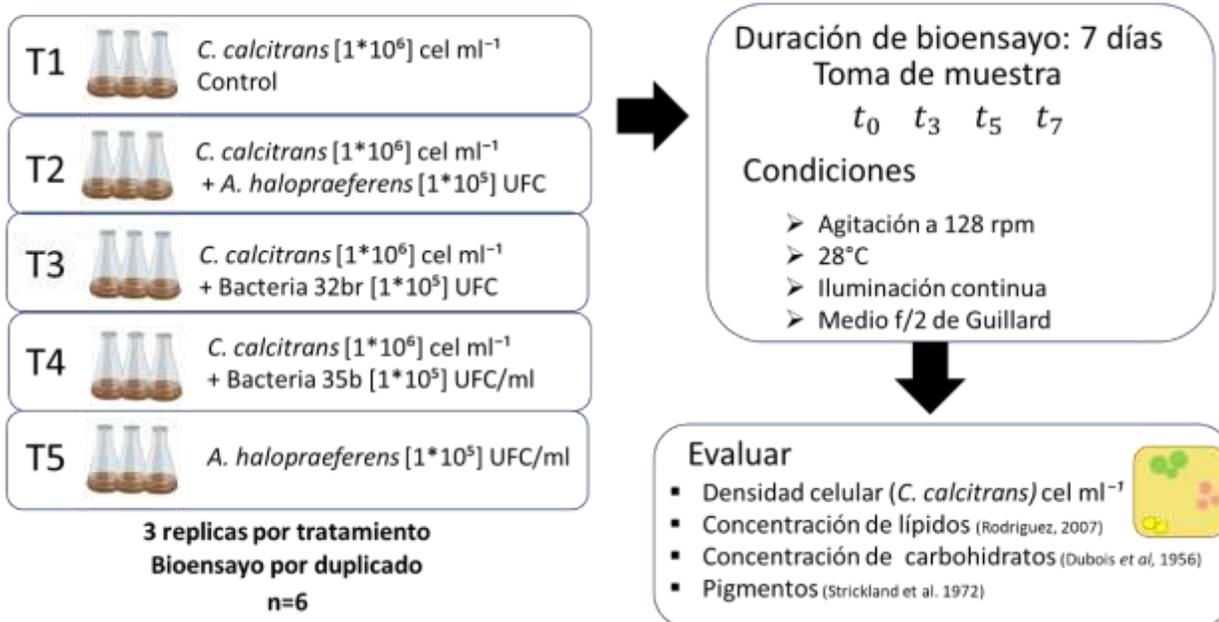


Figura 5. Diagrama del diseño experimental.

#### 6.4.1 Evaluación de la densidad celular

Se tomó 1 mL de muestra de cada uno de los tratamientos cada 24 horas, durante 7 días. Posteriormente se realizaban conteos de *C. calcitrans* en cámaras de Neubauer para determinar la concentración celular diaria. Para obtener la densidad celular se utilizó la ecuación (2), para la tasa de crecimiento la ecuación (3), y para determinar el tiempo de generación la ecuación (4).

#### 6.4.2 Evaluación de la concentración de pigmentos

Se tomaron 5 mL de muestra de cada matraz de los tratamientos, y se colocaron en tubos de centrifuga de 50 mL esterilizados. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm, durante 15 minutos, y se retiró el sobrenadante. Las muestras se cubrieron con papel aluminio y se colocaron en congelación a -20°C hasta su uso. Las muestras se recolectaron el día 0, 3, 5 y 7. Para la extracción de pigmentos se añadieron 3 mL de solvente (acetona al 90%) a cada una de las muestras. Se homogenizaron en vortex, y fueron colocadas en un baño ultrasonidos en hielo por 1 hora. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm, por 15 minutos. Las muestras fueron colocadas en hielo. El extracto de pigmentos se transfirió a otro tubo cubierto con papel aluminio utilizando una pipeta pasteur (Arredondo-Vega *et al.*, 2017). Se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de extracto de pigmentos pozos de microplacas y se utilizó un lector de microplacas. Las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro a 664 nm para determinar la clorofila *a* (*Chl a*), 630 nm para la clorofila *c* (*Chl c*) y de 480-510 para carotenoides. Las pruebas se hicieron por triplicado de cada uno de los bioensayos.

Para calcular la presencia de *Chl a* se utilizó la siguiente ecuación:

$$Chl\ a = (11.47 * abs_{664}) - (0.4 * abs_{630}) \quad (5)$$

$abs_{664}$  = absorbancia obtenida en la muestra

$abs_{630}$  = absorbancia obtenida en la muestra

La ecuación para determinar la *Chl c* fue la siguiente:

$$Chl\ c = (24.36 * abs_{630}) - (3.73 * abs_{664}) \quad (6)$$

Para la determinación de carotenoides se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Carotenoides} = 10 * \text{abs}_{480} \quad (7)$$

#### **6.4.3 Evaluación de la concentración de carbohidratos**

Se tomaron 5 ml de muestra de cada uno de los tratamientos, se centrifugo a 4000 rpm, durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se colocó en congelación a -20°C. Las muestras se cubrieron con papel aluminio. La toma de muestra se realizó a los tiempos 0, 72, 120, y 168 horas

#### **6.4.4 Evaluación de la concentración de lípidos**

Se tomaron 5 ml de muestra de cada uno de los tratamientos, se centrifugo a 4000 rpm, durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se colocó en congelación a -20°C. Las muestras se cubrieron con papel aluminio. La toma de muestra se realizó a los tiempos 0, 72, 120, y 168 horas.

#### **6.5 Análisis estadísticos**

Para la caracterización de cepas bacterias se realizaron 3 réplicas por cepa, por cada una de las pruebas realizada. Las pruebas se realizaron por duplicado (n=6). Se utilizo análisis de varianza unidireccional (ANOVA), posteriormente se realizó un análisis mediante la prueba de Tukey a  $p < 0.05$ . Los análisis estadísticos de la densidad celular y pigmentos fueron realizados mediante un análisis de la varianza unidireccional (ANOVA), posteriormente con una prueba de Tukey a  $p < 0.05$ . tres replicas por tratamiento. El bioensayo se realizó por duplicado.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Selección de bacterias con potencial de promover el crecimiento en microalgas

Para obtener las suspensiones de bacterias se realizó la purificación de cada cepa, (Figura 6). Estas cepas fueron utilizadas para su caracterización en pruebas de solubilización de fosforo, producción de amilasas, sideróforos, auxinas, biopelículas y motilidad. La selección de selección de las cepas utilizadas para los bioensayos se hizo con base a los resultados obtenidos de esta caracterización.

En la prueba de solubilización de fosforo inorgánico se observaron bacterias con la capacidad de solubilizar TPC y PHY. Pero no se observaron bacterias con la capacidad de solubilizar HXA (Tabla 1).

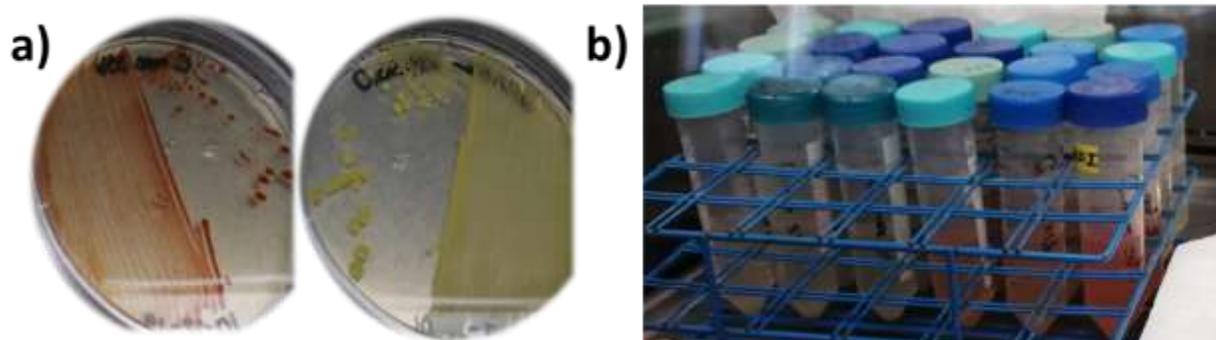
Para la prueba de solubilización de amilasas se observó un cambio de color alrededor de la colonia al colocar la solución reveladora de yodo. Por lo que se registraron como positivas las que no viraron de color y negativas las que viraron a color azul, como se muestra en la Figura 8.

En la prueba de producción de auxinas se observó el viraje de color de las muestras, al añadirse el reactivo de Salkowski. Esto se debe a la presencia de indoles en la muestra (figura 9). Al evaluarse en un espectrofotómetro se registraron los valores de su absorbancia y calcular su concentración mediante la curva estándar. (Figura 10; Figura 11).

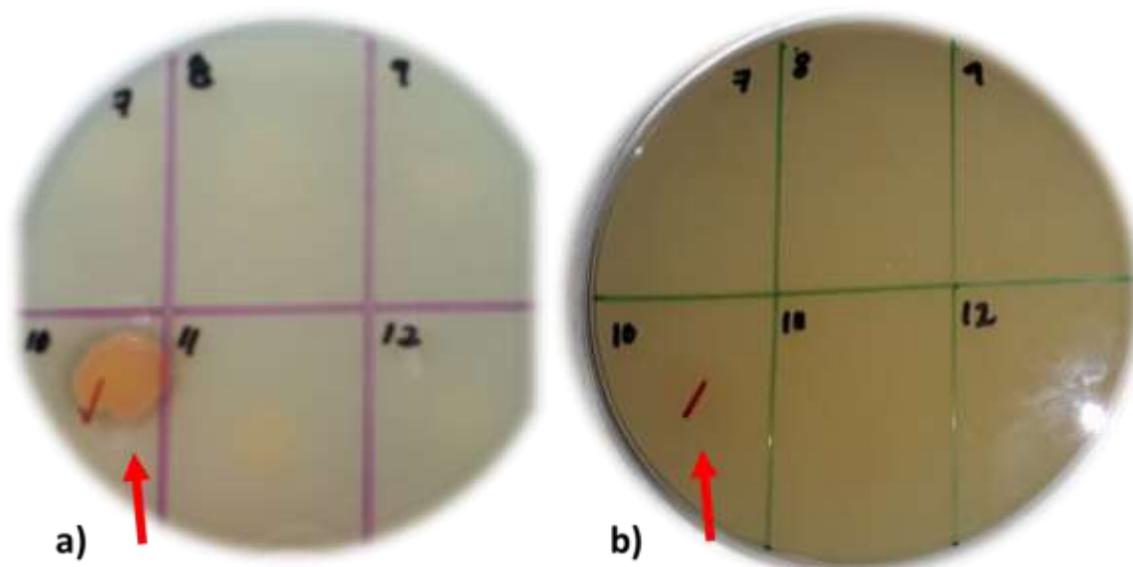
Se realizó un primer tamizado de las cepas, con base a los resultados obtenidos. Por lo que las cepas seleccionadas fueron *A. halopraeferens*, 32br, 35b, 27b, 31 y 41. Uno de los criterios principales fue la producción de auxinas.

En la prueba de motilidad se observó que las bacterias 35b y 32br registraron casi nula motilidad a las 24 y 48 horas (Figura 12a; Figura12c). Por otra parte, las cepas *A. halopraeferens*, 31 y 41, se registraron con mayor motilidad a las 24 y 48 horas (Figura 13).

En la evaluación de la formación de biopelículas se observó que las cepas 31, 41, y 27 produjeron menos biopelículas en comparación con las cepas 35b y 32br (Figura 14, Figura 15). Con base a estos resultados se seleccionaron las cepas 32br, 35b y *A. halopraeferens*, para la evaluación como MGPB.



