



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE  
CARBOHIDRATOS EN LA MICROALGA *Chlorella*  
spp. ASOCIADA CON LA BACTERIA *Azospirillum*  
*brasiliense*

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

**FRANCISCO JAVIER CHOIX LEY**

La Paz, Baja California Sur, Enero de 2014

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 31 del Mes de Enero del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**Evaluación de la acumulación de carbohidratos totales en la microalga *Chlorella* spp. asociada con la bacteria *Azospirillum brasilense***

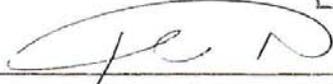
Presentada por el alumno:

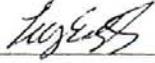
**Francisco Javier Choix Ley**

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

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

### LA COMISION REVISORA

  
\_\_\_\_\_  
DR. YOAV BASHAN  
DIRECTOR DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
DRA. LUZ ESTHELA GONZÁLEZ de-BASHAN  
DIRECTOR DE TESIS

\_\_\_\_\_  
DR. ALBERTO MENDOZA HERRERA  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. HANI ANTOUN  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. FELIPE ASCENCIO VALLE  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. JESÚS ANTONIO CÓRDOVA LÓPEZ  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ELISA SERRERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## RESUMEN

Los carbohidratos son biomoléculas orgánicas compuestas principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, los cuales se clasifican como: **Monosacáridos, Oligosacáridos y Polisacáridos**. En plantas terrestres y microalgas los carbohidratos son encontrados principalmente como polisacáridos, representados mayormente por el almidón; en donde, la biosíntesis y acumulación de almidón esta regulada por la actividad de la enzima ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPase. 2.7.7.27). Actualmente, el almidón generado por plantas y microalgas es un biopolímero considerado de gran importancia debido a su utilidad como alimento, en la industria y la obtención de biocombustibles. Por tal razón, muchos estudios se enfocan en incrementar la biosíntesis y acumulación de almidón en plantas y microalgas.

Por otra parte, la bacteria *Azospirillum brasilense*, es considerada promotora del crecimiento de diversas plantas de interés agrícola y comercial, además de la microalga del genero *Chlorella*. La co-inmovilización de *Chlorella* spp. y *Azospirillum brasilense* en esferas de alginato es propuesta para remover nutrientes (nitrógeno y fósforo) de un medio sintético de crecimiento o agua residual doméstica. Al mismo tiempo *Azospirillum* induce una mayor actividad enzimática de varias cepas de *Chlorella* e incrementa el contenido de pigmentos como clorofila *a* y *b*, luteína y violaxantina, además, provoca un incremento en el contenido de lípidos y la variedad de ácidos grasos en las células de microalga.

En esta investigación se evaluó el efecto de la bacteria promotora del crecimiento de microalgas *Azospirillum brasilense*, sobre la acumulación de carbohidratos totales y almidón de dos especies de *Chlorella* (*C. vulgaris* y *C. sorokiniana*). Cuando la bacteria y cada microalga se encontraban co-inmovilizadas en esferas de alginato y cultivadas en un medio sintético de crecimiento y creciendo bajo regimen autotrófico y heterotrófico. Además, se evaluó el efecto de *Azospirillum* sobre la actividad de la enzima reguladora de la biosíntesis de almidón en *C. vulgaris*, la ADP-Glucosa pirofosforilasa.

La interacción de la bacteria con la microalga aumentó el contenido de carbohidratos totales, principalmente el almidón, por cultivo y por célula de *Chlorella*, así como una mayor actividad de la enzima AGPase de la microalga. Finalmente este estudio demostró que *A. brasilense* tiene la habilidad para incrementar el metabolismo de biosíntesis y acumulación de almidón de *Chlorella*, por lo cuál esta bacteria puede ser considerada un factor biológico que puede cambiar composición celular de las microalgas bajo condiciones autotróficas y heterotróficas.

Palabras Clave: Almidón, *Azospirillum*, Carbohidratos, *Chlorella*

## ABSTRACT

Carbohydrates are organic molecules composed of carbon, hydrogen, oxygen, and are classified as monosaccharides, oligosaccharides and polysaccharides. Polysaccharides are mainly found as starch in higher plants and microalgae. Biosynthesis and accumulation of starch are regulated by the enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase. 2.7.7.27). Starch generated by plants and microalgae are of great importance because they are useful as food, industrial processes, and production of biofuels. For this reason, many studies focus on increasing starch biosynthesis and accumulation in plants and microalgae.

*Azospirillum brasilense* is a bacteria that promotes growth in many plants of agricultural and commercial interest, in addition the microalgae *Chlorella*. Immobilizing *Chlorella* spp. with *Azospirillum* in alginate beads is proposed as a means of removing nitrogen and phosphorus from residual synthetic media or domestic wastewater. Simultaneously, *Azospirillum* spp. induces higher enzymatic activity of various strains of *Chlorella* and increases pigment content of chlorophyll *a* and *b*, lutein, and violaxanthin. These two organisms together increase the lipid content and the variety of fatty acids in the cells of the microalgae.

In this research, we measured the effect on the microalgae of the growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* on the accumulation of total carbohydrates and starch *Chlorella vulgaris* and *C. sorokiniana*. The bacteria and microalgae were immobilized together in alginate beads, cultured in a synthetic residual medium and grown under autotrophic and heterotrophic conditions. We also measured the effect of *Azospirillum* on the activity of the regulatory enzyme (ADP-glucose pyrophosphorylase) on starch synthesis in *C. vulgaris*.

The interaction of *Azospirillum* with the microalgae increased total carbohydrates, mostly starch per culture and per cell of *Chlorella*, as well as increased AGPase enzyme activity of the microalgae. This study showed that *A. brasilense* can increase the activity of the enzyme in synthesizing and accumulating starch in *Chlorella*. Hence, *Azospirillum* is a biological factor that can change cellular composition of microalgae under autotrophic and heterotrophic conditions.

Keywords: *Azospirillum*, carbohydrates, *Chlorella*, starch.

## DEDICATORIAS

*A Dios, por permitirme llegar a estas instancias.*

*A mi esposa María Valdez Cota por hacer este esfuerzo junto conmigo.*

*A mis hijas Itzel Miyuki y María del Cielo, quienes son el mejor aliciente a superarme.*

*A mis Padres, Francisca Ley Ochoa y Francisco Javier Choix López, a quienes eternamente agradeceré por su incansable esfuerzo y apoyo incondicional para lograr mis objetivos.*

*A mis hermanos: Mercedes Ivonne y Jorge Ivan, por todo su apoyo en todos estos años.*

## AGRADECIMIENTOS

Al CIBNOR

A posgrado del CIBNOR por todos los servicios y apoyos brindados durante la formación doctoral, así como el apoyo otorgado con boletos de avión para asistir a congresos y estancias.

A Conacyt por la beca de nivel doctorado (172967) otorgada durante cuatro años, así como la beca asignada para la realización de una estancia nacional.

Al Grupo y laboratorio de Microbiología ambiental del CIBNOR, por todo el apoyo intelectual y técnico brindado para la realización de esta investigación.

A la Bashan Foundation por el apoyo y gratificaciones proporcionadas.

Al Dr. Yoav Bashan y Dra. Luz Estela González de-Bashan por su ejemplo, disciplina de trabajo y formación profesional que transmiten a cada uno de sus estudiantes y colaboradores. Así mismo, por la oportunidad y confianza brindada para realizar este trabajo.

A todos los colaboradores y personal del laboratorio de Microbiología Ambiental: M. en C. Manuel Moreno, M. en C. Juan Pablo Hernández, Dra. Blanca Estela López, Dr. Macario Bacilio; por sus atinados consejos durante el trabajo de laboratorio, discusiones, elaboración de presentaciones, gráficas, estadísticos, entre otros; a todos y cada uno de los integrantes del grupo de Microbiología Ambiental de CIBNOR.

Al comité tutorial, Dr. Alberto Mendoza Herrera, Dr. Felipe Ascencio Valle, Dr. Jesús Antonio Córdova López y Dr. Hani Antoun.

Al Laboratorio de Interacción planta-microorganismo del Centro de Biotecnología Genómica del IPN. Reynosa, Tamaulipas. Dr. Alberto Mendoza, Toñita, Susy, Lulu, Erik, Paola, Cintia. Por transmitirme sus conocimientos, consejos y la calidez de trabajo de su laboratorio.

A mis compañeros, amigos del doctorado e integrantes de la *RETAI*: Oskar Palacios, Manuel Moreno, Luis Leyva, Norma Lagunas, Fernando Pío, Juan Pablo Hernández, Dilian Anguas, Pablo Hernández, Edgar Amavizca, El Batillo (J. Emmanuel Vidaña), Tomas y todos los que conocí y se me pasaron o les cambie el nombre.

A la Maestra Diana Fisher, por su apoyo, asesorías y consejos en la edición en inglés de presentaciones, y por paciencia durante la enseñanza de dicho idioma; a Ira Fogel por su apoyo en la edición en Inglés de manuscritos.

Y todas aquellas personas que de alguna manera u otra colaboraron para llevar a buen puerto esta investigación.....Muchas gracias.

## CONTENIDO

Resumen	iii
Abstract	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xiii
1. Introducción	14
2. Antecedentes	16
2.1. Algas	16
2.1.1. Estrategias de nutrición	16
2.1.2. Composición celular	18
2.1.3. Biosíntesis de almidón	19
2.1.4. <i>Chlorella</i> spp.	21
2.1.5. Aplicaciones de microalgas	24
2.2. <i>Azospirillum</i> spp.	25
2.2.1. Mecanismos de acción de <i>Azospirillum</i> spp.	25
2.2.2. Producción de fitohormonas	26
2.2.3. Usos de <i>Azospirillum</i> spp.	27
2.3. Inmovilización	28
2.3.1. Aplicaciones de la inmovilización	29
2.3.2. Inmovilización de microalgas y bacterias	30
3. Justificación	33
4. Objetivos	34
5. Hipótesis	35
6. Materiales y métodos	36
6.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento iniciales	36
6.2. Inmovilización de microorganismos	36
6.3. Evaluar la acumulación de carbohidratos totales y almidón en <i>C. vulgaris</i> y <i>C. sorokiniana</i> inmovilizadas y co-inmovilizadas con <i>A. brasilense</i> , bajo condiciones autotróficas y heterotróficas utilizando glucosa y acetato de sodio como fuente de carbono	39
6.3.1. Condiciones de cultivo experimentales	39
6.3.2. Diseño experimental y análisis estadísticos	40
6.4. Evaluar el efecto de <i>A. brasilense</i> en la actividad enzimática (AGPase) del metabolismo de acumulación de almidón en <i>Chlorella vulgaris</i> interactuando co-inmovilizadas en esferas de alginato, creciendo bajo régimen heterotrófico	41
6.4.1. Condiciones de cultivo experimentales	41
6.4.2. Diseño experimental y análisis estadísticos	42
6.5. Evaluar el efecto del ácido indolacético (AIA) sobre la actividad de la enzima reguladora de la síntesis de almidón (AGPase) de <i>C. vulgaris</i>	42
6.5.1. Condiciones de cultivo experimentales	42

6.5.2. Diseño experimental y análisis estadísticos	43
6.6. Métodos analíticos	44
6.6.1. Determinación de carbohidratos totales	44
6.6.2. Determinación de almidón	44
6.6.3. Determinación del consumo de la fuente de carbono	44
6.6.4. Cuantificación de la actividad enzimática de la ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPase)	45
6.6.5. Conteo de microorganismos	45
7. Resultados	47
7.1. Evaluar la acumulación de carbohidratos totales y almidón en <i>C. vulgaris</i> y <i>C. sorokiniana</i> inmovilizadas y co-inmovilizadas con <i>A. brasilense</i> , bajo condiciones autotróficas y heterotróficas utilizando glucosa y acetato de sodio como fuente de carbono	47
7.1.1. Autotrófico	47
7.1.1.1. Acumulación de carbohidratos totales	47
7.1.1.2. Crecimiento autotrófico de <i>Chlorella</i> spp.	55
7.1.2. Heterotrófico	56
7.1.2.1. Acumulación de carbohidratos en <i>Chlorella</i> spp. co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> , usando D-glucosa como fuente de carbono	56
7.1.2.1.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	56
7.1.2.1.2. <i>Chlorella sorokiniana</i>	59
7.1.2.2. Consumo de D-glucosa	61
7.1.2.3. Acumulación de carbohidratos en <i>Chlorella</i> spp. co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> , usando acetato de sodio como fuente de carbono	63
7.1.2.3.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	63
7.1.2.3.2. <i>Chlorella sorokiniana</i>	65
7.1.2.4. Consumo de acetato de sodio	67
7.1.2.5. Crecimiento heterotrófico de <i>Chlorella</i> spp.	69
7.2. Evaluar el efecto de <i>A. brasilense</i> en la actividad enzimática (AGPase) del metabolismo de acumulación de almidón en <i>Chlorella vulgaris</i> interactuando co-inmovilizadas en esferas de alginato, creciendo bajo régimen heterotrófico	70
7.2.1. Actividad enzimática de la AGPase de <i>C. vulgaris</i> co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> , usando D-glucosa como fuente de carbono	70
7.2.2. Acumulación de almidón usando D-glucosa como fuente de carbono	75
7.2.3. Consumo de D-glucosa	77
7.2.4. Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	79
7.2.5. Actividad enzimática de la AGPase de <i>C. vulgaris</i> co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> , usando acetato de sodio como fuente de carbono	81
7.3. Evaluar el efecto del ácido indolacético (AIA) sobre la actividad de la enzima reguladora de la síntesis de almidón (AGPase) de <i>C. vulgaris</i>	82
7.3.1. Actividad específica de AGPase en <i>C. vulgaris</i> co-inmovilizada con cepas de <i>A. brasilense</i> silvestres o atenuadas en la producción de AIA	82
7.3.2. Contenido de almidón en <i>C. vulgaris</i> co-inmovilizada con cepas de	

	<i>A. brasilense</i> silvestres o atenuadas en la producción de AIA	85
7.3.3.	Consumo de D-glucosa de <i>C. vulgaris</i> co-inmovilizada con cepas de <i>A. brasilense</i> silvestres o atenuadas en la producción de AIA	86
8.	Discusión	89
9.	Conclusiones	104
10.	Bibliografía	105
11.	Anexos	115

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción fotosintética de carbohidratos y almidón (ciclo de Krebbs) (Barsanti y Gualtier, 2006)	17
Figura 2. Mecanismo acumulación (2a) y ramificación de almidón en plantas y microalgas (Nelson y cox, 2004)	20
Figura 3. Regulación de la síntesis de almidón por 3-fosfoglicerato (Nelson y cox, 2004)	21
Figura 4. Rutas metabólicas utilizadas por las microalgas bajo condiciones heterotróficas (Perez-Garcia <i>et al.</i> , 2011)	23
Figura 5. Estructura del ácido indol-3-acético	27
Figura 6. Interacción de <i>Chlorella</i> spp. y <i>Azospirillum brasilense</i> co-inmovilizadas en una esfera de alginato de calcio (sistema microalga-bacteria) (Lebsky <i>et al.</i> , 2001)	30
Figura 7. Proceso de inmovilización de microalgas y bacterias en esferas de alginato de calcio	38
Figura 8. Vista de una esfera de alginato de calcio con microorganismos inmovilizados	38
Figura 9. Acumulación de (a) carbohidratos totales y (b) almidón en <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada en esferas de alginato con <i>A. brasilense</i> bajo condiciones de crecimiento autotróficas	48
Figura 10. Densidad celular y acumulación de carbohidratos por célula en <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola (a) y co-inmovilizada (b) en esferas de alginato con <i>A. brasilense</i> bajo condiciones de crecimiento autotrófico. (c) Carbohidratos totales (columnas) y el porcentaje de almidón (valor arriba de la columna) después de 24 y 72 h de incubación	50
Figura 11. Acumulación de (a) carbohidratos totales y (b) almidón en <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada en esferas de alginato con <i>A. brasilense</i> bajo condiciones de crecimiento autotróficas	52
Figura 12. Densidad celular y acumulación de carbohidratos por célula en <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada sola (a) y co-inmovilizada (b) en esferas de alginato con <i>A. brasilense</i> bajo condiciones de crecimiento autotrófico. (c) Carbohidratos totales (columnas) y el porcentaje de almidón (valor arriba de la columna) después de 24 y 72 h de incubación	54

Figura 13. (a) Acumulación de carbohidratos totales, (b) Acumulación de almidón, (c) Consumo de glucosa, (d) Crecimiento (línea continua) y acumulación de carbohidratos por célula (columnas) por *C. vulgaris* inmovilizada sola en esferas de alginato. (e) Densidad celular (línea sólida) y acumulación de carbohidratos por célula en *C.vulgaris* co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. (f) Carbohidratos totales (columnas) y porcentaje de almidón (valores arriba de las columnas) a las 24 y 96 h de incubación

57

Figura 14. (a) Acumulación de carbohidratos totales, (b) Acumulación de almidón, (c) Consumo de glucosa, (d) Crecimiento (línea continua) y acumulación de carbohidratos por célula (columnas) por *C. sorokiniana* inmovilizada sola en esferas de alginato. (e) Densidad celular (línea sólida) y acumulación de carbohidratos por célula en *C.sorokiniana* co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. (f) Carbohidratos totales (columnas) y porcentaje de almidón (valores arriba de las columnas) a las 24 h de incubación

60

Figura 15. (a) Acumulación de carbohidratos totales, (b) Acumulación de almidón, (c) Consumo de acetato de sodio, (d) Crecimiento (línea continua) y acumulación de carbohidratos por célula (columnas) por *C. vulgaris* inmovilizada sola en esferas de alginato. (e) Densidad celular (línea sólida) y acumulación de carbohidratos por célula en *C.vulgaris* co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. (f) Carbohidratos totales (columnas) y porcentaje de almidón (valores arriba de las columnas) a las 24 h de incubación

64

Figura 16. (a) Acumulación de carbohidratos totales, (b) Acumulación de almidón, (c) Consumo de acetato de sodio, (d) Crecimiento (línea continua) y acumulación de carbohidratos por célula (columnas) por *C. sorokiniana* inmovilizada sola en esferas de alginato. (e) Densidad celular (línea sólida) y acumulación de carbohidratos por célula en *C.sorokiniana* co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. (f) Carbohidratos totales (columnas) y porcentaje de almidón (valores arriba de las columnas) a las 24 h de incubación

66

Figura 17. Actividad de la AGPase de *C. vulgaris*, *A. brasilense* inmovilizados solos y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato bajo ayuno (- N) y saciada (+ N) de nitrógeno, utilizando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono. Actividad específica de la AGPase (a,c,e,g), actividad por célula de la AGPase (b,d,f,h)

71

Figura 18. Actividad de la AGPase de *C. vulgaris*, *A. brasilense* inmovilizados solos y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato bajo ayuno (- P) y saciada (+ P) de fósforo, utilizando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono. Actividad específica de la AGPase (a,c,e,g), actividad por célula de la AGPase (b,d,f,h)

73

- Figura 19. Acumulación de almidón de *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C.vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato, bajo ayuno de nitrógeno (- N) (a,e) y fósforo (- P) (c,g), o saciada nitrógeno (+ N) (b,f) y fósforo (+ P) (d,h), usando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono 76
- Figura 20. Consumo de la fuente de carbono de *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C.vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato, bajo ayuno de nitrógeno (- N) (a,e) y fósforo (- P) (c,g), o saciada nitrógeno (+ N) (b,f) y fósforo (+ P) (d,h), usando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono 78
- Figura 21. Densidad celular de *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C.vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato, bajo ayuno de nitrógeno (- N) (a,e) y fósforo (- P) (c,g), o saciada nitrógeno (+ N) (b,f) y fósforo (+ P) (d,h), usando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono 80
- Figura 22. Actividad específica de AGPase en *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA, bajo condiciones de ayuno (a) o saciada (b) de nitrógeno; bajo régimen heterotrófico usando glucosa como fuente de carbono 84
- Figura 23. Acumulación de almidón en *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA, bajo condiciones de ayuno (a) o saciada (b) de nitrógeno; bajo régimen heterotrófico usando glucosa como fuente de carbono 87
- Figura 24. Consumo de D-glucosa de *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA, bajo condiciones de ayuno (a) o saciada (b) de nitrógeno; bajo régimen heterotrófico usando glucosa como fuente de carbono 88

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Remoción de nitrógeno y fósforo, acumulación de pigmentos y ácidos grasos en <i>C. vulgaris</i> y <i>C. sorokiniana</i> inmovilizadas y co-inmovilizadas con <i>A. brasilense</i>	31
Tabla 2. Descripción de cepas de <i>Azospirillum brasilense</i> silvestres o atenuadas en la producción de ácido indolacético (AIA)	42
Tabla 3. Análisis general de carbohidratos totales en <i>Chlorella</i> spp. creciendo inmovilizada sola o co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> en esferas de alginato	53
Tabla 4. Análisis general de carbohidratos totales en <i>Chlorella</i> spp. co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> en esferas de alginato en un medio residual sintético bajo condiciones heterotróficas, utilizando D-glucosa como fuente de carbono	62
Tabla 5. Análisis general de carbohidratos totales en <i>Chlorella</i> spp. co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> en esferas de alginato en un medio residual sintético bajo condiciones heterotróficas, utilizando acetato de sodio como fuente de carbono	68
Tabla 6. Análisis general de almidón en <i>C. vulgaris</i> co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> en esferas de alginato creciendo en ayuno o saciada de nutrientes y bajo condiciones heterotróficas, usando glucosa como fuente de carbono	77
Tabla 7. Análisis general de almidón en <i>C. vulgaris</i> co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> en esferas de alginato creciendo en ayuno o saciada de nutrientes y bajo condiciones heterotróficas, usando acetato de sodio como fuente de carbono	82

## 1. INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son biomoléculas orgánicas compuestas principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, los cuales se clasifican en tres clases (Nelson y Cox, 2004): 1. **Monosacáridos** o azúcares simples, son pequeñas moléculas de tres a nueve átomos de carbono; dentro de los cuales el más representativo es la glucosa, aldosa de seis átomos de carbono. 2. **Oligosacáridos**, consisten de cadenas cortas de monosacáridos unidas por enlaces glucosídicos, los más abundantes son los disacáridos, formados por la unión de dos monosacáridos; el más representativo es la sacarosa formado por la unión de una molécula de glucosa y fructosa. 3. **Polisacáridos**, son polímeros que contienen más de 20 unidades de monosacáridos, alcanzando más de mil unidades. Esta última clase de carbohidratos está representada principalmente por el almidón, glucógeno, celulosa y quitina.

Los carbohidratos cumplen múltiples funciones, por ejemplo: 1) reserva de energía e intermediarios metabólicos. 2) forman parte de la red estructural del ADN y ARN. 3) son elementos estructurales de las paredes celulares de plantas y microorganismos. 4) unidos a proteínas o lípidos forman glicoconjugados, los cuales actúan como intermediarios en la interacción entre células o con el medioambiente celular (Berg *et al.*, 2008).

En algas y plantas terrestres los carbohidratos se encuentran principalmente como polisacáridos: almidón (reserva de energía) y celulosa (forma parte de la pared celular); mientras que en bacterias y animales se encuentran como glucógeno (reserva de energía). La síntesis de almidón y glucógeno comparten la misma maquinaria metabólica y enzimática, donde la enzima reguladora es la ADP – Glucosa pirofosforilasa (AGPase. 2.7.7.27) (Ballicora *et al.*, 2004).

Actualmente, el almidón generado por plantas y algas es un biopolímero considerado de gran importancia debido a su utilidad como alimento (Keeling y Myers, 2010). Además de su utilidad en la industria y la obtención de biocombustibles (bioetanol). Hoy en día,

debido a la importancia que representan los carbohidratos, principalmente el almidón, muchos estudios se enfocan en incrementar el contenido del mismo en plantas terrestres y microalgas, en estas últimas, aprovechando su alta eficiencia fotosintética y altas tasas de crecimiento bajo condiciones fotoautotróficas y heterotróficas (Brányiková *et al.*, 2011; Dragone *et al.*, 2011).

Por otra parte, la bacteria *Azospirillum brasilense* es considerada promotora del crecimiento de plantas y microalgas (de-Bashan *et al.*, 2004). Esta bacteria, induce cambios fisiológicos en la microalga *Chlorella* spp. generando un incremento en el contenido de pigmentos, lípidos y variedad de ácidos grasos; así como, un incremento en el diámetro de la microalga y la densidad celular (de-Bashan *et al.*, 2002). Para lograr estos efectos benéficos, *Azospirillum* se vale de diversos mecanismos como: la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, entre otros (Bashan y de-Bashan, 2010). Sin embargo, hoy en día se atribuyen estos beneficios principalmente a la producción de fitohormonas, como el ácido indolacético (AIA) (de-Bashan *et al.*, 2008a). Aunque se desconoce si es solamente un mecanismo el que induce los efectos observados, o bien, es la interacción de múltiples mecanismos actuando al mismo tiempo (Bashan *et al.*, 2004).

Al día de hoy, no existen estudios de la influencia de *Azospirillum* sobre el metabolismo de biosíntesis de carbohidratos de *Chlorella* spp. o alguna otra microalga. Por tal razón, esta investigación pretende evaluar el efecto de la bacteria *Azospirillum brasilense* sobre el metabolismo de biosíntesis y acumulación de carbohidratos totales y almidón de *Chlorella* spp. bajo condiciones autotróficas y heterotróficas. Cuando ambos microorganismos se encuentran interactuando co-inmovilizados en esferas de alginato y creciendo bajo condiciones autotróficas y heterotróficas. De esta manera se pretende ampliar el conocimiento de la interacción mutualista de una bacteria promotora del crecimiento de plantas y una microalga bajo diferentes condiciones de cultivo, así mismo, la capacidad de esta bacteria promotora del crecimiento de microalgas para utilizarse en diferentes campos biotecnológicos.

## 2. ANTECEDENTES

### *2.1. Algas*

Las algas son un grupo muy heterogéneo de organismos acuáticos fotosintéticos, contienen clorofila y una estructura simple, exhiben una remarcable diversidad de formas, tamaños y existen en la mayoría de los ecosistemas (Tomaselli, 2004); pero su mayor distribución se encuentra en el agua, la cual cubre un 70% de la superficie de la tierra y se encuentran desde una sola célula en suspensión (microalga) o bien, agrupadas en varios metros de longitud (macroalgas). Las microalgas son importantes productores primarios de materiales orgánicos por lo que juegan un rol crítico en el medioambiente (Round, 1974). Según Patil *et al.* (2008) las microalgas son fábricas bioquímicas en miniatura y más eficientes fotosintéticamente que las plantas terrestres, en un rango de eficiencia mayor de 10 a 20% (Li, 2008). Por tal razón, hoy en día la importancia del cultivo de las microalgas ha incrementado, no solo por la producción de compuestos de interés comercial sino también desde un punto de vista medioambiental (Ogawa y Aiba, 1981).

#### *2.1.1. Estrategias de Nutrición*

Las microalgas son consideradas autótrofas, es decir, que dependen enteramente de su aparato fotosintético para sus necesidades metabólicas, utilizando la luz solar como fuente de energía y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como fuente de carbono inorgánica para producir carbohidratos y ATP (Figura 1) (Barsanti y Gualtieri, 2006).

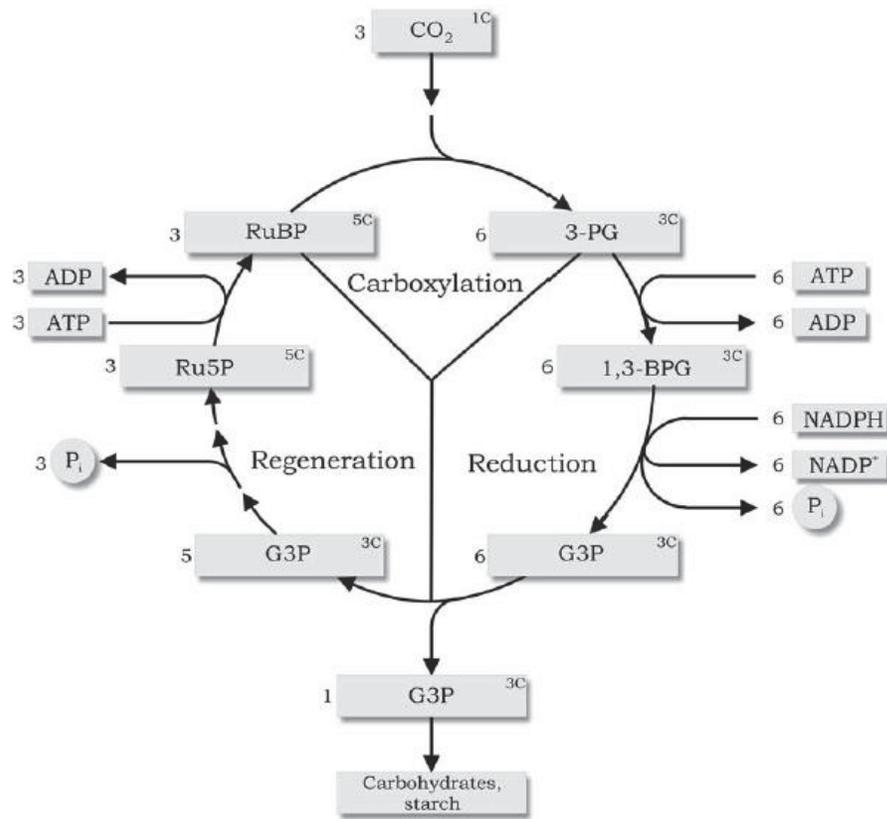


Figura 1. Producción fotosintética de carbohidratos y almidón (Tomado de Barsanti y Gualtieri, 2006).

Sin embargo, algunas microalgas tienen la habilidad de utilizar carbono de manera inorgánica ( $\text{CO}_2$ ) y/o orgánica (glucosa, acetato, glicerol etc.), por lo cual, su metabolismo de nutrición puede ser dividido en cuatro tipos (Markou *et al.*, 2012):

1. **Fotoautotrofia:** La única fuente de energía y carbono es la luz solar y el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) respectivamente.
2. **Heterotrofia:** La única fuente de energía y carbono es un compuesto orgánico como: glucosa, acetato, glicerol entre otras.
3. **Fotoheterotrofia:** Utiliza la luz solar como fuente de energía y compuestos orgánicos como fuente de carbono.
4. **Mixotrofia:** La única fuente de energía es la luz solar y utiliza  $\text{CO}_2$  y compuestos orgánicos como fuente de carbono.

El modo de nutrición utilizado por la microalga generalmente influye en la tasa de crecimiento, la densidad celular y la composición de la biomasa microalgal (Bumbak *et al.*, 2012; Markou *et al.*, 2012).

A pesar de que el régimen de crecimiento fotoautotrófico de las microalgas es muy común, el crecimiento heterotrófico presenta mayores ventajas; esto se debe a que la tasa de crecimiento, la biomasa seca y la generación de ATP por fuente de carbono orgánica suministrada son significativamente más altos que durante el crecimiento autotrófico (Perez-Garcia *et al.*, 2010). Actualmente, este mayor desempeño es la motivación para el cultivo heterotrófico de microalgas. Por ejemplo: la biomasa de *Chlamydomonas humicola* aumenta 5 veces cuando crece de manera heterotrófica usando acetato como fuente de carbono, mientras que *Scenedesmus acutus* creció 6 veces más usando melaza (Chu *et al.*, 1995). La tasa de crecimiento de *Chlorella vulgaris* creciendo de manera heterotrófica usando glucosa o acetato de sodio (ambos al 1%), aumentó 9 y 7 veces respectivamente, comparado con su crecimiento de manera autotrófico (Liang *et al.*, 2009). Por otra parte, el crecimiento mixotrófico presenta una estrategia para obtener altas tasas de crecimiento con el beneficio de obtener metabolitos fotosintéticos (Yu *et al.*, 2009; Perez-Garcia *et al.*, 2010).

### **2.1.2. Composición celular**

Los principales componentes de la biomasa de las microalgas son las proteínas, lípidos y carbohidratos, los cuales en conjunto constituyen hasta el 90 % del peso seco total; mientras que los minerales, ácidos nucleicos, pigmentos, vitaminas y otros componentes menores suman el restante 10% (Becker, 1994; Bumbak *et al.*, 2011).

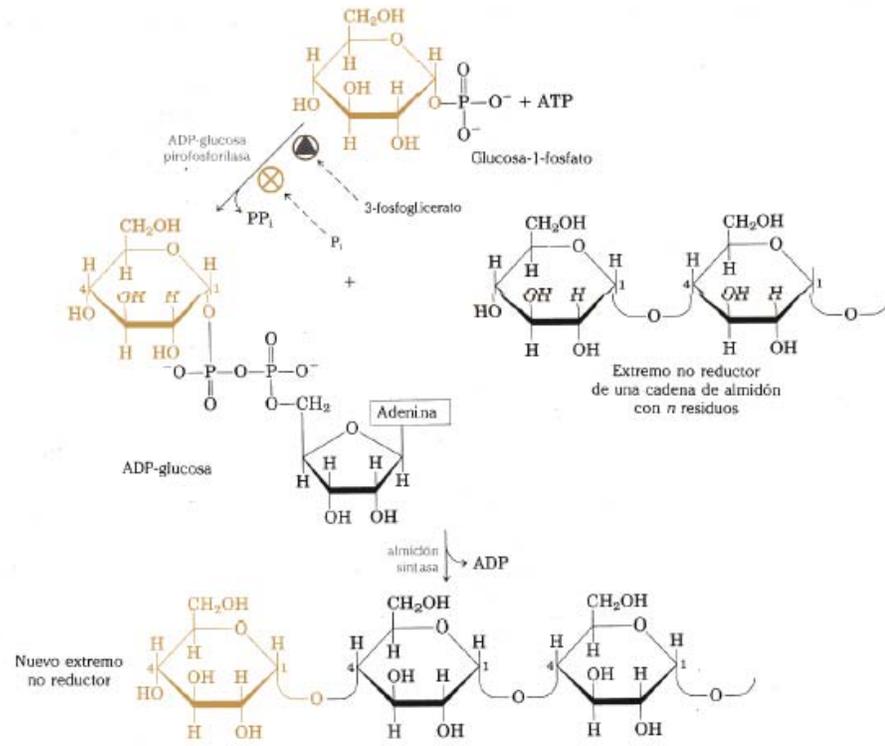
Varios estudios han demostrado que la composición celular de las microalgas puede ser afectada por varios factores físicos o químicos (Dragone *et al.*, 2011) como la intensidad de la luz, composición del medio de cultivo, las condiciones de crecimiento, pH, entre otros (Yeh *et al.*, 2010; Bumbak *et al.*, 2011; Markou *et al.*, 2012). Incluso el modo de nutrición de la microalga (autotrófico o heterotrófico) influye en su composición celular (Markou *et al.*, 2012). En el régimen de crecimiento heterotrófico de las microalgas, la fuente de carbono orgánica utilizada también es un factor que influye en la composición celular (Chu *et al.*, 1995; Isleten-Hosoglu *et al.*, 2012). Por

tal razón, el control en las condiciones de cultivo de microalgas es una estrategia para manipular su composición celular y maximizar la acumulación del compuesto deseado (Bumbak *et al.*, 2011; Markou *et al.*, 2012).

