UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR Y DE LA TIERRA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

TESIS

METABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* CD DURANTE LA INTERACCIÓN *CON CHLORELLA SOROKINIANA*

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS CON ORIENTACIÓN EN MANEJO SUSTENTABLE

PRESENTA:

EDGAR JAIRO GONZALEZ INFANTE

DIRECTORES:

DR. ALEJANDRO PALACIOS ESPINOSA
DRA. LUZ ESTELA GONZALEZ DE-BASHAN

LA PAZ, B.C.S., SEPTIEMBRE 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR Y DE LA TIERRA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

TESIS

METABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* CD DURANTE LA INTERACCIÓN *CON CHLORELLA SOROKINIANA*

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS CON ORIENTACIÓN EN MANEJO SUSTENTABLE

PRESENTA:

EDGAR JAIRO GONZALEZ INFANTE

DIRECTORES:

DR. ALEJANDRO PALACIOS ESPINOSA

DRA. LUZ ESTELA GONZALEZ DE-BASHAN

LA PAZ, B.C.S., SEPTIEMBRE 2020

DICTAMEN DE APROBACIÓN

Universidad Autónoma
de Baja California Sur
Sabiduría como meta, patria como destino

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
INTERDISCIPLINARIA Y POSGRADO
DEPARTAMENTO DE POSGRADO

FORMATO DP-EGD-001 DICTAMEN DE TESIS
PROYECTO TERMINAL Fecha: 17 /09 /2020

Dra. Georgina Brabata
JEFE/A DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
Ciencias Marinas y Costeras
Correo electrónico (gbrabata@uabcs.mx)

Por este conducto, quienes integramos el Comité Académico Asesor del/la alumno/a:
Edgar Jairo Gonzalez Infante
quien presentó una tesis/proyecto terminal titulado:
METABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN AZOSPIRILLUM BRASILENSE CD DURANTE LA INTERACCIÓN CON CHLORELLA SOROKINIANA

otorgamos nuestro voto aprobatorio y consideramos que dicho trabajo está listo para ser presentado y defendido en examen de grado (**modalidad a distancia**) del Programa de Maestría: **Ciencias Marinas y Costeras con orientacion en manejo sustentable**

COMITÉ ACADÉMICO ASESOR

Nombre	Firma	
Dr. Alejandro Palacios Espinosa		Director de Tesis
Dr. Luz Estela Gonzalez de-Bashan		Co-director(a)
Dr. Maurilia Rojas Contreras		Asesor(a)

C.c.p. Programa de Posgrado.
C.c.p. Comité Académico Asesor.
C.c.p. Alumna/o.
C.c.p. Expediente.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Yoav Bashan por sembrar en mi la pasión por la ciencia, por permitirme hacer parte de su legado y por ayudarme a cumplir mi sueño de publicar mi primer artículo científico, muchas gracias doctor vives en todos nosotros.

A la Dra. Luz de-Bashan por todo el apoyo brindado durante esta trayectoria de más de 6 años y especialmente durante los dos años de maestría, es un orgullo ser parte de todo esto, gracias.

Al Dr. Alejandro Palacios, cuyo apoyo fue fundamental de principio a fin con todos los análisis estadísticos y con mis inconvenientes con los trámites en la universidad.

Al Dr. Oskar Palacios quien como maestro, amigo y asesor me apoyo y aconsejo durante todo el desarrollo de esta tesis.

A toda la familia del laboratorio de microbiología ambiental por su apoyo incondicional para el desarrollo de este trabajo en especial a Edgar Amavizca por ser parte de este proceso como compañero de trabajo y como amigo. A la Dra. Blanca López por tomarse el tiempo de ayudarme a resolver mis numerosas dudas.

Al Dr. Luis Leyva y la Dra. Mariana por todo su apoyo y enseñanzas en la detección por HPLC durante la estancia en el laboratorio de biotecnología de alimentos del instituto tecnológico de Sonora. A Edgar, a Carlos (hijo) y Rolando mis amigos en Obregón.

Al Dr. Yi Wang, Yuechao, Pablo y los demás compañeros del laboratorio de ingeniería de bioprocesos de la universidad de Auburn por su amabilidad y apoyo y porque a pesar de las dificultades pudimos sacar adelante las corridas de PCR en tiempo real. A mis amigos Ji Hong Lee (y a couchsurfing.com), Kathleen, Collins Trey y keyla por su generosidad, calidad humana y por hacer mis días mejores en Auburn. A mis roomates en Auburn: Tony, Jim y Cori por entender mi situación y recibirme en su hermosa casa.

A los ratones y a Congo y Trosky por ser los mejores roomates que se pueda tener, por los bellos y memorables momentos vividos durante este proceso.

A la Universidad Autónoma de Baja California Sur y el posgrado en Ciencias Marinas y Costeras (CIMACO) por todo el conocimiento aportado y por las muchas veces que me apoyaron con mis ‘conflictos’ administrativos.