**Figura 6.** La imagen a se muestran placas de Petri con bacterias aisladas y purificadas. Imagen b suspensiones bacterianas de cada una de las cepas.



**Figura 7.** Prueba de solubilización de fosfato. La imagen a una placa de Petri con medio NRIPB y como fuente de fósforo TPC, se puede apreciar un halo alrededor de la colonia (flecha roja). En la imagen b placa de Petri con medio NRIPB y como fuente de fósforo PHY, se puede apreciar un halo alrededor de la colonia (flecha roja).

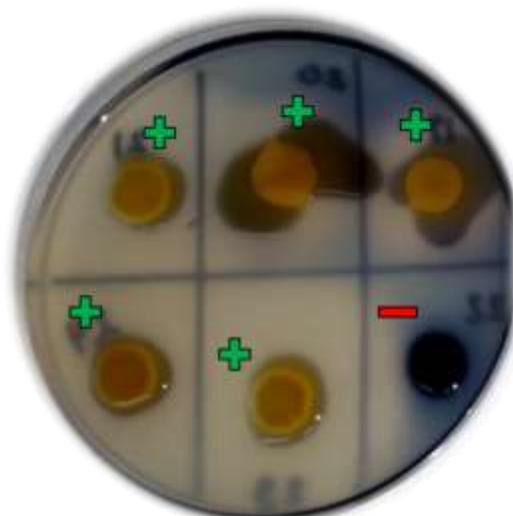
**Tabla 1. Solubilización de fosfatos**

Microalga asociada	Cepa	TPC	HXA	Ácido fítico	Amilasas
2805	1	+	-	+	+
2805	2	+	-	+	+
2805	3	+	-	+	+
2805	4	+	-	+	+
2805	5	+	-	+	+
2805	6	-	-	+	+
2805	7	-	-	-	-
2805	8F	-	-	+	+
2805	8G	+	-	+	+
2805	8H	+	-	+	+
2805	8I	+	-	+	+
2805	9	-	-	+	+
C.cal	27a	-	-	-	-
C.cal	27b	-	-	-	-
C.cal	28	-	-	-	-
C.cal	41	-	-	-	-
C.cal	42a	-	-	-	-
C.cal	42b	-	-	-	-
C.cal	43	-	-	-	-
C.cal	44	-	-	-	-
C.cap	15	-	-	-	-
C.cap	31	-	-	-	-
C.cap	32a	-	-	-	-
C.cap	32b beige	-	-	-	-
C.cap	32b rojo	-	-	-	+
C.mue	35	-	-	-	-
C.mue	35a	-	-	-	-
C.mue	35b	+	-	+	+
C.mue	36	-	-	-	-
I.gal	37	+	-	+	+
I.gal	38	-	-	-	-
I.gal	39a	+	-	+	-
I.gal	39b	-	-	+	+
I.gal	40	-	-	-	-

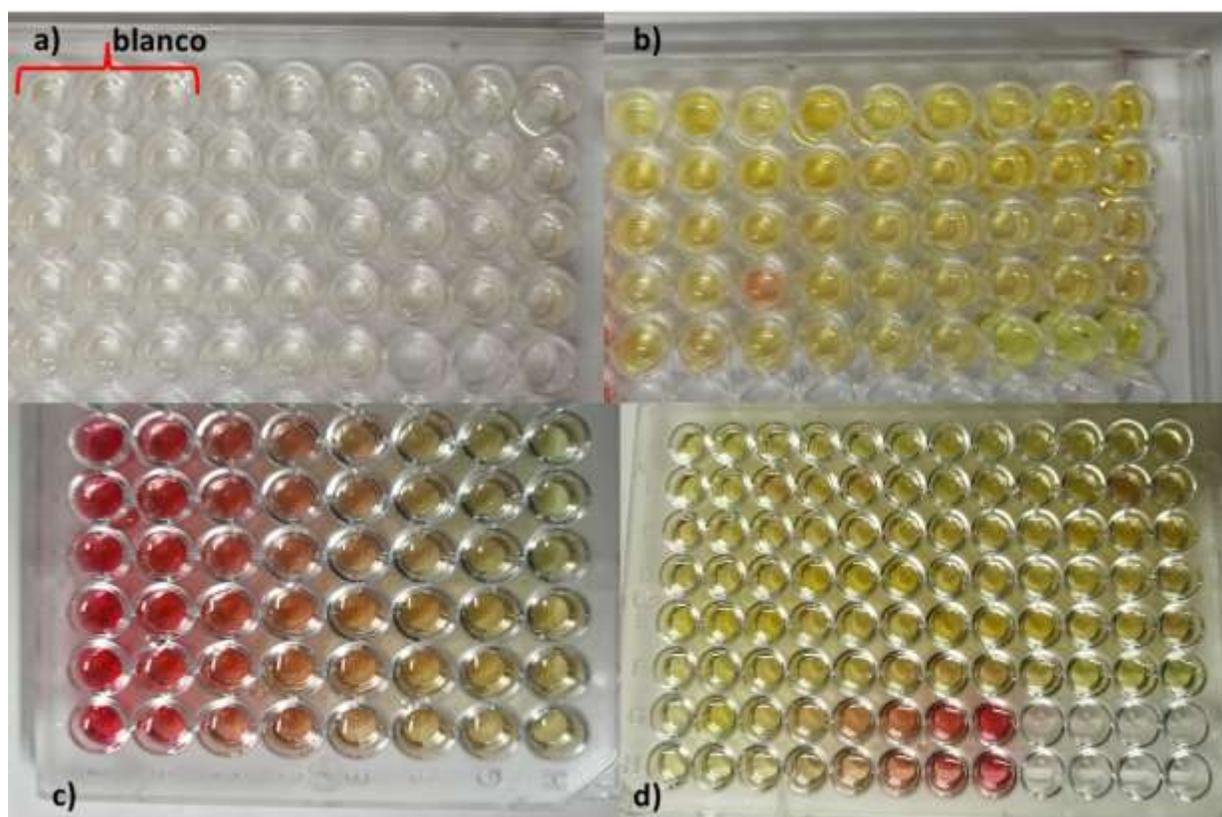
Microalga asociada: cultivo de microalga de donde se aisló la bacteria. 2808 (*Chlorella sorokiniana* UTEX 2805), C. cal (*Chaetocero calcitrans*), C. cap (*Chlorella capsulata*), C. mue (*Chaetoceros muelleri*), I. gal (*Isochrysis galbana*).

Positivo a la solubilización de fosforo: +(positivo),

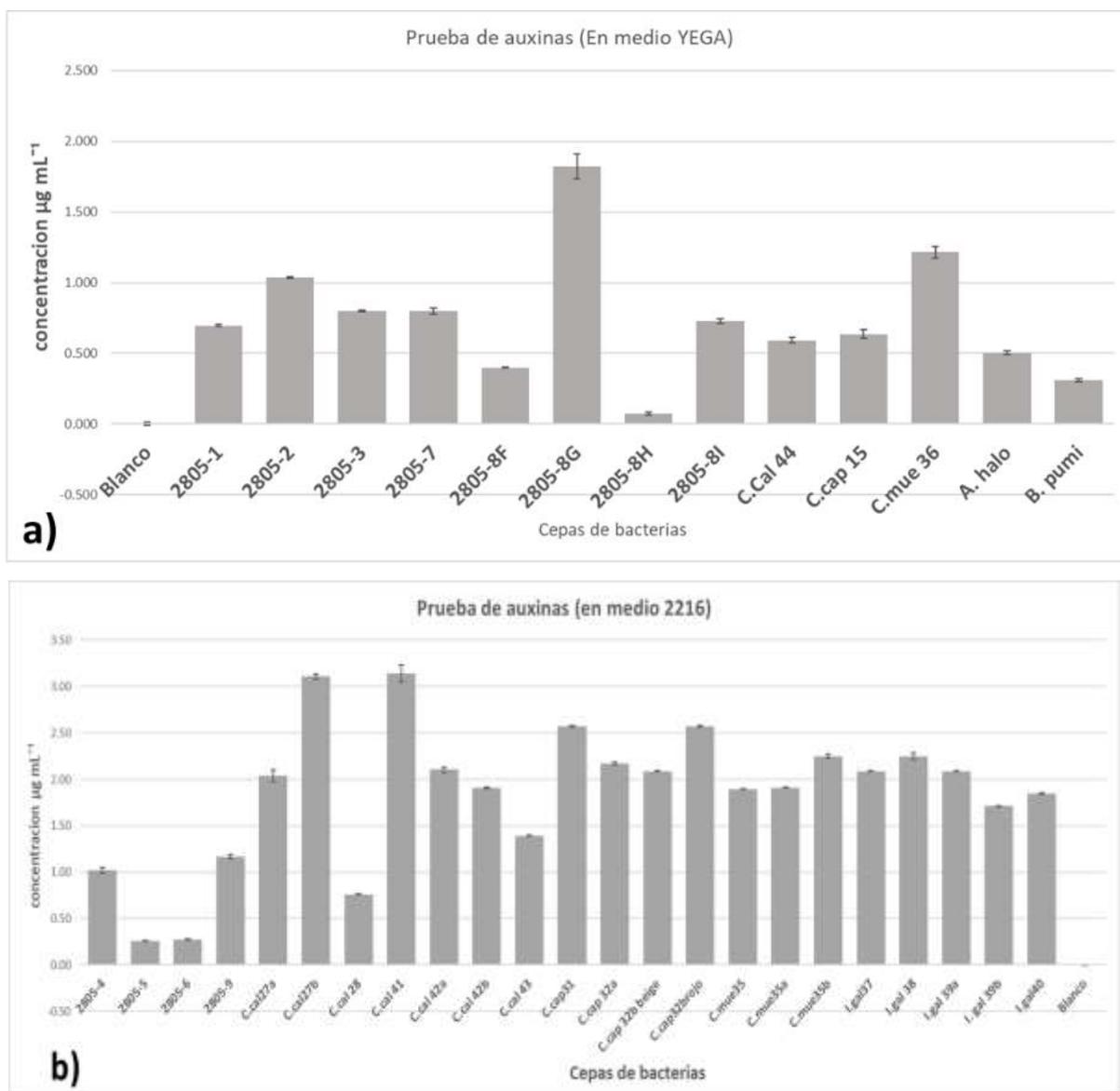
Negativo a la solubilización de fosforo: - (negativo)