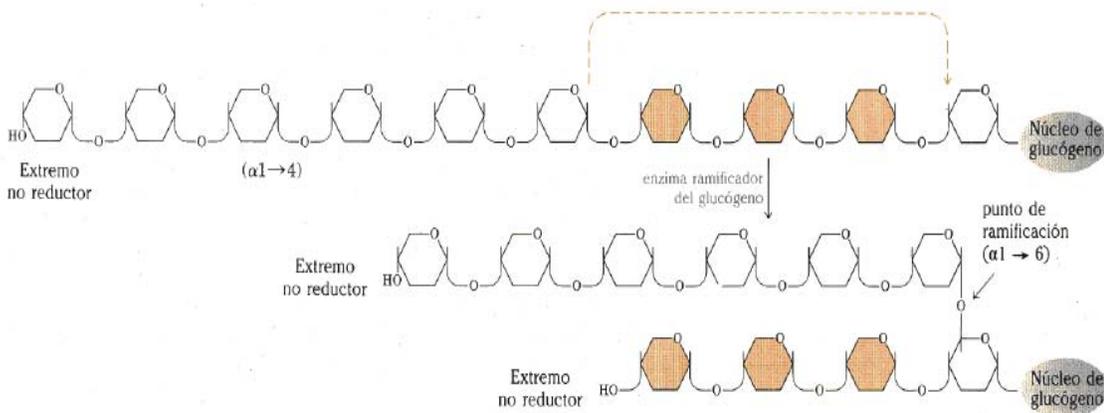
### **2.1.3 Biosíntesis de almidón**

El almidón es un homopolímero de glucosa usado para almacenar energía en las microalgas, formado de una mezcla de dos compuestos: amilosa y amilopectina. El almidón es rápidamente disponible para obtener energía para la biosíntesis de proteínas, pigmentos y división celular (Stewart, 1974; Wang *et al.*, 2010). Las propiedades del almidón de las microalgas se asemejan al almidón de cereales (Becker, 1994) así como el metabolismo y las enzimas involucradas en su biosíntesis (Stewart, 1974; Ballicora *et al.*, 2004). La biosíntesis de almidón involucra tres pasos: la activación de la glucosa, la elongación de la cadena de almidón y la ramificación de la misma (Ballicora *et al.*, 2004). El paso más importante en la síntesis de almidón es la activación de la glucosa, convirtiéndola en adenosin-nucleosidodifosfato (ADPglu) cuya función es la de transportar la molécula de glucosa para la elongación de la cadena de almidón. La formación del ADPglu es catalizada por la enzima ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPase; E.C.2.7.7.27); la cuál condensa una molécula de glucosa-6-fosfato y una molécula de ATP para la formación de ADPglu (ver figura 2a). La almidón sintasa (E.C.2.4.1.21) cataliza la elongación de la cadena almidón mediante la transferencia de la molécula de glucosa del ADPglu al extremo no reductor de la cadena de polisacárido ya existente, a través de la formación de enlaces glucosídicos  $\alpha$  1-4 (ver figura 2a). Finalmente la enzima ramificadora de almidón, glucosil (4-6) transferasa (E.C.2.4.1.18) cataliza la transferencia de un fragmento terminal de seis o siete moléculas de glucosa desde el extremo no reductor de una cadena de almidón al grupo hidroxilo en C-6 de la misma cadena o de otra cadena de almidón, formando enlaces glucosídicos  $\alpha$  1-6 (ver figura 2b). Sin embargo, la síntesis de almidón está regulada por la enzima ADP-Glucosa pirofosforilasa (Nakamura e Imamura, 1985; Iglesias *et al.*, 1994; Ballicora *et al.*, 2004).

616



2a



2b

Figura 2. Biosíntesis (2a) y ramificación (2b) de almidón en plantas y microalgas (Tomado de Nelson y Cox, 2004).

### 2.1.4. *Chlorella* spp.

El género *Chlorella* es una microalga verde, simple, inmóvil, unicelular, mide de 2-10  $\mu\text{m}$  y tiene el potencial para producir a partir de  $\text{CO}_2$  y energía solar una gran variedad de compuestos como polisacáridos, lípidos, proteínas, carotenoides, pigmentos, vitaminas, enzimas, compuestos farmacéuticos entre otros (Becker, 1994; Lebeau y Robert, 2006).

Algunas especies de *Chlorella* tienen la habilidad para crecer de manera heterotrófica, es decir, en completa oscuridad. Bajo este régimen de crecimiento *Chlorella* requiere una fuente de carbono para mantener su crecimiento; para lo cual, la D-glucosa y acetato sodio son las fuentes de carbono preferidas de esta microalga (Chen y Chen, 2006, Perez-Garcia *et al.*, 2011). Posteriormente la fuente de carbono utilizada es convertida en los componentes celulares de la microalga como: lípidos, proteínas y carbohidratos, principalmente almidón (Barsanti y Gualtieri, 2006; John *et al.*, 2011; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Bajo régimen de crecimiento autotrófico o heterotrófico, uno de los componentes más importantes de la biomasa de las microalgas es el contenido de carbohidratos, principalmente el almidón. Bajo condiciones autotróficas; *Chlorella* utiliza la fotosíntesis para producir y acumular carbohidratos y ATP; y utiliza el almidón como el principal compuesto para almacenar carbono y energía (Barsanti y Gualtieri, 2006). Durante la fotosíntesis, se produce una molécula de 3-fosfoglicerato, este compuesto es una molécula que representa un alto contenido de energía y carbono dentro de la célula, activando la enzima reguladora de la síntesis de almidón ADP-Glucosa pirofosforilasa (Nelson y Cox, 2004; Li *et al.*, 2011) (ver figura 3).

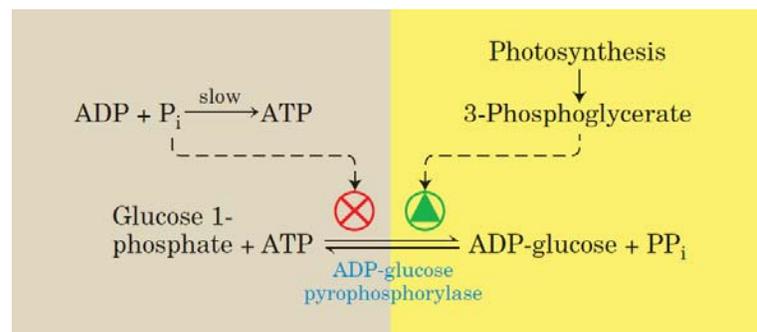


Fig. 3. Regulación de la síntesis de almidón por 3-fosfoglicerato (Tomado de Nelson y Cox, 2004).

Bajo condiciones autotróficas, *Chlorella* tiene una alta capacidad para acumular almidón. Por ejemplo: *Chlorella vulgaris* P12 tiene la capacidad de acumular almidón en un 41% de peso seco; mientras que otras cepas de *C. vulgaris* acumulan hasta un 55 % de peso seco bajo condiciones de limitación de nutrientes (Beherns *et al.*, 1989; Dragone *et al.*, 2011).

Por otra parte, varias especies de *Chlorella* tienen la capacidad de crecer bajo condiciones heterotróficas, en completa oscuridad. Durante el crecimiento heterotrófico, la fuente de carbono asimilada mediante diferentes rutas metabólicas influye en su composición celular; por ejemplo: la glucosa es metabolizada principalmente mediante la ruta de las pentosas fosfatos (PPP, por sus siglas en inglés); mientras que el acetato de sodio es metabolizado por el ciclo del glioxilato (ver figura 4). Para optimizar la composición celular deseada en la microalga creciendo heterotróficamente es esencial suministrar la fuente de carbono adecuada (Chu *et al.*, 1995).

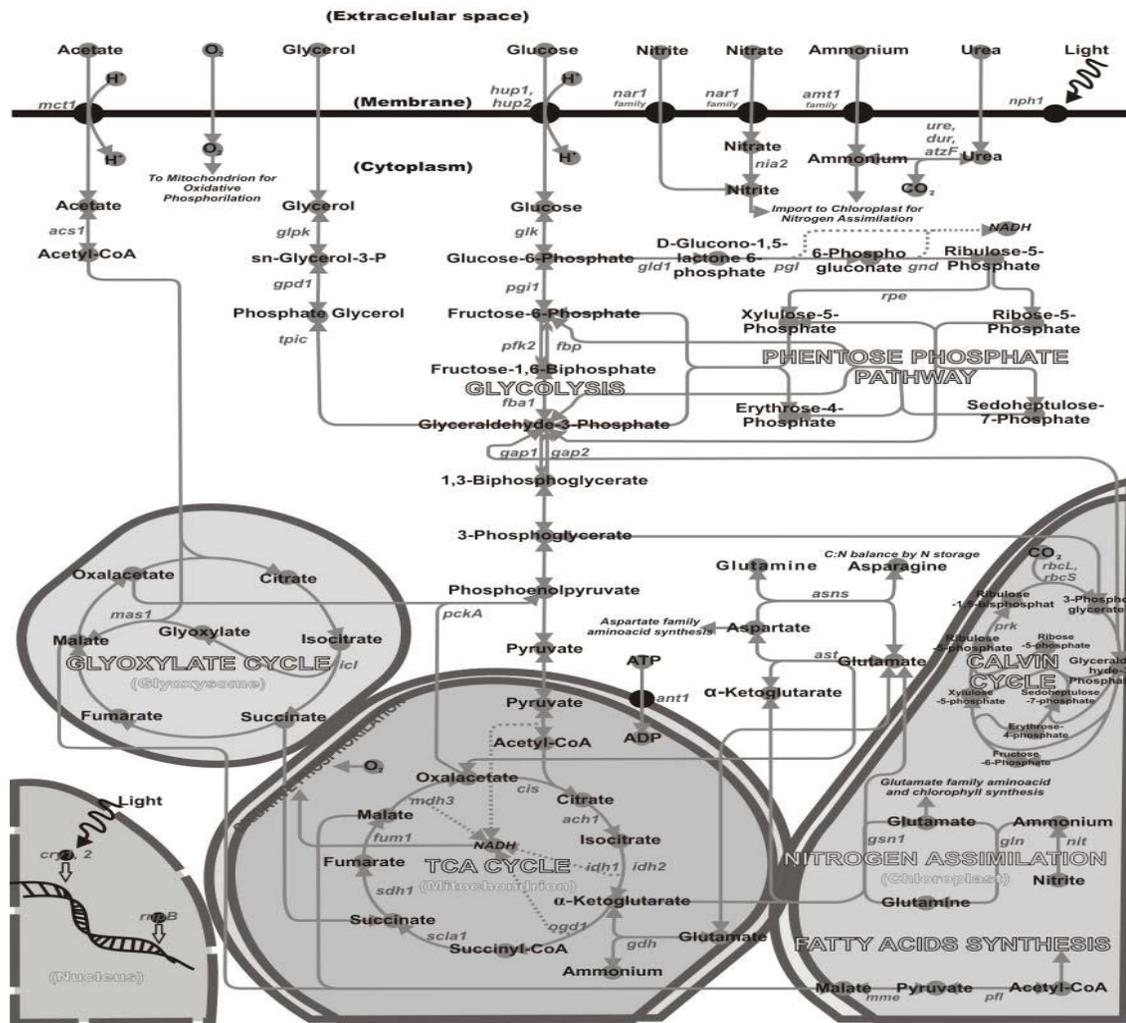


Fig. 4. Rutas metabólicas utilizadas por las microalgas bajo condiciones heterotróficas (Tomado de Perez-García *et al.*, 2011).

Hoy en día, se realizan estudios para incrementar la acumulación de almidón en las microalgas, aprovechando su alta tasa de crecimiento bajo condiciones autotróficas y heterotróficas, principalmente para la obtención de etanol (Behrens *et al.*, 1989; Nguyen *et al.*, 2009; Brányiková *et al.*, 2011; Dragone *et al.*, 2011).

Para lograr el incremento en el contenido de almidón, actualmente se utilizan diversas estrategias, entre las cuales se encuentran: 1. Obtención de mutantes mediante ingeniería genética (Work *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2010). 2. Aumento en la actividad de la enzima AGPase (Slattery *et al.*, 2000; Smith, 2008; Radakovits *et al.*, 2010; Rismani *et al.*, 2011), y 3. Cultivo de las microalgas bajo condiciones de estrés nutricional (ayuno o limitación de nutrientes) (Brányiková *et al.*, 2011; Dragone *et al.*, 2011). Según MacIntyre y Cullen (2005), el ayuno de nutrientes se define como el crecimiento

desbalanceado de la microalga en respuesta a la ausencia de uno o varios nutrientes; y la limitación de nutrientes se define como un crecimiento reducido de la microalga en respuesta a la baja concentración de uno o varios nutrientes.

Bajo estrés nutricional, la microalga es cultivada bajo la ausencia de uno o varios macro o micronutrientes, como por ejemplo: nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio, magnesio, fierro, entre otros (Ball *et al.*, 1990; González-Fernández y Ballesteros, 2012; Markou *et al.*, 2012). Si un nutriente es limitado u omitido del medio de cultivo, la microalga cambia su estrategia metabólica resultando en la alteración de su composición celular, generalmente relacionada con la acumulación de lípidos o almidón (Markou *et al.*, 2012).

### ***2.1.5. Aplicaciones de las microalgas***

Las microalgas juegan un pequeño pero importante rol en la economía de muchos países; por ejemplo: son utilizadas como alimento, ya sea para consumo humano o animal, biocombustibles y como fertilizantes orgánicos. A estos microorganismos también se les atribuye aproximadamente un 50% de la fijación del carbono atmosférico, además de ayudar a resolver problemas públicos por medio del tratamiento de aguas residuales (Becker, 1994). En trabajos científicos las microalgas son utilizadas como importantes herramientas de investigación en muchos procesos bioquímicos, ingeniería genética, morfología y fisiológicos; como fotosíntesis, fijación de nitrógeno, absorción de iones, metales entre otros (Round, 1974).

Actualmente, se realizan estudios acerca del potencial de las microalgas como una fuente de biocombustibles (biodiesel y etanol), aprovechando la capacidad para acumular lípidos (Chisti *et al.*, 2011) y almidón (Behrens *et al.*, 1989; Brányiková *et al.*, 2011; Dragone *et al.*, 2011). Sin embargo, la utilidad más estudiada y aplicada para las microalgas por más de una década es el tratamiento de aguas residuales, ya que las microalgas ofrecen una solución durante el tratamiento terciario de aguas residuales, debido a su habilidad para utilizar nitrógeno y fósforo (los cuales son los principales causantes de eutrofización de cuerpos de agua) durante su crecimiento (de la Noue *et al.*, 1992). Visto desde otro ángulo, este hecho es importante, puesto que el uso de aguas residuales municipales para cultivar microalgas, puede evitar la necesidad de agua

potable para su crecimiento, reducir costos y además, la biomasa microalgal es un recurso valioso para múltiples usos (Bhatnagar *et al.* 2009).

Con base en lo anterior, y a la necesidad de contar con una fuente alternativa de energía debido a los altos costos de los combustibles derivados del petróleo y su escasez. Y así mismo, a que día con día, la sociedad tiene mayor conciencia del problema de la contaminación del medio ambiente y la disposición de desechos peligrosos; las microalgas se tornan una vez más como una fuerte alternativa para incidir positivamente en estos aspectos.

## **2.2. *Azospirillum* spp.**

El género *Azospirillum* está constituido por bacterias Gram negativas heterotróficas, que presentan forma de bacilo como un bastón curvilíneo, miden entre 0.8-1.0 x 25  $\mu\text{m}$  de tamaño con gránulos de polidroxibutirato (PHB), los cuales pueden alcanzar hasta 50% del peso seco de la bacteria (Hartmann y Baldani, 2006). Las bacterias del género *Azospirillum* spp. han sido aisladas de la superficie de la raíz y su rizosfera de una gran variedad de plantas de interés económico, tal como maíz, trigo, sorgo, avena, arroz y pastos forrajeros (Bashan y Levanony, 1990).

Numerosos estudios demuestran que la inoculación con *Azospirillum* puede beneficiar a las plantas mediante mejoras en el sistema de raíz de la planta, debido a que el *Azospirillum* promueve la elongación de la raíz, el desarrollo de raíces laterales y pelos radiculares, con lo cual aumenta la absorción de agua, minerales y nutrientes (Okon y Kapulnik, 1986; Bashan y Holguín, 1997; Aguilar *et al.*, 2008).

### **2.2.1. *Mecanismos de acción de Azospirillum* spp.**

La capacidad de *Azospirillum* spp. para beneficiar el crecimiento y rendimiento de los cultivos inoculados, se debe a diversos mecanismos, tales como efectos hormonales mediante la producción de ácido indolacético (AIA) (Croizer *et al.*, 1998; Dobbelaere *et al.*, 1999), ácido abscísico (ABA) (Cohen *et al.*, 2008), ácido indolbutírico (Martínez *et al.*, 2003), giberelinas (Botini *et al.*, 1989), citocininas (Tsavkelova *et al.*, 2006), fijación de nitrógeno (Holguín y Bashan, 1996), la solubilización de fosfatos,

mitigación de estrés, control biológico, producción de etileno, óxido nítrico, entre otros (Bashan y de-Bashan, 2010). Además, una hipótesis aditiva indica que el efecto se debe a la interacción de todos los mecanismos mencionados anteriormente (Bashan *et al.*, 2004). Por lo tanto, las bacterias del género *Azospirillum* son consideradas promotoras del crecimiento de plantas (PGPB, por sus siglas en inglés). No se conoce si solamente interviene un mecanismo o la secuencia de varios mecanismos al mismo tiempo, durante el efecto benéfico de la bacteria en las plantas (Bahan y Holguín, 1997; Bashan y de-Bashan, 2010). Sin embargo, el modo de acción más estudiado hasta el momento y a quien se le atribuye en base a los resultados obtenidos en otras investigaciones y los beneficios observados en la planta, es la producción de fitohormonas (Spaepen y Dobbelaere, 2008).

### **2.2.2. Producción de fitohormonas**

Las fitohormonas son moléculas orgánicas que actúan como mensajeros químicos y controlan el crecimiento y desarrollo de la planta. Así mismo, tienen la capacidad de desencadenar una respuesta bioquímica, fisiológica y morfológica en la planta (Bashan y de-Bashan, 2010), así como incrementar la resistencia a factores ambientales e inducir o suprimir la expresión de genes y la síntesis de metabolitos (Timmusk y Wagner, 1999; Tsavkelova *et al.*, 2006; Bashan y de-Bashan, 2010). Por lo que representan un rol muy importante en el crecimiento y desarrollo de la planta (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Estas fitohormonas son indispensables como mediadores en la comunicación entre la bacteria y la planta. *Azospirillum* spp. son conocidas por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico además de su habilidad para producir fitohormonas, principalmente auxinas, citocinas y giberelinas, aunque la producción de auxinas es cuantitativamente la más importante (Bashan *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2008, Spaepen y Dobbelaere, 2008).

Las auxinas son responsables de la división y diferenciación celular en las plantas, afectar la fotosíntesis, formación de pigmentos y biosíntesis de varios metabolitos (Aguilar *et al.*, 2008; Tsavkelova *et al.*, 2006). Existen diversos tipos de auxinas como el ácido indolbutírico (AIB), indolpropionico (IPA); aunque el miembro más abundante

y quien exhibe la mayor actividad de esta familia es el ácido indolacético (AIA). El AIA es un compuesto heterocíclico que contiene un grupo carboximetilo (ver figura 5) (Massena-Reies *et al.*, 2011). A este compuesto se le atribuye el afectar diversas funciones y alteraciones del metabolismo, rendimiento y crecimiento de las plantas (Bashan *et al.*, 1993). de-Bashan *et al.* (2008) demostraron que la inoculación de AIA sintético imita la inoculación con *Azospirillum* en la morfología, rendimiento y crecimiento de la planta. Aunque no existe una cepa mutante de *Azospirillum* inhibida completamente de su producción de AIA, varios estudios demuestran que cepas mutantes, atenuadas en su producción de AIA son inefectivas en comparación con sus cepas silvestres. Sin embargo, mutantes sobreproductores de AIA mostraron marcados efectos en las plantas (Bashan y de-Bashan, 2010).

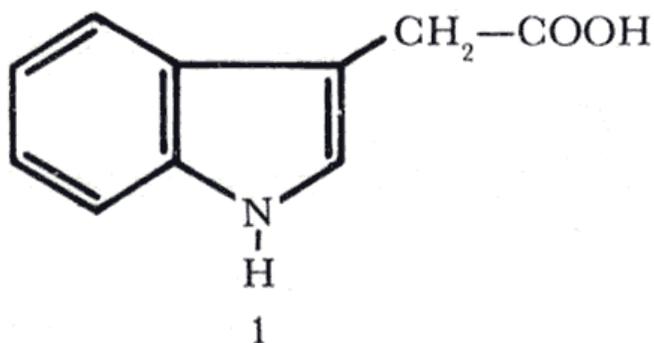


Figura 5. Estructura del ácido indol-3-acético (AIA).

### 2.2.3. Usos de *Azospirillum* spp.

El principal uso de *Azospirillum* se encuentra en la agricultura, y es un excelente modelo para estudios genéticos de las interacciones planta-bacteria. Sin embargo, su uso no solo se limita a actividades agrícolas, sino también a diversas actividades como producción de  $\beta$ -polihidroxibutirato para uso médico, degradación de contaminantes, producción de vitaminas y purificación de aguas residuales (Bashan y Holguín, 1997). Recientemente ha surgido el uso de *Azospirillum* para inocular plantas acuáticas y terrestres para resolver problemas ambientales, por ejemplo: la bioremediación de aguas residuales (de-Bashan *et al.*, 2002; de-Bashan *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2006; de-Bashan *et al.*, 2008c).

### 2.3 Inmovilización

Hoy en día, la inmovilización de células para diferentes propósitos ambientales es de gran importancia (Serp *et al.*, 2000; Pruse *et al.*, 2008). La inmovilización de microorganismos, células vegetales y células animales, han añadido nuevas fronteras de estudio dentro de la biotecnología (Iqbal y Saeed, 2004).

Según Tampion y Tampion (1987), una célula inmovilizada, se define como una célula que por medios naturales o artificiales no puede desplazarse de manera independiente desde su localización original a cualquier parte de una fase acuosa o sistema bajo estudio.

Actualmente, una gran variedad de matrices se han utilizado para la inmovilización celular, como polímeros naturales (carragenina, agar, alginato de calcio, quitosano) y polímeros sintéticos (poliacrilamida, poliuretano, polivinilo, resinas). Aunque, la inmovilización en matrices de origen natural es la técnica preferida debido a que se eliminan los problemas de toxicidad relacionados con las matrices poliméricas sintéticas (Iqbal y Saeed, 2004; de-Bashan y Bashan, 2010).

El alginato es un polímero orgánico, obtenido de algas marinas pardas principalmente *Macrocystis pyryfera* y *Laminaria hyperborea* (Moreno-Garrido, 2008). El alginato está formado por cadenas de monómeros de ácido D-manúnorico (M) y ácido L-gulurónico (G) en proporciones y arreglos secuenciales diferentes (Martinsen *et al.*, 1987; Martinsen *et al.*, 1992). Los alginatos son relativamente baratos en comparación con otras matrices poliméricas, no tóxicas, transparentes (Ideal para atrapar microorganismos fotosintéticos), estables y fácil de usar (Moreno-Garrido, 2008).

La inmovilización es benéfica para los microorganismos atrapados dentro de la matriz, ya que los protege de las condiciones extremas del medioambiente exterior, evita la depredación, reduce la competencia por los nutrientes con otros microorganismos, lo que provoca una mejora de la actividad metabólica del microorganismo (de-Bashan y Bashan, 2010). Durante el proceso de inmovilización por atrapamiento en gel de alginato, la célula inmovilizada no sufre cambios en su condición física y química; por lo cual la inmovilización puede mantener viables a microorganismos durante largos períodos de tiempo (Moreno-Garrido, 2008; Stephenson *et al.*, 2010).

### ***2.3.1. Aplicaciones de la inmovilización***

La inmovilización de microorganismos tiene múltiples funciones en diferentes áreas como: medicina, agricultura, medioambiente, almacenamiento celular, producción de biomasa, manejo de microorganismos, eliminación de nutrientes de aguas residuales entre otros (Serp *et al.*, 2000; Sayed y Ebrahim, 2007; Moreno-Garrido, 2008; de-Bashan y Bashan, 2010).

Actualmente, la inmovilización de microalgas es usada con una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas (de-Bashan y Bashan, 2010); una de ellas es la aplicación de microalgas inmovilizadas como una alternativa biológica al tratamiento terciario de aguas residuales (Ruíz-Marín *et al.*, 2010; Stephenson *et al.*, 2010). Hace más de una década se demostró que las microalgas son microorganismos capaces de remover contaminantes de aguas residuales (De la Noue *et al.*, 1992); sin embargo, una de las limitaciones técnicas de esta aplicación es la cosecha de las grandes cantidades de biomasa que se genera y uno de los métodos sugeridos para resolver este problemas es la inmovilización de las microalgas en polímeros (Serp *et al.*, 2000; Sayed y Ebrahim, 2007; Moreno-Garrido, 2008; de-Bashan y Bashan, 2010).

El uso de microalgas inmovilizadas es investigado actualmente debido a su capacidad de acumular y remover materiales de desecho, principalmente nitrógeno y fósforo de aguas residuales y remoción de metales pesados como cadmio, cobre, cromo, cobalto, oro, hierro, plomo, níquel, mercurio, uranio, zinc entre otros; además de utilizarse para eliminar contaminantes de aguas residuales industriales como: surfactantes, hidrocarburos y biocidas (de-Bashan y Bashan, 2010).

### 2.3.2. Inmovilización de microalgas y bacterias

El uso de dos o más microorganismos en una simbiosis mutualista, con la finalidad de mejorar el desempeño de los involucrados para una función específica es bien conocido. Por ejemplo, co-cultivos de *C. sorokiniana* y *Ralstonia basilensis* degradaron silicato de sodio y acetonitrilo; y el efecto positivo de bacterias marinas en diatomeas, es conocido por décadas (de-Bashan *et al.*, 2008).

A pesar de los ambientes distintos a los que pertenecen ambos microorganismos (acuático y terrestre), la co-inmovilización de la microalga *Chlorella* spp. y la bacteria *Azospirillum brasilense* en esferas de alginato de calcio, para remover nutrientes (Nitrógeno y Fósforo) de agua residual doméstica o un medio residual sintético, es una tecnología innovadora en el tratamiento de aguas residuales. En esta, la interacción entre ambos microorganismos es asegurada por la proximidad que mantienen dentro de la esfera de alginato de calcio (ver Figura 6) (González y Bashan, 2000).

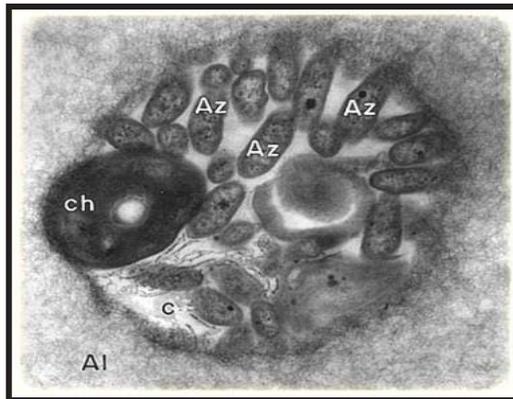


Figura 6. Interacción de *Chlorella* spp. y *Azospirillum brasilense* co-inmovilizadas en una esfera de alginato de calcio (sistema microalga-bacteria) (Tomado de Lebsky *et al.*, 2001).

Debido a esta proximidad, la bacteria *A. brasilense* ejerce sus efectos positivos en la microalga *Chlorella* spp. al igual que en las plantas terrestres (de-Bashan y Bashan, 2008), promoviendo mayor densidad celular de la microalga, mayor peso seco y peso fresco, mayor número de células, acumulación de pigmentos, acumulación de lípidos y en la variedad de ácidos grasos (ver tabla 1) (González y Bashan, 2000; de-Bashan *et al.*, 2002). Simultáneamente, la microalga incrementa la remoción de nitrógeno (amonio, nitratos y nitritos), y fósforo (fosfatos) de un medio residual sintético, bajo

condiciones autotróficas (ver tabla 1) (de-Bashan *et al.*, 2004); resultados similares usando agua residual domestica fueron obtenidos por Hernández *et al.*, (2006).

Tabla 1. Remoción de nitrógeno y fósforo, acumulación de pigmentos y ácidos grasos en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizadas y co-inmovilizadas con *A. brasilense*. (de-Bashan *et al.*, 2002, 2004, 2005).

Microalga	Compuestos	Inmovilizada (sola)	Co-Inmovilizada ( <i>A. brasilense</i> )	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Nitratos	75%	100%(96hrs)	
	Amonio	57%	100%	
	Fosfatos	19%	36%	
	Cel./ml	2.1 x 10 <sup>6</sup>	4.8 x 10 <sup>6</sup>	
	Pigmentos (µg/g cel.)	Clorofila a	250.6	706.23
		Clorofila b	71.9	180.4
		Luteína	52.0	120.4
	Ácidos grasos (µg/g cel.)	Ac. Tetradecanoico	4.68	9.41
		Ac. Hexadecanoico	18.20	73.06
		Ac. Octadecanoico	9.02	44.41
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Nitratos	28%	50%(48hrs)	
	Amonio	85%	100%	
	Fosfatos	27%	35%	
	Cel./ml	2.8 x 10 <sup>6</sup>	4.0 x 10 <sup>6</sup>	
	Pigmentos (µg/g cel.)	Clorofila a	1061.3	1646.17
		Clorofila b	491.9	807.2
		Luteína	116.1	201.53
	Ácidos grasos (µg/g cel.)	Ac. Tetradecanoico	4.53	7.78
		Ac. Hexadecanoico	7.34	31.94
		Ac. Octadecanoico	6.14	48.07

Este aumento en la remoción de nutrientes de la microalga *Chlorella* spp. co-inmovilizada con la bacteria *A. brasilense* en agua residual doméstica o medio sintético de crecimiento, se debe a un aumento en el metabolismo de asimilación de nitrógeno y

fósforo de la microalga. Estudios realizados por de-Bashan *et al.* (2008a, b), demuestran que la producción de fitohormonas por la bacteria *A. brasilense* (principalmente AIA) promueve una mayor actividad de las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamino sintetasa (GS) en *Chlorella vulgaris*, lo cual provoca mayor asimilación de amonio de la microalga e incremento en el número de células.

Hasta el momento los resultados obtenidos son bajo un régimen de crecimiento autotrófico de *Chlorella* spp. Sin embargo, actualmente se realizan estudios de este sistema microalga-bacteria bajo condiciones heterotróficas, aprovechando la capacidad de algunas cepas del genero *Chlorella* para crecer bajo este régimen (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Otro punto importante de esta tecnología es la facilidad que representa la recolección de la biomasa microalgal una vez concluido con la remoción de nitrógeno y fósforo (de-Bashan y Bashan, 2010; Ruíz-Marín *et al.*, 2010). Debido a esto último, hoy en día se realizan estudios para evaluar la utilidad que podría tener esta biomasa microalgal (sistema microalga-bacteria). En este sentido, estudios realizados por Trejo *et al.* (2012) demuestran que los residuos del sistema microalga-bacteria, una vez concluida su función principal de remover nutrientes (nitrógeno y fósforo) del agua residual o medio sintético de crecimiento, pueden ser utilizados como inoculante en suelos áridos erosionados, ya que la microalga contiene los nutrientes removidos, proteínas, carbono fijado por la fotosíntesis y funciona como un suplemento de materia orgánica, y por otra parte, la bacteria *A. brasilense* mantiene su rol de promover el crecimiento de plantas en dichos suelos marginados.

Este sistema de co-inmovilización de *A. brasilense* y *Chlorella* spp. en esferas de alginato, también ha sido propuesto como modelo de estudio de la interacción planta-bacteria, ya que *Chlorella* spp. posee el genoma eucariota más pequeño (40 Mb) en un microorganismo fotosintético, y es una de las microalgas más estudiadas hoy en día. Por otro lado, *Azospirillum* spp. es la bacteria promotora del crecimiento de plantas más estudiada, con varios mutantes disponibles de este género, además, ambos microorganismos son fácil de mantener y cultivar (de-Bashan y Bashan, 2008).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La biotecnología tiene su fundamento en el estudio y aprovechamiento de los mecanismos e interacciones biológicas de los seres vivos, específicamente los microorganismos, en beneficio de la sociedad. Por otra parte, hoy en día existe un enorme interés en el entendimiento y aprovechamiento de la capacidad de las microalgas para sintetizar y acumular carbohidratos, principalmente como almidón; debido a los diferentes usos y la importancia económica que pueden tener los carbohidratos en diferentes áreas como la alimentación, industrial y biocombustibles. De igual manera, las bacterias promotoras del crecimiento de plantas y microalgas son ampliamente investigadas debido a los beneficios fisiológicos que inducen en plantas de interés agrícola y comercial.

Por tal razón, en este trabajo, el estudio de la interacción de la microalga *Chlorella* con la bacteria promotora del crecimiento de plantas y microalgas *Azospirillum brasilense* permitiría profundizar el conocimiento acerca de la respuesta fisiológica de la microalga durante la biosíntesis y acumulación de carbohidratos totales y almidón, dilucidar las causas de esta respuesta fisiológica de *Chlorella* durante su interacción con *Azospirillum* y extender la habilidad y aplicación de *Azospirillum* en otros aspectos biotecnológicos diferentes al agrícola.

Con lo cual esta investigación, contribuiría significativamente a entender la interacción de estos dos microorganismos en aras de mejorar el aprovechamiento de sus capacidades individuales para beneficio de la sociedad.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la bacteria *Azospirillum brasilense* en el metabolismo de acumulación de carbohidratos totales y almidón en la microalga *Chlorella* spp. bajo condiciones de crecimiento autotrófico y heterotrófico.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la acumulación de carbohidratos totales y almidón en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizadas y co-inmovilizadas con *A. brasilense*, bajo condiciones autotróficas y heterotróficas utilizando glucosa y acetato de sodio como fuente de carbono.
- Evaluar el efecto de *A. brasilense* en la actividad enzimática (AGPase) del metabolismo de acumulación de almidón en *Chlorella vulgaris* interactuando co-inmovilizadas en esferas de alginato, creciendo bajo régimen heterotrófico.
- Evaluar el efecto del ácido indolacético (AIA) sobre la actividad de la enzima reguladora de la síntesis de almidón (AGPase) de *C. vulgaris*.

## 5. HIPÓTESIS

La interacción de la bacteria *Azospirillum brasilense* con la microalga *Chlorella* spp. induce cambios significativos en el metabolismo de la microalga *Chlorella vulgaris* incrementando el contenido de pigmentos como clorofila *a* y *b*, luteína y violaxantina, así como un incremento en el contenido de lípidos y en la variedad de ácidos grasos. Y en la actividad de las enzimas involucradas en el ciclo del nitrógeno de *Chlorella* spp.

La interacción de la bacteria promotora de crecimiento de plantas (*A. brasilense*), podría incrementar la actividad enzimática del metabolismo de acumulación de almidón y por consiguiente incrementar la acumulación de carbohidratos totales y almidón en la microalga *Chlorella* al estar co-inmovilizadas en esferas de alginato.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento iniciales

Se utilizaron las microalgas unicelulares *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714, Austin, TX) y *Chlorella sorokiniana* Shihira et Krauss (UTEX 2805) (de-Bashan *et al.*, 2004; Perez-Garcia *et al.*, 2010; Covarrubias *et al.*, 2012) y la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843, Braunschweig, Germany). Para obtener pre-cultivos de la microalga, 10 mL de cultivo axénico de cada microalga fueron inoculados independientes en 90 mL de medio de cultivo mineral (C30), el cual tiene la siguiente composición (en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{KNO}_3$  (25),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1),  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1). (en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (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),  $\text{NaMoO}_4$  (0.021) e incubados a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , y agitadas a 140 rpm bajo una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 7 d (González *et al.*, 1997). La bacteria creció en medio BTB-2 (Bashan *et al.*, 2011) el cual tiene la siguiente composición (en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NaCl}$  (1.2),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.25),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.13),  $\text{CaCl}_2$  (0.22),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.17),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (2.4),  $\text{NaHCO}_3$  (0.5),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.09),  $\text{Fe}_{\text{III}}\text{EDTA}$  (0.07), triptona (5), glicerol (8 mL) y extracto de levadura; (5). El pH fue ajustado a 7 con 1 M KOH e incubado a  $32 \pm 2^\circ\text{C}$  y agitado a 120 rpm por 16 h.

### 6.2. Inmovilización de microorganismos

Los cultivos de cada microalga y la bacteria que se obtuvieron, fueron centrifugados por 6 min a 2000 g, se resuspendieron y enjuagaron con 20 mL de solución salina al 0.85%, se repitió este procedimiento en dos ocasiones más, al final de los lavados se resuspendieron los microorganismos en 20 mL de la misma solución salina.

Para inmovilizar y co-inmovilizar los microorganismos, primeramente se preparó una solución de alginato al 2% en 80 mL de agua destilada, para ello se utilizó una relación 3:1 de alginato de media densidad (1.5 g) y alta densidad (0.5 g), se mezclaron ambos alginatos y se agregaron poco a poco en el agua destilada, se agitaron hasta formar un gel homogéneo y posteriormente fueron esterilizados.

Para inmovilizar la microalga se añadieron los 20 mL de cultivo de la microalga resuspendida en la solución salina en la solución de alginato estéril y se agitaron hasta

homogenizar. Para inmovilizar la bacteria inicialmente se ajustó la concentración de la misma a ( $10^9$  UFC), ajustando la densidad óptica de la solución a 1; posteriormente se añadieron los 20 mL de la solución salina con la bacteria en la solución de alginato estéril y se homogenizaron.

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

Una vez que se obtuvieron las soluciones de alginato con 1. Bacteria, 2. Microalga y 3. Microalga-Bacteria, se procedió a inmovilizarlos mediante la ayuda de una bomba peristáltica y a través de una manguera de silicón y una aguja estéril (ver Figura 7). Las gotas de solución de alginato homogenizada con los microorganismos se recibieron en 100 mL de una solución endurecedora de cloruro de calcio al 2% y se dejaron por 30 min en dicha solución. Posteriormente las esferas fueron enjuagadas dos veces con solución salina 0.85% y finalmente las esferas con los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados fueron sometidos a crecimiento secundario en una solución de caldo nutritivo 10% v/v (Sigma-Aldrich) a  $27 \pm 2$  °C, agitado por 140 rpm, con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por 24 h.