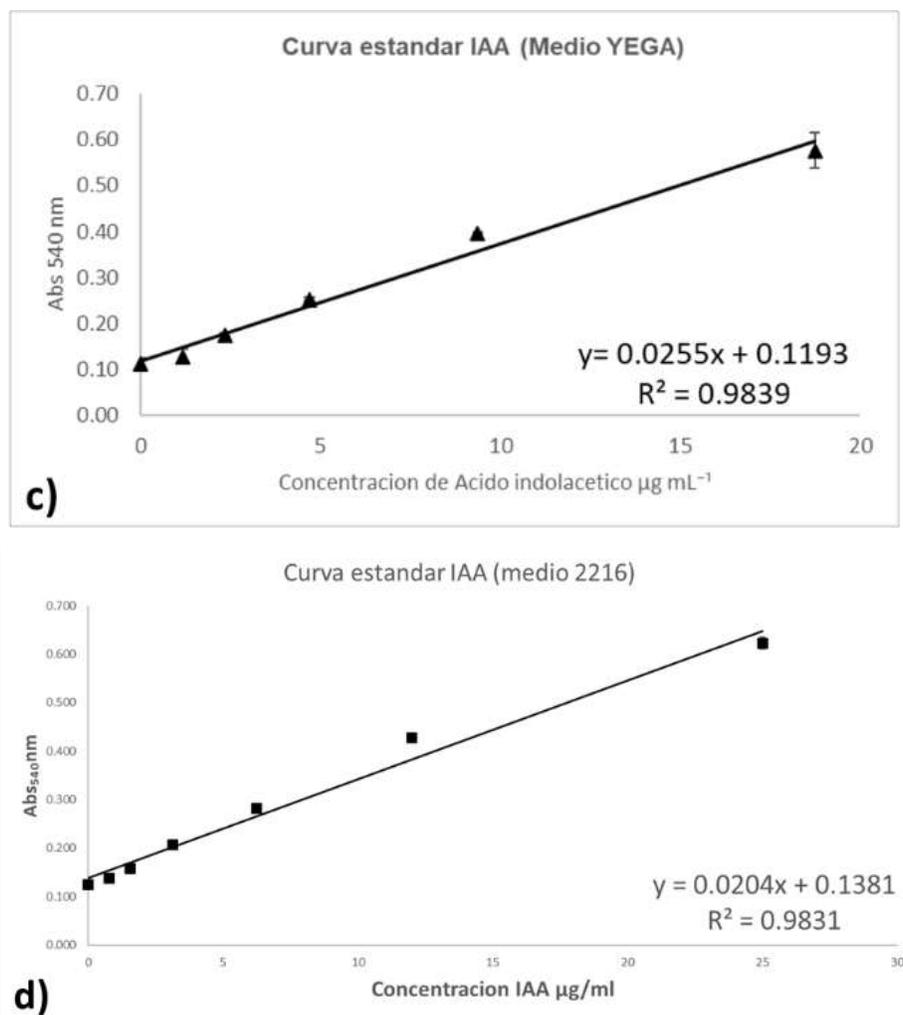
**Figura 8.** Prueba de producción de amilasas, al colocar gotas de Lugol sobre las colonias que viran a color azul se consideran como negativas (línea roja) a la prueba, y las que no viran se consideran como positivas (cruz verde).



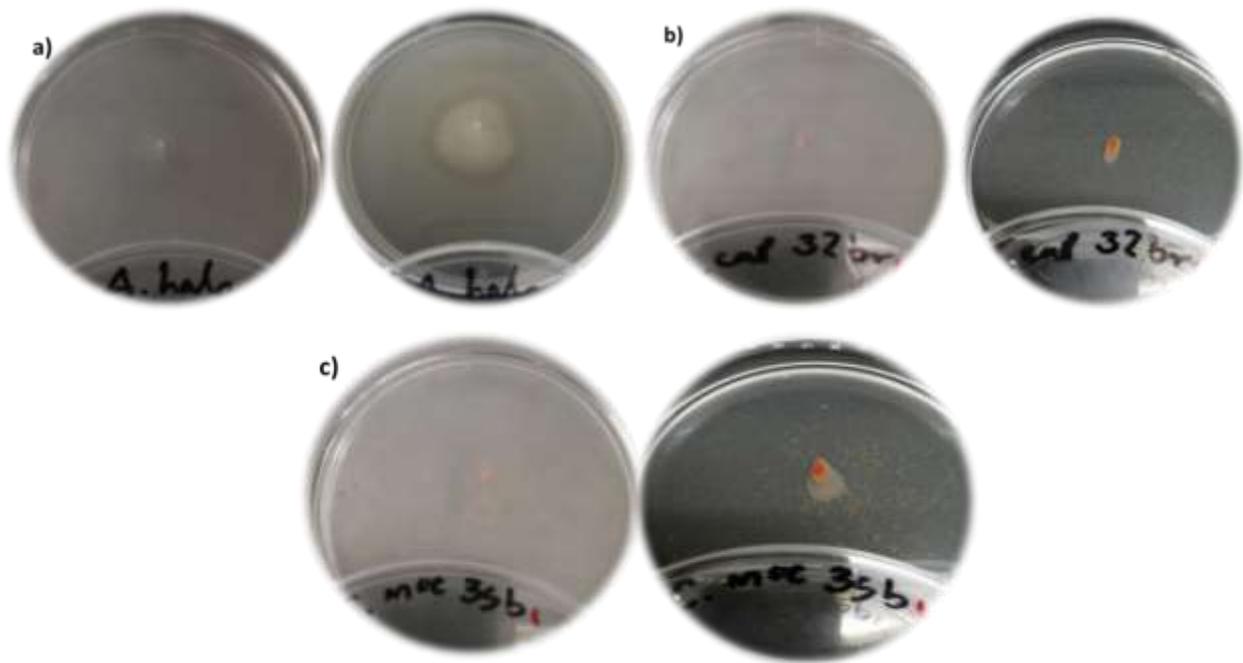
**Figura 9.** Prueba para la producción de auxinas. **a)** se observa las muestras obtenidas antes de añadir el reactivo de Salkowski la llave (color rojo) abarca el blanco (medio cultivo YEGA, sin bacterias). **b)** Cambio de color en las muestras al añadirse el reactivo de Salkowski (Medio YEGA). **c)** Curva estándar de AIA de concentraciones de  $50\mu\text{g mL}^{-1}$  (color rojo) a 0 (color amarillo) en medio YEGA. **d)** Muestras en medio 2216.



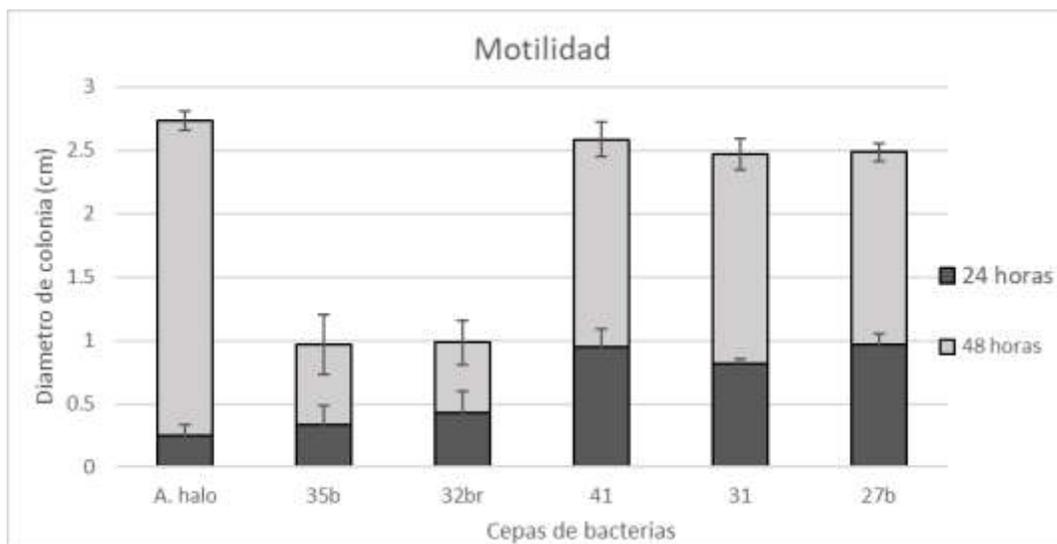
**Figura 10.** Graficas de las producciones de auxinas en bacterias. La imagen **a** son los resultados obtenidos en medio YEGA. La imagen **b** concentraciones obtenidas en medio 2216. Se utilizo ANOVA, posteriormente prueba de Tukey a  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ . No se observaron diferencias significativas entre tratamientos y control.



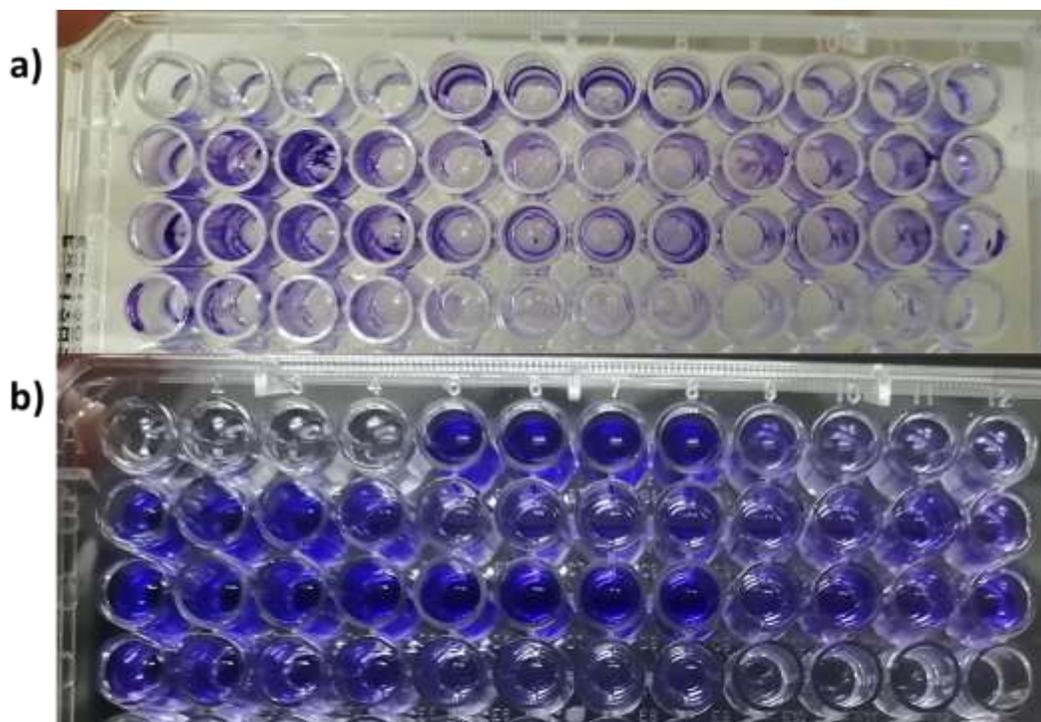
**Figura 11. c)** Curva estándar de AIA en medio YEGA utilizada para la obtención de las concentraciones de auxinas. **d)** Curva estándar de AIA en medio 2216 para la obtención de las concentraciones.



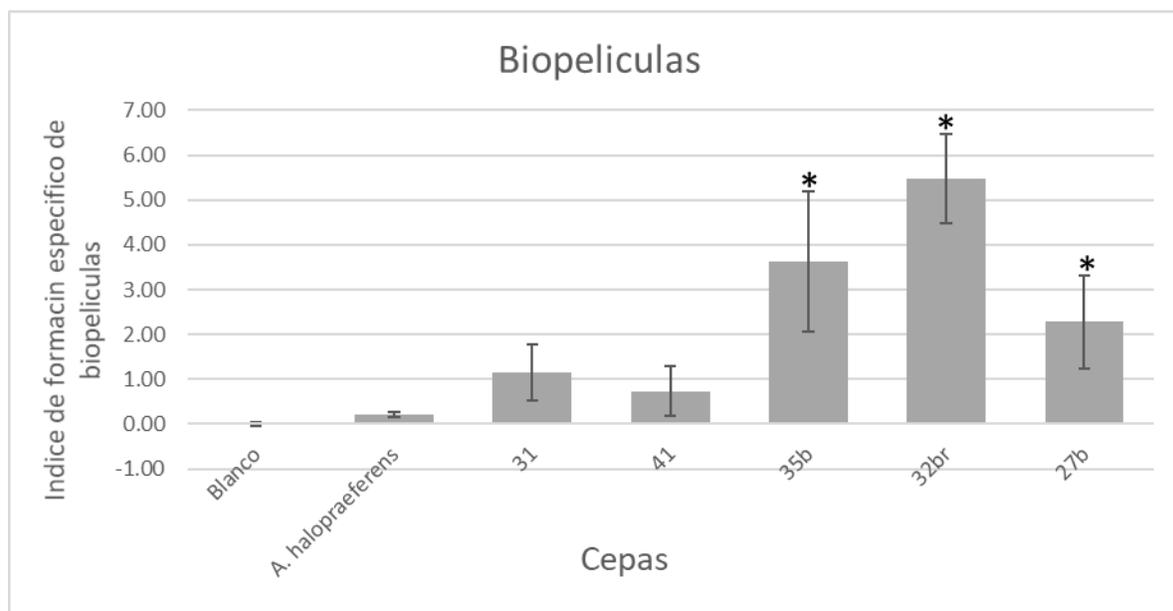
**Figura 12.** Prueba de motilidad. a) cepa *A. halopraeferens* a las 24 y 48. b) cepa 32br a las 24 y 48 horas. c) cepa 35b a las 24 y 48 horas.



**Figura 13.** Grafica de la prueba de motilidad en bacterias. Se muestran las barras del crecimiento radial de las colonias, a las 24 horas (color gris oscuro) y a las 48 horas (color gris claro).



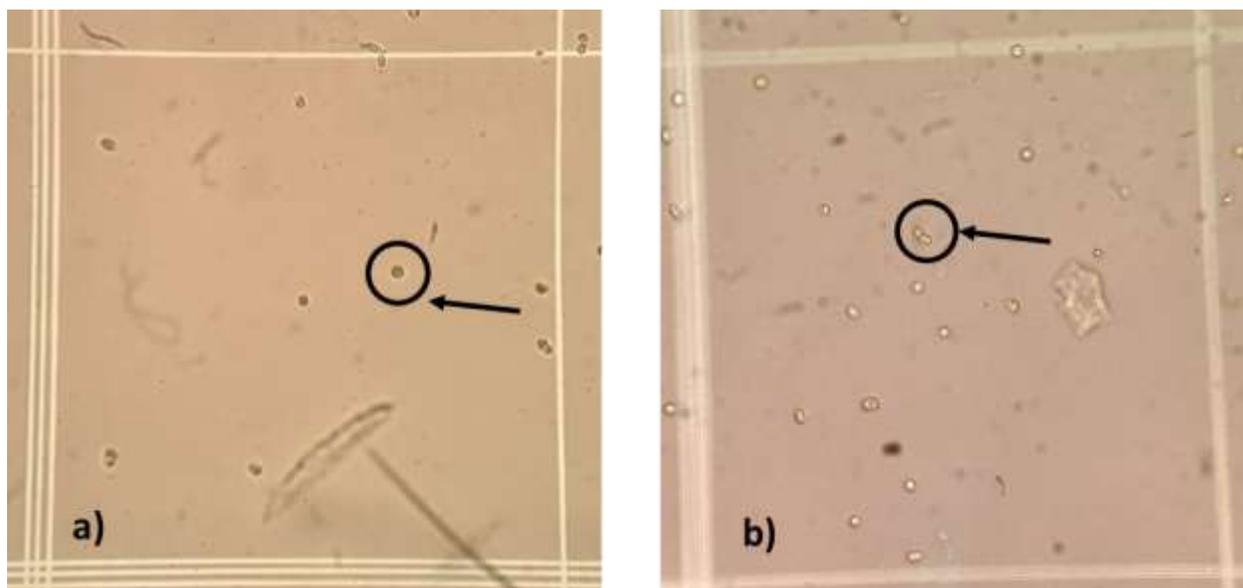
**Figura 14.** Prueba de producción de biopelículas. **a)** bacterias adheridas en la pared del pozo de la microplaca teñido con cristal violeta 0.3%. **b)** Extracción del cristal violeta con Etanol al 95% (Et-OH 95%).



**Figura 15.** Grafica de la prueba de índice de formación específico de biopelículas. Se analizaron mediante ANOVA, posteriormente con prueba de Tukey  $p < 0.05$ . Se observaron diferencias significativas (\*) con respecto al control.

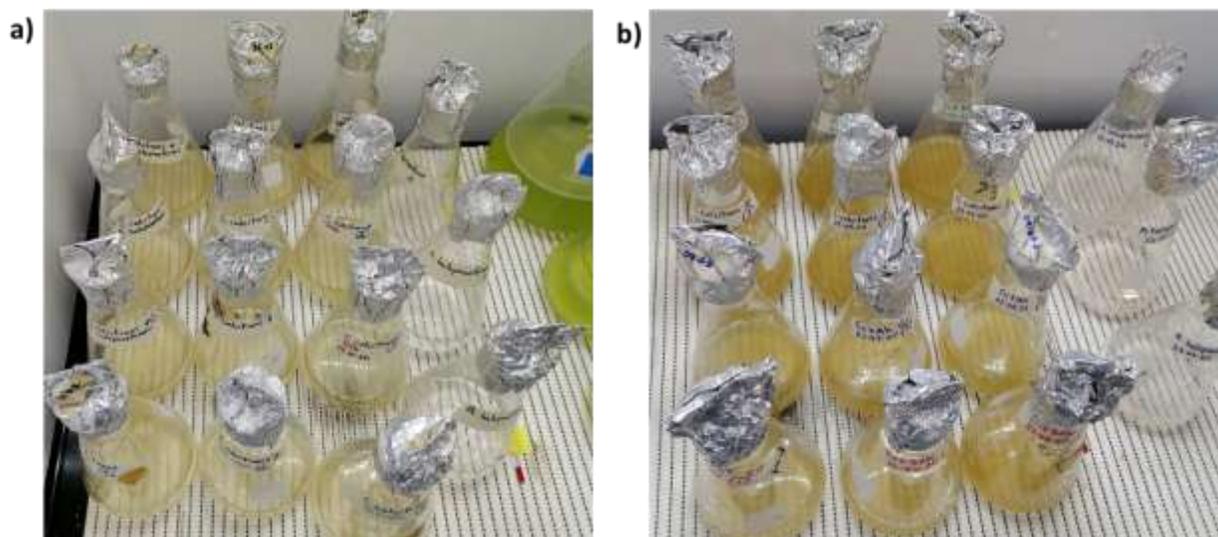
## 7.2 Concentración celular de *Chaetoceros calcitrans*

Durante el tiempo de cultivo de *C. calcitrans* no se observaron cambios morfológicos, ni células dañadas en los tratamientos (Figura 16).



**Figura 16.** Células de *Chaetoceros calcitrans* viables en cámaras de Neubauer. Imagen **a** muestra de 1 día de cultivo del **T1**. Imagen **b** muestra de 5 días de cultivo de **T1**.

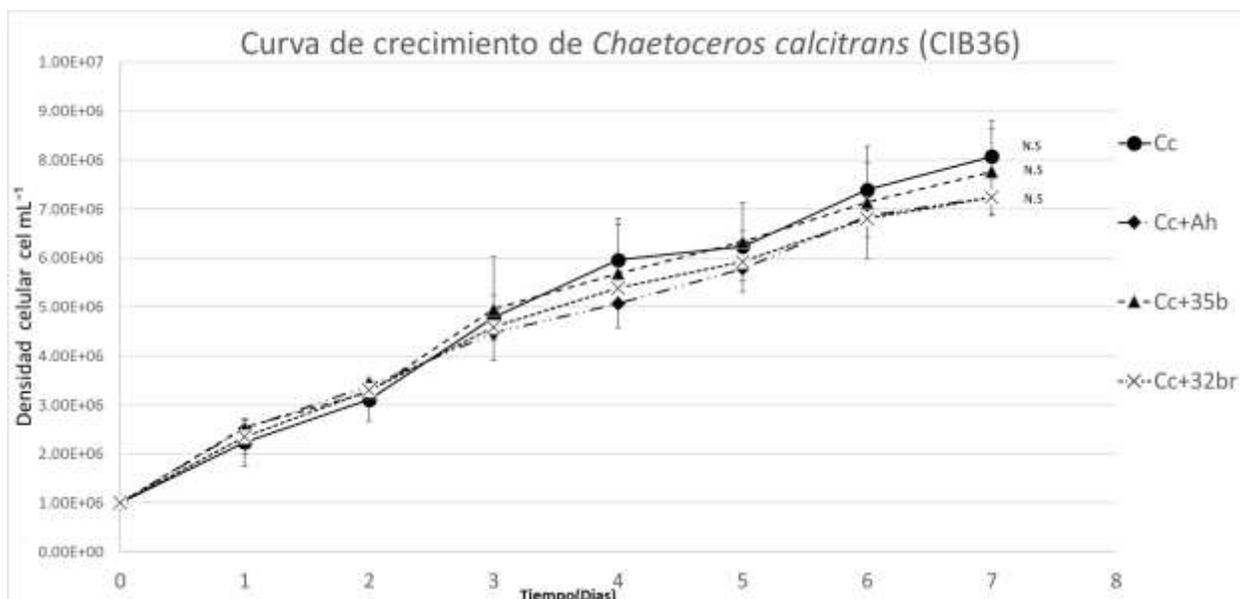
Se determinó la concentración celular del cultivo de *C. calcitrans* cada 24 horas utilizando la **ecuación 2**. Durante los 7 días se observó un crecimiento exponencial en cada uno de los tratamientos (Tabla 2). Al analizarse por ANOVA y prueba de Tukey a  $p < 0.05$ , no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.



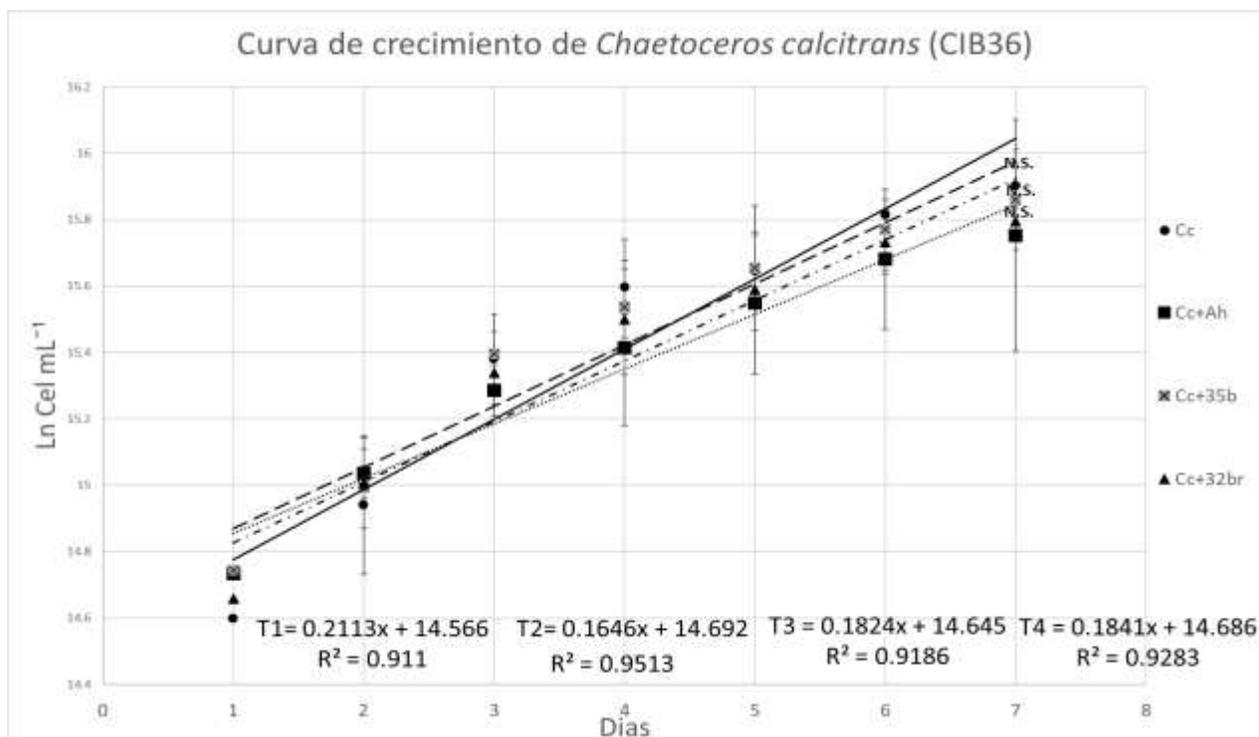
**Figura 17. a)** bioensayo con los 4 tratamientos al Día 0. **b)** Bioensayo al día 3, se aprecia un cambio de color debido a la densidad celular.