La esfera de alginato de calcio con los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados se puede apreciar en la figura 8. La proximidad entre ambos microorganismos (microalga y bacteria) dentro de la esfera se aprecia en la figura 6.

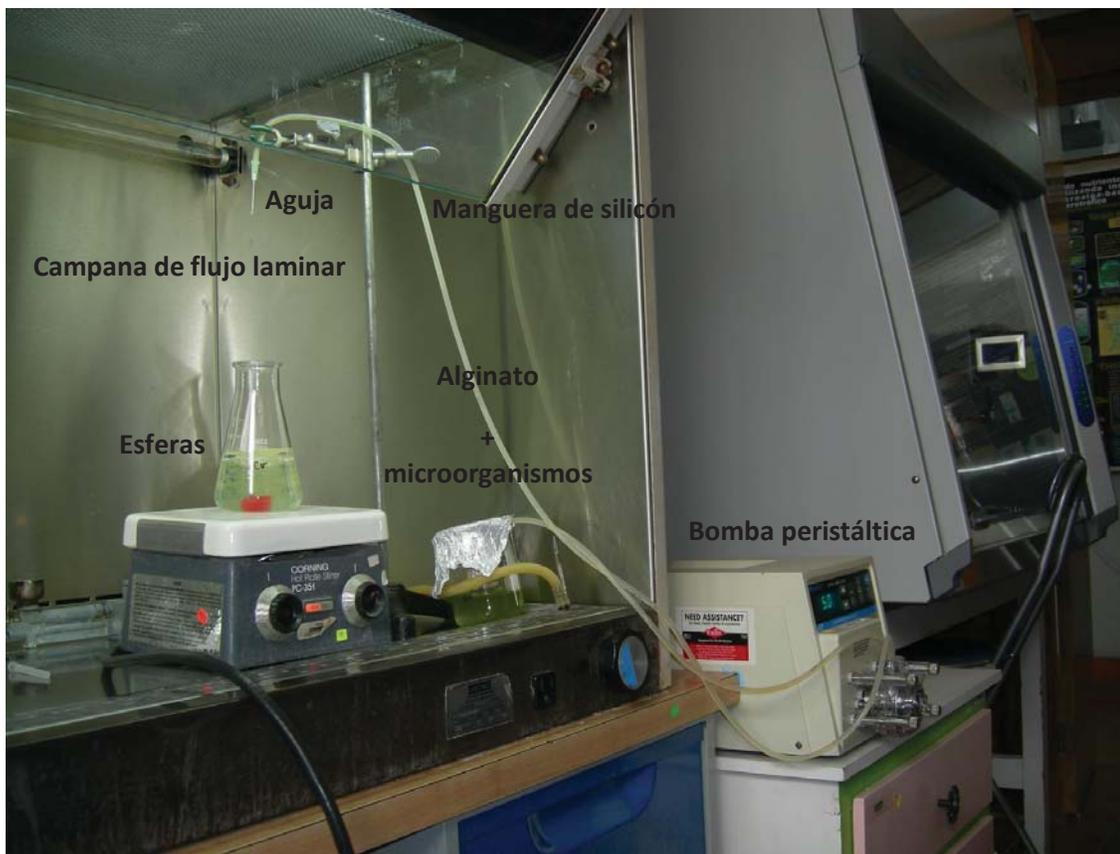


Figura 7. Proceso de inmovilización de microalgas y bacterias en esferas de alginato de calcio (www.bashanfoundation.org).



Figuras 8. Vista de una esfera de alginato de calcio con microorganismos inmovilizados (www.bashanfoundation.org).

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

- 1). *Chlorella vulgaris* inmovilizada
- 2). *Chlorella sorokiniana* inmovilizada
- 3). *Azospirillum brasilense* inmovilizada
- 4). *C. vulgaris* + *A. brasilense* co-inmovilizadas
- 5). *C. sorokiniana* + *A. Brasilense* co-inmovilizadas
- 6). Alginato de calcio (sin microorganismos)

**6.3. Evaluar la acumulación de carbohidratos totales y almidón en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizadas y co-inmovilizadas con *A. brasilense*, bajo condiciones autotróficas y heterotróficas utilizando glucosa y acetato de sodio como fuente de carbono**

#### **6.3.1. Condiciones de cultivo experimentales.**

En este primer objetivo específico de la tesis, de cada tratamiento y control, 8 g de esferas fueron inoculados en 100 mL de medio sintético de crecimiento (MSC) (Bashan *et al.*, 2002) y presentó la siguiente composición en (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): NaCl (7), CaCl<sub>2</sub> (4), MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (2), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (217), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (8.5), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (33.4), NH<sub>4</sub>Cl; (191) y fueron cultivados bajo condiciones autotróficas y heterotróficas.

Bajo régimen autotrófico las condiciones de crecimiento fueron las siguientes:  $27^{\circ} \pm 2$  °C (*C. vulgaris*) y  $37 \pm 2$  °C (*C. sorokiniana*), agitado a 140 rpm y una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , durante 7 días (144 h). En régimen heterotrófico las condiciones de crecimiento fueron las siguientes:  $27 \pm 2$  °C (*C. vulgaris*) y  $37 \pm 2$  °C (*C. sorokiniana*) y se añadieron  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de D-glucosa o acetato de sodio (Sigma, St. Louis, MO, USA) al MSC como fuente de carbono. El crecimiento se mantuvo durante 7 días (144 h). Ambas fuentes de carbono fueron esterilizadas mediante  $0.2 \mu\text{m}$  Acrodisc syringe filter (Pall Corp., Port Washington, NY).

### 6.3.2. Diseño experimental y análisis estadísticos.

El diseño experimental realizado en el primer objetivo específico fue de la siguiente manera: los experimentos se realizaron en cultivos por lote, contando con tres replicas, donde cada frasco Erlenmeyer de 250 mL se considero una réplica. Cada experimento contenía 6 tratamientos: 1. esferas sin microorganismos, 2. esferas con *C. vulgaris*, 3. esferas con *C. sorokiniana*, 4. esferas con *A. brasilense* (Controles); 5. esferas con *C. vulgaris* – *A. brasilense*, 6. esferas con *C. sorokiniana* – *A. brasilense* (Tratamientos) (n = 18). Cada experimento fue repetido dos veces, los datos de cada tratamiento de cada repetición (n = 36) fueron combinados y analizados primero por un ANOVA de una vía y después por un análisis post-hoc LSD, con significancia de  $P < 0.05$ , usando el programa Statistica 6.0 software (StatSoft, Tulsa, OK).

Las siguientes variables fueron analizadas:

$$(1) \quad \textit{Productividad volumétrica} = P_1 - P_0$$

Donde  $P_1$  y  $P_0$  son los gramos de producto (como células o biomasa) en un volumen definido (100 mL) en un tiempo inicial y final de muestreo.

$$(2) \quad \textit{Afinidad} = S_t / N_t$$

Donde  $S_t$  son los gramos de producto formado o gramos de sustrato consumido en 24 h y  $N_t$  es el número de células de microalga en este tiempo (Rahn, 1930).

$$(3) \quad \textit{Rendimiento de carbohidratos} = (P_1 - P_0) / (S_1 - S_0) / V$$

Rendimiento de carbohidratos (cantidad de carbohidratos producidos por g de fuente de carbono consumida durante 24 h). Donde  $P_1$  es la cantidad de carbohidratos después de 24 h,  $P_0$  es el inicio del intervalo de tiempo.  $S_1$  es la concentración de la fuente de carbono (D-glucosa o acetato de sodio) después de 24 h, y  $S_0$  en el inicio de este intervalo de tiempo.  $V$  es el volumen del medio utilizado (100 mL MSC).

El contenido de carbohidratos totales, contenido de almidón, conteo de microorganismos, consumo de la fuente de carbono (glucosa o acetato de sodio) fueron determinados como se describe posteriormente.

**6.4. Evaluar el efecto de *A. brasilense* en la actividad enzimática (AGPase) del metabolismo de acumulación de almidón en *Chlorella vulgaris* interactuando co-inmovilizadas en esferas de alginato, creciendo bajo régimen heterotrófico**

**6.4.1. Condiciones de cultivo experimentales.**

Para el segundo objetivo específico de la tesis, la microalga unicelular *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714, Austin, TX) y la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843, Braunschweig, Germany) fueron utilizadas. Para producir los inoculos de cada microorganismo se realizó el procedimiento descrito previamente.

Una vez inmovilizados o co-inmovilizados los microorganismos como se describió anteriormente; se realizó la incubación secundaria en el medio OAB con la siguiente composición (en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): KOH (4.80), ácido málico (5.00), NaCl (1.20),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.25),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.13),  $\text{CaCl}_2$  (0.22),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.17),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (2.40),  $\text{NaHCO}_3$  (0.50),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.09),  $\text{Fe}_{\text{III}}\text{EDTA}$  (0.07),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1) y (en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0.2),  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.2),  $\text{ZnCl}_2$  (0.15),  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.2),  $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20) (Bashan *et al.*, 1993). Bajo condiciones de ayuno, el nitrógeno o fósforo fue removido del medio OAB, dependiendo de la condición experimental a seguir.

Para los experimentos, 12 g de esferas con los microorganismos inmovilizados o co-inmovilizados fueron inoculados con 150 mL de medio sintético de crecimiento con la composición arriba mencionada; la cuál contiene suficiente (saciada) nitrógeno o fósforo (+ N, + P) (Bashan *et al.*, 2011). En las condiciones de ayuno, nitrógeno o fósforo (- N, - P) fueron removidos del MSC. Se agregaron  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de D-glucosa o acetato de sodio (Sigma, St. Louis, MO, USA) al MSC como fuente de carbono. El crecimiento se mantuvo durante 96 h bajo condiciones heterotróficas, utilizando glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono.

#### 6.4.2. Diseño experimental y análisis estadísticos.

Los experimentos en este segundo objetivo específico se realizaron en cultivos por lote, contando con tres réplicas, donde cada frasco Erlenmeyer de 250 mL se consideró una réplica. Cada experimento contenía 4 tratamientos: 1. esferas sin microorganismos, 2. esferas con *C. vulgaris*, 3. esferas con *A. brasilense* (Controles); 4. esferas con *C. vulgaris* – *A. brasilense* (Tratamiento) ( $n = 12$ ). Cada experimento fue repetido dos veces ( $n = 24$ ). Los datos de cada tratamiento de cada repetición fueron combinados y analizados, primero por ANOVA de una vía y después por análisis LSD post-hoc, con significancia  $P < 0.05$ , utilizando Statistica 6.0 software (StatSoft, Tulsa, OK).

Productividad volumétrica ( $Y_p$ ), Afinidad ( $S_a$ ) y Rendimiento de almidón ( $Q_s$ ) fueron determinados como se describió previamente. Los siguientes parámetros fueron determinados como se describe posteriormente: contenido de almidón, consumo de la fuente de carbono (glucosa o acetato de sodio), Actividad enzimática de la ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPase), conteo de microorganismos.

#### 6.5. Evaluar el efecto del ácido indolacético (AIA) sobre la actividad de la enzima reguladora de la síntesis de almidón (AGPase) de *C. vulgaris*

##### 6.5.1. Condiciones de cultivo experimentales.

En el tercer objetivo específico, la microalga unicelular *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714, Austin, TX) y las cepas silvestres o atenuadas en su producción de AIA (ver Tabla 7) fueron utilizadas. Para producir los inoculos de cada microorganismo se realizó el procedimiento descrito previamente.

Tabla 2. Descripción de cepas silvestres de *Azospirillum brasilense* o atenuadas en la producción de ácido indolacético (AIA). (Tomado de de-bashan *et al.*, 2008a).

Cepa de <i>Azospirillum</i>	Descripción	Producción AIA (ng· $\mu$ L <sup>-1</sup> )	Referencia o fuente de la cepa
<i>A. brasilense</i> Cd	Cepa silvestre de <i>A. brasilense</i> (USA)	44.01 ± 0.17	DSM 1843
<i>A. brasilense</i> Sp6	Cepa silvestre de <i>A. brasilense</i> (Italia)	55.18 ± 0.81	Barbieri y Galli, 1993
<i>A. brasilense</i> SpM7918	Derivada de <i>A. brasilense</i> Sp6, llevando una inserción Tn5 en el gen <i>ipdC</i> (Italia)	15 ± 0.4	Barbieri y Galli, 1993

Una vez inmovilizados o co-inmovilizados los microorganismos como se describió anteriormente; se realizó la incubación secundaria en el medio OAB – N o en una solución de caldo nutritivo 10% v/v (Sigma-Aldrich) con la composición descrita anteriormente. Cada condición de crecimiento se realizó dependiendo de la condición experimental a seguir.

Para los experimentos, 12 g de esferas con los microorganismos inmovilizados o co-inmovilizados fueron inoculados con 150 mL de medio sintético de crecimiento con la composición arriba mencionada; la cuál contiene suficiente (saciada) nitrógeno (+ N) (Bashan *et al.*, 2011). En las condiciones de ayuno, nitrógeno (– N) fué removido del MSC. Se agregaron  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de D-glucosa al MSC como fuente de carbono. El crecimiento se mantuvo durante 96 h bajo condiciones heterotróficas.

#### **6.5.2. Diseño experimental y análisis estadísticos.**

Nuevamente en este tercer objetivo específico, los experimentos se realizaron en cultivos por lote, contando con tres replicas, donde cada frasco Erlenmeyer de 250 mL se considero una réplica. Cada experimento contenía 9 tratamientos: 1. esferas sin microorganismos, 2. esferas con *C. vulgaris*, 3. esferas con *C. vulgaris* (añadiendo al MSC AIA sintético), 4. esferas con *A. brasilense* Cd, 5. esferas con *A. brasilense* Sp6, 6. Esferas con *A. brasilense* SpM (Controles); 7. esferas con *C. vulgaris* – *A. brasilense* Cd, 8. esferas con *C. vulgaris* – *A. brasilense* Sp6, 9. esferas con *A. brasilense* SpM (Tratamientos) (n = 27). Cada experimento fue repetido dos veces, los datos de cada tratamiento de cada repetición (n = 54) fueron combinados y analizados primero por un ANOVA de una vía y después por un análisis post-hoc LSD, con significancia de  $P < 0.05$ , usando el programa Statistica 6.0 software (StatSoft, Tulsa, OK).

La Actividad enzimática de la ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPase), el contenido de almidón y consumo de glucosa de *C. vulgaris* fueron determinados como se describe posteriorme

## **6.6. Métodos analíticos**

### **6.6.1. Determinación de carbohidratos totales**

Muestras de un gramo de esferas de alginato (por réplica y por tratamiento, n = 9) fueron tomadas cada 24 h, lavadas con agua destilada, secadas a 80 °C por 12 h, y molidas con mortero y pistilo. De un gramo de esfera fresca se obtuvieron 10 mg de esfera seca. Estos 10 mg fueron resuspendidos en 5 mL 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sonicados por 4 min a 22.5 kHz con un ultrasonic cell disruptor (Misonix, Farmingdale, NY). Carbohidratos fueron extraídos por hidrólisis de la muestra de la esfera seca por 60 min a 100 °C. Carbohidratos totales fueron cuantificados por el método fenol-sulfúrico (Fox y Robyt, 1991; Masuko *et al.*, 2005), usando glucosa como el estándar.

### **6.6.2. Determinación de almidón**

El contenido de almidón fue cuantificado por el método descrito por Brányiková *et al.* (2011), el cuál es una modificación del método de McCready *et al.* (1956), basado en la hidrólisis total de almidón mediante ácido perclórico 30% y cuantificación de la glucosa liberada por colorimetría. Brevemente: se tomaron 10 mg de la muestra de las esferas en polvo, se agregaron 100 µl de agua y se dejaron a -20°C por 24 h, posteriormente al pellet se le adicionaron 5 mL de ácido perclórico al 30%, se sometió a sonicación por 4 min., Se agitó vigorosamente por 15 min a temperatura ambiente, se centrífugo y recuperó el extracto líquido (5 ml), se adicionó al pellet nuevamente 2.5 ml de ácido perclórico 35% y se agitó nuevamente 15 min, se centrífugo y recuperó el extracto líquido, se repitió esta operación una vez más hasta obtener un volumen de extracto líquido de 10 mL. Del extracto líquido se realizó la determinación de almidón mediante el método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

### **6.6.3. Determinación del consumo de la fuente de carbono**

El consumo de D-glucosa o acetato de sodio del MRS por los microorganismos fue analizada utilizando kits: El kit Megazyme para determinación de D-glucosa (glucose oxidase/peroxidase) catálogo # K-GLUC, gopod format, Megazyme International, Bray,

Ireland. Y el kit para determinar acetato de sodio (catálogo # K-ACETAF 12/07, acetyl-coA synthetase format; Megazyme International). Estos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del mismo.

#### ***6.6.4. Cuantificación de la actividad enzimática de la ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPase)***

Seis g de esferas de alginato de cada tratamiento fueron tomadas cada 24 h. Las esferas fueron disueltas en 30 mL de NaHCO<sub>3</sub> 4% y centrifugadas a 2000 g por 6 min. El sobrenadante fue desechado y el pellet obtenido fue lavado tres veces con solución salina 0.85%. La actividad enzimática fue determinada por el método descrito por Li *et al.* (2011) como sigue: la actividad de la AGPase fue determinada en un buffer de extracción con la siguiente composición (mM): HEPES pH 7.4 (100), ADP-glucose (1.2), sodium pyrophosphate (3), MgCl<sub>2</sub> (5), dithiothreitol (DTT) (4), en un volumen final de 500 µL. La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente (26 ± 2 °C) por 20 min. La reacción fue detenida en un baño de agua hirviendo por 2 min. Después se añadieron 600 µL de agua destilada y la mezcla fue centrifugada a 13,000 g por 10 min. El sobrenadante (1000 µL) fueron mezclados con 0.3 mg de NADP<sup>+</sup>. La actividad fue determinada como el incremento in A<sub>340</sub> después de agregar 2 µL de las siguiente enzimas: Fosfoglucomutasa (0.8 U) y Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa (1 U). La actividad de AGPase es expresada como U mg<sup>-1</sup> proteína, donde una unidad (U) es nmol ADP mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>. Proteínas en la mezcla fueron determinadas por el método descrito por Bradford (1976).

#### ***6.6.5. Conteo de microorganismos***

En cada experimento, tres esferas de cada frasco de 250 mL fueron cuantificadas. Cada esfera fue solubilizada por inmersión en 1 mL de una solución de NaHCO<sub>3</sub> 4% durante 30 min a temperatura ambiente de 25 ± 4 °C. Células de *A. brasilense* fueron primero teñidas con fluorescein diacetato (Sigma) (Chrzanowski *et al.* 1958) y después contadas directamente bajo un microscopio de fluorescencia (BX41, Olympus, Tokyo). Células de *Chlorella* fueron contadas bajo microscopía de luz con un Neubauer hemocitómetro conectado a un analizador de imagen (Image ProPlus 4.5, Media Cybernetics, Silver

Spring, MD) (González y Bashan, 2000). La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) fue calculada de la siguiente manera:

$$(4) \quad \mu = (\ln N_{t_1} - \ln N_{t_0}) / (t_1 - t_0)$$

Donde  $N_{t_1}$  es el número de células en el tiempo de muestreo y  $N_{t_0}$  es el número de células en el inicio del experimento (Oh-Hama y Miyachi, 1992).

## 7. RESULTADOS

**7.1. Evaluar la acumulación de carbohidratos totales y almidón en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizadas y co-inmovilizadas con *A. brasilense*, bajo condiciones autotróficas y heterotróficas utilizando glucosa y acetato de sodio como fuente de carbono.**

### 7.1.1 Autotrófico

#### 7.1.1.1. Acumulación de carbohidratos totales

El promedio del contenido de carbohidratos totales en *Azospirillum* inmovilizada fue constante y dentro del rango de  $9.7 \pm 1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , durante todo el tiempo de incubación (Fig. 9a, letras mayúsculas). *C. vulgaris* inmovilizada sola no acumuló cantidades significativas de carbohidratos. El contenido más alto de carbohidratos fue obtenido después de 72 h de incubación en un nivel de  $57 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ; posteriormente el contenido de carbohidratos disminuyó con el tiempo (Fig. 9a, letras mayúsculas). En *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense*, el contenido de carbohidratos incrementó con el tiempo, alcanzando la acumulación más alta a las 72 h de incubación (Fig. 9a, letras mayúsculas) y fue significativamente mayor que *C. vulgaris* inmovilizada sola (Fig. 9a, letras minúsculas). Este contenido más alto a las 72 h fue  $94 \pm 5.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Similar a la microalga sola, el contenido de carbohidratos totales del co-inmovilizado empezó a disminuir, alcanzando el mismo nivel que *C. vulgaris* sola después de 144 h (Fig. 9a, letras minúsculas). El incremento en el contenido de carbohidratos totales después de 72 h fue de  $18 \pm 1.68\%$  en *C. vulgaris* inmovilizada sola y  $96 \pm 1.75\%$  co-inmovilizada con *A. brasilense*.

En el mismo tiempo en el que se alcanzó el máximo contenido de carbohidratos (72 h), el contenido de carbohidratos por célula no fue el mayor ( $17.9 \pm 0.44 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  inmovilizada sola y  $27.7 \pm 0.16 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$ , co-inmovilizada). El nivel más alto de carbohidratos por célula fue alcanzado a las 24 h ( $37.9 \pm 1.3$  inmovilizada sola y  $43.1 \pm 0.92 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada; Figs. 10a, b). A las 24 h la acumulación de carbohidratos por cultivo fue  $47 \pm 16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  inmovilizada sola y  $72 \pm 15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  co-inmovilizada (Fig. 9a). No se detectaron carbohidratos en las esferas de alginato sin microorganismos en ningún experimento. Por lo tanto no será mencionado en adelante.

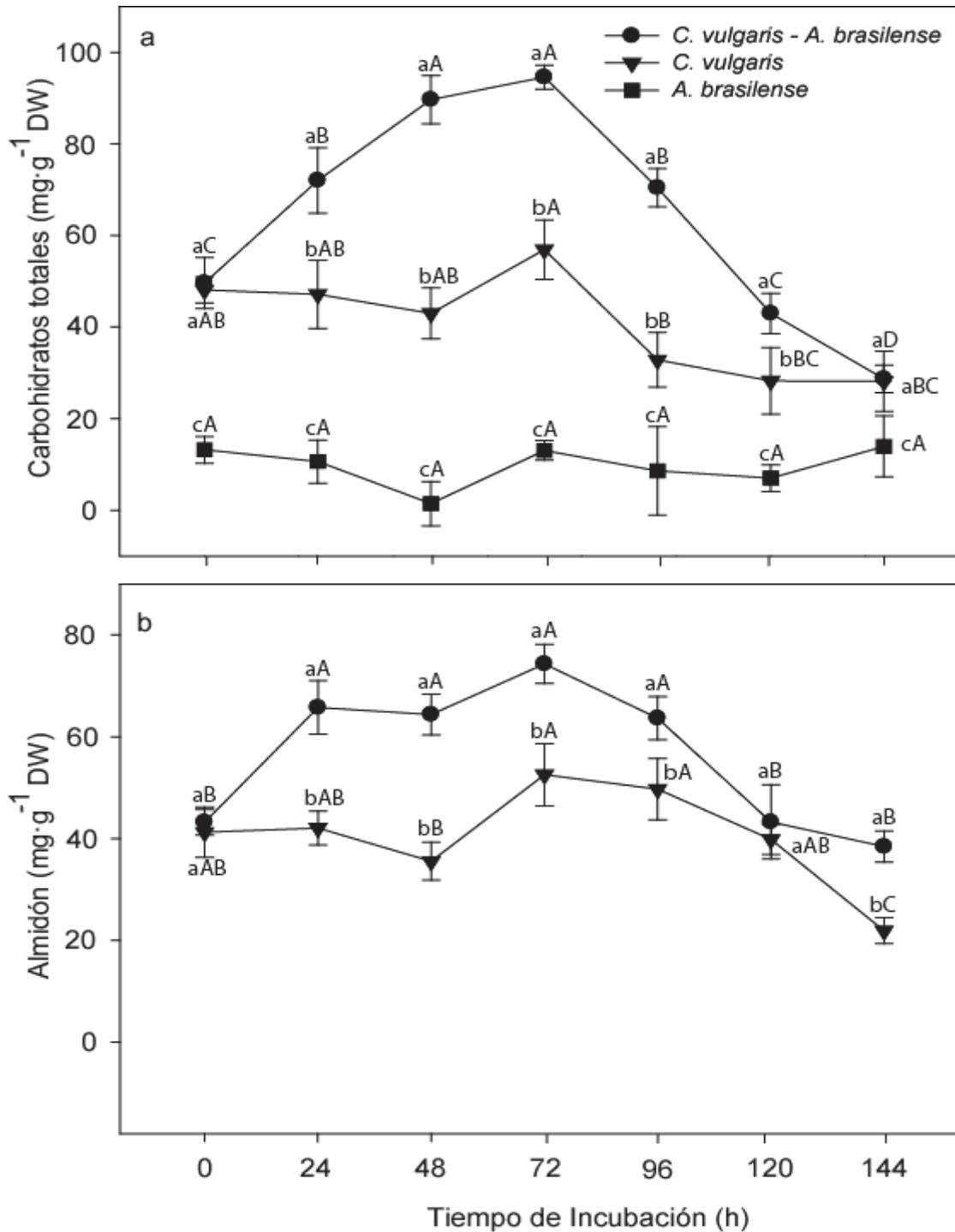


Figura 9. Acumulación de (a) carbohidratos totales y (b) almidón en *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense* bajo condiciones de crecimiento autotróficas. Los valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente, utilizando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Los puntos en cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a  $P < 0.05$ . (en la Fig. a, ANOVA, en la Fig. b, prueba t de Student). Las barras representan el error estándar.

La mayoría de los carbohidratos totales se acumularon como almidón. Un patrón similar de acumulación de almidón, durante el tiempo de incubación, como en el contenido de carbohidratos totales fue determinado. El contenido más alto de almidón fue detectado a las 72 h y presentando diferencias significativas entre los tratamientos de *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada en la mayoría de los intervalos de tiempo de incubación (Fig. 9b, letras minúsculas). *C. vulgaris* inmovilizada sola alcanzó  $52 \pm 12$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $74 \pm 8.6$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de almidón co-inmovilizada (Fig. 9b). Lo cual indica que, del total de carbohidratos acumulados después de 72 h,  $92 \pm 1.7\%$  y  $78 \pm 1\%$  es almidón, respectivamente (Fig. 10c).

El contenido de almidón por célula presentó el mismo patrón de carbohidratos totales por célula. El mayor contenido de almidón por célula fue también determinado a las 24 h,  $33.8 \pm 0.76$   $\text{ng}\cdot\text{cel}^{-1}$ , *C. vulgaris* inmovilizada sola, y  $39.3 \pm 0.88$   $\text{ng}\cdot\text{cel}^{-1}$ , co-inmovilizada (Anexo 1). La acumulación de almidón por cultivo en este tiempo (24 h) fue solo  $42 \pm 7.7$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $67 \pm 12$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 9b). Cuando se determinó el contenido máximo de almidón por cultivo a las 72 h de incubación, el contenido por célula no fue el máximo,  $16.5 \pm 0.54$   $\text{ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  inmovilizada sola y  $21.8 \pm 0.32$   $\text{ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada (Anexo 1).

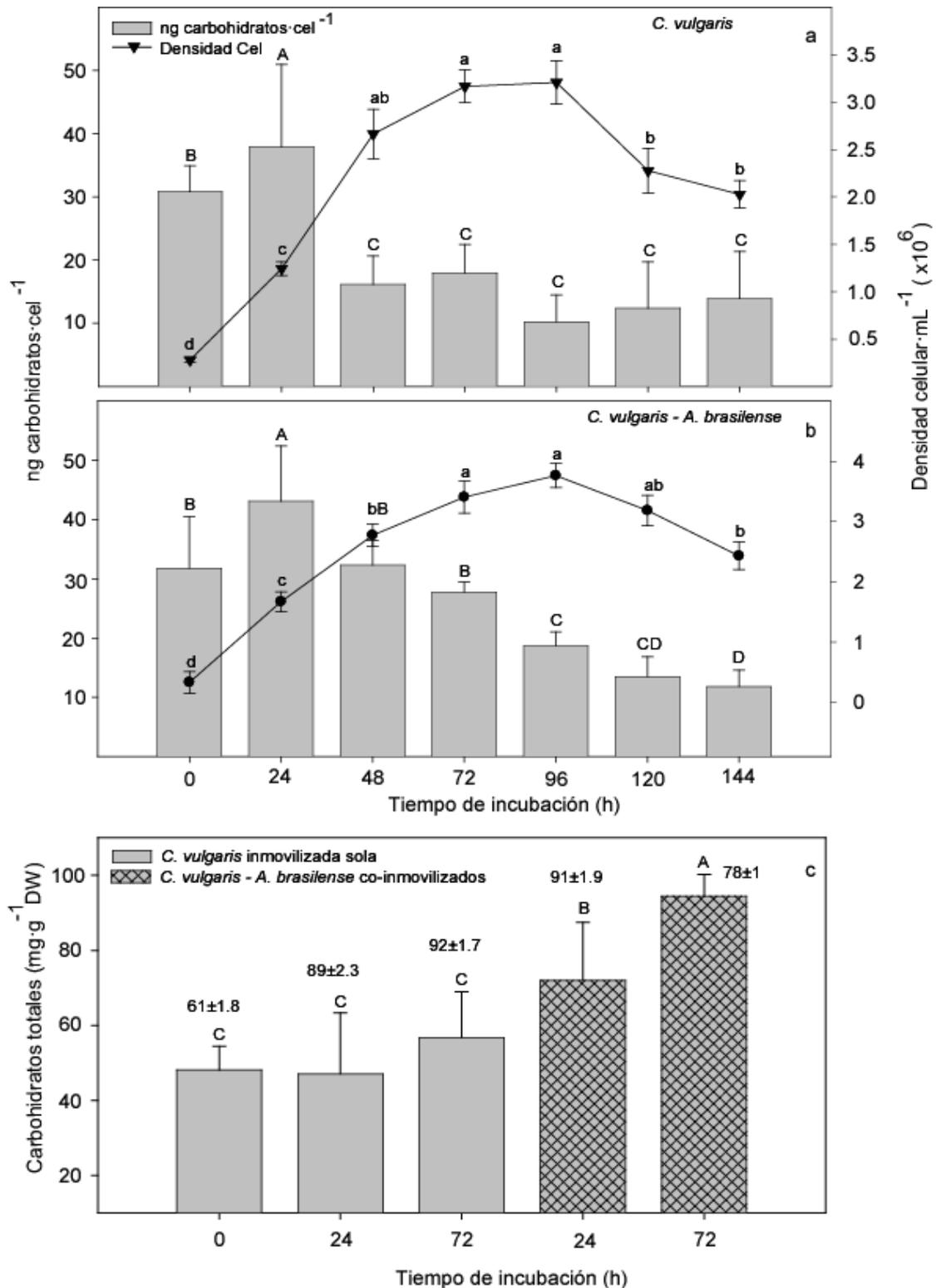


Figura 10. Densidad celular y acumulación de carbohidratos por célula en *C. vulgaris* inmovilizada sola (a) y co-inmovilizada (b) en esferas de alginato con *A. brasilense* bajo condiciones de crecimiento autotrófico. (c) Carbohidratos totales (columnas) y el porcentaje de almidón (valor arriba de la columna) después de 24 y 72 h de incubación. Valores a lo largo de la curva con diferentes letras minúsculas difieren significativamente usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc a  $P < 0.05$ . Columnas denotadas por diferentes letras mayúsculas difieren significativamente usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc a  $P < 0.05$ . Barras representan el error estándar.

Un patrón similar en la acumulación de carbohidratos totales y almidón fue encontrado con *C. sorokiniana* (Fig. 11a, letras mayúsculas). Después de 72 h de incubación la mayor acumulación de carbohidratos fue  $63 \pm 18 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  en *C. sorokiniana* inmovilizada sola y  $98 \pm 29 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  co-inmovilizada, mostrando diferencias significativas entre ambos tratamientos, (Fig. 11a, letras minúsculas). Este incremento representa  $62 \pm 1.84\%$  en *C. sorokiniana* inmovilizada sola y  $141 \pm 3.80\%$  co-inmovilizada con *A. brasilense*; posteriormente (96 h), el contenido de carbohidratos disminuyó y permaneció en este nivel hasta las 144 h (Fig. 11a, letras mayúsculas).

A las 24 h el contenido máximo de carbohidratos totales por célula fue  $83.7 \pm 4.03 \text{ ng}^{-1}$  en *C. sorokiniana* inmovilizada sola y  $68.4 \pm 2.97 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada (Fig. 12a, b); la acumulación de carbohidratos totales por cultivo en este tiempo (24 h) fue  $42 \pm 2$  y  $55 \pm 2.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 11a). A las 72 h el contenido de carbohidratos por célula disminuyó, alcanzando  $38.2 \pm 0.88 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  inmovilizada sola y  $46.2 \pm 1.37 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada (Fig. 12a, b).

Este incremento también fue principalmente almidón, alcanzando diferencias significativas a las 72 h entre ambos tratamientos (Fig. 11b, letras minúsculas). Inmovilizada sola, *C. sorokiniana* acumuló  $57 \pm 8$  y  $71 \pm 6.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de almidón co-inmovilizada, lo cual representa  $91 \pm 1\%$  y  $72 \pm 1\%$ , respectivamente del total de carbohidratos totales acumulados (Fig. 12c). En este tiempo (72 h) el contenido de almidón por célula fue  $32.6 \pm 0.45 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  inmovilizada sola y  $44.1 \pm 0.42 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada. A las 24 h de incubación, el máximo contenido de almidón por célula alcanzó  $60.2 \pm 1.59 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  y  $49.6 \pm 0.49 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  respectivamente (Anexo 1). En este tiempo, la producción de almidón por cultivo fue  $32 \pm 3.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $30 \pm 5.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 11b).

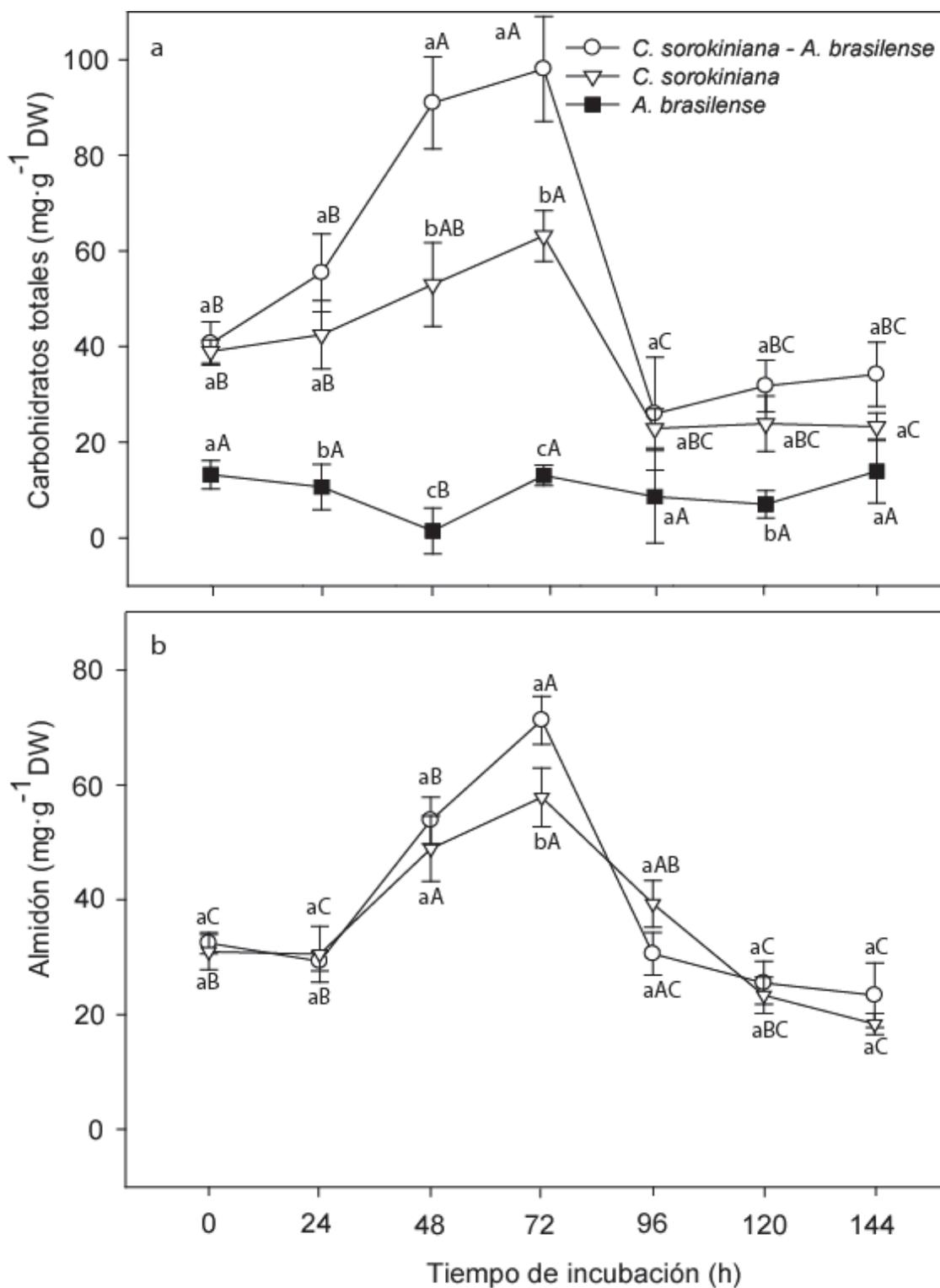


Figura 11. Acumulación de (a) carbohidratos totales y (b) almidón en *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense* bajo condiciones de crecimiento autotróficas. Los valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente, utilizando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Los puntos en cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a  $P < 0.05$ . (en la Fig. a, ANOVA, en la Fig. b, prueba t de Student). Las barras representan el error estándar.