**Tabla 2.** Densidades celulares de cada uno de los tratamientos durante 7 días.

Tiempo (días)	0	1	2	3	4	5	6	7
T1	$1 \times 10^6$	$2.23 \times 10^6$	$3.11 \times 10^6$	$4.78 \times 10^6$	$5.96 \times 10^6$	$6.23 \times 10^6$	$7.39 \times 10^6$	$8.07 \times 10^6$
T2	$1 \times 10^6$	$2.51 \times 10^6$	$3.39 \times 10^6$	$4.48 \times 10^6$	$5.07 \times 10^6$	$5.79 \times 10^6$	$6.86 \times 10^6$	$7.25 \times 10^6$
T3	$1 \times 10^6$	$2.35 \times 10^6$	$3.30 \times 10^6$	$4.59 \times 10^6$	$5.39 \times 10^6$	$5.93 \times 10^6$	$6.81 \times 10^6$	$7.24 \times 10^6$
T4	$1 \times 10^6$	$2.54 \times 10^6$	$3.26 \times 10^6$	$4.96 \times 10^6$	$5.69 \times 10^6$	$6.33 \times 10^6$	$7.14 \times 10^6$	$7.77 \times 10^6$



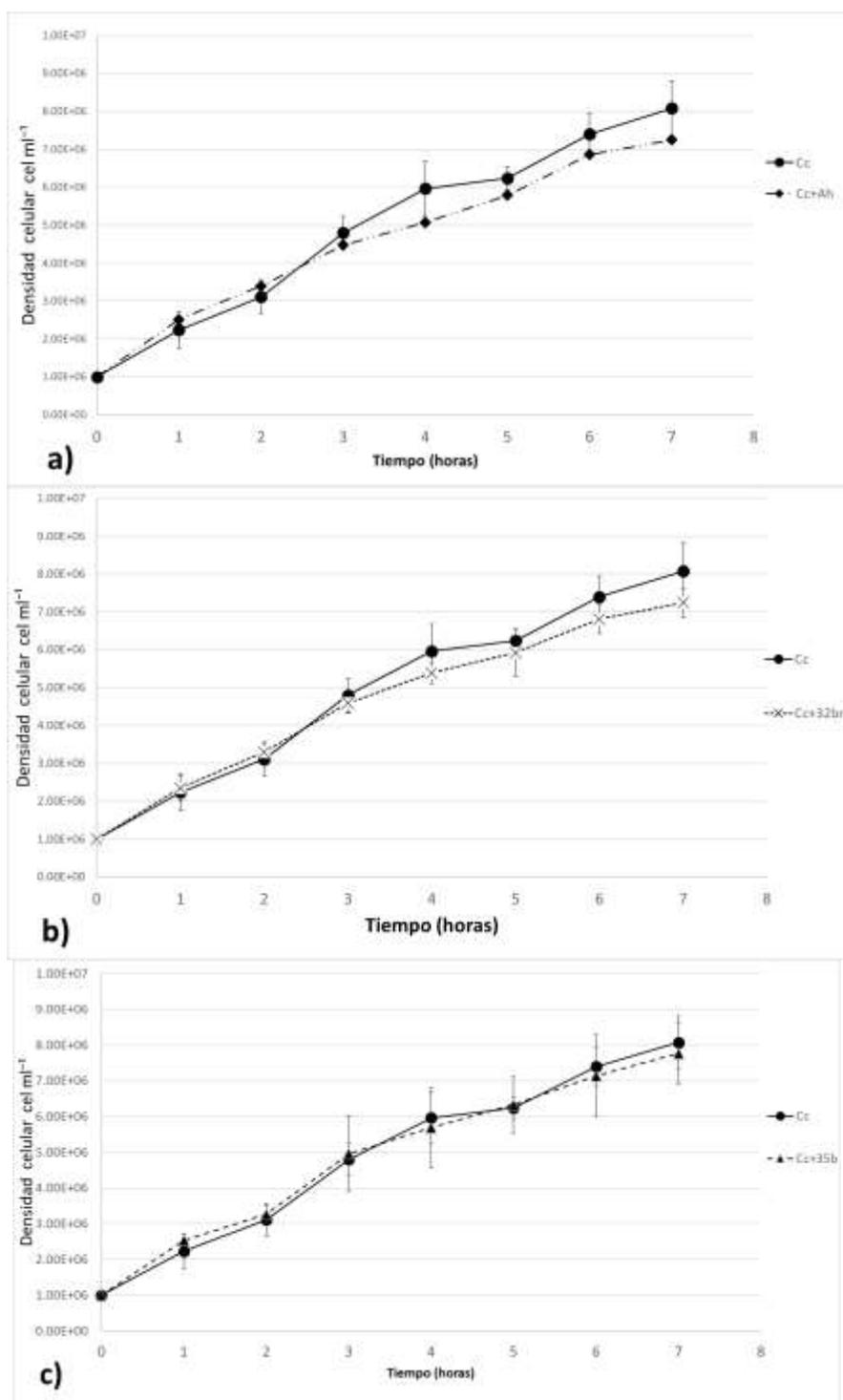
**Figura 18.** Concentraciones celulares de *C. calcitrans* en T1 (circulo), T2 (rombo), T3 (cruz) y T4 (Triangulo), desde el tiempo 0 hasta el día 7. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos por ANOVA y prueba de comparación de promedios de Tukey con  $p \leq 0.05$ , N.S.=No significancia,  $n=6$



**Figura 19.** Densidades celulares de *C. calcitrans* de cada uno de los tratamientos, expresados en logaritmo natural (Ln) con una tendencia lineal. No se observaron diferencias significativas con respecto al control.  $P < 0.05$ ,  $n=6$ .

**Tabla 3.** Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ ) y tiempo de generación promedio ( $T_g$ ) de *C. calcitrans* para el control y cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Tasa de crecimiento promedio $\text{dia}^{-1}$ ( $\mu$ )	Tiempo de generación promedio $\text{dia}^{-1}$ ( $T_g$ )
T1	0.298	5.03
T2	0.282	4.71
T3	0.292	4.37
T4	0.283	4.68



**Figura 20.** Grafica de las densidades celulares de *Chaetoceros calcitrans* durante 7 días. La gráfica **a**, muestra el comportamiento de la concentración entre **T1** (*C. calcitrans* como control) y **T2** (*C. calcitrans* + *A. halopraeferens*). la gráfica **b** muestra el comportamiento de la densidad celular entre **T1**(control) y **T3** (*C. calcitrans* + cepa 32br). La grafica **c** muestra el comportamiento entre **T1** (control) y **T4** (*C. calcitrans* + 35b).

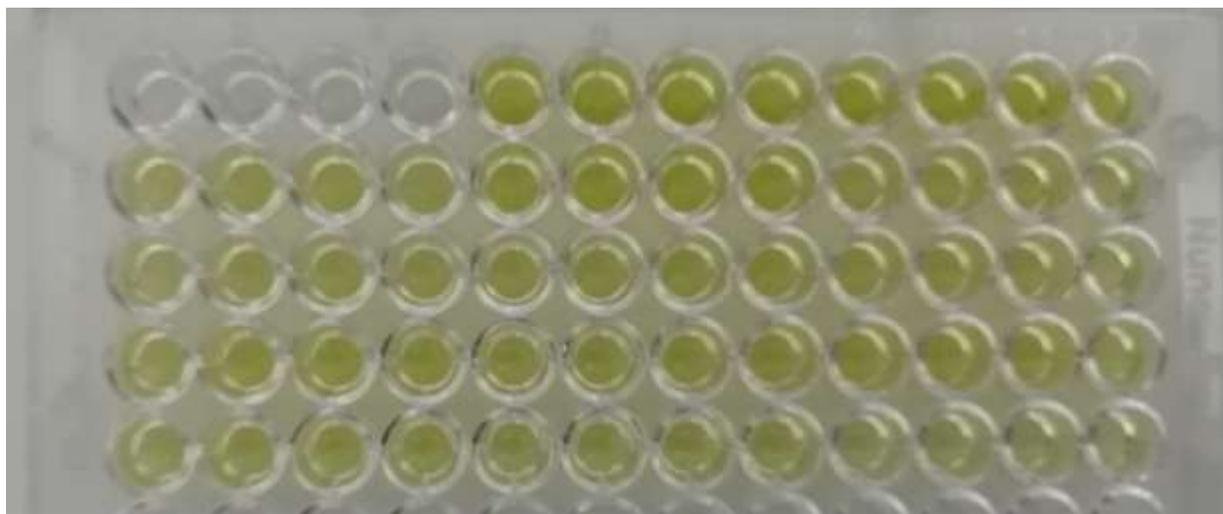
### 7.3 Pigmentos

Se evaluó la concentración de pigmentos de cada tratamiento de los días 0, 3, 5 y 7. Se determinó la concentración de *chl a* mediante la ecuación 5. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y control (Figura 22).

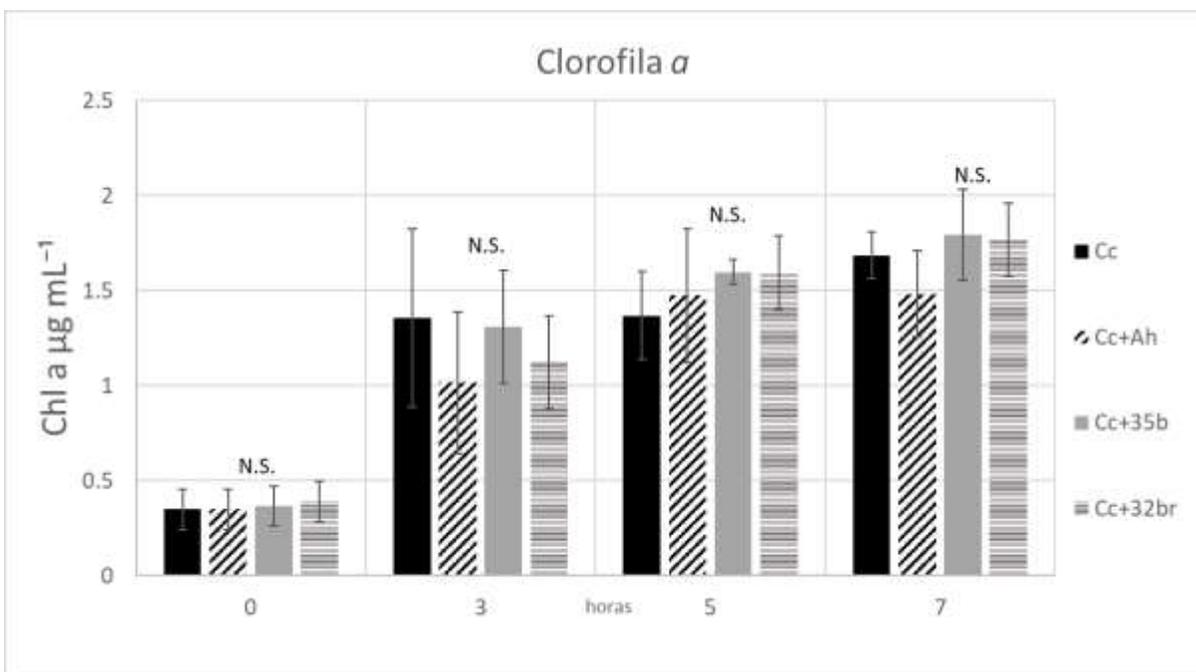
*La concentración de chl c se determinó mediante la ecuación 6. Se evaluaron muestras a los días 0, 3, 5 y 7. Se observó una diferencia significativa entre T4 y T1 al día 5 (Figura 23).*

La concentración de carotenos se determinó utilizando la ecuación 7. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

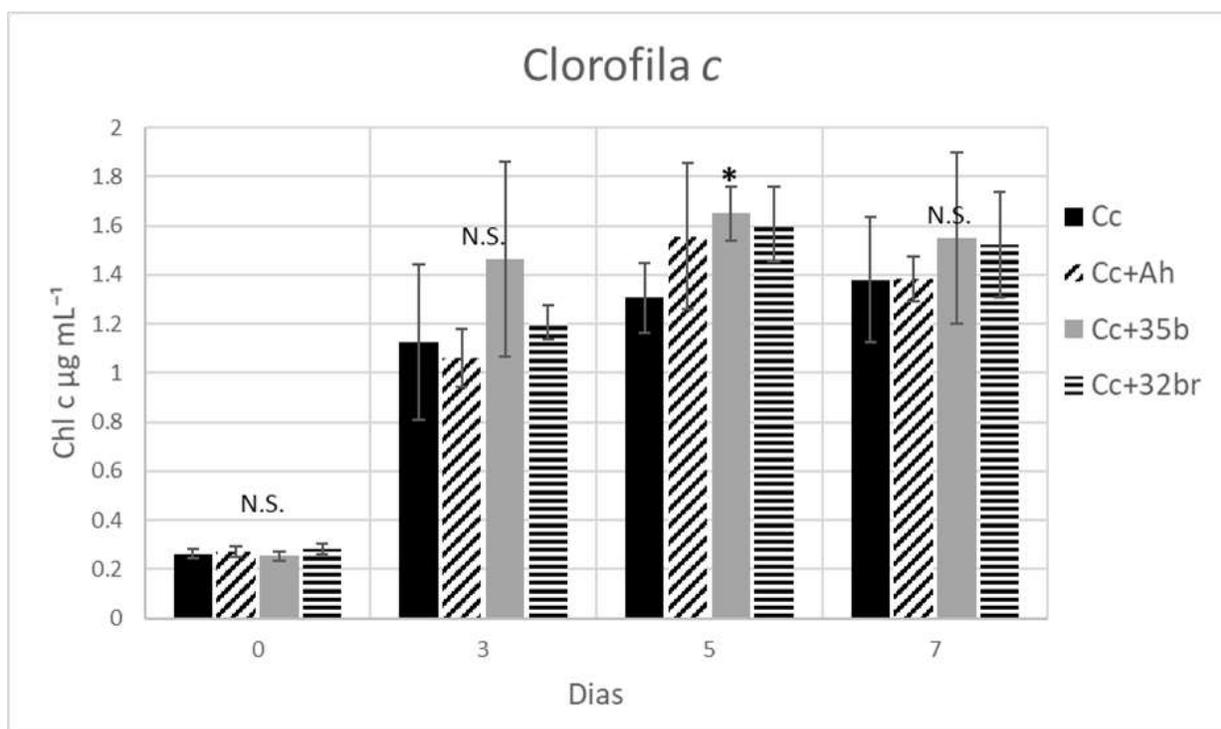
Al determinar la concentración de los pigmentos totales de cada tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.



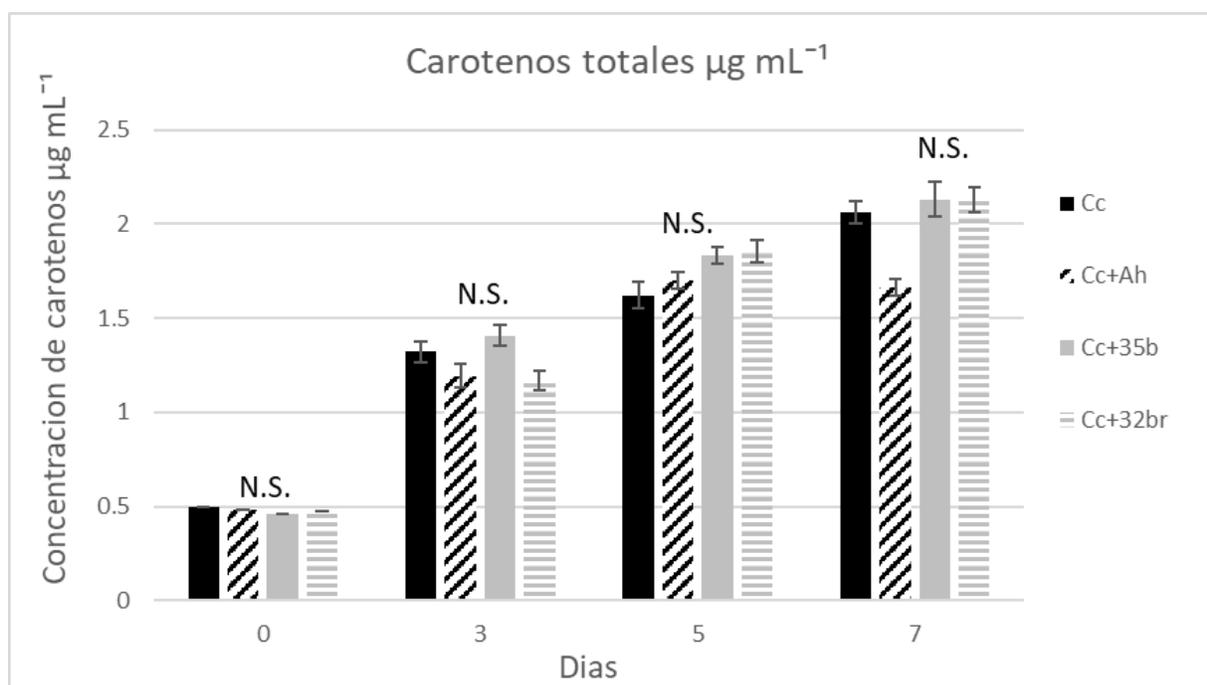
**Figura 21.** Extracción de pigmentos con acetona al 90%, y determinación de la concentración de pigmentos en microplacas.



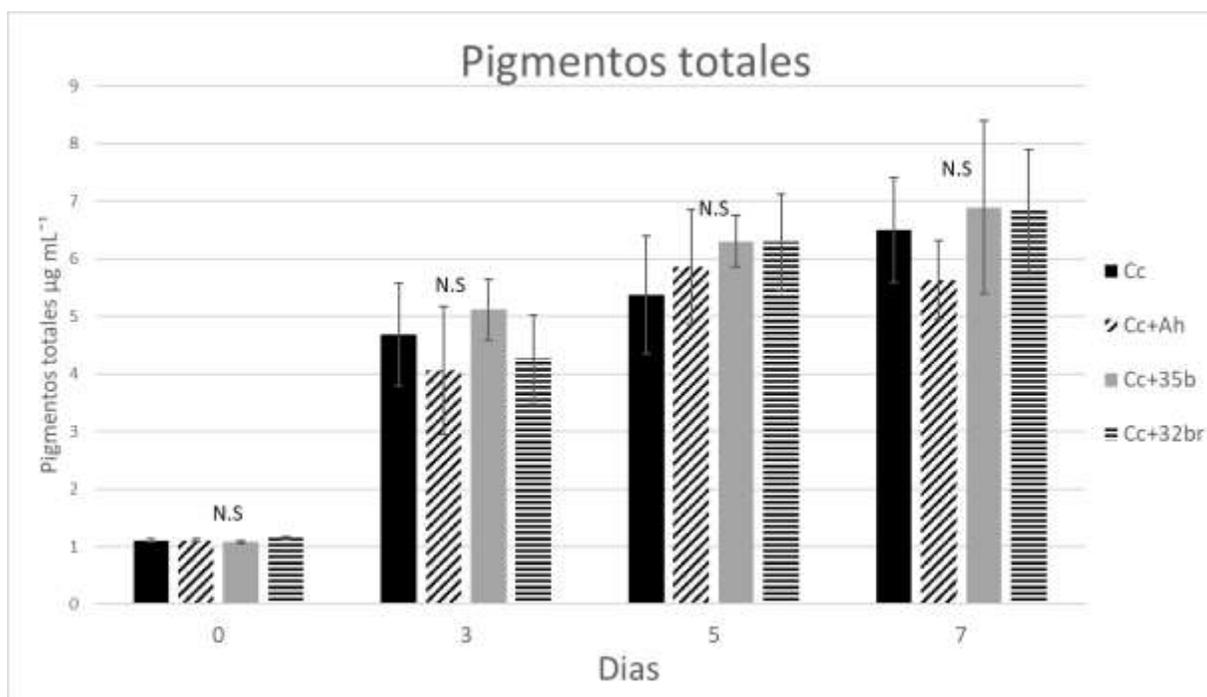
**Figura 22.** Concentraciones de Chl a de cada uno de los tratamientos los tiempos (Días) 0, 3 y 7. Se utilizo ANOVA, posteriormente prueba de Tukey  $p < 0.005$ , ( $n=6$ ). No se observaron diferencias significativas (N.S.) entre los tratamientos y con respecto al control.



**Figura 23.** Concentración de Chl c  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En los tiempos (Días) 0, 3, 5 y 7 días. Se utilizo ANOVA, posteriormente prueba de Tukey  $p < 0.005$ , ( $n=6$ ). Se observo una diferencia significativa (\*) con respecto al tratamiento control (T1).



**Figura 24.** Concentración de carotenos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). En los tiempos 0, 3, 5 y 7 días. Se utilizó ANOVA, posteriormente prueba de Tukey  $p < 0.005$ , ( $n=6$ ). No se observaron diferencias significativas (N.S.) entre los tratamientos y control.



**Figura 25.** Concentraciones de pigmentos totales ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). En los tiempos 0, 3, 5 y 7 días. Se utilizó ANOVA, posteriormente prueba de Tukey  $p < 0.005$ , ( $n=6$ ). No se observaron diferencias significativas (N.S.) entre los tratamientos y control.

#### 7.4 Lípidos

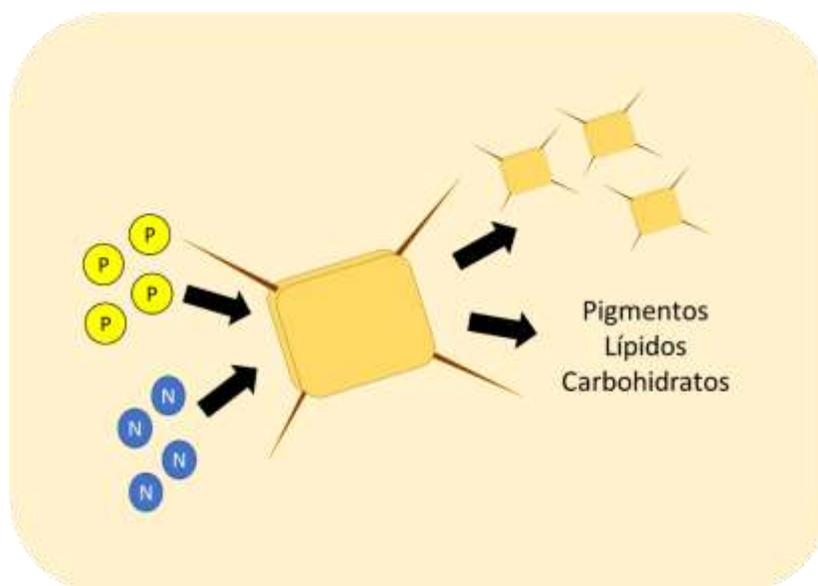
Las muestras se colocaron en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Hasta su uso.