Las dos microalgas mostraron la mayor afinidad y productividad volumétrica después de 72 h. Encontrándose diferencias significativas entre la microalga inmovilizada sola (baja afinidad) y co-inmovilizada con *A. Brasilense* (alta afinidad), aunque en todos los tratamientos, el contenido más alto de carbohidratos por célula fue obtenido a las 24 h (Tabla 3). A las 24 h, la afinidad y la productividad volumétrica no alcanzaron sus niveles más altos.

Tabla 3. Análisis general de carbohidratos totales en *Chlorella* spp. creciendo inmovilizada sola o co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato.

	Afinidad		Productividad volumétrica	
	mg·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>	
	Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola
<b><i>C. vulgaris</i></b>				
0 - 24 h	1.67±1.29 aA	0.26±0.02 bA	61.5±4.8 aA	2.6±2.0 bA
48 - 72 h	7.09±1.33 aB	1.75±1.1 bB	123.6±27.9 aB	24.1±3.5 bB
<b><i>C. sorokiniana</i></b>				
0 - 24 h	2.14±0.13 aA	1.02±0.17 bA	40.6±7.8 aA	9.6±5.8 bA
48 - 72 h	7.38±2.44 aB	2.41±1.22 bB	157.8±10.0 aB	66.4±3.3 bB

Los valores de cada tratamiento y cada especie de microalga denotados por diferentes letras mayúsculas difieren significativamente en cada intervalo de tiempo. Los valores para cada comparación entre los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados con diferentes letras minúsculas difieren significativamente. Los análisis estadísticos fueron realizados usando un ANOVA de una vía y análisis post-hoc a  $P < 0.05$  por una prueba t de Student. Las barras representan el error estándar.

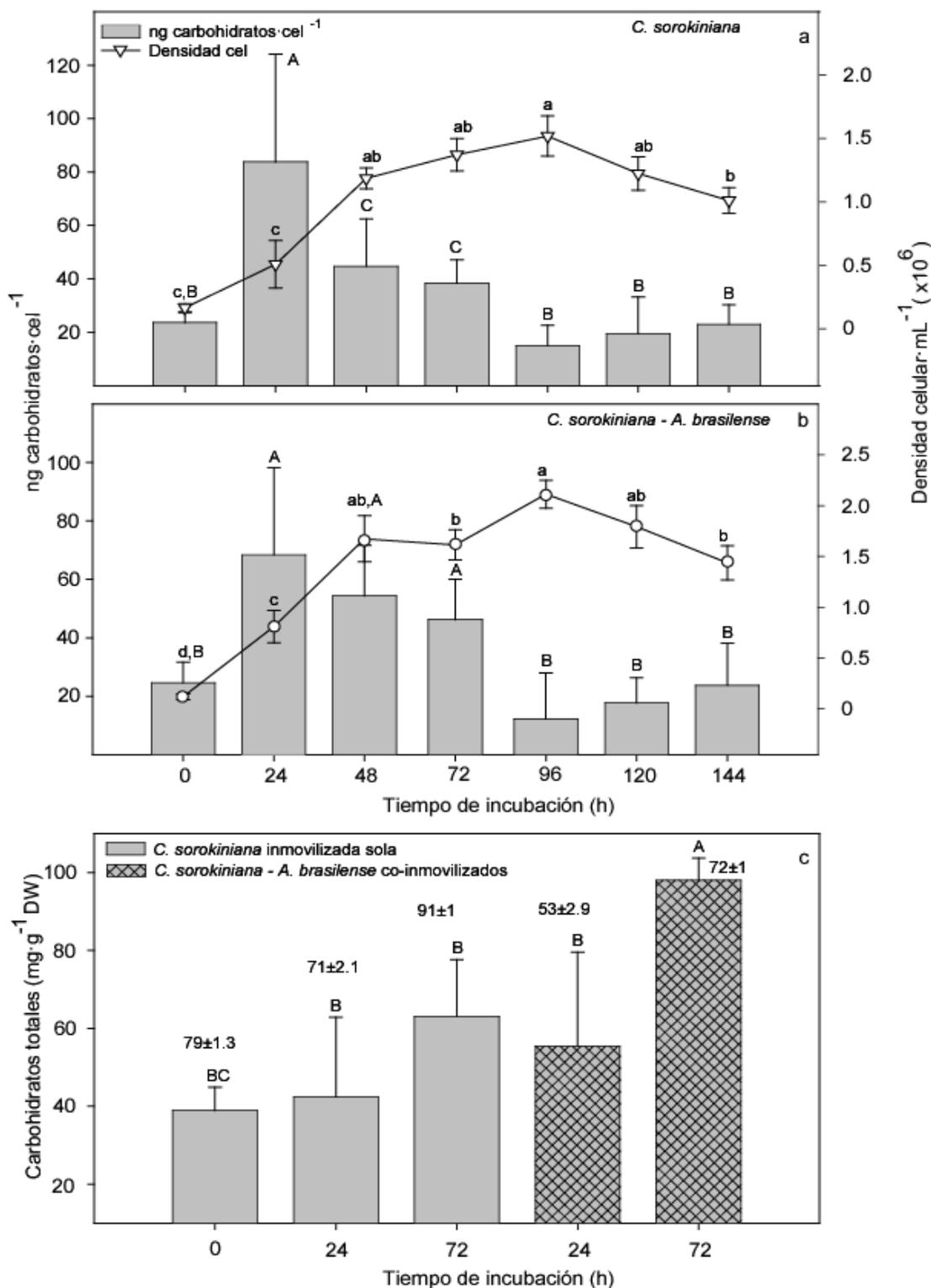


Figura 12. Densidad celular y acumulación de carbohidratos por célula en *C. sorokiniana* inmovilizada sola (a) y co-inmovilizada (b) en esferas de alginato con *A. brasilense* bajo condiciones de crecimiento autotrófico. (c) Carbohidratos totales (columnas) y el porcentaje de almidón (valor arriba de la columna) después de 24 y 72 h de incubación. Valores a lo largo de la curva con diferentes letras minúsculas difieren significativamente usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc a  $P < 0.05$ . Columnas denotadas por diferentes letras mayúsculas difieren significativamente usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc a  $P < 0.05$ . Barras representan el error estándar.

### 7.1.1.2. Crecimiento autotrófico de *Chlorella* spp.

La población de *C. vulgaris* inmovilizada con *A. brasilense* fue sólo ligeramente más alta que cuando la microalga creció sola. En ambos tratamientos, las poblaciones de las microalgas alcanzaron el máximo crecimiento y tasa de crecimiento ( $\mu$ ) a las 96 h de incubación. En este tiempo, la densidad celular de *C. vulgaris* co-inmovilizada fue  $3.7 \times 10^6 \pm 0.37 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $\mu = 0.90 \pm 0.18$ , mientras que inmovilizada sola alcanzó  $3.2 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $\mu = 0.81 \pm 0.05$ . Posteriormente la densidad celular disminuyó con el tiempo (Fig. 10a, b).

Los cultivos de *C. sorokiniana* mostraron un patrón de crecimiento similar. Estos presentaron un mayor crecimiento co-inmovilizados con *A. brasilense*. La máxima densidad celular y tasa de crecimiento fue obtenida a las 96 h. *C. sorokiniana* co-inmovilizada alcanzó  $2.11 \times 10^6 \pm 0.26 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $\mu = 0.97 \pm 0.026$ ; lo cual fue significativamente mayor que la densidad celular de *C. sorokiniana* sola,  $1.51 \times 10^6 \pm 0.26 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $\mu = 0.72 \pm 0.11$  (Figs. 12a, b). El crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada o co-inmovilizada fue menor que *C. vulgaris*, respectivamente.

## 7.1.2 Heterotrófico

### 7.1.2.1. Acumulación de carbohidratos en *Chlorella* spp. co-inmovilizada con *A. brasilense*, usando *D-glucosa* como fuente de carbono.

#### 7.1.2.1.1. *Chlorella vulgaris*

El contenido total de carbohidratos totales en *A. brasilense* fue constante durante las 144 h de incubación, dentro del rango de  $15.9 \pm 7.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (Fig. 13a, letras mayúsculas). *C. vulgaris* inmovilizada sola ( $113.4 \pm 18.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y co-inmovilizada ( $133 \pm 20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) incrementaron el contenido de carbohidratos totales a las 24 h. En este tiempo no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig. 13a, letras minúsculas). Posteriormente el contenido de carbohidratos disminuyó hasta las 72 h (Fig. 13a, letras mayúsculas), alcanzando el mismo nivel de carbohidratos en la microalga inmovilizada y co-inmovilizada (Fig.13a, letras minúsculas). La máxima acumulación de carbohidratos fue alcanzada a las 96 h de cultivo. En este tiempo, el contenido de carbohidratos fue significativamente mayor en *C. vulgaris* co-inmovilizada ( $200 \pm 20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) que inmovilizada sola ( $113 \pm 7.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Fig.13a, letras minúsculas). Este contenido de carbohidratos permaneció constante hasta el final del tiempo de incubación.

Se alcanzó un incremento de carbohidratos de  $143 \pm 5\%$  en *C. vulgaris* inmovilizada sola y  $333 \pm 8\%$  co-inmovilizada a las 96 h de incubación. Sin embargo, en este tiempo, el contenido de carbohidratos por célula no fue el mayor ( $58 \pm 3.2$  inmovilizada sola y  $366 \pm 145 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada). El contenido máximo por célula se presentó a las 24 h ( $310 \pm 130$  inmovilizada sola y  $468 \pm 92 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada) (Figs. 13d, e). Bajo estas condiciones se observó un patrón similar en la acumulación de almidón. A las 24 h de incubación, el contenido de almidón fue de  $46 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  inmovilizada sola y  $65 \pm 11 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  co-inmovilizada, encontrando diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig. 13b, letras minúsculas). Igual a la acumulación de carbohidratos totales, la acumulación de almidón ocurrió a las 96 h, alcanzando diferencias

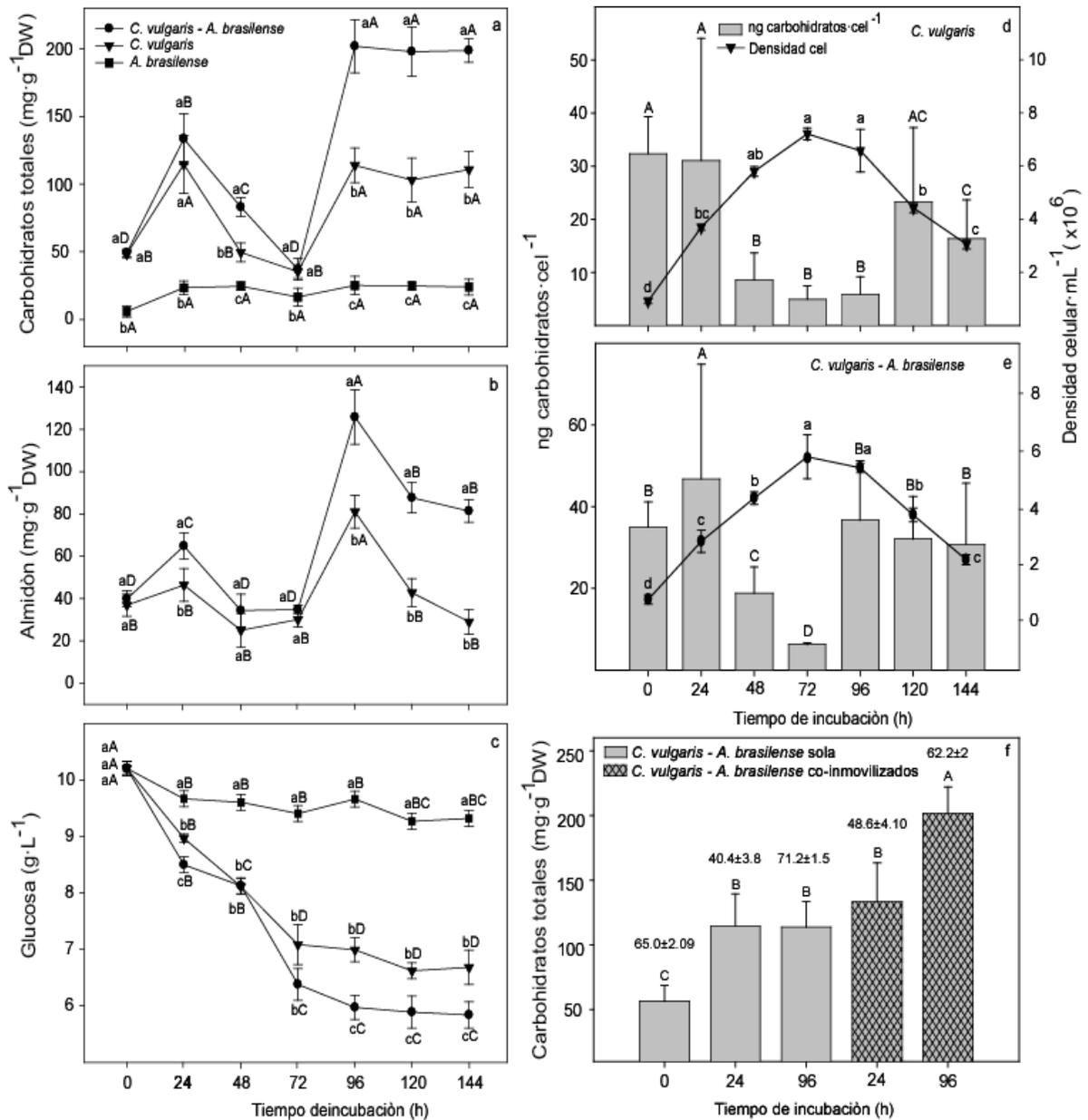


Figura 13. (a) Acumulación de carbohidratos totales, (b) Acumulación de almidón, (c) Consumo de glucosa, (d) Crecimiento (línea continua) y acumulación de carbohidratos por célula (columnas) por *C. vulgaris* inmovilizada sola en esferas de alginato. (e) Densidad celular (línea sólida) y acumulación de carbohidratos por célula en *C. vulgaris* co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. (f) Carbohidratos totales (columnas) y porcentaje de almidón (valores arriba de las columnas) a las 24 y 96 h de incubación. Todos los experimentos fueron realizados en condiciones heterotróficas utilizando glucosa como fuente de carbono. Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc a  $P < 0.05$ . Puntos de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a  $P < 0.05$  en (a) y (c) usando un ANOVA, en (b) usando una prueba t de Student. En (d), (e), y (f), columnas denotadas por diferentes letras mayúsculas difieren significativamente por un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

significativas entre la microalga inmovilizada sola ( $81 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y co-inmovilizada ( $126 \pm 23 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Fig. 13b, letras minúsculas).

Después de este tiempo, el contenido de almidón disminuyó (Fig. 13b, letras mayúsculas). De los carbohidratos totales acumulados a las 96 h, el contenido de almidón fue  $71.2 \pm 1.5\%$  incubada sola y  $62.2 \pm 2\%$  incubada co-inmovilizada (Fig. 13f). Aunque el contenido de almidón a las 96 h fue mayor que a las 24 h (Fig. 13b, letras mayúsculas), el contenido de almidón por célula en *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada a las 24 y 96 h fue casi el mismo;  $125 \pm 47 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  y  $123 \pm 26 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  respectivamente, incubada sola y  $229 \pm 46 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  y  $228 \pm 51 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada con la bacteria (Anexo 2).

### 7.1.2.1.2. *Chlorella sorokiniana*

Creciendo en condiciones heterotróficas, *C. sorokiniana* inmovilizada sola o co-inmovilizada con *A. Brasilense* presentó cantidades similares de carbohidratos totales en todo el período de incubación (144 h) (Fig. 14a, letras mayúsculas).

Un nivel constante de carbohidratos en *C. sorokiniana* inmovilizada sola fue encontrado en todos los intervalos de tiempo. Después de 24 h de incubación alcanzó el máximo de acumulación de carbohidratos de  $96 \pm 40 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  inmovilizada sola y  $115 \pm 38 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  interactuando con *A. brasilense*. No se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos en ningún intervalo de tiempo (Fig. 14a, letras minúsculas). El incremento en el contenido de carbohidratos totales a las 24 h fue  $96 \pm 5.09\%$  incubada sola y  $135 \pm 6.79\%$  incubada co-inmovilizada, comparado con el nivel inicial. A las 24 h, el contenido máximo de carbohidratos por célula fue  $332 \pm 175 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en la microalga sola y  $504 \pm 298 \text{ ng}\cdot\text{cell}^{-1}$  interactuando con la bacteria. Posteriormente este contenido de carbohidratos disminuyó hasta el final del tiempo de incubación (Fig. 14d, e).

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos totales en *C. sorokiniana* cuando estuvo co-inmovilizada o sola, el almidón fue el principal carbohidrato detectado. En el tratamiento co-inmovilizado, el contenido de almidón fue significativamente mayor en varios intervalos de incubación (Fig. 14b, letras minúsculas). El mayor contenido de almidón se alcanzó a las 24 h;  $52 \pm 15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  inmovilizada sola y  $73 \pm 8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  co-inmovilizada. Posteriormente, el contenido de almidón fue disminuyendo lentamente (Fig. 14b, letras mayúsculas). El contenido de almidón fue  $54.1 \pm 2.5\%$  sola  $63.3 \pm 1.4\%$  co-inmovilizada, del total de carbohidratos totales acumulados (Fig. 14f). A las 24 h, el mayor contenido de almidón por célula fue  $181 \pm 64 \text{ ng}\cdot\text{cell}^{-1}$ , inmovilizada sola, y  $318 \pm 53 \text{ ng}\cdot\text{cell}^{-1}$ , co-inmovilizada (Anexo 2).

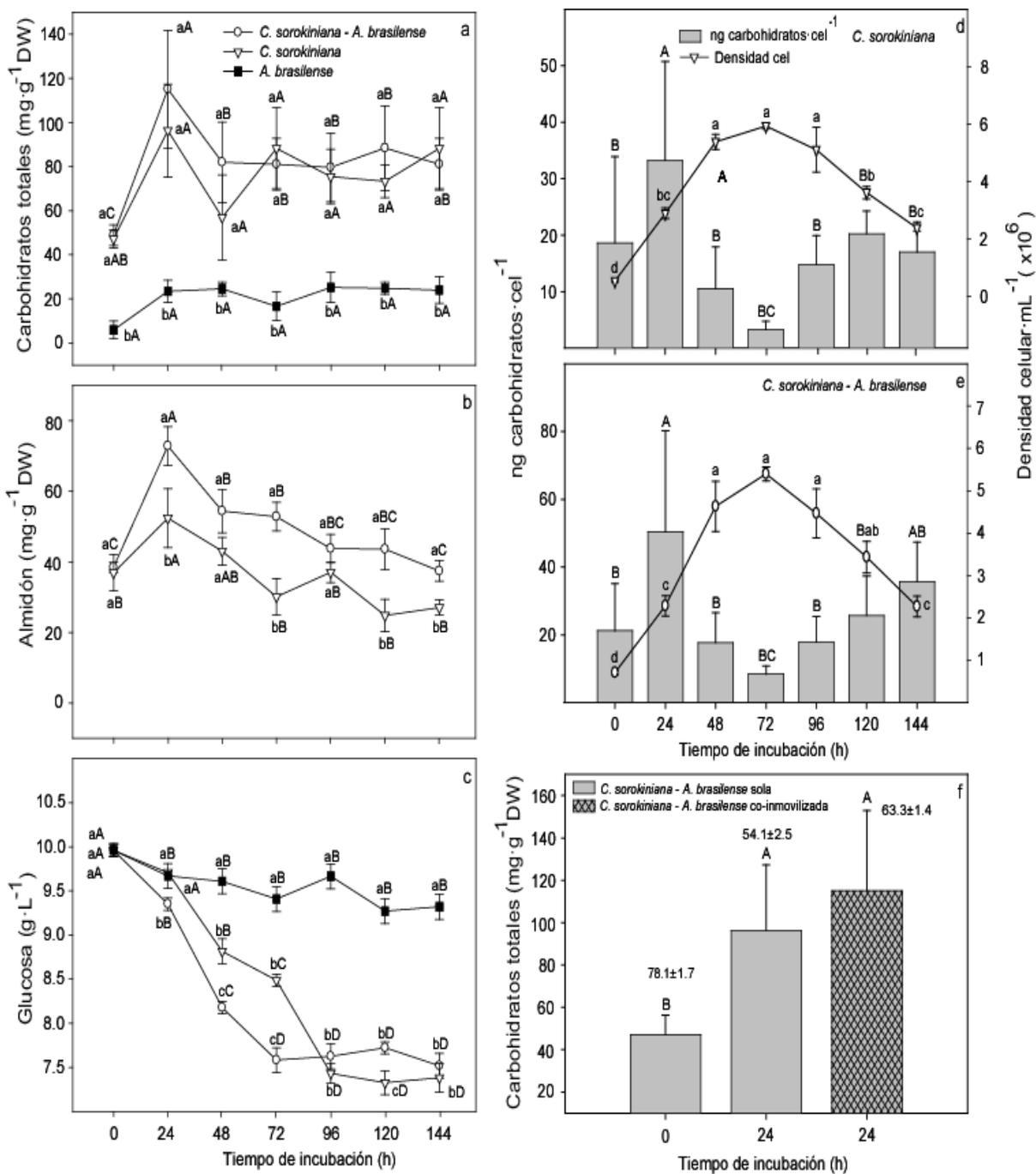


Figura 14. (a) Acumulación de carbohidratos totales, (b) Acumulación de almidón, (c) Consumo de glucosa, (d) Crecimiento (línea continua) y acumulación de carbohidratos por célula (columnas) por *C. sorokiniana* inmovilizada sola en esferas de alginato. (e) Densidad celular (línea sólida) y acumulación de carbohidratos por célula en *C. sorokiniana* co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. (f) Carbohidratos totales (columnas) y porcentaje de almidón (valores arriba de las columnas) a las 24 h de incubación. Todos los experimentos fueron realizados en condiciones heterotróficas utilizando glucosa como fuente de carbono. Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc a  $P < 0.05$ . Puntos de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a  $P < 0.05$  en (a) y (c) usando un ANOVA, en (b) usando una prueba t de Student. En (d), (e), y (f), columnas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente por un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

### 7.1.2.2. Consumo de D-glucosa

*A. brasilense* no consumió D-glucosa durante el período de incubación (Fig. 13c, letras mayúsculas), como es conocido para esta especie (Hartmann y Zimmer, 1994). *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada exhibió un consumo continuo de D-glucosa durante las primeras 72 h de incubación, pero sin alcanzar diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig. 13c, letras minúsculas). Ulteriormente el consumo de D-glucosa permaneció en este nivel hasta el fin del período de incubación (Fig. 13c, letras mayúsculas), aunque diferencias significativas fueron encontradas entre la microalga inmovilizada y co-inmovilizada (Fig. 13c, letras minúsculas).

*C. sorokiniana* inmovilizada sola gradualmente aumentó el consumo de D-glucosa hasta las 96 h y luego este consumo cesó (Fig. 14c, letras mayúsculas). Co-inmovilizada, un gradual y continuo consumo de D-glucosa se encontró hasta las 72 h, el cuál fue significativamente mayor que el consumo de D-glucosa de la microalga inmovilizada sola (Fig. 14c, letras minúsculas). Después de este tiempo (72 h), el consumo de D-glucosa cesó (Fig. 14c, letras mayúsculas).

La afinidad más grande de *C. vulgaris* inmovilizada sola o co-inmovilizada se obtuvo a las 72 h, pero fue significativamente mayor interactuando con la bacteria en todos los intervalos de tiempo (Tabla 4, letras minúsculas). La menor productividad volumétrica y el rendimiento de carbohidratos fue calculado a las 96 h (Tabla 3, letras mayúsculas); en este tiempo, el tratamiento co-inmovilizado fue significativamente mayor (Tabla 4, letras minúsculas). A las 96 h, la afinidad para *C. vulgaris* sola o co-inmovilizada fue la menor (Tabla 4, letras mayúsculas).

Tabla 4. Análisis general de carbohidratos totales en *Chlorella* spp. co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato en un medio residual sintético bajo condiciones heterotróficas, utilizando D-glucosa como fuente de carbono.

	Afinidad		Productividad volumétrica		Rendimiento de carbohidratos	
	mg·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>	
	Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola
<i>C. vulgaris</i>						
0 – 24 h	0.81±0.08 aA	0.44±0.04 bA	7.21±1.11 aA	5.78±0.42 bA	4.67±1.7 aA	4.22±0.4 aA
48 – 72 h	1.17±0.06 aA	0.72±0.24bA	-4.60±1.51 aB	-1.42±0.81 bB	-1.38±0.07 aB	-2.63±0.6 bB
<i>C. sorokiniana</i>						
0 – 24 h	0.44±0.32 aA	0.12±0.09 bA	6.61±1.16 aA	4.90±0.49 bA	19.4±0.31 aA	10.8±0.08 bA
48 – 72 h	0.97±0.58 aA	0.68±0.50 bB	-0.09±8.2 aB	3.13±0.37 bA	-0.15±1.26 aB	9.52±2.30 bA

Los valores de cada tratamiento y cada especie de microalga denotados por diferentes letras mayúsculas difieren significativamente en cada intervalo de tiempo. Los valores para cada comparación entre los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados con diferentes letras minúsculas difieren significativamente. Los análisis estadísticos fueron realizados usando un ANOVA de una vía y análisis post-hoc a  $P < 0.05$  por una prueba t de Student. Las barras representan el error estándar.

A las 72 h, *C. sorokiniana* también mostró la mayor afinidad (Tabla 4, letras mayúsculas), y similar a *C. vulgaris*, también expuso diferencias significativas entre sola y co-inmovilizada (Tabla 4, letras minúsculas). La productividad volumétrica y el rendimiento de carbohidratos fueron significativamente menor en la microalga co-inmovilizada. El máximo rendimiento de carbohidratos y productividad volumétrica fueron calculados a las 24 h en ambos tratamientos (Tabla 4, letras mayúsculas), logrando el co-inmovilizado ser significativamente mayor (Tabla 4, letras minúsculas). La afinidad a las 24 h fue baja en ambos tratamientos (Tabla 4, letras mayúsculas).

**7.1.2.3. Acumulación de carbohidratos en *Chlorella* spp. co-inmovilizada con *A. brasilense*, usando acetato de sodio como fuente de carbono.**

**7.1.2.3.1. *Chlorella vulgaris***

El contenido de carbohidratos totales en *A. brasilense* fue constante durante todo el tiempo de incubación cuando creció en acetato de sodio, el promedio de carbohidratos fue  $16 \pm 5.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (Fig. 15a, letras mayúsculas). A lo largo de todo el período de incubación, no hubieron diferencias significativas entre el cultivo de *C. vulgaris* sola y co-inmovilizada (Fig. 15a, letras minúsculas). Ambos cultivos llegaron a su máxima acumulación de carbohidratos después de 24 h,  $83 \pm 9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  inmovilizada sola y  $93 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , co-inmovilizada. El incremento fue  $117 \pm 3.25\%$  inmovilizada y  $126 \pm 2.61\%$  interactuando con la bacteria, comparado con el contenido de carbohidratos al inicio del cultivo. El contenido de carbohidratos por célula fue  $237 \pm 57 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  inmovilizada sola y  $247 \pm 39 \text{ ng}\cdot\text{cell}^{-1}$  co-inmovilizada (Fig. 15d, e), con niveles bajos en el resto de los intervalos de incubación y el contenido de carbohidratos disminuyendo con el tiempo (Fig. 15a, letras mayúsculas).

Semejante al contenido de carbohidratos, durante todo el período de incubación no hubo diferencias significativas entre el contenido de almidón de *C. vulgaris* sola y co-inmovilizada (Fig. 15b, letras minúsculas). El más importante contenido de almidón en *C. vulgaris* creciendo sola e interactuando con la bacteria fue a las 24 h, consiguiendo acumular  $45 \pm 6.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  sola y  $52 \pm 7.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  co-inmovilizada. El contenido de almidón a las 24 h representa  $54.2 \pm 1.8\%$  de los carbohidratos totales acumulados creciendo sola, y  $55.6 \pm 1.6\%$ , co-inmovilizada (Fig. 14f). A las 24 h, el contenido de almidón por célula fue  $75 \pm 15 \text{ ng}\cdot\text{cell}^{-1}$ , creciendo sola, y  $138 \pm 26 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  co-inmovilizada (Anexo 3). Después el contenido de almidón disminuyó y permaneció en el mismo rango (Fig. 15b, letras mayúsculas).

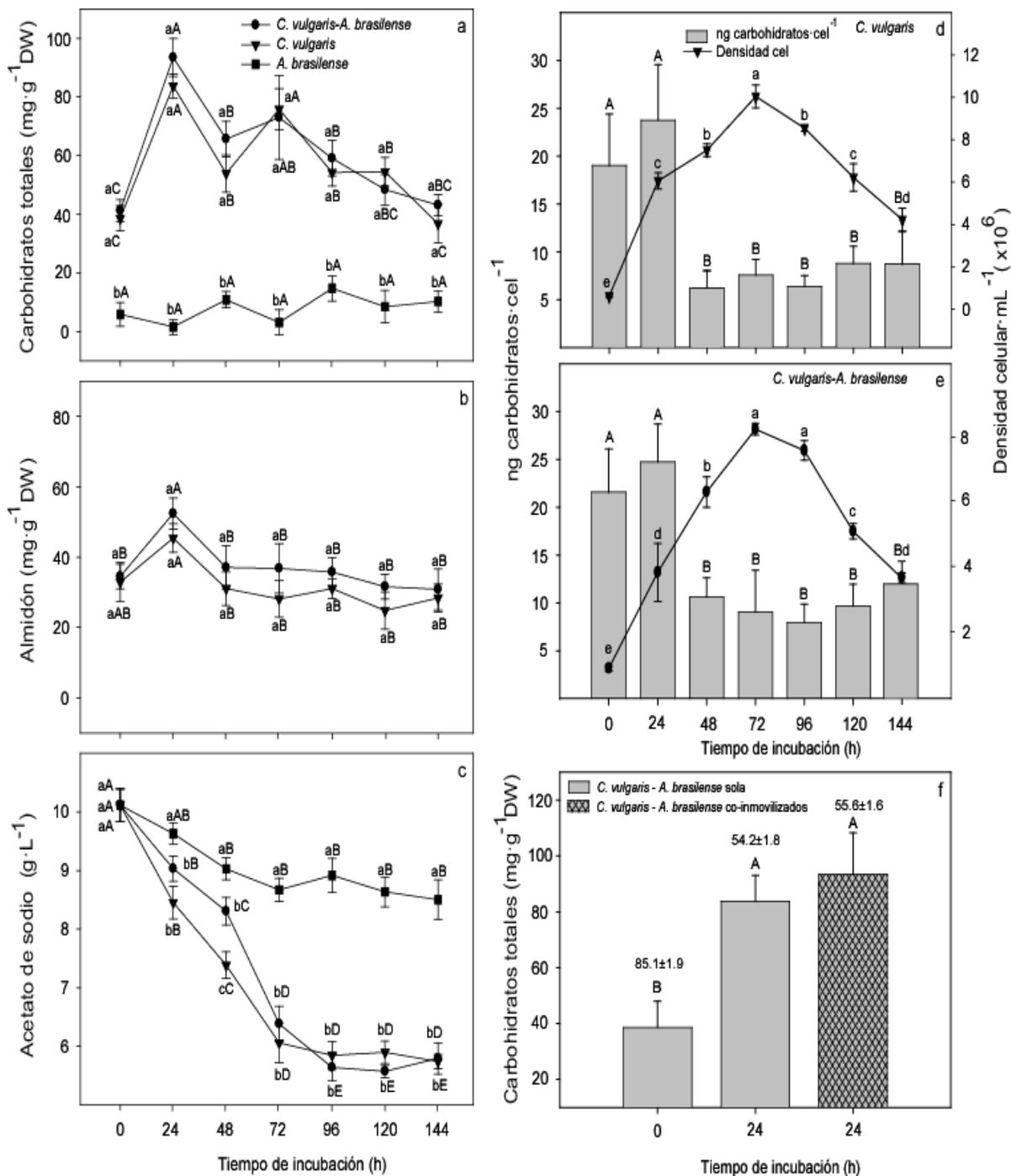


Figura 15. (a) Acumulación de carbohidratos totales, (b) Acumulación de almidón, (c) Consumo de acetato de sodio, (d) Crecimiento (línea continua) y acumulación de carbohidratos por célula por *C. vulgaris* inmovilizada sola en esferas de alginato. (e) Densidad celular (línea sólida) y acumulación de carbohidratos por célula en *C. vulgaris* co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. (f) Carbohidratos totales (columnas) y porcentaje de almidón (valores arriba de las columnas) a las 24 h de incubación. Todos los experimentos fueron realizados en condiciones heterotróficas utilizando acetato de sodio como fuente de carbono. Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc a  $P < 0.05$ . Puntos de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a  $P < 0.05$  en (a) y (c) usando un ANOVA, en (b) usando una prueba t de Student. En (d), (e), y (f), columnas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente por un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

### 7.1.2.3.2. *Chlorella sorokiniana*

*C. sorokiniana* presentó un patrón equivalente a la acumulación de carbohidratos totales y almidón como *C. vulgaris*, pero acumuló, en ciertos intervalos, cantidades superiores. Durante el tiempo de incubación, no hubo diferencias significativas en la acumulación de carbohidratos totales entre *C. sorokiniana* creciendo sola o interactuando con *A. brasilense* (Fig. 16a, letras minúsculas). Ambos cultivos llegaron a su mayor contenido de carbohidratos después de 24 h de incubación;  $123 \pm 10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , inmovilizada, y  $102 \pm 3.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , co-inmovilizada. El incremento de carbohidratos totales a las 24 h fue  $157 \pm 3.45\%$  y  $114 \pm 5\%$ , respectivamente, con respecto a la concentración inicial de carbohidratos (0 h). A las 24 h, la máxima cantidad de carbohidratos por célula fue similar:  $34.1 \pm 14.0 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  y  $34.1 \pm 13.8 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 16d, e), mostrando menor cantidad de carbohidratos por célula en los demás intervalos y mantenida en este nivel bajo (Fig. 16a, letras mayúsculas).

La acumulación de almidón presentó un patrón afín a los carbohidratos totales acumulados. Después de 24 h, el almidón alcanzó su máxima acumulación:  $77 \pm 8.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  co-inmovilizada, la cual fue significativamente mayor que  $56 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  inmovilizada sola (Fig.16b, letras minúsculas). Este contenido de almidón representa  $45.7 \pm 1 \%$  y  $75.4 \pm 2 \%$ , del total de carbohidratos acumulados en este tiempo (24 h) (Fig. 16f).

A las 24 h, el almidón por célula fue  $15.6 \pm 1.8 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$  y  $25.8 \pm 3.6 \text{ ng}\cdot\text{cel}^{-1}$ , respectivamente. Desde las 24 a las 144 h, el contenido de almidón por cultivo disminuyó y continuó en el nivel más bajo, similar al contenido de carbohidratos (Fig. 16b, letras mayúsculas) (Anexo 3).