#### 7.5 Carbohidratos

Las muestras se colocaron en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Hasta su uso.

#### 7.6 Diatomeas

Las diatomeas proporcionan diversos beneficios a la actividad acuícola, uno de estos es la disminución de la concentración de compuestos con nitrógeno y fósforo. Diversos estudios mencionan asimilación de nitrógeno desde 50-80% y fósforo desde 20-80%. La eficacia de remoción está relacionada con las concentraciones de los compuestos en la que se encuentren las microalgas, temperatura, salinidad e intensidad de luz (Singh *et al.* 2021; Tantanasarit *et al.* 2013; Inbakandan *et al.* 2020).



**Figura 26.** La asimilación de compuestos con N y P, promueven el crecimiento celular, aumenta la concentración de pigmentos, lípidos y carbohidratos.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Selección de bacterias con potencial de promover el crecimiento en microalgas

A partir del aislamiento de bacterias asociadas a microalgas, y al realizar pruebas para su caracterización como posibles promotoras de crecimiento en microalgas.

El ácido fítico y el fosfato tricálcico provienen de las dietas ricas en proteína vegetal (principalmente soja), y harinas de pescado. Estos compuestos representan entre el 50-90% del fósforo total (Kokou *et al.*, 2018; Ma *et al.* 2014). Se observó que algunas bacterias tienen la capacidad de solubilizar por lo menos una fuente de fósforo inorgánico, como TPC y PHY, debido a la capacidad de producir ácidos orgánicos y/o fitasas. Estos compuestos se han encontrado en concentraciones de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (Martins *et al.*, 2017). Por motivo, la solubilización del fósforo inorgánico es esencial para la asimilación y el crecimiento de microalgas (Corrales-Ramírez *et al.*, 2014). Se observó que las cepas 32br y 35b, presentan mecanismos para hidrolizar y de solubilizar fuentes de fósforo como TPC y PHY.

El almidón es un compuesto utilizado ampliamente como fuente de energía económica, aplicado en algunas dietas como aglutinante (Nolasco-Soria 2020). La prueba de amilasas nos permite detectar cepas con la capacidad de producir amilasas para la hidrólisis de almidón. Las cepas 32br y 35b fueron capaces de hidrolizar el almidón del medio.

Se han reportado una gran cantidad de bacterias que producen AIA; esta fitohormona tiene un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las microalgas, aumenta la producción de ciertos metabolitos de interés (lípidos y carbohidratos), (Bashan *et al.*, 2008; Jauffrais *et al.*, 2017, Salama *et al.*, 2017). Las cepas 32b y 32br mostraron las más altas auxinas ( $1.63 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $1.95 \mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente). Con base a estos resultados fueron seleccionadas para el bioensayo.

Las biopelículas son estructuras de polisacáridos, en donde ocurren diversos procesos como, interacciones celulares (Nielsen *et al.* 2015). Naves (2008) reportó un índice de formación específicas de biopelículas donde valores  $<0-35$  es una nula producción, y valores  $\geq 1-10$  son

fuertes productoras de biopelículas. Las cepas 35b y 23br obtuvieron valores de 5.14 y 5.37, por lo que, fueron registradas como fuertes productoras de biopelículas.

La motilidad en las bacterias es un mecanismo que les permite colonizar nichos, adherirse a células huésped, como forma de supervivencia. Cuando la bacteria usa la rotación flagelar para desplazarse en superficies acuosas se le conoce como motilidad de natación (Casado-Garcia *et al.* 2021). Las cepas 35b y 32br no presentaron motilidad durante las 48 horas, en contraste con *A. halopraeferens* que tuvo un crecimiento radial de 2.48 cm.

Con base a los resultados obtenidos, se seleccionaron las cepas 32br y 35b, como posibles promotoras de crecimiento.

## **8.2 Concentración celular y pigmentos de *Chaetoceros calcitrans***

Aunque se observó un crecimiento exponencial en los 4 tratamientos de los cultivos con *Chaetoceros calcitrans*, no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 18). Se ha reportado que *Chaetoceros calcitrans* se desarrolla de forma exponencial durante los primeros 7 días, en medios de cultivo F/2 (Kaspar *et al.* 2014; Reveillón *et al.* 2016). Las bacterias no afectaron el crecimiento, en comparación con el tratamiento control. Por lo que se sugiere que el tipo de relación entre diatomeas y bacterias es de neutralismo, ya que no se observó un beneficio (Xia *et al.* 2021).

Las diatomeas contienen dos tipos de pigmentos, clorofilas y carotenoides. La *Chl a* es la predominante, por lo que su función central es convertir la energía fotoquímica. Mientras que la *Chl c* es utilizada como un pigmento accesorio. Por otro lado están los carotenoides que estos participan en la fotoprotección (Kuczynska *et al.* 2015). En relación con la producción de *chl a*, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. En la producción de *Chl c* se observó una diferencia significativa entre el tratamiento T4 y control. En la Concentración de pigmentos totales no se observaron diferencias significativas. Al evaluar la concentración de pigmentos totales no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y con respecto al control. reportaron que la concentración de pigmentos está relacionada con la

interacción entre microalga-bacteria y la concentración de las diferentes fuentes de nitrógeno (Fallahi *et al.* 2021, Zhang *et al.* 2021)

El uso de diatomeas como *Chaetoceros calcitrans* es muy importante para el sector acuícola, actualmente ha despertado el interés de aplicación de consorcios microalga-bacteria para la disminución de las concentraciones de N y P en los efluentes, para evitar la eutrofización en zonas costeras. Ya que se reportado que las diatomeas tienen la capacidad de asimilar desde un 50-80% del nitrógeno total y de un 20 a 80% de fosforo (Marella *et al.*, 2020).

## 9. CONCLUSIONES

- Se observó que las bacterias aisladas tenían potencial de ser promotoras de crecimiento, ya que solubilizaban fuentes de fosforo, producían auxinas, y formaban biopelículas.
- Al evaluar el crecimiento de los co-cultivos no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos. Las bacterias no tuvieron un efecto sobre el crecimiento de los cultivos en medio f/2.
- Al evaluar los pigmentos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Debido a que el aumento en la producción de *Chl* y pigmentos está relacionada con la concentración de fuentes nitrógeno disponibles.
- Las diatomeas tienen un gran potencial biotecnológico, su tolerancia a cambios de temperatura, salinidad, intensidad de luz y concentración nutrientes, además de que pueden formar interacciones con bacterias para potenciar su asimilación de N y P, para promover su crecimiento.

Como perspectivas y recomendaciones para el trabajo realizado con la caracterización de bacterias asociadas a microalgas y con posible potencial para ser promotoras de crecimiento en microalgas, y los resultados obtenidos en relación con el crecimiento celular y la concentración de pigmentos, sugieren lo siguiente:

- Las bacterias aisladas demostraron tener diversas capacidades para ser posibles promotoras de crecimiento en microalgas, ya que pueden solubilizar diferentes fuentes de fosforo, hidrolizar almidón, producen AIA, son fuertes productoras de biopelículas, tiene motilidad. Por lo tanto, en futuros trabajos se podrán evaluar las cepas que no fueron co-cultivadas con *C. calcitrans*.
- Algunos estudios sugieren evaluar las bacterias en aguas con altas concentraciones de nutrientes, ya que esto permite contrastar el comportamiento de la microalga en co-cultivo con bacterias con potencial de ser promotoras de crecimiento.

- El reciente interés por conocer las interacciones entre microalga y bacteria aportara mayor conocimiento sobre las moléculas que intervienen en sus procesos metabólicos. También potenciara el desarrollo y producción de co-cultivos para la obtención de diversos productos de interés biotecnológico a los diversos sectores.

## 10. LITERATURA CITADA

1. Akbarnejad M., Rajabi H., Javaheri M., Shamsaie M., Filizadeh Y. Effect of light and nitrogen concentration on the growth and lipid content of marine diatom, *Chaetoceros calcitrans*. Iran. J. Fish. Sci. 2020. p. 986-993
2. Amin S, Hmelo L, Tol H, Durham B, Carlson L, Heal K, Morales R, Berthiaume C, Parker M, Djunaedi B, Ingalls A, Parsek M, Moran M, Armbrust E. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. Nature. 2015 (522) p. 98-101.
3. Amin S, Parket M, Armbrust V. Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012 (76) p. 667-684.
4. Anu P, Nandan S, Jayachandran P, Don N. Toxicity effects of copper on the marine diatom, *Chaetoceros calcitrans*. Reg. Stud. Mar. Sci. 2016 (8) p. 498-504
5. Arredondo-Vega B, Voltolina D, Cordero-Esquivel B. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Arredondo-Vega B, Voltolina D, Zenteno-Savin T, Arce-Montoya M, Gomez-Anduro G. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 2da edición. La Paz, B.C.S. 2017. p. 44-50
6. Arredondo-Vega B, Voltolina D. Determinación de pigmentos totales por métodos espectrofotométricos. En: Arredondo-Vega B, Voltolina D, Zenteno-Savin T, Arce-Montoya M, Gomez-Anduro G. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 2da edición. La Paz, B.C.S. 2017. p. 75-83
7. Barahona E, Navazo A, Yousef-Coronado F, Aguirre D, Martínez-Granero F, Espinosa-Urgel M, Martín M, Rivilla R. Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. Environ Microbiol 2010 (12) p. 3185–3195
8. Bentzon-Tilia M., Sonnenschein C., Gram L. Monitoring and managing microbes in aquaculture-Towards a sustainable industry. Microb. Biotechnol 2016, 9(5), p. 576–584.
9. Bozarth A., Maier U.G., Zauner, S. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 82, p. 195–201.
10. Brodie J., Chan C., De Clerck O., Cock J., Coelho S., Gachon C., Grossman A., Mock T., Raven J., Smith A., Yoon H., Bhattacharya D. The algal revolution. Trends plant Sci. 2017 Vol 22 p. 726-738
11. Casado-García A, Chichon G, Dominguez C, Garcia-Dominguez M, Heras J, Ines A, Mata E, Pascual V, Saenz Y. MotilityJ: An open-source tool for the classification and segmentation of bacteria on motility images. Comput. Biol. Med. 2021. Vol. 136. p. 104673.
12. Chen Y, Vaidyanathan S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. Anal. Chim. Acta. 2013. Vol. 776. p. 31
13. Corrales-Ramirez L, Arevalo-Galvez Z, Moreno Burbano V. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. Rev. Cinc. Biomed. 2014. Vol. 12(21). p. 67-79.
14. D'Costa P., Anil A. Diatom community dynamics in a tropical, monsoon-influenced environment; west coast of India. *Cont. shelf res.* 2010 vol. 30 p. 1324-1337.
15. Datta A., Marella T.K., Tiwari A., Wani S.P. The diatoms: From eutrophic indicators to mitigators. Gupta S., Bux F. Application of Microalgae in Wastewater Treatment. Springer International Publishing. 2019. Vol 2. p. 19–40.