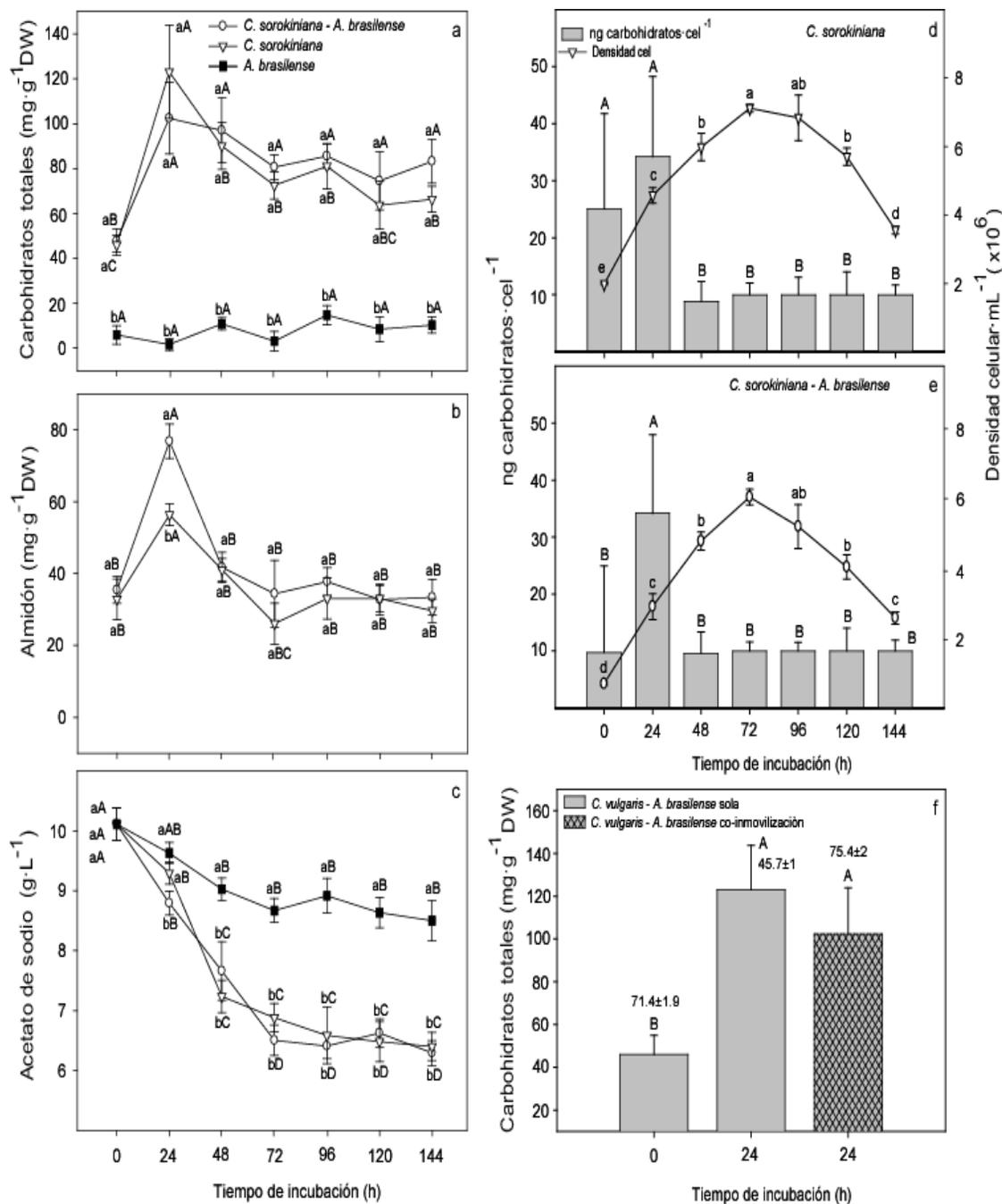


Figura 16. (a) Acumulación de carbohidratos totales, (b) Acumulación de almidón, (c) Consumo de acetato de sodio, (d) Crecimiento (línea continua) y acumulación de carbohidratos por célula (columnas) por *C. sorokiniana* inmovilizada sola en esferas de alginato. (e) Densidad celular (línea sólida) y acumulación de carbohidratos por célula en *C. sorokiniana* co-inmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. (f) Carbohidratos totales (columnas) y porcentaje de almidón (valores arriba de las columnas) a las 24 h de incubación. Todos los experimentos fueron realizados en condiciones heterotróficas utilizando acetato de sodio como fuente de carbono. Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc a  $P < 0.05$ . Puntos de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a  $P < 0.05$  en (a) y (c) usando un ANOVA, en (b) usando una prueba t de Student. En (d), (e), y (f), columnas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente por un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

#### 7.1.2.4. Consumo de acetato de sodio

En *A. Brasilense* se obtuvo un incremento en el consumo de acetato de sodio hasta las 72 h, luego de este intervalo, el consumo cesó (Fig. 15c., letras mayúsculas). *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada acrecentó el consumo hasta las 72 h. Posteriormente el consumo cesó también en estos tratamientos (Fig. 15c, letras mayúsculas). En las primeras 48 h, los microorganismos co-inmovilizados tuvieron significativamente más consumo de acetato de sodio; en el resto de los intervalos de tiempo, no se detectaron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig. 15c, letras minúsculas).

El consumo de acetato de sodio por *C. sorokiniana* fue similar a aquel de *C. vulgaris*, con el mayor consumo a las 72 h. Durante todo el tiempo de incubación, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos inmovilizados y co-inmovilizados (Fig. 16c, letras minúsculas).

Con acetato de sodio como la fuente de carbono. La máxima afinidad en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* fue calculada a las 72 h (Tabla 5, letras mayúsculas). La afinidad fue significativamente mayor en los tratamientos co-inmovilizados (Tabla 5, letras minúsculas). A las 72 h, la productividad volumétrica y el rendimiento de carbohidratos fueron bajos (Tabla 5, letras mayúsculas), con diferencias significativas entre los dos tratamientos (Tabla 5, letras minúsculas). Después de 24 h, los tratamientos inmovilizados y co-inmovilizados alcanzaron la máxima productividad volumétrica y rendimiento de carbohidratos (Tabla 5, letras mayúsculas), pero solo *C. vulgaris* mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos (Tabla 5, letras minúsculas). La afinidad a las 24 h fue baja (Tabla 5, letras mayúsculas).

Tabla 5. Análisis general de carbohidratos totales en *Chlorella* spp. co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato en un medio residual sintético bajo condiciones heterotróficas, utilizando acetato de sodio como fuente de carbono.

	Afinidad		Productividad volumétrica		Rendimiento de carbohidratos	
	mg·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>	
	Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola
<b><i>C. vulgaris</i></b>						
0 – 24 h	0.37±0.15 aA	0.30±0.09 aA	5.22±0.63 aA	4.51±0.47 bA	4.82±0.40 aA	2.72±0.97 bA
48 – 72 h	1.02±0.18 aB	0.52±0.06 bB	0.73±0.17 aB	2.93±0.51 bB	0.38±0.07 aB	2.21±0.31 bA
<b><i>C. sorokiniana</i></b>						
0 – 24 h	0.58±0.13 aA	0.26±0.05 aA	5.46±1.09 aA	4.59±0.22 aA	4.14±1.03 aA	5.62±1.14 aA
48 – 72 h	0.90±0.22 aB	0.26±0.19 bA	-1.63±0.14 aB	-3.30±0.36 bB	-1.41±0.54 aB	-9.35±0.49 bB

Los valores de cada tratamiento y cada especie de microalga denotados por diferentes letras mayúsculas difieren significativamente en cada intervalo de tiempo. Los valores para cada comparación entre los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados con diferentes letras minúsculas difieren significativamente. Los análisis estadísticos fueron realizados usando un ANOVA de una vía y análisis post-hoc a  $P < 0.05$  por una prueba t de Student. Las barras representan el error estándar.

### 7.1.2.5. Crecimiento heterotrófico de *Chlorella* spp.

Generalmente, el crecimiento de *Chlorella* spp. inmovilizada sola fue superior que co-inmovilizada con *A. brasilense*. Cuando el crecimiento estuvo basado en D-glucosa, *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* alcanzaron la máxima densidad celular y tasa de crecimiento a las 72 h. *C. vulgaris* obtuvo una población de  $7.2 \times 10^6 \pm 0.51 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y una tasa de crecimiento de  $0.83 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$ , mientras que co-inmovilizada, la máxima población a las 72 h fue de  $5.5 \times 10^6 \pm 0.30 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y la tasa de crecimiento  $0.70 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ . Diferencias significativas fueron encontradas entre ambos tratamientos. Ulterior de este intervalo, la densidad celular disminuyó (Figs. 13d, 13e). El mismo patrón ocurrió con *C. sorokiniana*. A las 72 h, la densidad celular fue significativamente diferente entre los tratamientos, alcanzando  $6.0 \times 10^6 \pm 0.30 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  cuando estuvo inmovilizada sola y  $5.4 \times 10^6 \pm 0.50 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  co-inmovilizada (Figs. 14d, 14e); las tasas de crecimiento fueron  $0.80 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$  y  $0.67 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente.

*C. vulgaris* y *C. sorokiniana* creciendo en acetato de sodio mostraron el mismo patrón de crecimiento, consiguiendo la máxima densidad celular y tasa de crecimiento después de 72 h de incubación, logrando mayor densidad celular que utilizando D-glucosa como la fuente de carbono. A las 72 h, *C. vulgaris* presentó diferencias significativas entre ambos tratamientos, alcanzando una población de  $10 \times 10^6 \pm 1.19 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  inmovilizada sola y  $8.5 \times 10^6 \pm 1.13 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  co-inmovilizada con *A. brasilense* (Figs. 15d, 15e); las tasas de crecimiento fueron  $0.93 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$  y  $0.73 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente.

*C. sorokiniana* tuvo una población de  $6.6 \times 10^6 \pm 0.36 \text{ mL}^{-1}$  y  $6.1 \times 10^6 \pm 0.56 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, mientras que la tasa de crecimiento fue  $0.81 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$  y  $0.72 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$  (Figs. 16d, 16e). Estas tasas de crecimiento fueron significativamente diferentes entre la microalga creciendo sola o interactuando con la bacteria. La tasa de crecimiento y la densidad celular de *C. vulgaris* fueron más grandes que *C. sorokiniana*, utilizando cualquier fuente de carbono.

**7.2. Evaluar el efecto de *A. brasilense* en la actividad enzimática (AGPase) del metabolismo de acumulación de almidón en *Chlorella vulgaris* interactuando co-inmovilizadas en esferas de alginato, creciendo bajo régimen heterotrófico.**

**7.2.1. Actividad enzimática de la AGPase de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense*, usando *D*-glucosa como fuente de carbono**

Creciendo satisfechas o saciadas de nitrógeno, *A. brasilense* mostró una actividad constante de la AGPase, alcanzando una máxima actividad de  $8.81 \pm 3.44$  U a las 48 h y después la actividad declinó hasta las 96 h (Fig. 17c, letras mayúsculas). *C. vulgaris* sola o co-inmovilizada alcanzaron la mayor actividad de la AGPase igualmente a las 48 h,  $11.23 \pm 2.69$  U (inmovilizada) y  $18.76 \pm 3.04$  U (co-inmovilizada). Después esta actividad disminuyó con el tiempo hasta las 96 h en ambos tratamientos (Fig. 17c, letras mayúsculas). Diferencias significativas entre la actividad de la AGPase in *C. vulgaris* sola y *A. brasilense* no fueron encontradas en ningún intervalo de incubación (Fig. 17c, letras minúsculas). Sin embargo, la actividad específica de AGPase en *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* fue significativamente mayor que inmovilizada sola durante todo el tiempo de incubación (Fig. 17c, letras minúsculas).

Creciendo en ayuno de nitrógeno, la actividad específica de *A. brasilense* fue  $6.09 \pm 2.06$  U a las 24 h y permaneció constante en este rango todo el período de incubación (Fig. 17a, letras mayúsculas). *C. vulgaris* inmovilizada sola mostró la máxima actividad a las 48 y 72 h ( $10.23 \pm 2.05$  U) y posteriormente disminuyó (Fig. 17a, letras mayúsculas). No hubieron diferencias significativas en la actividad de la AGPase de *C. vulgaris* inmovilizada sola y con *A. brasilense* sola a las 24, 48 y 96 h pero si a las 72 h (Fig. 17a, letras minúsculas). La actividad específica de la AGPase de *C. vulgaris* co-inmovilizada con la bacteria, aunque no cambio significativamente durante el tiempo de incubación, fue  $17.17 \pm 3.58$  U a las 48 h (Fig. 17a, letras mayúsculas) y fue significativamente mayor en todo el tiempo de incubación que los dos controles que fueron inmovilizados solos (Fig. 17a, letras minúsculas).

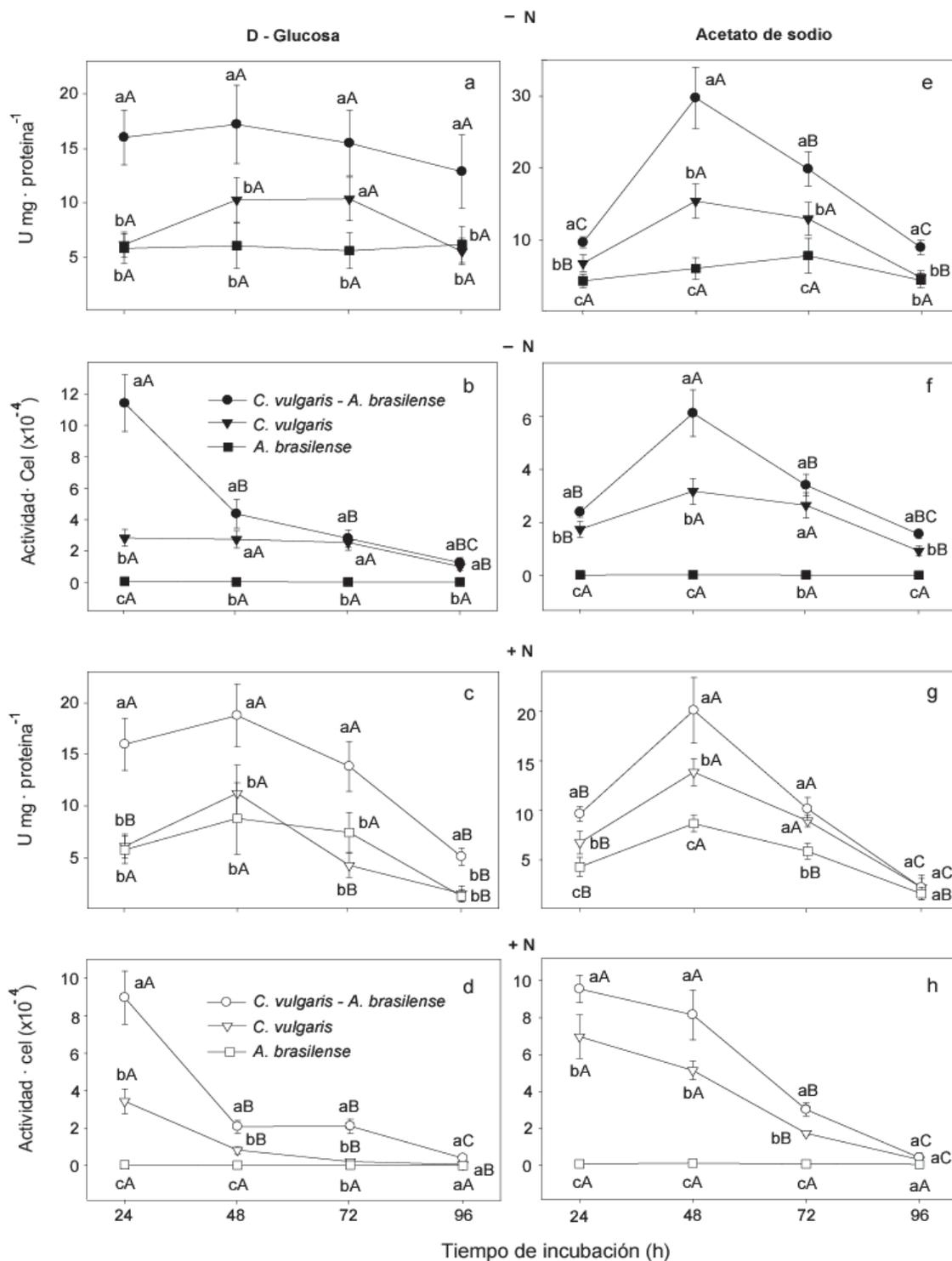


Figura 17. Actividad de la AGPase de *C. vulgaris*, *A. brasilense* inmovilizados solos y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato bajo ayuno (- N) y saciada (+ N) nitrógeno, utilizando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono. Actividad específica de la AGPase (a,c,e,g), actividad por célula de la AGPase (b,d,f,h). Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente. Los valores de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente; ambos usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

Sin embargo, cuando la actividad de la AGPase fue medida por célula en *A. brasilense* creciendo saciadas ( $4.3 \times 10^{-6} \pm 1.95$ ) o en ayuno de nitrógeno ( $6.14 \times 10^{-6} \pm 1.42$ ), la actividad fue muy baja y constante durante las 96 h de incubación (Fig. 17b, d, letras mayúsculas). En presencia de nitrógeno, *C. vulgaris* creciendo sola o co-inmovilizada con *A. brasilense* mostró la máxima actividad por célula a las 24 h,  $3.43 \times 10^{-4} \pm 6.49$  (inmovilizada sola) y  $8.95 \times 10^{-4}$  (co-inmovilizada), posteriormente esta actividad disminuyó con el tiempo (Fig. 1d, letras mayúsculas). Esta actividad fue significativamente mayor en el tratamiento co-inmovilizado que en la microalga sola en la mayoría de los intervalos de tiempo (Fig. 1d, letras minúsculas). Bajo condiciones de ayuno, la actividad por célula de la AGPase en *C. vulgaris* inmovilizada sola fue constante durante las primeras 72 h de incubación ( $2.82 \times 10^{-4} \pm 5.34$ ) y después disminuyó (Fig. 17b, letras mayúsculas). Co-inmovilizada *C. vulgaris* mostró la máxima actividad de la AGPase a las 24 h ( $11.14 \times 10^{-3} \pm 1.08$ ) y más tarde declinó (Fig. 17b, letras mayúsculas). Solo en este tiempo (24 h) hubo diferencias significativas entre la microalga creciendo sola o interactuando con la bacteria (Fig. 17b, letras minúsculas).

Creciendo satisfechas de fósforo, la actividad de la AGPase en *A. brasilense* fue  $4.93 \pm 1.54$  U a las 24 h y permaneció constante hasta las 72 h y después declinó (Fig. 18c, letras mayúsculas). Un patrón similar fue encontrado en la actividad de la AGPase en *C. vulgaris* inmovilizada sola ( $6.87 \pm 1.6$  U) o co-inmovilizada ( $9.7 \pm 1.3$  U). En todos los tratamientos, esta actividad enzimática fue alcanzada a las 24 h y permaneció sin cambiar hasta las 72 h y después disminuyó a las 96 h (Fig. 18c, letras mayúsculas). No hubo diferencias significativas entre la actividad de esta enzima en *C. vulgaris* y *A. brasilense* (Fig. 18c, letras minúsculas). Aunque la actividad de esta enzima (AGPase) en la microalga co-inmovilizada fue mayor que las actividades alcanzadas en cada microorganismo inmovilizado solo; aunque no hubo diferencias significativas en los valores obtenidos en todos los intervalos de tiempo (Fig. 18c, letras minúsculas).

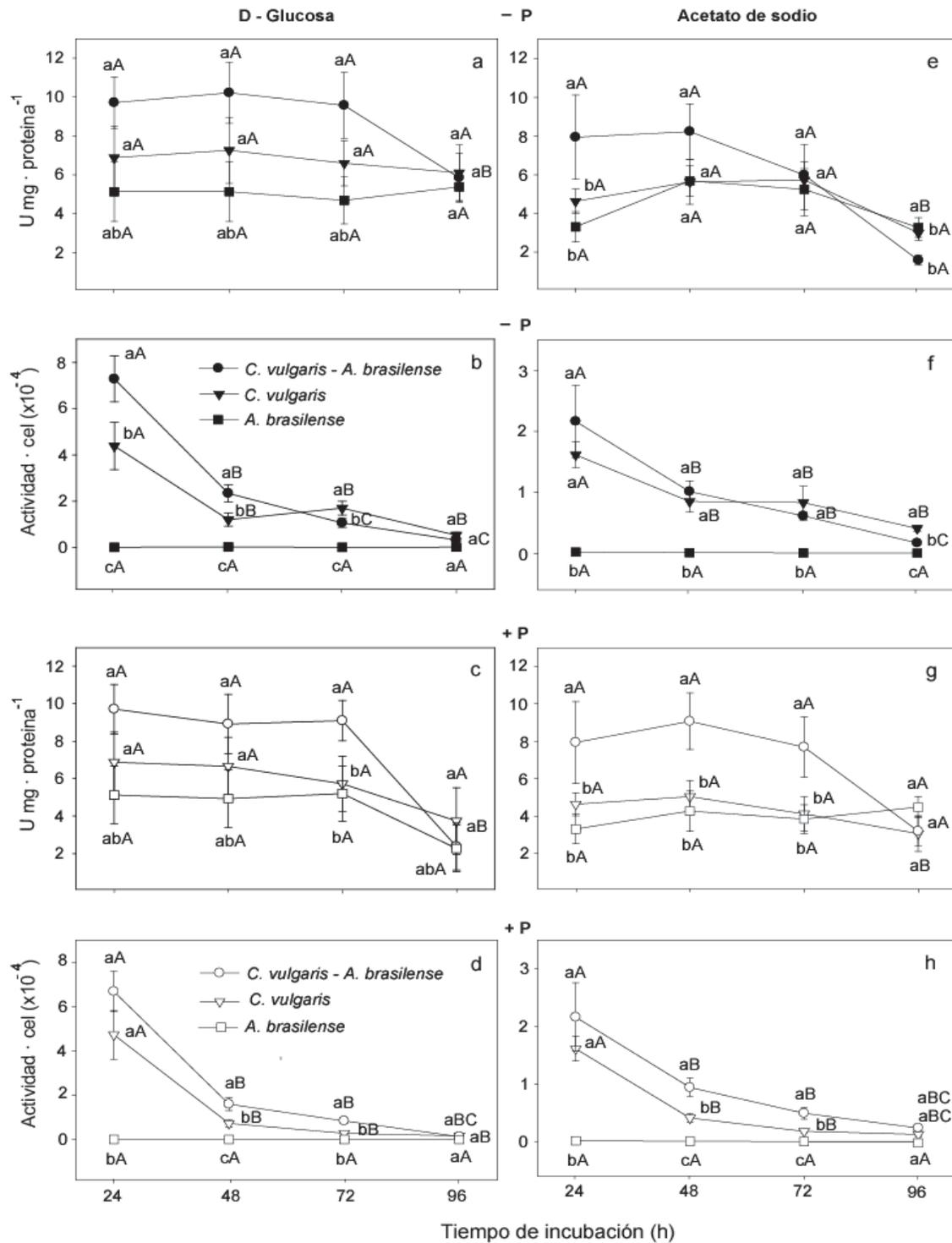


Figura 18. Actividad de la AGPase de *C. vulgaris*, *A. brasilense* inmovilizados solos y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato bajo ayuno (- P) y saciada (+ P) fósforo, utilizando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono. Actividad específica de la AGPase (a,c,e,g), actividad por célula de la AGPase (b,d,f,h). Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente. Los valores de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente; ambos usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

Bajo condiciones de ayuno de fósforo, la AGPase de *A. brasilense* mostró una actividad similar durante 96 h ( $5.12 \pm 1.53$  U) (Fig. 18a, letras mayúsculas). La actividad enzimática de *C. vulgaris* inmovilizada sola mostró una actividad similar de  $7.25 \pm 1.69$  U durante todo el período de incubación (Fig. 18a, letras mayúsculas). Esta actividad específica en *C. vulgaris* inmovilizada sola fue mayor que *A. brasilense*, pero no fue significativamente mayor en la mayoría de los intervalos (Fig. 18a, letras minúsculas). En la microalga co-inmovilizada, la actividad específica de la AGPase permaneció alrededor de  $10.21 \pm 1.57$  hasta las 72 h, y después declinó (Fig. 18a, letras mayúsculas). A pesar de la mayor actividad, no hubo diferencias significativas en la actividad de la AGPase en la microalga co-inmovilizada y los microorganismos inmovilizados solos (Fig. 18a, letras minúsculas).

Un diferente patrón fue detectado cuando la actividad de la AGPase fue calculada por célula. La actividad en *A. brasilense* creciendo saciadas ( $1.31 \times 10^{-6} \pm 3.93$ ) o ayuno ( $1.52 \times 10^{-6} \pm 4.56$ ) de fósforo permaneció constante y muy bajo durante todo el tiempo de incubación (Fig. 18b, d letras mayúsculas). Creciendo saciada de fósforo, *C. vulgaris* creciendo sola o interactuando con la bacteria, presentó la máxima actividad de la AGPase a las 24 h y después la actividad disminuyó (Fig. 18d, letras mayúsculas) en ambos tratamientos, donde la actividad de la AGPase fue  $4.74 \times 10^{-4} \pm 1.10$  (inmovilizada) y  $6.69 \times 10^{-4} \pm 9.09$  (co-inmovilizada). Diferencias significativas entre la microalga sola y co-inmovilizada fueron alcanzadas a las 48 y 72 h de incubación (Fig. 18d, letras minúsculas).

Un patrón similar fue encontrado en *C. vulgaris* bajo ayuno de fósforo. La mayor actividad de la AGPase fue encontrada a las 24 h en la microalga inmovilizada y co-inmovilizada, después disminuyó (Fig. 18b, letras mayúsculas). En este tiempo la actividad por célula de la AGPase fue  $4.39 \times 10^{-4} \pm 1.02$  (inmovilizada) y  $7.28 \times 10^{-4} \pm 9.89$  (co-inmovilizada) y diferencias significativas fueron obtenidas en varios intervalos de tiempo (Fig. 18b, letras minúsculas).

### 7.2.2. Acumulación de almidón usando D-glucosa como fuente de carbono

Cuando el nitrógeno o fósforo fueron saciados, la microalga sola o co-inmovilizada mostró el mismo patrón de acumulación de almidón, significativamente mayor en la microalga co-inmovilizada que inmovilizada sola (Fig. 19b, d letras minúsculas). Creciendo satisfecha de nitrógeno, el contenido de almidón in *C. vulgaris* inmovilizada ( $51.97 \pm 6.31 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y co-inmovilizada ( $64.43 \pm 3.10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) fue mayor a las 48 h (Fig. 19b, letras mayúsculas). Mientras que satisfechas de fósforo, a las 48 h, la máxima acumulación de almidón obtenida fue  $51.09 \pm 3.12 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (inmovilizada) y  $60.03 \pm 3.71 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (co-inmovilizada) (Fig. 19d, letras mayúsculas).

Bajo condiciones de ayuno, de nitrógeno o fósforo, *C. vulgaris* inmovilizada o co-inmovilizada la mayor acumulación de almidón se alcanzó a las 72 h (Fig. 19a, c letras mayúsculas). En este tiempo, (bajo ayuno de nitrógeno) *C. vulgaris* inmovilizada acumuló  $65.14 \pm 2.88 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $79.16 \pm 3.22 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  co-inmovilizada. Bajo ayuno de fósforo, el contenido de almidón fue  $55.34 \pm 4.49 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (inmovilizada sola) y  $66.25 \pm 4.76 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (co-inmovilizada). Diferencias significativas fueron encontradas a las 48 y 72 h entre ambos tratamientos (Fig. 19c, letras minúsculas). Bajo todas las condiciones, el rendimiento de almidón ( $Q_s$ ) y la productividad volumétrica ( $Y_p$ ) alcanzaron su máximo nivel a las 48 h, aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de la microalga inmovilizada y co-inmovilizada; excepto bajo condiciones satisfechas de nitrógeno; donde  $Y_p$  es más mayor para *C. vulgaris* co-inmovilizada (Tabla 6). Sólo después de este intervalo, el  $Q_s$  y  $Y_p$  disminuyó con el tiempo.

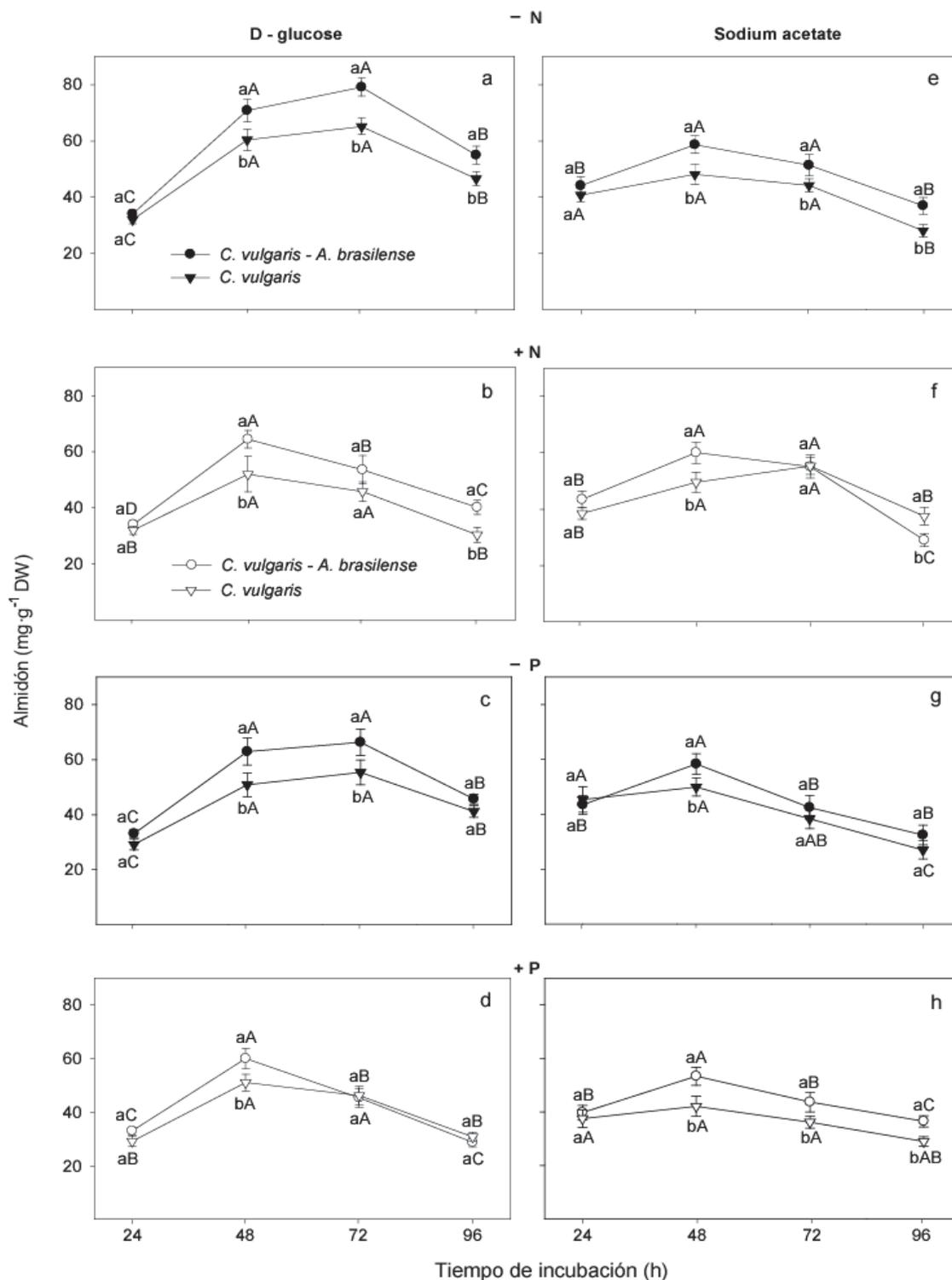


Figura 19. Acumulación de almidón de *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato, bajo ayuno de nitrógeno (- N) (a,e) y fósforo (- P) (c,g), o saciada nitrógeno (+ N) (b,f) y fósforo (+ P) (d,h), usando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono. Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente. Los valores de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente; ambos usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

### 7.2.3. Consumo de D-glucosa

Saciada de nutrientes (N o P), inmovilizada sola o co-inmovilizada, *C. vulgaris* consumió cantidades significativas de glucosa a las 48 h (Fig. 20b[N], 20d[P], letras mayúsculas). En este tiempo, el mismo nivel de glucosa fue alcanzado en ambos tratamientos (Fig. 20b, d letras minúsculas). Después de 48 h, el consumo de glucosa permaneció constante en *C. vulgaris* inmovilizada hasta las 96 h; mientras un consumo significativamente mayor de glucosa se presentó en la microalga co-inmovilizada (Fig. 20b, d letras mayúsculas y letras minúsculas, independientes). Un patrón similar se presentó bajo condiciones de ayuno (N o P) (Fig. 20a, c letras mayúsculas y letras minúsculas, independientes). Independientemente de las condiciones experimentales, la afinidad máxima a la glucosa se obtuvo a las 48 h, mostrando diferencias significativas entre la microalga inmovilizada y co-inmovilizada (Tabla 6). Después la afinidad disminuyó en ambos tratamientos.

Tabla 6. Análisis general de almidón en *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato creciendo en ayuno o saciada de nutrientes y bajo condiciones heterotróficas, usando D-glucosa como fuente de carbono.

		Afinidad		Productividad volumétrica		Rendimiento de almidón	
		mg·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>	
		Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola
<i>C. vulgaris</i>							
24 – 48 h	– N	0.87 ± 0.05a	0.73 ± 0.05a	36.81 ± 3.34a	28.34 ± 3.70a	19.16 ± 1.74a	19.52 ± 2.54a
	+ N	0.25 ± 0.01a	0.13 ± 0.01b	30.37 ± 4.28a	19.92 ± 5.77b	16.12 ± 2.27a	12.34 ± 3.57a
	– P	0.72 ± 0.04a	0.37 ± 0.02b	29.82 ± 5.35a	21.70 ± 5.80a	13.58 ± 2.43a	12.92 ± 3.45a
	+ P	0.48 ± 0.04a	0.23 ± 0.01b	26.95 ± 4.32a	21.93 ± 4.49a	13.42 ± 2.15a	12.39 ± 2.54a

Diferentes letras minúsculas, para cada par de valores indican diferencias significativas entre *C. vulgaris* inmovilizada y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *Azospirillum* analizada por una prueba de t Student.  $P < 0.05$ . (±) Representa el error estándar

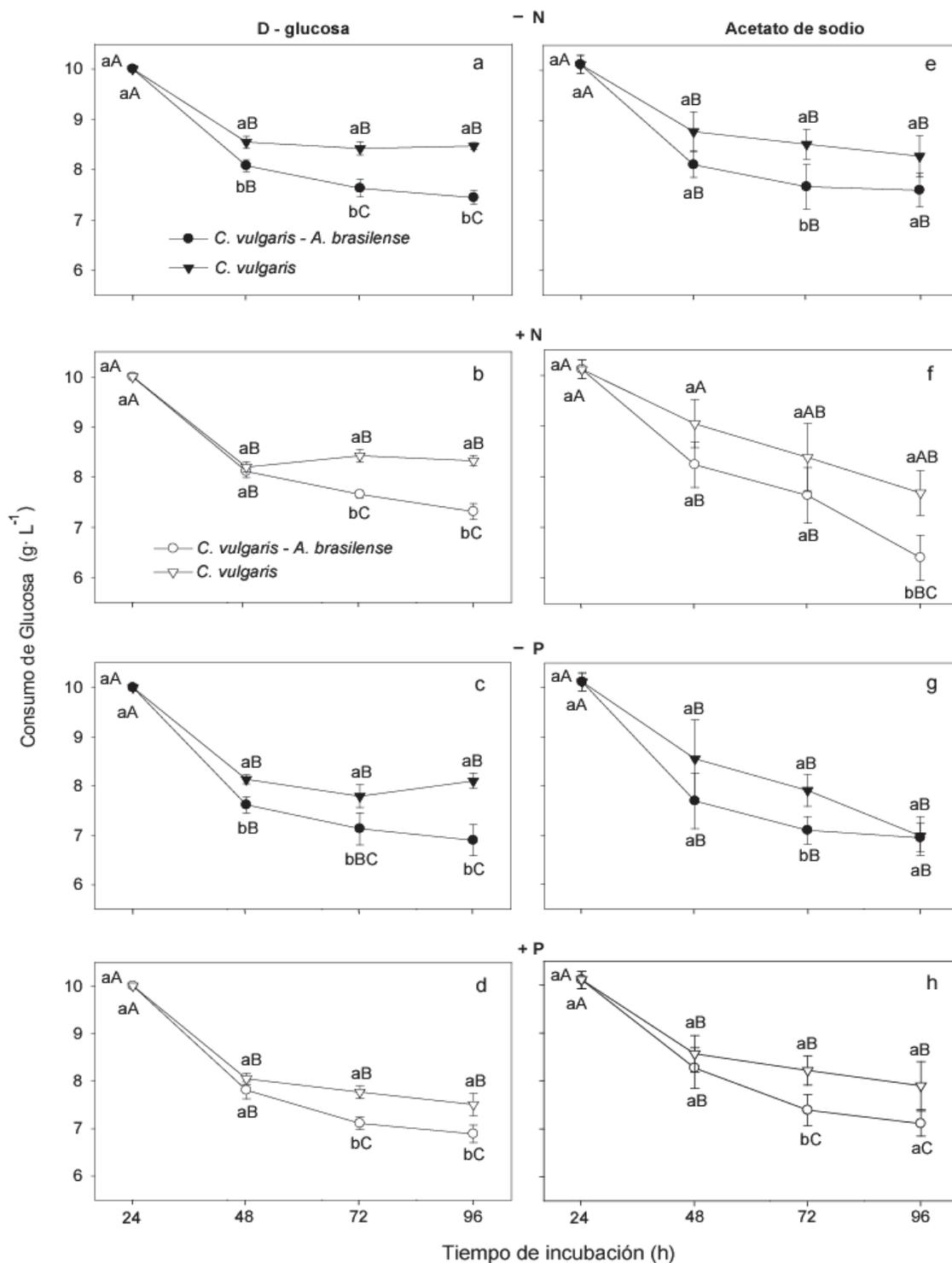


Figura 20. Consumo de la fuente de carbono de *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato, bajo ayuno de nitrógeno (- N) (a,e) y fósforo (- P) (c,g), o saciada nitrógeno (+ N) (b,f) y fósforo (+ P) (d,h), usando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono. Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente. Los valores de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente; ambos usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

#### 7.2.4. Crecimiento de *Chlorella vulgaris*

Creciendo saciada de N o P, la densidad celular de *C. vulgaris* inmovilizada sola fue significativamente mayor que la co-inmovilizada con *A. Brasilense* (Fig. 21b, d letras minúsculas). Con nitrógeno la máxima población fue alcanzada a las 96 h in *C. vulgaris* inmovilizada ( $5.37 \pm 0.22$  Log densidad  $\text{cel}^{-1}$ ) y co-inmovilizada ( $5.10 \pm 0.10$  Log densidad  $\text{cel}^{-1}$ ) (Fig. 21b, letras mayúsculas). En este tiempo, las tasas de crecimiento fueron  $0.87 \pm 0.26$  y  $0.66 \pm 0.06$   $\text{d}^{-1}$  inmovilizada y co-inmovilizada, respectivamente. Saciada de P, en el mismo tiempo (96 h) la densidad celular mayor fue  $5.30 \pm 0.13$  (inmovilizada) y  $5.20 \pm 0.12$  Log densidad  $\text{cel}^{-1}$  (co-inmovilizada) (Fig. 21d, letras mayúsculas), alcanzando tasas de crecimiento  $0.88 \pm 0.15$   $\text{d}^{-1}$  (inmovilizada) y  $0.81 \pm 0.11$   $\text{d}^{-1}$  (co-inmovilizada).

Un patrón opuesto fue encontrado bajo condiciones de ayuno (N o P). Bajo condiciones de ayuno de nitrógeno la máxima densidad celular fue también alcanzada a las 96 h en *C. vulgaris* inmovilizada o co-inmovilizada (Fig. 21a, c letras mayúsculas). Sin embargo, en este tiempo, la densidad celular fue significativamente mayor en la microalga interactuando con *A. brasilense* ( $4.98 \pm 0.16$ ) que inmovilizada ( $4.66 \pm 0.26$  Log densidad  $\text{cel}^{-1}$ ) (Fig. 21a letras minúsculas); alcanzando tasas de crecimiento de  $0.25 \pm 0.18$   $\text{d}^{-1}$  (inmovilizada) y  $0.67 \pm 0.14$   $\text{d}^{-1}$  (co-inmovilizada). Mientras que en ayuno de P, la densidad celular fue  $5.01 \pm 0.21$  (inmovilizada sola) y  $5.22 \pm 0.13$  Log densidad  $\text{cel}^{-1}$  (co-inmovilizada) (Fig. 21c, letras mayúsculas). Bajo estas condiciones las tasas de crecimiento fueron  $0.63 \pm 0.20$  (inmovilizada) y  $0.85 \pm 0.09$   $\text{d}^{-1}$  (co-inmovilizada).

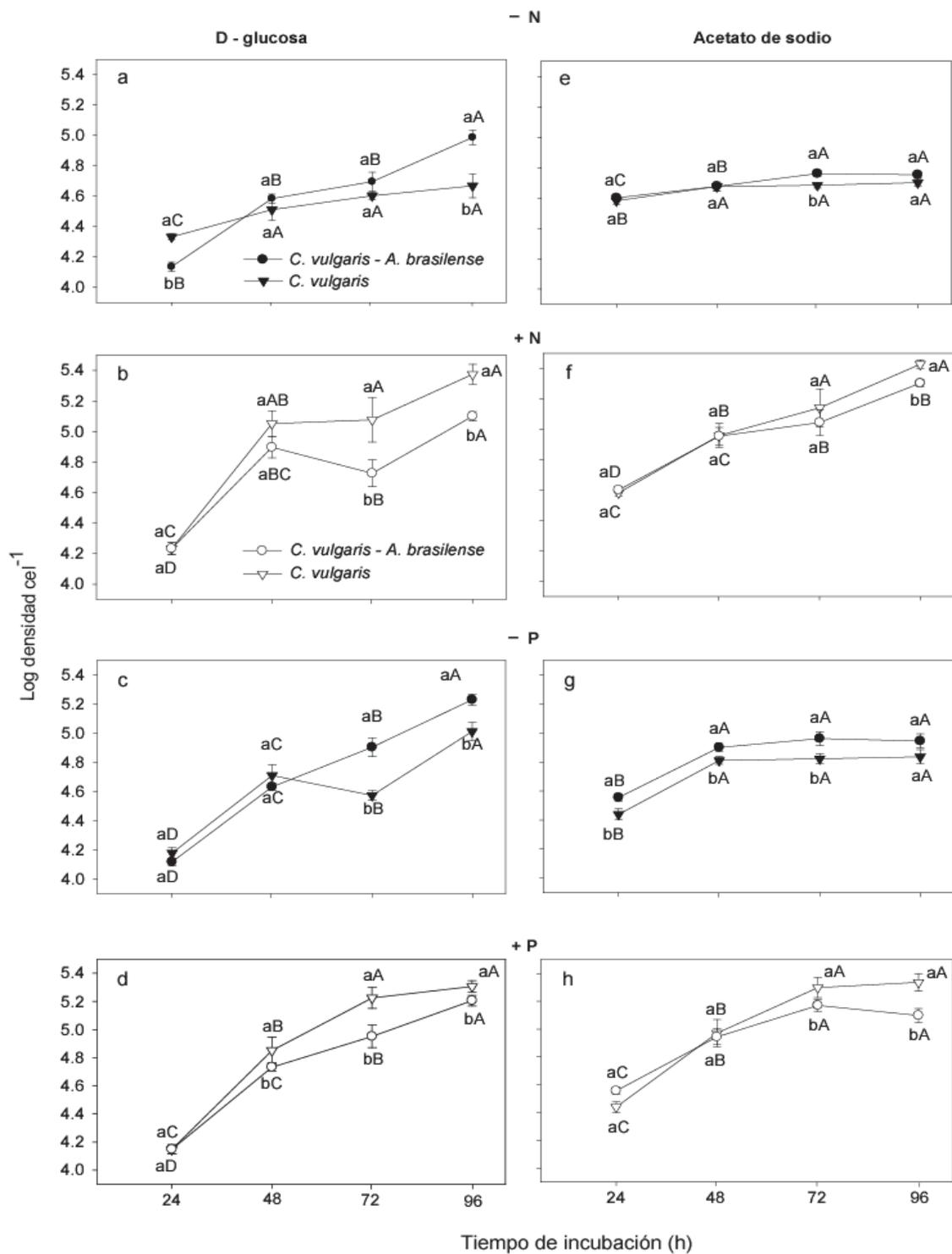


Figura 21. Densidad celular de *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato, bajo ayuno de nitrógeno (- N) (a,e) y fósforo (- P) (c,g), o saciada nitrógeno (+ N) (b,f) y fósforo (+ P) (d,h), usando D-glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono. Valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente. Los valores de cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente; ambos usando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

### **7.2.5. Actividad enzimática de la AGPase de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense*, usando acetato de sodio como fuente de carbono**

Utilizando acetato de sodio como fuente de carbono y cultivando todas las combinaciones de *C. vulgaris* y *A. brasilense* descritas anteriormente, generó un patrón similar y el mismo nivel en la actividad específica de la AGPase y la acumulación de almidón, igual que usando D-glucosa como fuente de carbono (comparando saciada y el ayuno de amonio: fig. 17a vs.17e, 17b vs. 17f, 17c vs. 17g y 17d vs. 17h y para la presencia y ayuno de fosfato: fig. 18a vs. 18e, 18b vs. 18f, 18c vs. 18g y 18d vs. 18h). La actividad específica y la actividad por célula fueron significativamente mayor in *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* que cuando ambos microorganismos estuvieron inmovilizados solos. Esto fue obtenido bajo ayuno y saciadas de nitrógeno (Fig. 17e, f, g, h) o bajo ayuno o saciada de fósforo (Fig. 18e, f, g, h).

Similar al uso de D-glucosa como fuente de carbono, todas los tratamientos utilizando acetato de sodio como fuente de carbono, presentaron un patrón similar bajo ayuno o satisfecha de N o P con respecto al contenido de almidón (Fig. 19a, b, c, d [D-glucosa] vs. Fig. 19e, f, g, h [acetato de sodio]), el consumo de acetato de sodio (Fig. 20a, b, c, d [D- glucosa] vs. Fig. 20e, f, g, h [acetato de sodio]), y la densidad celular (Fig. 21a, b, c, d [D-glucosa] vs. Fig. 21e, f, g, h [acetato de sodio]). Los valores para cada tratamiento en *C. vulgaris* co-inmovilizada fueron significativamente mayor que inmovilizada sola en la mayoría de los intervalos de incubación (Fig. 19, 20, 21 letras minúsculas, Tabla 7).

Tabla 7. Análisis general de almidón en *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato creciendo en ayuno o saciada de nutrientes y bajo condiciones heterotróficas, usando acetato de sodio como fuente de carbono.

		Afinidad		Productividad volumétrica		Rendimiento de almidón	
		mg·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>		mg·100 mL <sup>-1</sup> ·dia <sup>-1</sup>	
		Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola	Co- inmovilizada	Sola
<i>C. vulgaris</i>							
24 – 48 h	– N	2.40 ± 0.45a	1.36 ± 0.42b	14.53 ± 4.39a	7.43 ± 4.02a	7.25 ± 2.19a	5.54 ± 3.00a
	+ N	0.48 ± 0.04a	0.23 ± 0.01b	16.55 ± 4.07a	11.01 ± 4.30a	8.81 ± 2.38a	10.29 ± 4.02a
	– P	0.54 ± 0.13a	0.41 ± 0.18a	14.83 ± 5.32a	4.53 ± 5.27a	8.15 ± 2.92a	2.90 ± 3.37a
	+ P	0.30 ± 0.06a	0.16 ± 0.04b	13.59 ± 4.09a	4.56 ± 4.78a	7.38 ± 2.22a	2.95 ± 3.09a

Diferentes letras minúsculas, para cada par de valores indican diferencias significativas entre *C. vulgaris* inmovilizada y *C. vulgaris* co-inmovilizada con *Azospirillum* analizada por una prueba t de Student.  $P < 0.05$ . (±) Representa el error estándar

### 7.3. Evaluar el efecto del ácido indolacético (AIA) sobre la actividad de la enzima reguladora de la síntesis de almidón (AGPase) de *C. vulgaris*.

#### 7.3.1. Actividad específica de AGPase en *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA.

Bajo condiciones de ayuno de nitrógeno, la máxima actividad específica de AGPase en *C. vulgaris* inmovilizada sola ( $18.99 \pm 2.09$  U) se obtuvo a las 48 h; mientras que añadiendo AIA sintético al MSC fue  $32.06 \pm 1.49$  U a las 24 h. Después, la actividad disminuyó (Fig. 22a letras mayúsculas) y se mantuvo en el mismo nivel entre ambos tratamientos (Fig. 22a letras minúsculas). En *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* SpM la mayor actividad de AGPase fue  $22.87 \pm 2.30$  U a las 24 h y permaneció en este nivel (Fig. 22a letras mayúsculas). En este tiempo (24 h), la actividad de la AGPase en *C. vulgaris* adicionada con AIA sintético fue significativamente mayor que en *C. vulgaris* inmovilizada con *A. brasilense* SpM (Fig. 22a letras minúsculas). Las máximas actividades de AGPase en *C. vulgaris* fueron

obtenidas co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd o *A. brasilense* Sp6 y fueron significativamente mayores que los demás tratamientos en la mayoría de los intervalos de tiempo (Fig. 22a letras minúsculas). A las 24 h, la máxima actividad de AGPase en *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd fue  $46.77 \pm 3.55$  U, mientras que co-inmovilizada con *A. brasilense* Sp6 alcanzó  $44.99 \pm 3.55$  U. En ambos tratamientos esta actividad permaneció en este nivel hasta las 72 h (Fig. 22a letras mayúsculas). Esta actividad de AGPase fue mayor en *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Sp6 que co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd, aunque no presentó diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig. 22a letras minúsculas).

Creciendo saciada de nitrógeno, la actividad de AGPase en *C. vulgaris* inmovilizada sola alcanzó su mayor actividad a las 72 h ( $25.89 \pm 5.43$  U) y permaneció en este nivel (Fig. 22b letras mayúsculas); nuevamente en presencia de AIA sintético en el MSC, la actividad de AGPase en *C. vulgaris* sola mostró su máxima actividad a las 24 h ( $29.11 \pm 1.80$ ) y posteriormente disminuyó (Fig. 22b letras mayúsculas). Co-inmovilizada con *A. brasilense* SpM, la mayor actividad de AGPase en la microalga fue ( $27.89 \pm 3.13$  U) a las 48 h y se mantuvo en este nivel (Fig. 22b letras mayúsculas). Nuevamente las mayores actividades de AGPase se obtuvieron en *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd o *A. brasilense* Sp6 siendo significativamente mayores a los demás tratamientos en varios intervalos de tiempo (Fig. 22b letras minúsculas). Co-inmovilizada con *A. brasilense* Sp6, la AGPase de *C. vulgaris* alcanzó su mayor actividad a las 24 h ( $48.75 \pm 0.81$  U), posteriormente disminuyó y se mantuvo en ese nivel (Fig. 22b letras mayúsculas). Co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd alcanzó una actividad de  $54.49 \pm 5.24$  U a las 24 h y permaneció en este rango hasta las 72 h, después declino (Fig. 22b letras mayúsculas); esta actividad fue mayor que la actividad de AGPase en *C. vulgaris* - *A. brasilense* Sp6, pero no mostró diferencias significativas (Fig. 22b letras minúsculas).

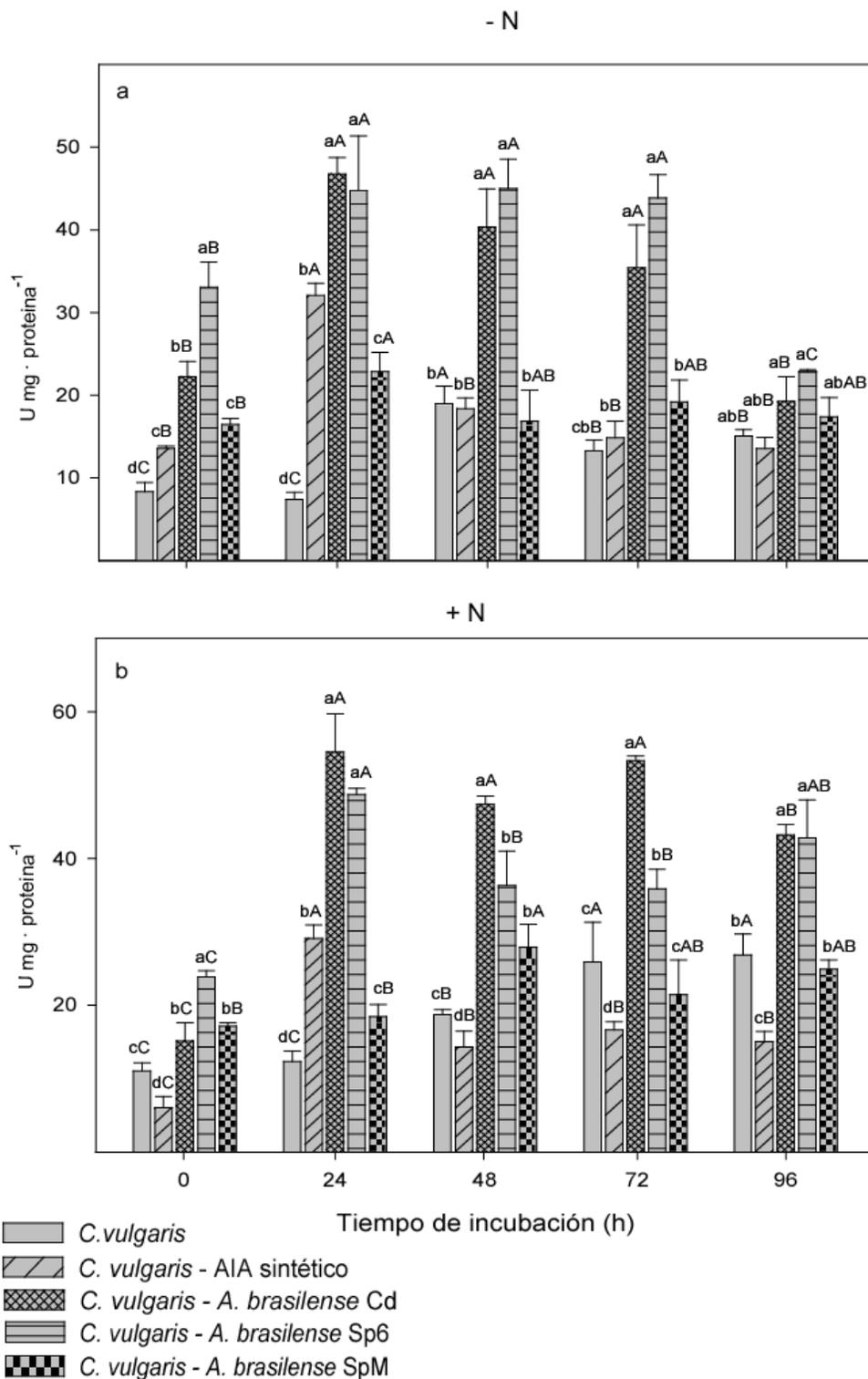


Figura 22. Actividad específica de AGPase en *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA, bajo condiciones de ayuno (a) o saciada (b) de nitrógeno; bajo régimen heterotrófico usando glucosa como fuente de carbono. Columnas en el mismo intervalo de tiempo denotadas con diferentes letras minúsculas difieren significativamente. Columnas del mismo tratamiento denotadas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente en los intervalos de tiempo; usando ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

### 7.3.2. Contenido de almidón en *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA.

Creciendo en condiciones de ayuno de nitrógeno, *C. vulgaris* inmovilizada sola ( $29.63 \pm 2.44 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) o adicionando AIA sintético ( $61.75 \pm 2.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) presentó el mayor contenido de almidón a las 24 h y posteriormente disminuyó (Fig. 23a letras mayúsculas), siendo significativamente mayor cuando se adicionó AIA sintético (Fig. 23a letras minúsculas). Co-inmovilizada con *A. brasilense* SpM, la máxima acumulación de almidón en *C. vulgaris* se obtuvo a las 48 h ( $30.16 \pm 1.63 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y posteriormente ligeramente disminuyó (Fig. 23a letras mayúsculas). Interactuado con cepas silvestres de *A. brasilense* (Cd o Sp6), *C. vulgaris* presentó la mayor acumulación de almidón, siendo significativamente mayor que los demás tratamientos en la mayoría del tiempo de incubación (Fig. 23a letras minúsculas). El contenido de almidón en la microalga fue  $77.16 \pm 2.02 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (*A. brasilense* Cd) y  $79.44 \pm 3.15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (*A. brasilense* Sp6) a las 24 h, no encontrando diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig. 23a letras minúsculas). Después este contenido disminuyó con el tiempo (Fig. 23a letras mayúsculas), siendo significativamente mayor en la microalga co-inmovilizada con *A. brasilense* Sp6 que interactuando con *A. brasilense* Cd (Fig. 23a letras minúsculas).

Bajo condiciones saciadas de nitrógeno, el contenido de almidón en *C. vulgaris* inmovilizada sola permaneció en un rango de  $26.51 \pm 0.45 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  durante todo el tiempo de incubación, mientras que adicionada con AIA sintético el máximo contenido de almidón se obtuvo a las 24 h ( $82.08 \pm 1.30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), ulteriormente disminuyó (Fig. 23b letras mayúsculas). En este tiempo, el contenido de almidón fue significativamente mayor en la microalga adicionada con AIA sintético (Fig. 23b letras minúsculas). Interactuando con *A. brasilense* SpM, el contenido de almidón de *C. vulgaris* se mantuvo en un rango de  $55.07 \pm 5.30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  durante todo el periodo de incubación (Fig. 23b letras mayúsculas); pero nuevamente interactuando con las cepas silvestres (*A. brasilense* Cd o Sp6), la microalga obtuvo la mayor contenido de almidón, mostrando ser significativamente mayor que los demás tratamientos en varios intervalos de tiempo (Fig. 23b letras minúsculas). El máximo contenido de almidón de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd fue  $157.89 \pm 3.04 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  a las 24 h y  $123.66 \pm 6.78$

mg·g<sup>-1</sup> a las 72 h interactuando con *A. brasilense* Sp6, en ambos tratamientos este contenido se mantuvo a través del tiempo (Fig. 23b letras mayúsculas). Aunque fue significativamente mayor interactuando con *A. brasilense* Cd que con Sp6 (Fig. 23b letras minúsculas).

### **7.3.3. Consumo de D-glucosa de *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA.**

*C. vulgaris* co- inmovilizada con cepas silvestres o atenuadas en su producción de AIA y creciendo bajo condiciones de ayuno o saciada de nitrógeno, presentó un consumo continuo de glucosa durante todo el periodo de incubación (Fig. 24a, b letras mayúsculas). En ayuno o saciada de nitrógeno, interactuando con *A. brasilense* SpM o adicionada con AIA sintético el consumo de glucosa de *C. vulgaris* fue significativamente mayor que inmovilizada sola durante la mayoría de los intervalos de tiempo (Fig. 24a, b letras minúsculas). Sin embargo, la asimilación de la fuente de carbono fue significativamente mayor en la microalga co-inmovilizada con las cepas silvestres de *A. brasilense* (Cd o Sp6), comparada a los otros tratamientos (Fig. 24a, b letras minúsculas).

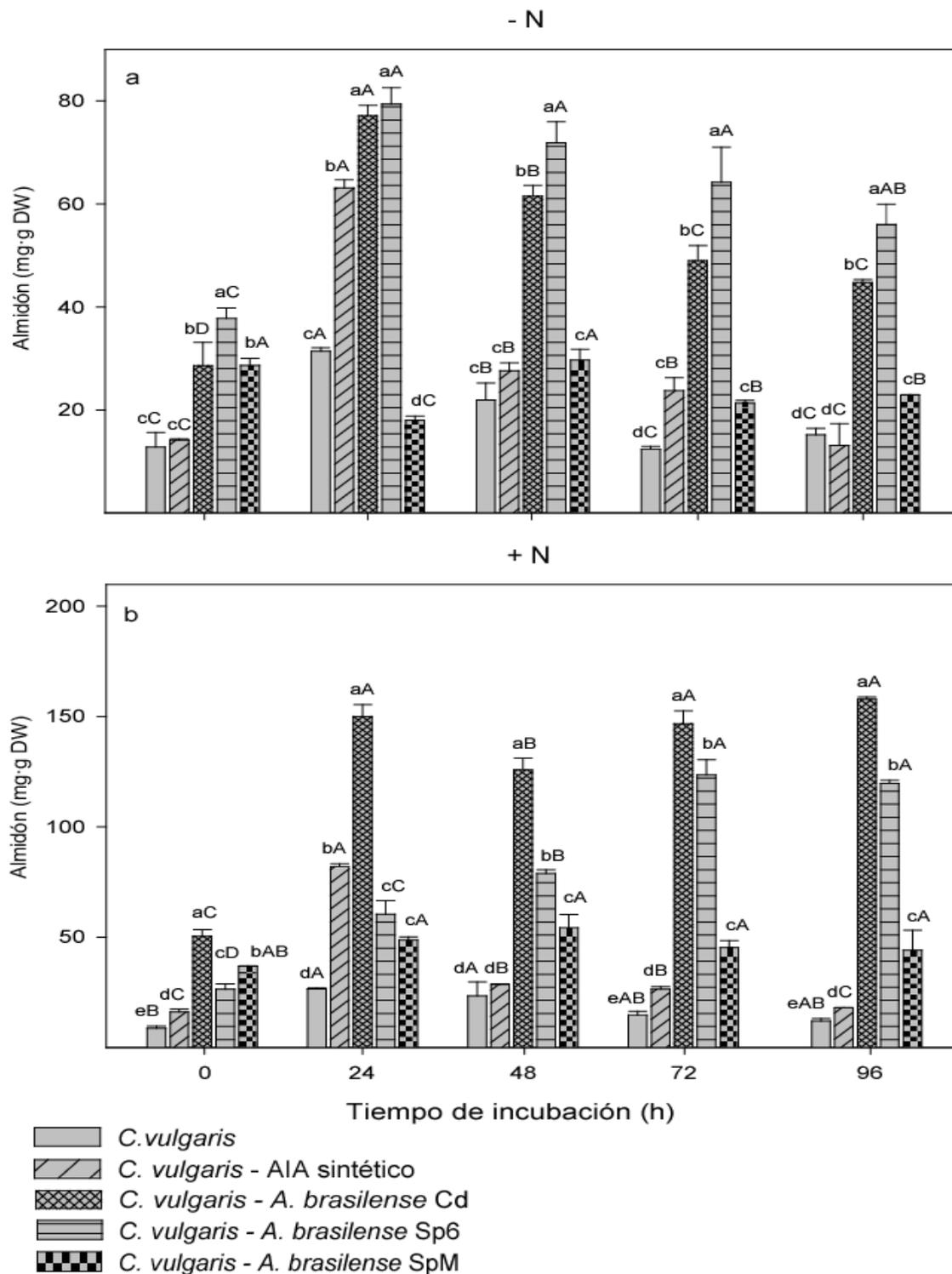


Figura 23. Acumulación de almidón en *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA, bajo condiciones de ayuno (a) o saciada (b) de nitrógeno; bajo régimen heterotrófico usando glucosa como fuente de carbono. Columnas en el mismo intervalo de tiempo denotadas con diferentes letras minúsculas difieren significativamente. Columnas del mismo tratamiento denotadas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente en los intervalos de tiempo; usando ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

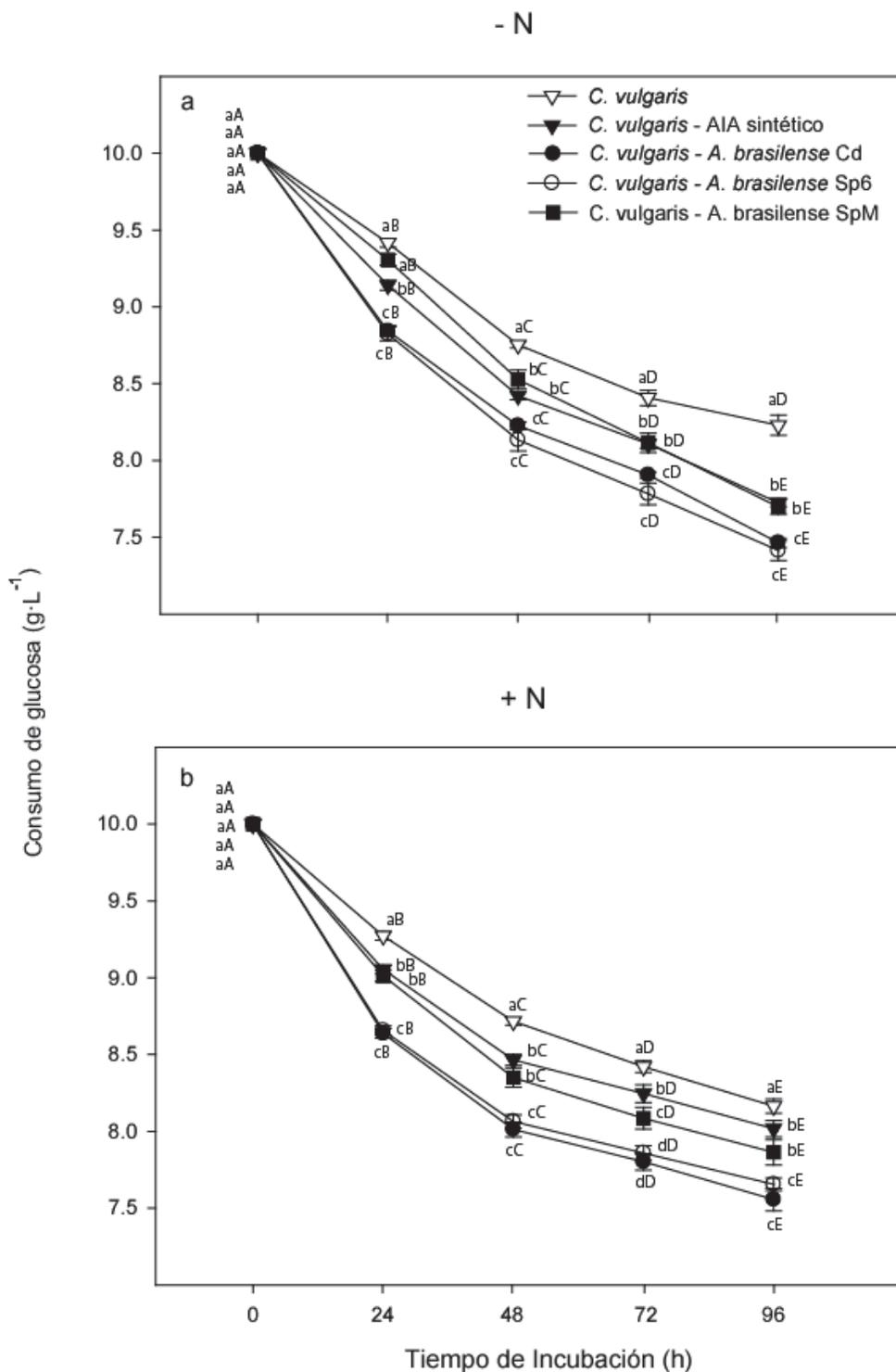


Figura 24. Consumo de D-glucosa de *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas de *A. brasilense* silvestres o atenuadas en la producción de AIA, bajo condiciones de ayuno (a) o saciada (b) de nitrógeno; bajo régimen heterotrófico usando glucosa como fuente de carbono. Los valores en las curvas con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente, utilizando un ANOVA de una vía combinado con un análisis post-hoc LSD a  $P < 0.05$ . Los puntos en cada intervalo de tiempo con diferentes letras minúsculas difieren significativamente a  $P < 0.05$ . Las barras representan el error estándar.

## 8. DISCUSIÓN

Como en todas las plantas terrestres, uno de los componentes celulares más importantes son los carbohidratos, los cuales son principalmente utilizados para funciones celulares, estructurales y como almacenamiento de energía. Bajo condiciones autotróficas, las microalgas verdes utilizan la fotosíntesis para producir y acumular carbohidratos y ATP (Barsanti y Gualtieri, 2006). Por otra parte, *A. brasilense* induce cambios en las células de varias cepas de *Chlorella* spp. con respecto a sus parámetros de crecimiento y varios procesos fisiológicos (González y Bashan, 2000; de-Bashan *et al.*, 2002; de-Bashan *et al.*, 2008, 2008a, b). Por tal razón, nuestra hipótesis de trabajo fue que la bacteria también podría afectar la acumulación de carbohidratos totales y almidón en las especies de *Chlorella* que fueron examinadas. Se demostró que las células de *C. vulgaris* o *C. sorokiniana*, co-inmovilizadas en esferas de alginato con *A. brasilense*, incrementaron su contenido de carbohidratos; y que ambas microalgas presentaron el mismo patrón de acumulación de carbohidratos totales, representados principalmente como almidón. Esto puede deberse a la capacidad de esta bacteria de incrementar la actividad de la fotosíntesis (Tsimilli-Michael *et al.*, 2000; de-Bashan y Bashan, 2010), además de parámetros de crecimiento de varios cultivos y diversas especies de plantas (Bashan *et al.*, 2004; Bashan y de-Bashan, 2010), incluyendo *Chlorella* spp.

Similar al aumento en la producción y acumulación de lípidos y pigmentos inducidos por *A. brasilense* en *Chlorella* spp., el aumento en la acumulación de carbohidratos en la microalga es atribuido a un incremento en la actividad metabólica de la fotosíntesis de *Chlorella* spp. Recientes estudios han demostrado que el mayor mecanismo de *Azospirillum* sobre el metabolismo de *Chlorella* es vía hormonal, principalmente por la producción de ácido indolacético (AIA) (de-Bashan *et al.*, 2008a). En muchas plantas la producción de AIA por *Azospirillum* puede incrementar la actividad de la fotosíntesis, incrementar la producción de pigmentos y síntesis de varios metabolitos (Bashan y de-Bashan, 2010), tal como el 3-fosfoglicerato, un metabolito clave en la fotosíntesis. Así mismo, un incremento en la producción de pigmentos fotosintéticos de *Chlorella* spp.

inducidos por *Azospirillum*, tales como clorofila *a*, *b*, luteína y violaxantina (de-Bashan *et al.*, 2002) son considerados parámetros que coinciden con el incremento de la fotosíntesis en plantas terrestres (Bashan *et al.*, 2006).

En las dos especies de microalga examinadas, el almidón fue el principal carbohidrato acumulado. Las microalgas verdes (Chlorophyta) utilizan el almidón como el principal compuesto para almacenar carbono y también como un producto para almacenar energía (Li *et al.*, 2011), similar a muchas otras algas y plantas superiores (Marsálková *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Esto indica una relación entre el incremento en la actividad fotosintética y la acumulación de almidón. Como se ha indicado anteriormente, durante la fotosíntesis se produce 3-fosfoglicerato. Este metabolito representa una señal de un alto contenido de carbono y energía dentro de la célula, lo cual activa a la enzima reguladora de la síntesis de almidón, la ADP-Glucosa pirofosforilasa (Van den Koornhuyse *et al.*, 1996; Ballicora *et al.*, 2004). El incremento de almidón en *Chlorella* spp. co-inmovilizada con *Azospirillum* podría estar relacionada con una mayor actividad de la enzima ADP-Glucosa pirofosforilasa durante la biosíntesis y acumulación de almidón.

Otra explicación reportada para la acumulación de carbohidratos en microalgas es mediante el ayuno o limitación de nitrógeno y fósforo en el medio de crecimiento (Behrens *et al.*, 1989; Brányiková *et al.*, 2011; Dragone *et al.*, 2011); la limitación de azufre mejora la acumulación de almidón pero el crecimiento de la microalga cesó (Brányiková *et al.*, 2011). Nosotros no encontramos estos efectos en nuestro estudio. Estudios realizados por de-Bashan *et al.* (2002, 2004, 2008b) demostraron que, bajo condiciones autotróficas, *Chlorella* spp. co-inmovilizada con *A. brasilense* removió todo el amonio y nitratos del medio sólo después de ~96 h. Aproximadamente 30% del fósforo fue removido en la mayoría de los casos. En nuestro estudio, el mayor contenido de carbohidratos en cultivos de *Chlorella* spp. fué detectado después de un período de incubación de 72 h. En este tiempo, el medio de cultivo (MSC) todavía contenía nitrógeno y suficiente fósforo. Por consiguiente, es más probable que la acumulación de carbohidratos en nuestro estudio sea el resultado de la influencia de *A. brasilense* y no del estrés impuesto por la limitación o ayuno de nitrógeno o fósforo.