16. De bashan L., Hernandez J., Morey T., Bashan Y. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorous from municipal wastewater. *Water research*, 2004 (38) p. 466-474
17. De-Bashan L, Antoun H, Bashan Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *azospirillum* spp. In promoting growth of *chlorella vulgaris*. *J Phycol.* 2008. Vol. 44(4). p. 938-947
18. De-Bashan L., Hernandez J., Bashan Y., 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation- A comprehensive evaluation. *Appl. soil Ecol.* 2012 (61) p. 171-189
19. Del Rio-Chanona E, Cong X, Bradford E, Zhang D, Jing K. Review of advanced physical and data-driven models for dynamic bioprocess simulation: case study of algae bacteria consortium wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 2019. Vol. 116(2), p. 342-353
20. Fallahi A, Rezvani F, Asgharnejad H, Nazloo E, Hajinajaf N, Higgins B. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere.* 2021. Vol. 272. p. 129878.
21. FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma.
22. Fei C., Ochsenkühn M., Shubk A., Isaac A., Wang C., Amin S. Quorum sensing regulates ‘swim-or-stick’ lifestyle in the phycosphere. *Environ. Microbiol.* 2020 (22) p. 4761-4778.
23. Gireesh R., Haridevi C., Gopinathan C. Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquac. Res.* 2008. Vol 39. p. 1053-1058.
24. Glick B. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica.* Vol 2012, Article ID 963401, 15 pages.
25. Glickmann, E., Dessaux, Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61(2), p. 793–796.
26. Godhe A, Asplund M, Härnström K, Saravanan V, Tyagi A, Karunasagar I. Quantification of Diatom and Dinoflagellate Biomasses in Coastal Marine Seawater Samples by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol 74(23). p. 7174-7182.
27. Hildebrand M., Davis A.K., Smith S.R., Traller J.C., Abbriano R. The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels.* 2012. Vol. 3, p. 221–240.
28. Inbakandan D, Murthy P, Peter D, Vinithkumar N, Dharani G. Growth response of the diatom *Chaetoceros species* to the elemental ratios of Deep Ocean waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2020. Vol. 241. p. 106812.
29. Jauffrais T, Agogué H, Germin M, Beaugeard L, Jézéquel V. Effect of bacteria on growth and biochemical composition of two benthic diatoms *Halamphora coffeaeformis* and *Entomoneis paludosa*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2017. Vol. 495. p. 65-74.
30. Kaspar H, Keys E, King N, Smith K, Watson A, Miller M. Continuous production of *Chaetoceros calcitrans* in a system suitable for commercial hatcheries. *Aquac.* 2014. Vol. 420-421. p. 1-9.
31. Khatoon H, Banerjee S, Syakir M, Mat N, Munafi A, Endut A. Re-use of aquaculture wastewater in cultivating microalgae as live feed for aquaculture organisms. *Desalin. Water Treat.* 2016. Vol 57 (60). p. 29295-29302

32. Kimbrel J, Samo T, Ward C, Nilson D, Thelen M, Siccardi A, Zimba P, Lane T, Mayali X. Host selection and stochastic effects influence bacterial community assembly on the microalgal phycosphere. *Algal res.* 2019. Vol 40. p. 101489.
33. Kokou F, Fountoulaki E. Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. *Aquac.* 2018. Vol. 495. p. 295-310.
34. Kong F, Ran Z, Zhang J, Zhang M, Wu K, Zhang R, Liao K, Cao J, Lin Zhang L, Xu J, Yan X. Synergistic effects of temperature and light intensity on growth and physiological performance in *Chaetoceros calcitrans*. *Aquac. Rep.* 2021. Vol 21. p. 100805
35. Kuczynska P, Jemiola-Rzemisnka M, Strzalka K. Photosynthetic pigments in diatoms. *Mar Drugs.* 2015. Vol 13(9). p. 5847-5881.
36. Lépinay A., Turpin V., Mondeguer F., Grandet-Marchant Q., Capiaux H., Baron R., Lebeau T. First insight on interactions between bacteria and the marine diatom *Haslea ostrearia* algal growth and metabolomic fingerprinting. *Algal res.* 2018 (31) p. 395-405
37. Lezama-Cervantes C., Paniagua-Michel J., Zamora-Castro J. Biorremediación de los efluentes de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone,1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 2010, 38(1): 129-142.
38. Ma R, Hou H, Mai K, Bharadwaj A, Ji F, Zhang W. Comparative study on the bioavailability of chelated or inorganic zinc in diets containing tricalcium phosphate and phytate to turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquac.* 2014. Vol. 420-421. p. 187-192.
39. Makut B, Das D, Goswami G. Production of microbial biomass feedstock via co-cultivation of microalgae-bacteria consortium coupled with effective wastewater treatment: a sustainable approach. *Algal Res.* 2019. Vol 37. p. 228-239
40. Marella T K, I.Y. Lopez-Pacheco I Y, Parra-Saldívar R, Dixit S, Tiwari A. Wealth from waste: diatoms as tools for phycoremediation of wastewater and for obtaining value from the biomass. *Sci. Total Environ.* 2020. Vol. 724, Article 137960
41. Marella T. K, Saxena A, Tiwari A. Diatom mediated heavy metal remediation: a review *Bioresour. Technol.* 2020. Vol. 305 , Article 123068
42. Marella T.K., Parine N.R., Tiwari A. Potential of diatom consortium developed by nutrient enrichment for biodiesel production and simultaneous nutrient removal from wastewater. *Saudi J. Biol. Sci.* 2018. Vol. 25, p. 704–709.
43. Martins M, Santos E, Marques C. First study on oyster-shell-based phosphorous removal in saltwater - A proxy to effluent bioremediation of marine aquaculture. *Sci. Total Environ.* 2017. Vol. 574. P. 605-615.
44. Miller M, Quek S, Staehler K, Nalder T, Packer M. Changes in oil content, lipid class and fatty acid composition of the microalga *Chaetoceros calcitrans* over different phases of batch culture. *Aquac. Res.* 2014. Vol. 45(10). p. 1634-1647.
45. Mishra B, Saxena A, Tiwari A. Biosynthesis of silver nanoparticles from marine diatoms *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Thalassiosira* sp., and their antibacterial study, *Biotechnol. Rep.* 2020, volume 724, 137960
46. Misra N, Gupta G, Jha P. Assessment of mineral phosphate-solubilizing properties and molecular characterization of zinc-tolerant bacteria. *J. Basic Microbiol.* 2012. Vol. 52. p.449-558
47. Mohsenpour S, Hennige S, Willoughby N, Adeloye A, Gutierrez T. Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Sci. Total. Environ.* 2021. Vol. 752. 142168
48. Moriarty D. The role of microorganism in aquaculture ponds. *Aquac.* 1997.(151) p. 333-349

49. Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Rodríguez-Cerrato V., Ponte M., Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method dependent. *J. Appl. Microbiol.* 2008. (105) p. 585–590
50. Nielsen T, Biofilm development. *Microbiol. Spectr.* 2015. Vol. 2(3). p. 1-12
51. Nolasco-Soria H. Amylase quantification in aquaculture fish studies: A revision of most used procedures and presentation of a new practical protocol for its assessment. *Aquac.* 2021. Vol. 538. 736536.
52. Orozco-Mosqueda M., Rocha-Granados M., Glick R., Santoyo G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth promoting mechanism. *Microbiol. Res.* 2018 Vol. 208 p. 25-31
53. Puente M, Holguien G, Glick B, Bashan Y. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1999. Vol 23(3). p. 283-292.
54. Qu W, Zhang C, Chen X, Ho S. New concept in swine wastewater treatment: development of a self-sustaining synergetic microalgae-bacteria symbiosis (ABS) system to achieve environmental sustainability. *J. Hazard. Mater.* 2021. Vol 418. 126264
55. Réveillon D, Séchet V, Hess P, Amzil Z. Production of BMAA and DAB by diatoms (*Phaeodactylum tricorutum*, *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros calcitrans* and, *Thalassiosira pseudonana*) and bacteria isolated from a diatom culture. *Harmful Algae.* Vol. 58. p. 45-50.
56. Salama E, Jeon B, Chang S, Lee S, Roh H, Yang I, Kurade M, El-Dalatony M, Kim D, Kim K, Kim S. Interactive effect of indole-3-acetic acid and diethyl aminoethyl hexanoate on the growth and fatty acid content of some microalgae for biodiesel production. *J. Clean. Prod.* 2017. Vol. 168. p. 1017-1024.
57. Sanchez C, Cristóbal G, Bueno G. Diatom identification including life cycle stages through morphological and texture descriptors *Peer J.*, 7 (2019), p. e6770.
58. Schwyn B., Neilands J. Universal CAS assays for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 1987 Vol. 160(1) p. 47-56
59. Seraspe E., Gabotero S., De la Peña M., Pahila I., Amar E. Evaluation of dietary freeze dried *Chaetoceros calcitrans* supplementation to control *Vibrio harveyi* infection on *Penaeus monodon* juvenile. *Aquac.* 2014, (432) p. 212-216
60. Singh P, Bhattacharjya R, Saxena A, Mishra B, Tiwari A. Utilization of wastewater as nutrient media and biomass valorization in marine Chrysophytes- *Chaetoceros* and *Isochrysis*. *Energy Convers. Manag.* 2021. Vol. 769. p. 145217.
61. Sirakov I., Velichkova k. Stoyanova S., Staykov Y., The importance of microalgae for aquaculture industry. *Rev. Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2015. Vol 2(4). p. 81-84.
62. Talapatra N, Gautam R, Mittal V, Ghosh U. A comparative study of the growth of microalgae-bacteria symbiotic consortium with the axenic culture of microalgae in dairy wastewater through extraction and quantification of chlorophyll. *Mater. Today: Proc.* 2021. ISSN 2214-7853.
63. Tantanasarit C., Englande A., Babel S. 2013. Nitrogen, phosphorous and silicon uptake kinetics by marine diatom *Chaetoceros calcitrans* under high nutrient concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2013 (446) p. 67-75
64. Tiwari A., Marella T.K.. Potential and Application of Diatoms for Industry-Specific Wastewater Treatment. *Application of Microalgae in Wastewater Treatment.* Springer, 2019. Netherlands, p. 321–339.

65. Vaseekaran S, Balakumar S, Arasaratnam V. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable  $\alpha$ -amylase. Trop. Agric. Res. 2010. Vol. 22(1). p. 1-11
66. Vasiljević B., Simić S.B., Paunović M., Zuliani T., Krizmanić J., Marković V., Tomović J., Contribution to the improvement of diatom-based assessments of the ecological status of large rivers- the Sava River case study. Sci. Total Environ. 2017. Vol. 605-606. P874-883.
67. Wasmund N., The diatom/Dinoflagellate index as an indicator of ecosystem changes in the Baltic Sea. 2. Historical data for use in determination of good environmental status. Front. Mar. Sci. 2017. Vol 4. p 153.
68. Wirth R, Pap B, Böjti T, Shetty P, Lakatos G, Bagi Z, Kovács K, Maróti G. *Chlorella vulgaris* and Its Phycosphere in Wastewater: Microalgae-Bacteria Interactions During Nutrient Removal. Front. bioeng. biotechnol. 2020. Vol. 8. 557572
69. Xiao Z, Zheng Y, Gudi C, Liu Y, Liao W, Tang Y. Development of a kinetic model to describe six types of symbiotic interactions in a formate utilizing microalgae-bacteria cultivation system. Algal res. 2021. Vol 58. p. 102372.
70. Zhang L, Pei H, Yang Z, Wang X, Chen S, Li Y, Xie Z. Microalgae nourished by mariculture wastewater aids aquaculture self-reliance with desirable biochemical composition. Bioresour. Technol. 2019. Vol 278. p. 205-213.
71. Zhang R., Kong z., Chen S., Ran Z., Ye M., Xu J., Zhou C., Liao K., Cao J., Yan X. The comparative study for psysiological and biochemical mechanisms of *Thalassiosira pseudonama* and *Chaetoceros calcitrans* in response to different light intensities. Algal res. 2017. (27) p. 89-98.