La óptima acumulación de carbohidratos por ambas microalgas fue a las 72 h, similar a las 80 h encontradas por Behrens *et al.* (1989) en *C. vulgaris*, *Chlorella* spp., sola o co-inmovilizada presentaron la mayor acumulación de carbohidratos por célula después de 24 h incubación, cuando la densidad celular del cultivo es baja; sin embargo, en este tiempo, la afinidad y la productividad volumétrica de estos cultivos fue menor que la máxima calculada. En comparación con el intervalo a las 72 h, donde a pesar de que el contenido de carbohidratos por célula fue bajo, el cultivo tuvo la mayor afinidad y productividad volumétrica. Esto puede ser atribuido a que la densidad celular de las microalgas es más grande, en comparación con la población más pequeña que la población a las 24 h. Este fenómeno también puede ser explicado por lo menos de otras dos formas, probablemente influenciado por las especies o cepas de microalgas: (1) de-Bashan *et al.* (2005) demostró que las condiciones de cultivo tienen un efecto significativo en el metabolismo de *Chlorella* spp., pequeñas poblaciones pueden consumir grandes cantidades de nitrógeno, mientras que grandes poblaciones fueron menos eficientes. Equivalentemente, la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* presenta una correlación inversa entre la tasa de crecimiento y el contenido de carbohidratos por célula (Wang *et al.*, 2010). (2) Cuando las células de la microalga están creciendo bajo condiciones óptimas, estas normalmente muestran una alta eficiencia fotosintética para mantener el crecimiento y reproducción. Bajo estas condiciones, las microalgas pueden almacenar poder reductor en la forma de almidón preferentemente sobre los lípidos. Esto último debido a que la síntesis de almidón a partir de 3-fosfoglicerato requiere seis moléculas de NADPH y nueve de ATP por cada 18-moléculas de carbono. Lo cual es energéticamente más económico comparado con la síntesis de lípidos (Li *et al.*, 2011).

Como se ha demostrado en varios estudios anteriores y confirmados en nuestro estudio, bajo condiciones autotróficas, varias cepas de *C. vulgaris* y *C. sorokiniana*, alcanzaron poblaciones más densas y tasas de crecimiento más altas al estar co-inmovilizada que inmovilizadas solas (Ballicora *et al.*, 2004; de-Bashan *et al.*, 2004; de-Bashan *et al.*, 2008c; Perez-Garcia *et al.*, 2010); sin embargo, en nuestro estudio, a pesar del estatus de co-inmovilización, ambas microalgas tuvieron el menor contenido de carbohidratos a las 96 h. En este tiempo, todos los cultivos tuvieron sus poblaciones más densas. Un

aumento en la densidad celular podría explicar la disminución de carbohidratos, ya que para mantener poblaciones más densas, las células deben sintetizar otros compuestos, tales como proteínas, pigmentos y lípidos utilizando como precursores los carbohidratos acumulados previamente (Wang *et al.*, 2010; Doucha *et al.*, 2012). Li *et al.* (2011) menciona que la conversión de almidón a lípidos neutros en la microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) es una ruta general e indispensable para la síntesis y acumulación de lípidos neutros en esta alga. Incluso, la síntesis de la pared celular se realiza con moléculas de glucosa procedentes del almidón acumulado previamente (Salisbury y Ross, 1992). Brányiková *et al.* (2011) demostraron que durante la división celular autotrófica de *C. vulgaris*, el contenido de almidón disminuyó hasta un 13% de su peso seco.

Es plausible que aunque la alta densidad celular alcanzada a las 96 h, esta fue acompañada por un bajo contenido de carbohidratos en cada célula de esta población. Es de conocimiento común que diferentes cepas de *Chlorella* spp. exhiben diferente comportamiento y acumulan compuestos en cantidades variables (Oh-Hama y Miyachi, 1992; Lebeau y Robert, 2006; Barsanti y Gualtieri, 2006).

Una alternativa factible para el cultivo de microalgas, pero restringida a sólo unas pocas especies de microalgas, es usar su capacidad de crecimiento heterotrófico en la ausencia de luz. Esta propuesta es significativamente más económica que el crecimiento autotrófico (Chen y Chen, 2006). Debido a que las dos microalgas utilizadas en este estudio como *Azospirillum* spp. pueden crecer e interactuar bajo condiciones heterotróficas (Perez-García *et al.* 2010), nuestro estudio también exploró la acumulación de carbohidratos y almidón bajo condiciones heterotróficas, usando glucosa y acetato de sodio como fuente de carbono.

Mediante este trabajo, se demostró que la co-inmovilización con *A. brasilense* promueve la acumulación de almidón en *Chlorella* spp. creciendo heterotróficamente. En teoría, esto puede ser explicado debido a que la bacteria afecta varias rutas metabólicas de *Chlorella* spp. (de-Bashan *et al.*, 2002; de-Bashan *et al.*, 2008a), lo cual induce la acumulación de carbohidratos. Cuando la microalga estuvo creciendo sola,

esta utilizó la fuente de carbono para la multiplicación celular, un punto que es discutido más tarde. de-Bashan y Bashan (2008) sugieren que *Chlorella* spp. responde a la interacción con la MGPB *A. brasilense* en forma similar a las interacciones de la bacteria con las plantas superiores, donde esta aumenta el crecimiento de la microalga y cambia su metabolismo (Bashan y de-Bashan, 2010). El efecto de *A. brasilense* en *Chlorella* spp. bajo condiciones autotróficas como heterotróficas posiblemente se da por la producción de fitohormonas tal como el ácido indolacético (AIA). El AIA en *Azospirillum* spp. es dependiente del triptófano (Bashan *et al.*, 2004) y *C. vulgaris* es conocida por sintetizar triptófano (Sauer *et al.*, 1983). El AIA está involucrado en la biosíntesis de metabolitos, varios mecanismos celulares y cambios en la fisiología de plantas y microalgas, incluyendo el metabolismo de carbohidratos (Tsavkelova *et al.*, 2006; Bashan y de-Bashan, 2010).

Alternativamente, puede haber cambios en la actividad enzimática del metabolismo de asimilación de la fuente de carbono. Las consideraciones teóricas son que el AIA puede alterar el metabolismo de varias rutas metabólicas, tal como la actividad de la membrana celular (Bashan y Holguín, 1997; Bashan *et al.*, 2004) y la biosíntesis y acumulación de carbohidratos (principalmente almidón) usando D-glucosa como la fuente de carbono.

Esto último puede ocurrir debido a que *C. vulgaris* incorpora directamente la D-glucosa en almidón sin desglose y resíntesis (Bailey y Neish, 1954; Yang *et al.*, 2000), como sigue: la asimilación oxidativa de la glucosa produce glucosa-6-fosfato, la cual forma reversiblemente glucosa-1-fosfato, una molécula rápidamente disponible para incorporarla como almidón (Bailey y Neish, 1954; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Bajo condiciones heterotróficas la glucosa ha sido la fuente de carbono comúnmente usada durante el cultivo heterotrófico de *Chlorella* y muchas otras especies (Griffiths *et al.*, 1960; Endo *et al.*, 1974; Martínez *et al.*, 1991).

Probablemente la diferencia más grande en el metabolismo heterotrófico de la glucosa versus el autotrófico de las microalgas, es que bajo oscuridad, la glucosa es principalmente metabolizada vía la ruta de las pentosas fosfatos (PPP, por sus siglas en

ingles), mientras que la ruta Embden-Meyerhof (EMP, por sus siglas en ingles) es el principal proceso glucolítico de las células bajo condiciones autotróficas. Por ejemplo: en completa oscuridad y usando D-glucosa como fuente de carbono, la PPP en *C. sorokiniana* (= *C. pyrenoidosa*) representa el 90% del flujo metabólico de la glucosa y la EMP es operativa a menor grado (Endo *et al.*, 1974). La asimilación de la glucosa en las microalgas es realizada por transportadores específicos. Una vez dentro de la célula bajo condiciones heterotróficas, la glucosa es asimilada vía PPP (Tanner, 2000).

Los cultivos de *C. vulgaris* inmovilizada y co-inmovilizada mostraron una tendencia similar en la acumulación de carbohidratos totales y almidón. Cuando los cultivos estuvieron co-inmovilizados con *A. brasilense*, la cantidad de almidón fue más alto. Este incremento en la acumulación de almidón podría ser atribuido a una mayor asimilación de D-glucosa y mayor actividad enzimática de la ADP-Glucosa-pirofosforilasa, la enzima reguladora de la biosíntesis de almidón (Ballicora *et al.*, 2004).

Aunque, la co-inmovilización de *C. sorokiniana* y *A. brasilense* no indujo un mayor incremento en el contenido de carbohidratos totales usando D-glucosa como la fuente de carbono, *A. brasilense* indujo un ligero incremento en la biosíntesis y acumulación de almidón, comparada con *C. sorokiniana* inmovilizada sola; pero diferente de la acumulación obtenida en *C. vulgaris*. Esto podría ser explicado debido a que el metabolismo y acumulación de D-glucosa varía grandemente y depende principalmente de la especie de microalga utilizada (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Por ejemplo, Griffiths *et al.* (1960) demostraron que la asimilación oxidativa de la glucosa en algunas cepas de *Chlorella* y *Scenedesmus* induce la acumulación de otros polisacáridos como la hemicelulosa. Olaitan y Northcote (1962) purificaron tres polisacáridos en *C. pyrenoidosa* (= *C. sorokiniana*) (Yang *et al.*, 2000; Perez-Garcia *et al.*, 2011); hemicelulosa A, B y almidón, en un radio de 9:2:1 respectivamente. Existe la posibilidad que en nuestro estudio, *C. sorokiniana* haya acumulado otros compuestos como lípidos, proteínas o hemicelulosas después de la asimilación de D-glucosa; tal como el caso de *C. prothecoides*, la cual incorpora D-glucosa para formar principalmente lípidos cuando crece de manera heterotrófica (Chu *et al.*, 1995).

Por otra parte, el acetato de sodio como fuente de carbono bajo condiciones heterotróficas, es una de las fuentes de carbono más comunes para muchas especies microbianas (Droop, 1974). El acetato no siempre promueve el crecimiento. Este podría ser tóxico para muchos microorganismos en altas concentraciones (Wood *et al.*, 1999). En la oscuridad, bajo condiciones aeróbicas, las células eucariotas asimilan el acetato usando una proteína transportadora monocarboxílica/protón que permite el transporte de moléculas monocarboxílicas a través de la membrana para formar acetil-Coenzima A. Esta última molécula, entra al ciclo del glioxilato de la célula (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Cuando acetato de sodio es utilizado como fuente de carbono, *A. brasilense* no induce un incremento significativo en el contenido de carbohidratos totales de *C. vulgaris* y *C. sorokiniana*.

Estudios anteriores han demostrado que la asimilación y metabolismo de acetato de sodio en varias especies de microalgas, incluso en *C. vulgaris*, promueve la acumulación de ácidos grasos y lípidos (Bouarab *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2009). Chen y Chen (2006) demostraron que la superioridad del acetato sobre la D-glucosa para la producción de ácidos grasos ocurre cuando la D-glucosa es convertida a acetil-CoA, la estructura básica para la biosíntesis de ácidos grasos. La glucosa necesita varios pasos, mientras que el acetato puede ser directamente convertido en acetil-CoA. Por tal razón, cuando ambas microalgas crecieron en acetato, acumularon otros compuestos, tales como ácidos grasos y lípidos, aunque estos no fueron analizados en este estudio. No obstante, *A. brasilense* ligeramente aumentó la acumulación de almidón. Una explicación indirecta para esto podría ser que, como *A. brasilense* altera el metabolismo de *C. vulgaris* y altera el perfil de ácidos grasos (de-Bashan *et al.*, 2002), esta bacteria podría haber hecho lo mismo también con los carbohidratos.

Para las dos especies de microalga utilizadas, la co-inmovilización con *Azospirillum* algunas veces aumentó la acumulación de carbohidratos, pero inmovilizada sola, la fuente de carbono fue utilizada principalmente para el crecimiento de la microalga. La evidencia para esta suposición se encuentra en calcular la afinidad; ambas microalgas, cuando estuvieron inmovilizadas con *A. brasilense*, exhibieron las mayores afinidades a la fuente de carbono que cuando estuvieron inmovilizadas solas, mientras que las tasas

de crecimiento fueron superiores cuando las microalgas crecieron inmovilizadas solas. Samejima y Myers, (1958) encontraron que, bajo condiciones heterotróficas, la fuente de carbono que genera bajas tasas de crecimiento en *C. sorokiniana* son consumidas para mantener el metabolismo y no el crecimiento. Esta afinidad mayor en los cultivos co-inmovilizados, no coincide con la mayor productividad volumétrica y rendimiento de carbohidratos. Este resultado es diferente a lo que ocurrió bajo condiciones autotróficas, donde la afinidad, productividad volumétrica y la tasa de crecimiento fueron mayores en el mismo intervalo de tiempo cuando *Chlorella* spp. estuvo interactuando con *A. brasilense*. Un fenómeno similar fue obtenido cuando la toma de amonio ocurrió en cultivos co-inmovilizados bajo condiciones heterotróficas, en este caso, el amonio fue almacenado. Mientras que los cultivos creciendo sin la bacteria, el amonio fue usado para el crecimiento (Perez-García *et al.*, 2011a). Esto pasa debido a que el metabolismo del carbono y nitrógeno están relacionados y comparten los suministros de carbono orgánico y energía suministrados de la respiración del carbono asimilado (Perez-García *et al.*, 2011a).

En todos los tratamientos, el incremento significativo de carbohidratos y almidón por cultivo y por célula después de 24 h podría ser atribuido al almacenamiento de los mismos; ya que la microalga los almacena como reserva de carbono y energía los cuales son posteriormente utilizados para su crecimiento (Zeeman *et al.*, 2010; Geigenberger, 2011). Esta es probablemente la razón que en este tiempo nosotros encontramos tasas de crecimiento bajas y alta productividad volumétrica y rendimiento de carbohidratos en *Chlorella* spp. Estos carbohidratos totales y almidón fueron rápidamente consumidos cuando la microalga obtuvo su máxima densidad celular a las 72 h, el mismo tiempo cuando, en todos los tratamientos, el contenido de carbohidratos por célula más bajo fue encontrado. Brányiková *et al.* (2011) mencionan que *C. vulgaris*, creciendo bajo condiciones heterotróficas, usa el almidón casi completamente durante la división celular, disminuyendo hasta un 4% de su peso seco.

Muchos reportes mencionan que el contenido de carbohidratos totales y almidón en varias cepas de microalgas puede ser incrementado por imponer un ayuno o limitación de nutrientes como: nitrógeno, fósforo o azufre (Behrens *et al.*, 1989; Brányiková *et al.*, 2011; Dragone *et al.*, 2011). En este estudio, y también mostrado bajo condiciones

autotróficas, el medio de cultivo (MSC) tuvo suficiente nitrógeno, fósforo y azufre. Esto demuestra que este incremento en el contenido de carbohidratos totales y almidón en *Chlorella* spp co-inmovilizada no es debido a la limitación de nutrientes en el MSC, sino más bien a la influencia de *A. brasilense*.

Bajo condiciones heterotróficas, las dos cepas de *Chlorella* spp. evaluadas, cuando estuvieron inmovilizadas solas, tuvieron poblaciones superiores que co-inmovilizadas con *A. brasilense*. Como se menciona anteriormente, bajo estas condiciones, *C. vulgaris* creciendo sin influencia de la bacteria, consumió la fuente de carbono para la multiplicación celular, mientras que co-inmovilizada, la microalga acumuló carbohidratos. Aunque la D-glucosa provee más energía por mol comparada con otros sustratos, la densidad celular de ambas microalgas usando acetato de sodio como fuente de carbono fue superior que usando D-glucosa. Estos resultados están de acuerdo con otros reportes donde se indica que el acetato de sodio genera mayor población microalgal que la D-glucosa (Perez-García *et al.*, 2011a y referencias citadas en el mismo).

Por lo que respecta a la actividad de la ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPase); bajo condiciones heterotróficas y usando glucosa como fuente de carbono esta es la enzima reguladora en la biosíntesis de almidón en plantas y microalgas (Ballicora *et al.*, 2004). Varios estudios han indicado que el contenido de almidón es una correlación directa con la actividad de la AGPase en tubérculos de patata (Slattery *et al.*, 2000), endospermo de trigo y en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Ballicora *et al.*, 2004). Estudios recientes han mostrado que la co-inmovilización en esferas de alginato de *A. brasilense* con *Chlorella* spp. induce beneficios significativos a la microalga (González y Bashan 2000; de-Bashan y Bashan 2008). Además, en este estudio se demostró que *A. brasilense* aumenta la acumulación de almidón en *C. vulgaris* bajo condiciones autotróficas y heterotróficas. Por tal razón, nuestra hipótesis es que este incremento del contenido de almidón en *Chlorella* spp. inducido por *A. brasilense*, está relacionado con

un incremento en la actividad enzimática de la AGPase de la microalga, la enzima clave en la biosíntesis de almidón.

De esta manera, evaluamos la actividad de la AGPase en *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* y cultivada bajo ayuno y suficiente nitrógeno y fósforo, creciendo heterotróficamente. El ayuno de nutrientes es bien conocido que incrementa la acumulación de varios compuestos en las microalgas, incluyendo *Chlorella* sp. (Khozin-Goldberg y Cohen, 2006; Xiong *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2011; Přibyl *et al.*, 2012).

Este estudio demostró que bajo condiciones heterotróficas y ayuno de nutrientes (nitrógeno o fósforo), *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* exhibió una mayor actividad específica de la AGPase que creciendo inmovilizada sola. Este resultado se obtuvo cuando la actividad enzimática se calculó como actividad específica o de actividad por célula. La mayor actividad de la AGPase puede ser atribuido al efecto de esta bacteria debido a que *Azospirillum* generalmente altera el metabolismo de *Chlorella* spp. posiblemente debido a la producción de fitohormonas (de-Bashan *et al.*, 2008a). Muchas especies del género *Azospirillum* producen varias auxinas, citocininas, giberelinas o combinaciones de varias de ellas (Bashan y de-Bashan, 2010), donde el principal efecto en el metabolismo de *Chlorella* spp. por *Azospirillum*, demostrado hasta ahora, es hormonal, principalmente por la producción del ácido indolacético (AIA) (de-Bashan *et al.*, 2008a). Existen por lo menos dos explicaciones plausibles de cómo puede pasar este efecto benéfico sobre la actividad de la AGPase. 1). El AIA afecta directamente o regula la actividad de la AGPase. Esto fue recientemente demostrado en plantas de arroz (Jing *et al.*, 2013). Igualmente, la aplicación de AIA provocó la acumulación de almidón en granos de sorgo (Bhatia y Singh, 2002). 2). El AIA incrementa la absorción de D-glucosa que puede convertir, vía AGPase, en una mayor acumulación de almidón como sigue: Las células de *Chlorella* poseen un sistema simporte hexosas/H<sup>+</sup> inducible. Este sistema es responsable de la asimilación de glucosa del MSC bajo condiciones heterotróficas (Tanner, 2000). Si el AIA afecta cualquier sistema simporte esto puede causar mayor asimilación de glucosa provocando que cada célula este cargada con un mayor contenido de carbono y energía. La síntesis de polisacáridos de reserva en bacterias y plantas es máxima cuando el carbono y energía

están en exceso (Ballicora *et al.*, 2004). Por lo tanto, este estado de la microalga de energía/carbono en exceso incrementa la actividad de la AGPase y por consecuencia la acumulación de almidón. Este escenario hipotético fue demostrado en este estudio; mayor asimilación de glucosa, mayor actividad de la AGPase y mayor acumulación de almidón fueron obtenidos en *C. vulgaris* interactuando con *A. brasilense*.

En las bacterias, el gen que codifica para la AGPase es *glgC*. Nosotros hemos identificado este gen en secuencias completas de varias cepas de *A. brasilense* (Kaneko *et al.*, 2010; Wisniewsky-Dyé *et al.*, 2011, 2012). En esta bacteria, esta enzima regula la biosíntesis de glucógeno (Caiola *et al.*, 2004; Lerner *et al.*, 2009). El glucógeno en *Azospirillum* spp. mejora la supervivencia bajo estrés. El gen *glgC* tiene una mayor regulación bajo condiciones hiperosmóticas y desecación (*Sinorhizobium meliloti* y *Yersinia pestis*), altas temperaturas (*Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*) y ayuno de nutrientes (*Escherichia coli*) (Lerner *et al.*, 2009).

Bajo condiciones heterotróficas, la glucosa asimilada por *Chlorella* es rápidamente incorporada como almidón, mientras que el acetato de sodio induce mucho menos acumulación de almidón (Choix *et al.*, 2012b). Incluso, usando cualquier fuente de carbono, el contenido de almidón fue mayor en *Chlorella* co-inmovilizada con *A. brasilense*. Esto puede ser explicado por la producción de AIA por *A. brasilense*, el cuál induce una cascada de cambios metabólicos significativos en la microalga, incluyendo efectos en el metabolismo de carbohidratos, a pesar de la fuente de carbono utilizada (Tsavkelova *et al.*, 2006; Bashan y de-Bashan, 2010; Choix *et al.*, 2012a, b). Este aumento en la acumulación de almidón coincide con la mayor actividad de la AGPase en *Chlorella* co-inmovilizada bajo condiciones de ayuno o saciadas nitrógeno o fósforo. Comúnmente, un incremento en la actividad de AGPase y el contenido de almidón fue encontrado en tubérculos de patatas (Slattery *et al.*, 2000) pero raramente en microalgas de agua dulce. Recientemente, Li *et al.* (2011) demostraron que el máximo nivel de almidón en la microalga terrestre *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) coincide con el incremento en la actividad de AGPase.

Bajo todas nuestras condiciones experimentales, el consumo de la fuente de carbono y la afinidad por la D-glucosa o acetato de sodio fueron siempre relativamente más altos

en la microalga co-inmovilizada. El máximo consumo de la fuente de carbono ocurrió a las 48 h de incubación. Esto podría ser atribuido al hecho que los cultivos fueron primeramente sometidos a un período preliminar de ayuno de nitrógeno o fósforo durante 24 h previo al cultivo con la fuente de carbono. Vonshak y Torzillo (2004) postularon que bajo condiciones de ayuno de nutrientes, la microalga debe realizar ajustes metabólicos y bioquímicos para balancear la absorción de energía (como ATP) y la producción de poder reductor (como NADPH) para el mantenimiento celular. Un alto y rápido consumo de nutrientes bajo condiciones de ayuno por *Scenedesmus bicellularis* fue reportado (Kaya y Picard, 1995). En este estudio, la alta afinidad a la fuente de carbono después de 48 h de incubación coincide con el máximo rendimiento de almidón y productividad volumétrica. Esto demuestra que el mayor consumo de la fuente de carbono y el incremento en la actividad de la AGPase pueden estar relacionadas a la mayor acumulación de almidón en *C. vulgaris* co-inmovilizada. Recientemente, Choix *et al.* (2012b) demostraron que bajo condiciones heterotróficas *A. brasilense* promueve la conversión de glucosa o acetato de sodio en almidón en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana*.

La mayor actividad de la AGPase fue medida después de 24 h en la microalga co-inmovilizada. Este tiempo permitió suficiente interacción con lo cual *Azospirillum* puede estimular esta mayor actividad de la enzima en *C. vulgaris*. El almidón acumulado en los cultivos las primeras 72 h de incubación bajo todas nuestras condiciones experimentales, puede ser explicado de la siguiente manera: bajo condiciones de ayuno de nutrientes la microalga rápidamente cambia su metabolismo de a la síntesis de proteínas a almidón, para utilizarlo para su supervivencia (Dragone *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012; Markou *et al.*, 2012). El almidón acumulado en las células provee energía para su posterior crecimiento cuando las condiciones son restauradas (Markou *et al.*, 2012). Siaut *et al.* (2011) encontraron que bajo condiciones de ayuno *Chlamydomonas reinhardtii* utiliza el almidón como el principal compuesto para almacenar energía mientras que los lípidos son almacenados bajo condiciones de estrés prolongado. Este mismo patrón fue recientemente encontrado en *C. vulgaris* (Ho *et al.*, 2013). Sin embargo, en este trabajo, cuando *C. vulgaris* estuvo creciendo bajo condiciones saciadas de nutrientes; el contenido de almidón fue similar al acumulado en la microalga bajo condiciones de ayuno. Esto podría haber pasado debido a que la

población mantenida previamente en ayuno y posteriormente restauradas las condiciones nutricionales donde la microalga está saciada de nutrientes, la microalga no pudo regenerar su densidad celular.

Usualmente, el crecimiento heterotrófico de *Chlorella* spp. bajo condiciones saciadas en el suministro de nutrientes genera altas tasas de crecimiento y altas densidades celulares. (Perez-García *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio bajo condiciones de ayuno o de suficientes nutrientes, la densidad celular en *C. vulgaris* inmovilizada sola o co-inmovilizada fue relativamente baja. MacIntyre y Cullen (2005) mencionan que bajo condiciones de ayuno el metabolismo de la microalga disminuye y el crecimiento cesa. Esto se debe a que los nutrientes como el nitrógeno y fósforo son esenciales para generar ADN, ARN, ATP y proteínas. Cuando uno de estos nutrientes es removido o reducido, este induce bajas tasas de crecimiento y consecuentemente baja biomasa (Ballin *et al.*, 1988; Zachleder *et al.*, 1988; Bumbak *et al.*, 2011; Markou *et al.*, 2012). La recuperación de la densidad celular cuando el suministro de nutrientes fue recuperado, no sucedió. Esto podría haber ocurrido debido a que durante la fase de crecimiento secundario de *C. vulgaris*, realizado en este estudio, la microalga estuvo bajo ayuno de nitrógeno o fósforo. Como se menciona anteriormente, el ayuno genera un crecimiento desbalanceado que puede causar que la microalga muera. Además, la respuesta fisiológica de diferentes especies de microalgas al ayuno, difiere y también varía de minutos a días (Vonshak y Torzillo, 2004). Estudios realizados anteriormente, demuestran que *C. vulgaris* creciendo bajo ayuno de nutrientes no pudo recobrar su densidad celular incluso cuando la concentración de nutrientes del medio de cultivo fue restablecida (Hernández *et al.*, 2006). Por lo tanto, en este estudio, los cultivos de *C. vulgaris* inmovilizada sola o co-inmovilizada no pudieron recuperar su densidad celular. Considerando esto último, la disminución del metabolismo y la baja densidad celular inducida por el ayuno de nutrientes, podría explicar la similar acumulación de almidón en *C. vulgaris* creciendo saciada de nutrientes después de un corto período de ayuno de 24 h.

Contrario a lo anterior, nosotros encontramos que a pesar del ayuno de nitrógeno o fósforo, *A. brasilense* promueve una mayor densidad celular de *C. vulgaris* co-inmovilizada que inmovilizada sola. Esto puede ser debido a que esta bacteria reduce

muchas condiciones de estrés en plantas (Bashan *et al.*, 2004; Bashan y de-Bashan, 2010) así como en *Chlorella* spp. (de-Bashan *et al.*, 2005; de-Bashan y Bashan, 2008) por numerosos mecanismos a pequeña escala. Aunque, cuando *C. vulgaris* estuvo creciendo bajo condiciones saciada nitrógeno y fósforo, esta alcanzó una densidad celular mayor que inmovilizada sola.

Cultivada en ayuno o saciedad de nitrógeno, *C. vulgaris* co- inmovilizada con cepas de *A. brasilense* superproductoras o atenuadas en la producción de AIA, demostró el efecto de esta fitohormona para promover mayor actividad de la AGPase de la microalga. Estudios anteriores han demostrado que la aplicación de AIA sintético incrementa la producción de metabolitos en *Chlorella* (Tate *et al.*, 2013) como el almidón (Bhatia and Singh, 2002). Recientemente, Jing *et al.*, demostraron que el AIA tiene la capacidad de incrementar la actividad de AGPase en plantas de arroz. Lo cual explica el incremento en la actividad de la AGPase en *C. vulgaris* cuando se agregó AIA sintético al MSC. Interactuando con una cepa atenuada en su producción de AIA (*A. brasilense* SpM), la actividad de la AGPase en la microalga permaneció en el mismo nivel que la microalga inmovilizada sola, lo cual demuestra que el AIA es un factor para promover el incremento en la actividad enzimática de *Chlorella* (Barbieri y Galli, 1993; de-bashan *et al.*, 2008b, Tate *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayor actividad de la AGPase obtenida en *C. vulgaris* co-inmovilizada con cepas silvestres, se puede atribuir a que el género *Azospirillum* posee múltiples mecanismos para promover el incremento en la actividad metabólica (Bashan *et al.*, 2004; Bashan y Holguín, 1997; Bashan y de-Bashan, 2010), los cuales pudieran estar interactuando entre ellos para potenciar el incremento en la actividad de la AGPase. Bajguz *et al.*, (2013) demostraron que las auxinas (AIA) actúan de manera sinérgica con otras fitohormonas (brasinoesteroides) para potenciar el incremento de metabolitos (monosacáridos) en *C. vulgaris*. Lo cual explica porque la actividad de la AGPase fue superior cuando *C. vulgaris* estuvo co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd o *A. brasilense* Sp6 que cuando se agregó únicamente AIA sintético o estuvo co-inmovilizada con *A. brasilense* SpM.

Un efecto similar se obtuvo en el contenido de almidón y la asimilación de la fuente de carbono de *C. vulgaris* interactuando con cepas silvestres de *A. brasilense*, a mayor consumo de glucosa corresponde una mayor actividad de la AGPase y un mayor

contenido de almidón. Esto demuestra que la producción de fitohormonas, principalmente el AIA por *Azospirillum* influye positivamente en el metabolismo de acumulación de almidón de la microalga evaluada en este estudio.

## 9. CONCLUSIONES

Este estudio demostró que bajo condiciones autotróficas o heterotróficas, *Azospirillum brasilense* incrementa el contenido de carbohidratos totales, principalmente como almidón, en dos cepas de *Chlorella*. El incremento en el contenido de almidón de *Chlorella* se debe principalmente a un incremento en la actividad enzimática de la AGPase de la microalga, lo que induce la mayor acumulación de almidón durante la interacción con la bacteria. Igual al efecto de *Azospirillum* en plantas superiores, este incremento en la actividad de la enzima clave en la biosíntesis de almidón y por ende mayor acumulación del mismo, se debe a la producción de ácido indolacético por *A. brasilense*. Similar respuesta de la microalga interactuando con la bacteria fue encontrada cuando se sometieron a un cultivo bajo condiciones de ayuno o saciada de nutrientes (nitrógeno o fósforo), o bien, utilizando glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono. Considerando la habilidad de *A. brasilense* y la respuesta fisiológica de *Chlorella* durante la interacción de ambos microorganismos, se demuestra que la bacteria *A. brasilense* es un factor biológico que puede cambiar la composición celular en las microalgas. Habilidad que puede ser utilizada en otros campos biotecnológicos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Piedras, J.J., M.L. Xiqui-Vásquez, S. García-García, B.E. Baca. 2008. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. Rev Latinoam Microbiol. 50(1–2):29–37.
- Bailey, J.M., A.C. Neish. 1954. Starch synthesis in *Chlorella vulgaris*. Can J Biochem Physiol. 32(4):452–464.
- Bajguz, A., A. Piotrowska-Niczyporuk. 2013. Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiol Biochem. 71:290–297.
- Ball, S.G., L. Dirik, A. Decq, J.-C. Martiat, R.F. Matagne. 1990. Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Sci. 66(1):1–9.
- Ballicora, M.A., A.A. Iglesias, J. Preiss. 2004. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. Photosynth Res. 79(1):1–24.
- Ballin, G., J. Doucha, V. Zachleder, I. Šetlík. 1988. Macromolecular syntheses and the course of cell cycle events in the Chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* under nutrient starvation: Effect of nitrogen starvation. Biol Plantarum. 30(2):81–91.
- Barbieri, P., E. Galli. 1993. Effect on wheat roor development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. Res Microbiol. 144(1):69–75.
- Barsanti, L., P. Gualtieri. 2006. Algae–Anatomy, biochemistry, and biotechnology. CRC Press. Boca Ratón, FL. 301p.
- Bashan, Y., A. Trejo, L.E. de-Bashan. 2011. Development of two cultures media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. Biol Fertil Soils. 47(8):963–969.
- Bashan, Y., G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). Can J Microbiol. 43(2):103–121.
- Bashan, Y., G. Holguín, L.E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). Can J Microbiol. 50:521–577.
- Bashan, Y., G. Holguin, R. Lifshitz. 1993. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. En: B. R. Glick, J. E. Thompson. (Eds.). Methods in plant molecular biology and biotechnology. CRC Press, USA. pp. 331–345p.
- Bashan, Y., H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can J Microbiol. 36(9):591–608.
- Bashan, Y., J.J. Bustillos, L.A. Leyva, J.-P. Hernández, M. Bacilio. 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. Biol Fertil Soils. 42(4):279–285.

- Bashan, Y., L.E. de-Bashan. 2010. How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth –A critical assessment. *Adv Agron.* 108:77–136.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae–Biotechnology and Microbiology.* Cambridge University Press. New York, NY. 177p.
- Behrens, P.W., S.E. Bingham, S.D. Hoeksema, D.L. Cohoon, J.C. Cox. 1989. Studies on the incorporation of CO<sub>2</sub> into starch by *Chlorella vulgaris*. *J Appl Phycol.* 1(2):123–130.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, L. Stryer. 2008. *Biochemistry.* W. H. Freeman and Company. 5th edition. New York. 1514p.
- Bhatia, S., R. Singh. 2002. Phytohormone-mediated transformation of sugars to starch in relation to the activities of amylases, sucrose-metabolising enzymes in sorghum grain. *Plant Growth regul.* 36(2):97–104.
- Bhatnagar A., M. Bhatnagar, S. Chinnaamy, K.C. Das. 2009. *Chlorella minutissima* ---A promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161(1–8):523–536.
- Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce, R.P. Pharis. 1989. Identification of Gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90(1):45–47.
- Bouarab, L., A. Dauta, M. Loudiki. 2004. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. *Water Res.* 38(11):2706–2712.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72(1–2), 248–254.
- Brányiková, I., B. Marsálková, J. Doucha, T. Brányik, K. Bisová, V. Zachleder, M. Vítová. 2011. Microalgae – novel highly efficient starch producers. *Biotechnol Bioeng.* 108(4):766–776.
- Bumbak, F., S. Cook, V. Zachleder, S. Hauser, K. Kovar. 2011. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Appl Microbiol Biot.* 91(1)31–46.
- Caiola, M.G., A. Canini, A.L. Bott Biotechnol Bioeng a, M. Del Gallo. 2004. Localization of *Azospirillum brasilense* Cd in inoculated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. *Ann Microbiol.* 54(4):365–380.
- Chen, G.-Q., F. Chen. 2006. Growing phototrophic cells without light. *Biotechnol Lett.* 28(9):607–616.
- Chisti, Y., S. Sirisansaneeyakul, S. Singhasuwan, W. Choorit, N. Phoopat, J.L. García. 2011. Photoautotrophic production of lipids by some *Chlorella* Strain. *Mar. Biotechnology.* 13(5):928–941.
- Choix, F.J., L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2012a. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. *Enzyme Microb Tech.* 51(5):294–299.
- Choix, F.J., L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2012b. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced

by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. *Enzyme Microb Tech* 51(5):300–309.

- Chrzanowski, T.H., R.D. Crotty, J.G. Hubbard, R.P. Welch. 1984. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microb Ecol.* 10(2):179–185.
- Chu, W.-L., S.-M. Phang, S.-H. Goh. 1995. Influence of carbon source on growth, biochemical composition and pigmentation of *Ankistrodesmus convolutus*. *J Appl Phycol.* 7:59–64.
- Cohen, A.C., R. Bottini, P.N. Piccoli. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regul.* 54(2):97–103.
- Covarrubias, S.A., L.E. de-Bashan, M. Moreno, Y. Bashan. 2012. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(6):2669–2680.
- Crozier, A., P. Arrunda, J.M. Jasmin, A.M. Montero, G. Sandberg. 1998. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microb.* 54(11):2833–2837.
- de-Bashan, L.E., A. Trejo, V.A.R. Huss, J.-P. Hernández, Y. Bashan. 2008c. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresour Technol.* 99(11):4980–4989.
- de-Bashan, L.E., H. Antoun, Y. Bashan. 2005. Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Ecol.* 54(2):197–203.
- de-Bashan, L.E., H. Antoun, Y. Bashan. 2008a. Involvement of indole-3-acetic-acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *J Phycol.* 44(4):938–947.
- de-Bashan, L.E., J.P. Hernández, T. Morey, Y. Bashan. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38(2):466–474.
- de-Bashan, L.E., P. Magallon, H. Antoun, Y. Bashan. 2008b. Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *J Phycol.* 44(5):1188–1196.
- de-Bashan, L.E., Y. Bashan. 2008. Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. *Appl Environ Microbiol.* 74(21):6797–6802.
- de-Bashan, L.E., Y. Bashan. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour Technol.* 101(6):1611–1627.
- de-Bashan, L.E., Y. Bashan, M. Moreno, V.K. Lebsky, J.J. Bustillos. 2002. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of

the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Microbiol.* 48(6):514–521.

- de la Noue, J., G. Laliberté, D. Proulx. 1992. Algae and waste water. *J Appl Phycol.* 4(3):247–254.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, A. Vande Broek, J. Vanderleyden. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in AIA production on wheat. *Plant Soil.* 212(2):153–162.
- Droop, M. R. 1974. Heterotrophy of carbon. En: Stewart, W.D.P., C.E. Pierce. (eds). *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, U.K. p. 530–59.
- Doucha, J., K. Lívanský. 2012. Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. *J Appl Phycol.* 24(1):35–43.
- Dragone, G., B.D. Fernandes, A.P. Abreu, A.A. Vicente, J.A. Teixeira. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl Energ.* 88(10):3331–3335.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.A. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28(3):350–356.
- Endo, H., K. Nakajima, R. Chino, M. Shiota. 1974. Growth characteristics and cellular components of *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growing strain. *Agric Biol Chem.* 38:9–18.
- Fox, J.D., J.F. Robyt. 1991. Miniaturization of three carbohydrate analysis using a microsample plate reader. *Anal Biochem.* 195(1):93–96.
- Jing, F., Y.-J. Xu, L. Chen, L.-M. Yuan, Z.-Q. Wang, J.-C. Yang. 2013. Changes in enzyme activities involved in starch synthesis and hormone concentrations in superior and inferior spikelets and their association with grain filling of super rice. *Rice science.* 20(2):120–128.
- Geigenberger, P. 2011. Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol.* 155(4):1566–1577.
- González, L.E., R.O. Cañizares, S. Baena. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour Technol.* 60(3):259–262.
- González, L.E., Y. Bashan. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol.* 66(4):1527–1531.
- González-Fernández, C., M. Ballesteros. 2012. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnol Adv.* 30(6):1655–1661.
- Griffiths, D.J., C.L. Thresher, H.E. Street. 1960. The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (Brannon No. 1 strain): with two figures in the text. *Ann Bot.* 24(1):1–11.
- Griffiths, D.J. 1965. The accumulation of carbohydrate in *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions. *Ann Bot.* 29(3):347–357.

- Hameed, M.S., O.H. Ebrahim. 2007. Biotechnological potential uses of immobilized algae. *J Agric Biol.* 9(1):183–192.
- Hartmann, A., A.J. Baldani. 2006. The genus *Azospirillum*. En: Springer. A handbook of the biology of bacteria: Proteobacteria: Alfa and Beta Subclasses. 3ra. edición. New York. 115–140p.
- Hartmann, A., W. Zimmer. 1994. Physiology of *Azospirillum*. En: Okon, Y. (Ed). *Azospirillum / Plant associations*. CRC Press. Boca Raton, F.L. p. 15–39.
- Hernández, J.-P., L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme Microb Technol.* 38(1–2):190–198.
- Ho, S.-H., C.-Y. Chen, J.-S. Chang. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technol.* 113:244–252.
- Ho, S.-H., S.-W. Huang, C.-Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo, J.-S. Chang. 2013. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technol.* 135: 157–165.
- Holguin, G., Y. Bashan. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biol Biochem.* 28(12):1651–1660.
- Iglesias, A.A., Y.-Y. Charng, S. Ball, J. Preiss. 1994. Characterization of the kinetic, regulatory, and structural properties of ADP-Glucose pyrophosphorylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 104(4):1287–1294.
- Isleten-Hosoglu, M., I. Gultepe, M. Elibol. 2012. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochem Eng J.* 61:11–19.
- John, R.P., G.S. Anisha, K.M. Nampoothiri, A. Pandey. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol.* 102(1):186–193.
- Kaneko, K., et al. (20 co-authors). 2010. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Research* 17(1):37–50.
- Kaya, V.M., G. Picard. 1995. The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrient starvation in air at 100% relative humidity. *Biotechnol Bioeng.* 46(5):459–464.
- Keeling, P.L., A.M. Myers. 2010. Biochemistry and genetics of starch synthesis. *Annu Rev Food Sci.* 1:271–303.
- Khozin-Goldberg, I., Z. Cohen. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochem.* 67(7):696–701.
- Lebeau, T., J.M. Robert. 2006. Biotechnology of immobilized micro algae: a culture technique for the future? En: Rao, S. (Ed). *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications*. Science Publishers. Enfield, N.H. 801–37.
- Lebsky, V.K., L.E. González-Bashan, Y. Bashan. 2001. Ultrastructure of coimmobilization 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 Microb.* 47(1):1–8.

- Lerner, A., S. Castro-Sowinski, H. Lerner, Y. Okon, S. Burdman. 2009. Glycogen phosphorylase is involved in stress endurance and biofilm formation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *FEMS Microbiol Lett.* 300(1):75–82.
- Li, Y., D. Han, M. Sommerfeld, Q. Hu. 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresour Technol.* 102(1):12–29.
- Li, Y., M. Horsman, N. Wu, Q.L. Christopher, N. Dubois-Calero. 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog.* 24(4):815–820.
- Liang, Y., N. Sarkany, Y. Cui. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett.* 31(7):1043–1049.
- MacIntyre, H.L., J.J. Cullen. 2005. Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. En: Andersen, R. A. (Ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier academic Press. Burlington, M.A. pp. 287–326.
- Markou, G., I. Angelidaki, D. Georgakakis. 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl Microbiol Biotech.* 96(3):631–645.
- Marsálková, B., M. Sirmarová, M. Kurec, T. Brányik, I. Brányiková, K. Melzoch, V. Zachleder. 2010. Microalgae *Chlorella* sp. as an alternative source of fermentable sugars. *Chem Eng Tran.* 21:1279–1284.
- Martínez, F., C. Ascaso, M.I. Orús. 1991. Morphometric and stereologic analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. *Ann Bot.* 67(3):239–245.
- Martínez, L.J., L. Soto, B.E. Baca, J.A. Sánchez. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.* 228(2):167–173.
- Martinsen, A., G. Skjark-Braek, O. Smidsrod. 1987. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng.* 33(1):79–89.
- Martinsen, A., I. Storro, G. Skjark-Braek. 1992. Alginate as immobilization material: III. Difusional properties. *Biotechnol Bioeng.* 39(2):186–194.
- Massena-Reis, V., K. R. Teixeira, R. O. Pedraza. 2011. What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant Growth-Promoting Bacteria? En: D. K. Maheshwari (Ed). *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth responses*. Berlin. 126–138p.
- Masuko, T., A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S.I. Nishimura, Y.C. Lee. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem.* 339(1):69–72.
- McCready, R.M., J. Guggolz, V. Silveira, H.S. Owens. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. *Anal Chem.* 22(9):1156–1158.
- Moreno-Garrido, I. 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technol.* 99(10):3949–3964.

- Nakamura, Y., M. Imamura. 1985. Regulation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase from *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* 78(3):601-605.
- Nelson, D. L., M. M. Cox. 2004. *Lehninger principles of biochemistry*. W. H. and Company (Eds). 4th Edition. New York. 1130p.
- Nguyen, M.T., S.P. Choi, J. Lee, J.H. Lee, S.J. Sim. 2009. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *J Microbiol Biotechnol.* 19(2):161-166.
- Ogawa, T., S. Aiba. 1981. Bioenergetic Analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnol Bioeng.* 23(5):1121-1132.
- Oh-Hama, T., S. Miyachi. 1992. *Chlorella*. En: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., (eds). *Micro-algae Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge UK. 477p.
- Okon, Y., Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum-inoculated* roots. *Dev Plant Soil Sci.* 21:3-16.
- Olaitan, S.A., D.H. Northcote. 1962. Polysaccharides of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem J.* 82(3):509-519.
- Patil, V., T. Khanh-Quang, R.G. Hans. 2008. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *Int J Mol Sci.* 9:1188-1195.
- Perez-Garcia, O., F.M.E. Escalante, L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2011b. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 45(1):11-36.
- Perez-Garcia, O., L.E. de-Bashan, J.-P. Hernández, Y. Bashan. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *J Phycol.* 46(4):800-812.
- Perez-Garcia, O., Y. Bashan, M.E. Puente. 2011a. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *J Phycol.* 47(1):190-199.
- Příbyl, P., V. Cepák, V. Zachleder. 2012. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl Microbiol Biotech.* 94(2):549-561.
- Prusse, U., L. Bilancetti, M. Bucko, B. Bugarsky, J. Bukowsky, P. Gemeiner, D. Lewinska, V. manojlovik, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovik, D. Poncelet, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Tosi, A. Vikartovská, K.D. Vorlop. 2008. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem Pap.* 62(4):364-374.
- Radakovits, R., R.E. Jinkerson, A. Darzins, M.C. Posewitz. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot cell.* 9(4):486-501.
- Rahn, O. 1930. The formula for the fermenting capacity of a single cell. *J Bacteriol.* 19(6):383-387.
- Rismani-Yazdi, H., B.Z. Haznedaroglu, K. Bibby, J. Peccia. 2011. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: Pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC Genomics.* 12(148).

- Round, F.E. 1974. The biology of the algae. Edward Arnold. 2nd edición. Londres, England. 278.
- Ruíz-Marin, A., L.G. Mendoza-Espinosa, T. Stephenson. 2010. Growth and nutrients removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource technol.* 101(1):58–64.
- Salisbury, F., C. Ross. 1992. Plant physiology. Wadsworth Pub Co. 4th edición. Belmont, C.A. 682p.
- Samejima, H., J. Myers. 1958. On the heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *J Gen Microbiol.* 18(1):107–117.
- Sauer, N., E. Komor, W. Tanner. 1983. Regulation and characterization of two inducible amino-acid transport systems in *Chlorella vulgaris*. *Planta.* 159(5):404–410.
- Sayed, M., O. Ebrahim. 2007. Biotechnological potential uses of immobilized algae. *International journal of agriculture and biology.* 9(1):183–192.
- Siaut, M., S. Cuiné, C. Cagnon, B. Fessler, M. Nguyen, P. Carrier, A. Beyly, F. Beisson, C. Triantaphylides, Y. Li-Beisson, G. Peltier. 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol.* 11(7).
- Slattery, C.J., I.H. Kavakli, T.W. Okita. 2000. Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends plant sci.* 5(7):291–298.
- Smith, A.M. 2008. Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *Plant J.* 54(4):546–558.
- Spaepen, S., S. Dobblaere, A. Croonenborghs, J. Vanderleyden. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* idole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil.* 312(1–2):15–23.
- Stewart W.D.P. 1974. Algal physiology and biochemistry. University of California press. 1ra edición. Los angeles, CA. 989.
- Tampion, J., M.D. Tampion. 1987. Immobilized cells: Principles and Applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 257p.
- Tang, H., M. Chen, M.E.D. Garcia, N. Abunasser, K.Y. Simon Ng, S.O. Salley. 2011. Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *Biotechnol Bioeng.* 108(10):2280–2287.
- Tanner, W. 2000. The *Chlorella* hexose/H<sup>+</sup>-symporters. *Int. Rev. Cytol.* 200:101–141.
- Tate, J.J., M.T. Gutierrez-Wing, K.A. Rusch, M.G. Benton. 2013. The effects of plant growth substances and mixed cultures on growth and metabolite production of green alga *Chlorella* sp.: A review. *J Plant Growth Regul.* 32(2):417–428.
- Timmusk, S., E.G.H. Wagner. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* Gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant Microbe In.* 12(11):951–959.
- Tomaselli, L. 2004. The microalgal cell. En: Richmond, A. (Ed) Handbook of microalgae culture: Biotechnology and applied phycology. Blackwell Publishing. Oxford, U.K. pp. 3–20.

- Trejo, A., L.E. de-Bashan, A. Hartmann, J-P Hernandez, M. Rothballer, M. Schmid, Y. Bashan. 2012. Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environ Exp Bot.* 75:65–73.
- Tsavkelova, E.A., S.Y. Klimova, T.A. Cherdyntseva, A.I. Netrusov. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol.* 42(2):133–43.
- Tsimilli-Michael, M., P. Eggenberg, B. Biro, K. Köves-Pechy, I. Vörös, R.J. Strasser. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. *Appl Soil Ecol.* 15(2):169–182.
- Van den Koornhuysse, N., N. Libessart, B. Delrue, C. Zabawinski, A. Decq, A. Iglesias, A. Carton, J. Preiss, S. Ball. 1996. Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 271:16281–16287.
- Vonshak, A., G. Torzillo. 2004. Environmental stress physiology. En: Richmond, A. (Ed.) *Handbook of microalgae culture: Biotechnology and applied phycology.* Blackwell Publishing. Oxford, U.K. pp. 57–82.
- Wang, C., H. Kong, S. He, X. Zheng, C. Li. 2010. The inverse correlation between growth rate and cell carbohydrate content of *Microcystis aeruginosa*. *J Appl Phycol.* 22(1):105–107.
- Wisniewsky-Dyé, F., K. Borziak, G. Khalsa-Moyers, G. Alexandre, L.O. Sukharnikov, et al. 2011. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *Plos Genetics.* 7(12).
- Wisniewski-Dyé, F., L. Lozano, E. Acosta-Cruz, S. Borland, B. Drogue, C. Prigent-Combaret, Z. Rouy, V. Barbe, A.-M. Herrera, V. González, P. Mavingui. 2012. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. *Genes.* 3(4):576–602.
- Wood, B.J.B., P.H.K. Grimson, J.B. German, M. Turner. 1999. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *J Biotechnol.* 70:175–83.
- Work, V. H., R. Radakovits, R. E. Jinkerson, J. E. Meuser, L. G. Elliot, D. J. Vinyard, M. L. Laurens, G. C. Dismukes, C. Posewitz. 2010. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* STA7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eucaryot Cell.* 9(8):1251–1261.
- Xiong, W., Gao, C., Yan, D., Wu, C., Wu, Q., 2010. Double CO<sub>2</sub> fixation in photosynthesis–fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology* 101 (7), 2287–2293.
- Yang, C., Q. Hua, K. Shimizu. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem Eng J.* 6(2):87–102.
- Yeh, K.-L., J.-S. Chang, W.-M. Chen. 2010. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng Life Sci.* 10(3):201–208.

- Yu, H., S. Jia, Y. Dai. 2009. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flageliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *J Appl Phycol.* 21(1):127–133.
- Zachleder, V., G. Ballin, J. Doucha, I. Šetlík. 1988. Macromolecular syntheses and the course of cell cycle events in the Chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* under nutrient starvation: Effect of phosphorus starvation. *Biol Plantarum.* 30(2):92–99.
- Zeeman, S.C., J. Kossmann, A.M. Smith. 2010. Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 61:209–234.

## 11. ANEXOS

**A1.** Acumulación de almidón por célula en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizadas solas y co-inmovilizadas con *A. brasilense* bajo condiciones autotróficas.

ng almidón·cél <sup>-1</sup>				
Tiempo de Incubación (h)	<i>C. vulgaris</i>		<i>C. sorokiniana</i>	
	Sola	Co-inmovilizada	Sola	Co-inmovilizada
0	14.7 ± 1.76	12.9 ± 0.74	18.7 ± 1.88	27.0 ± 1.55
24	33.8 ± 0.76	39.3 ± 0.88	60.2 ± 1.59	49.6 ± 0.49
48	13.3 ± 1.39	23.2 ± 1.44	41.2 ± 4.80	32.1 ± 2.42
72	16.5 ± 0.44	21.8 ± 0.32	32.6 ± 0.45	44.1 ± 2.58
96	15.4 ± 1.88	16.9 ± 1.12	25.8 ± 2.66	14.4 ± 1.76
120	17.4 ± 1.29	13.5 ± 2.29	19.1 ± 2.60	14.2 ± 2.08
144	10.7 ± 1.25	15.8 ± 1.25	18.2 ± 1.81	16.2 ± 3.91

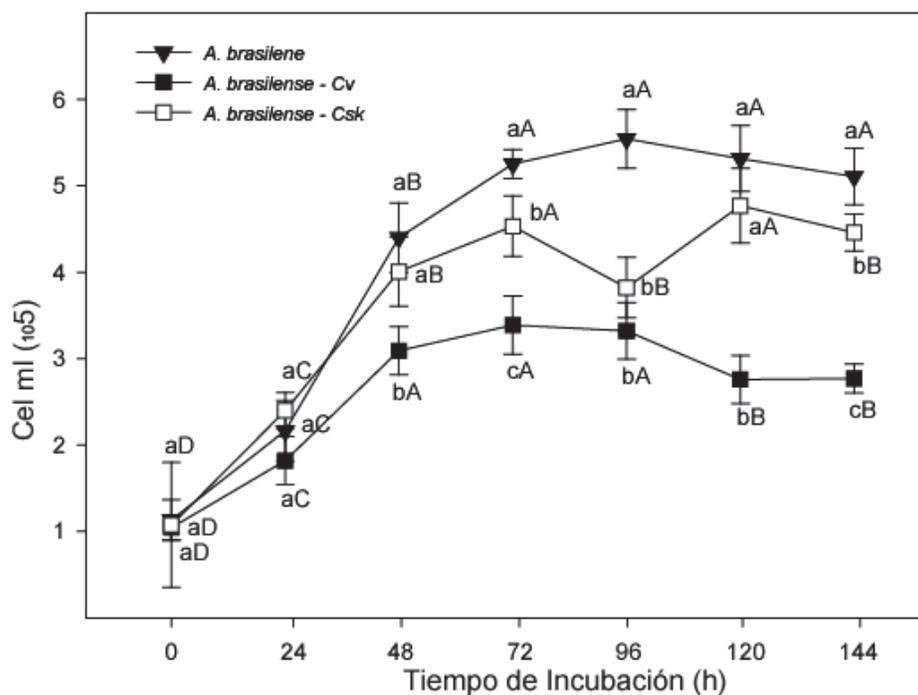
**A2.** Acumulación de almidón por célula en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizadas solas y co-inmovilizadas con *A. brasilense* bajo condiciones heterotróficas, usando D-glucosa como fuente de carbono.

ng almidón·cél <sup>-1</sup>				
D-Glucosa				
Tiempo de Incubación (h)	<i>C. vulgaris</i>		<i>C. sorokiniana</i>	
	Sola	Co-inmovilizada	Sola	Co-inmovilizada
0	40.4 ± 6.81	53.9 ± 5.66	69.1 ± 9.69	54.3 ± 2.16
24	125 ± 47.0	229 ± 46.2	181.0 ± 64.0	318 ± 53
48	43.1 ± 17.3	77.8 ± 13.8	79.9 ± 7.21	117.3 ± 13.2
72	41.7 ± 3.38	58.9 ± 5.02	50.7 ± 8.73	97.7 ± 7.58
96	123 ± 26.0	228 ± 51.0	72.4 ± 5.67	97.9 ± 8.96
120	96.6 ± 16.7	209.6 ± 15.0	68.5 ± 12.6	126.9 ± 16.7
144	121.4 ± 33.3	353.7 ± 30.2	113.4 ± 8.89	164.9 ± 12.8

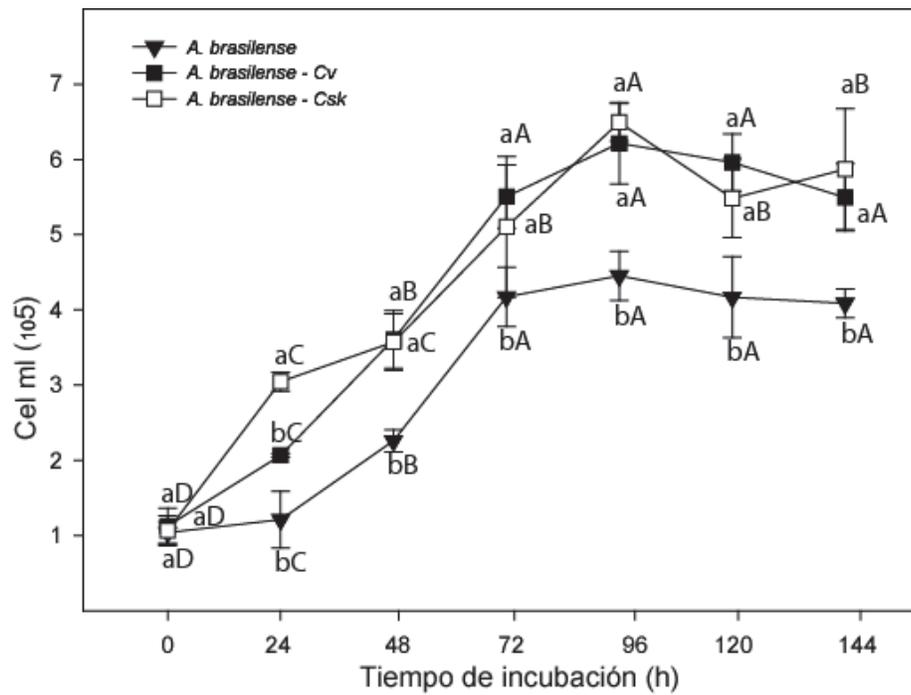
**A3.** Acumulación de almidón por célula en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizadas solas y co-inmovilizadas con *A. brasilense* bajo condiciones heterotróficas, usando acetato de sodio como fuente de carbono.

ng almidón·cél <sup>-1</sup>				
Acetato de sodio				
Tiempo de Incubación (h)	<i>C. vulgaris</i>		<i>C. sokiniana</i>	
	Sola	Co-inmovilizada	Sola	Co-inmovilizada
0	20.2 ± 3.4	18.0 ± 1.8	6.1 ± 1.0	5.0 ± 0.5
24	75.0 ± 15.0	138.0 ± 26	15.6 ± 1.8	25.8 ± 3.6
48	41.3 ± 6.3	59.9 ± 9.9	7.8 ± 0.6	8.5 ± 0.8
72	27.9 ± 5.19	45.6 ± 8.7	3.9 ± 0.8	5.5 ± 1.5
96	36.3 ± 3.1	48.2 ± 5.5	5.2 ± 0.9	7.1 ± 0.7
120	39.8 ± 8.5	63.1 ± 7.0	6.7 ± 0.7	7.9 ± 1.0
144	67.1 ± 9.4	85.6 ± 16.0	12.3 ± 1.3	12.6 ± 1.9

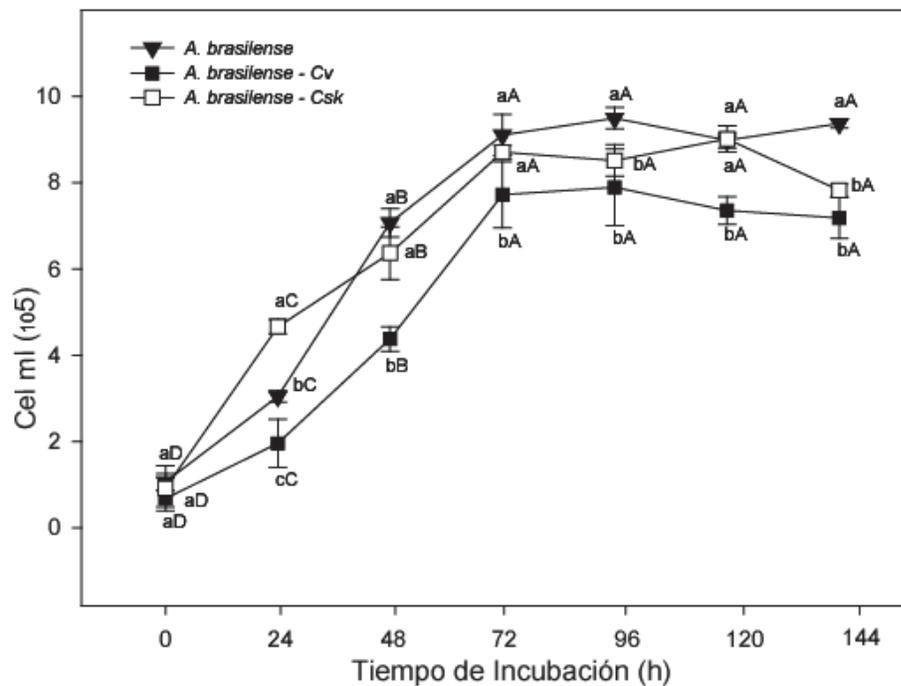
**A4.** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* inmovilizada sola o co-inmoviliada con *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* bajo condiciones autotróficas.



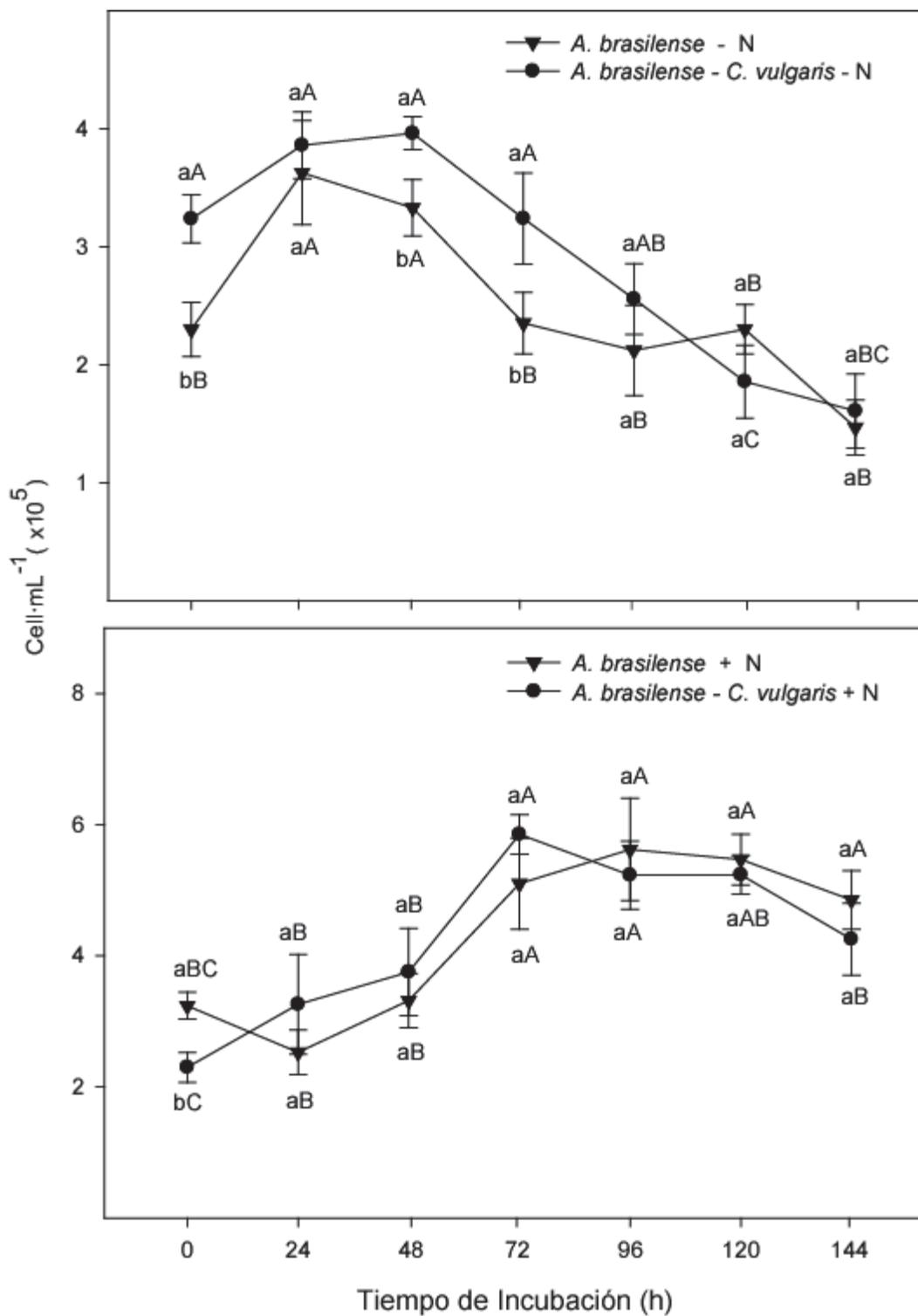
**A5.** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* inmovilizada sola o co-inmovilizada con *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* bajo condiciones heterotróficas, usando glucosa como fuente de carbono.



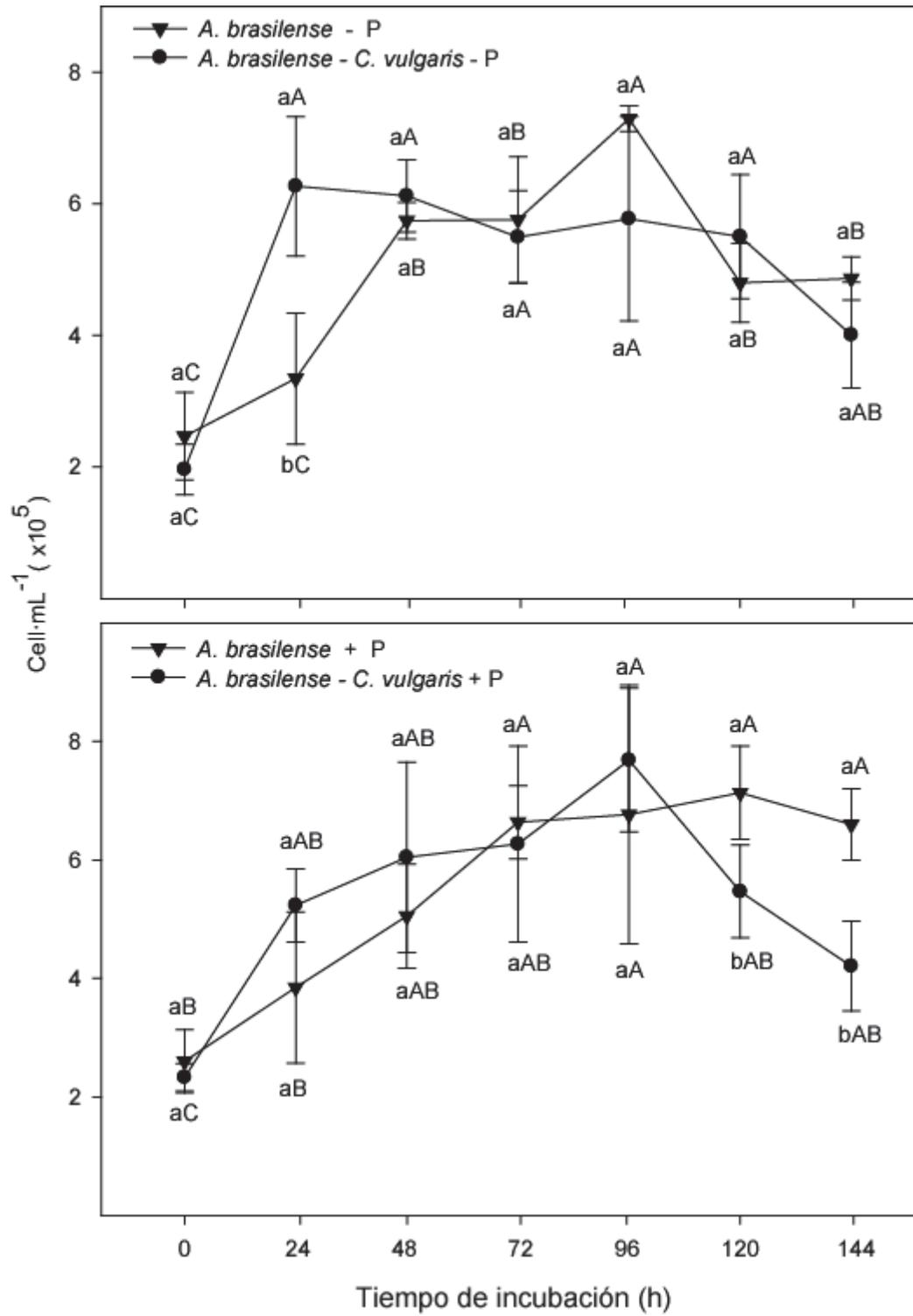
**A6.** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* inmovilizada sola o co-inmovilizada con *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* bajo condiciones heterotróficas, usando acetato de sodio como fuente de carbono.



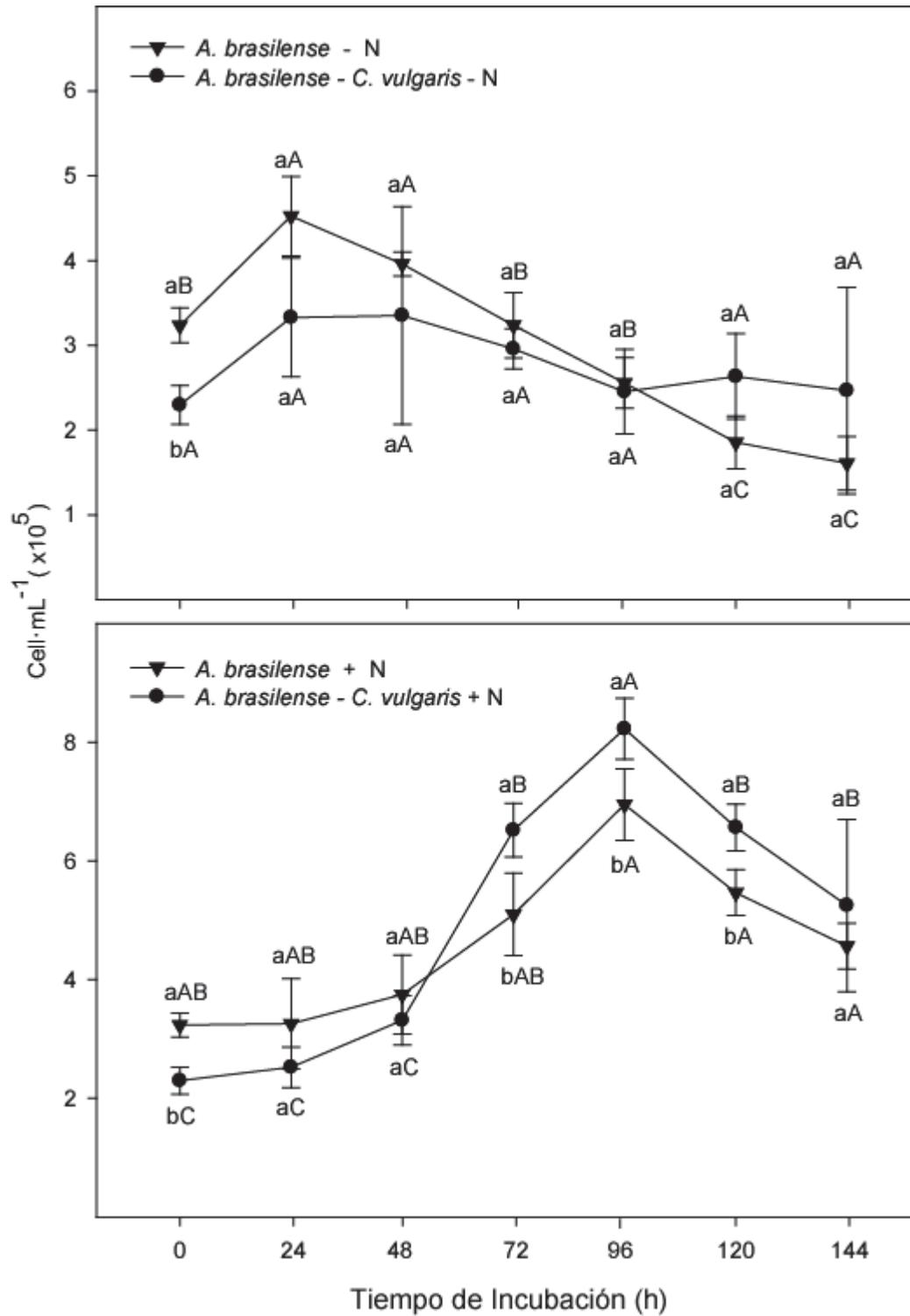
**A7.** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* inmovilizada sola o co-inmoviliada con *C. vulgaris* en condiciones de ayuno (- N) o saciada (+ N) de nitrógeno, bajo condiciones heterotróficas usando glucosa como fuente de carbono.



**A8.** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* inmobilizada sola o co-inmoviliada con *C. vulgaris* en condiciones de ayuno (- P) o saciada (+ P) de fósforo, bajo condiciones heterotróficas usando glucosa como fuente de carbono.



**A9.** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* inmobilizada sola o co-inmoviliada con *C. vulgaris* en condiciones de ayuno (- N) o saciada (+ N) de nitrógeno, bajo condiciones heterotróficas usando acetato de sodio como fuente de carbono.



**A10.** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* inmobilizada sola o co-inmovilizada con *C. vulgaris* en condiciones de ayuno (- P) o saciada (+ P) de fósforo, bajo condiciones heterotróficas usando acetato de sodio como fuente de carbono.