Al gobierno mexicano quien a través de la beca CONACYT # 717282, financio la realización de esta tesis, gracias por apoyar la formación de jóvenes extranjeros en temas ciencia y tecnología.

A mis padres y hermanos por su incondicional amor y apoyo.

DEDICATORIA:

A mis papas Nelson y Clara y a mis hermanos Camilo y Lina, por esa chispa que le dan a mi vida, que no me deja desfallecer, me mantiene luchando y con la voluntad encendida. Chispa que ni el tiempo apaga, que me permite soñar en grande y vivir sin miedo (EL AMOR).

No te rindas, por favor no cedas, aunque el frío queme, aunque el miedo muerda, aunque el sol se esconda, y se calle el viento, aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños. Porque la vida es tuya y tuyo también el deseo, porque cada día es un comienzo nuevo, porque esta es la hora y el mejor momento, porque no estás solo.

Mario Benedetti

INDICE:

RESUMEN ……...1

ABSTRACT……..2

1. INTRODUCCIÓN……...4

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES……..……..…...6

2.1. *Azospirillum brasilense* Cd…….……6

2.2. *Chlorella sorokiniana*……7

2.3. Estudios de la interacción *Chlorella sorokiniana-Azospirillum brasilense*……8

2.4. Fuentes de carbono exudadas por *Chlorella* spp……....9

2.5. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* Cd en distintas fuentes de carbono……11

2.5.1. Metabolismo de β-polihidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense*.....11

2.5.2. Metabolismo de carbohidratos en *Azospirillum brasilense*……...13

2.5.3. Metabolismo de ácido galacturónico en *Azospirillum brasilense*……....15

3. JUSTIFICACIÓN…….…….……..16

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN…….……16

5. HIPOTÉSIS……..……16

6. OBJETIVOS……...……..17

7. MATERIALES Y MÉTODOS…….……...18

7.1. Microorganismos y condiciones de cultivo……..18

7.2. Caracterización de carbohidratos en exudados de *Chlorella sorokiniana* por Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia (HPLC)……18

7.3. Interacción *Azospirillum-Chlorella* en cultivo en suspensión. Condiciones experimentales……...……22

7.4. Conteos poblaciones de *Azospirillum* bajo los tratamientos evaluados……23

7.5 Análisis de expresión de genes por medio de PCR en tiempo real……..23

7.5.1. Diseño de primers…….23

7.5.2. Análisis de expresión relativa……...24

7.5.3. Comparación de modelos de preprocesamiento de datos de PCR en tiempo real……..…25

7.6. Diseño experimental…….....27

8. RESULTADOS…...……..29

8.1. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* Cd en distintas fuentes de crecimiento…….29

8.2. Comparación de modelos de preprocesamiento de datos para el cálculo de la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real ……..……..30

8.3. Análisis de expresión relativa mediante PCR en tiempo real y correlación en la expresión de genes…….,,,,,,,,,,,,,,,……..32

9. DISCUSIÓN……..35

9.1. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* Cd en interacción con *Chlorella sorokiniana*……35

9.2. Importancia de la eficiencia de la reacción para validar los resultados de PCR en tiempo real……..36

9.3. Metabolismo de PHB y relación con el ciclo de Krebs en *Azospirillum brasilense* Cd durante la interacción con *Chlorella sorokiniana*…….....37

10. CONCLUSIONES……..……..40

11. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS……..……..…….….41

12. REFERENCIAS…….……....42

13. ANEXOS……..……...53

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Efecto de la producción ácido indolacético durante la interacción *Azospirillum* - *Chlorella*. (Tomado de http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/iprojects.html).....9

Figura 2. Gránulos intracelulares de polihidroxibutirato en *Azospirillum brasilense*. Modificado de Caiola *et al*., 2004……..12

Figura 3. Metabolismo de carbohidratos y polihidroxibutirato en *Azospirillum brasilense*. Ruta de Embder Meyenorf Parnas (EMP), ruta de Embder Doudoroff (ED), ruta de Deley Doudoroff (DD), ruta isomerasa (RI), ruta L-arabinosa (RA) (Elaboración propia)……14

Figura 4. Ruta de síntesis de ácido galacturónico en *E. coli* (Richard y Hilditch, 2009)……..……15

Figura 5. Cromatogramas de los estándares usados. (Método de Tarczynski *et al*., 1992)…..20

Figura 6. Cromatogramas obtenidos por HPLC para cada cepa de microalga en contraste con los estándares. Arriba *C. sorokiniana* 2714, abajo *C. sorokiniana* 2805…….21

Figura 7. Modelos de preprocesamiento de datos para el cálculo de la eficiencia de reacción de PCR en tiempo real……26

Figura 8. Figura 8. Diseño experimental. Interacción mutualista sintética *Azospirillum-Chlorella*……...…28

Figura 9. Crecimiento *Azospirillum brasilense* Cd en distintos medios de cultivo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre tratamientos medidas por medio del ANOVA y la prueba post-hoc de Duncan (α=0.05)……..30

Figura 10. Expresión relativa con respecto al tratamiento control (SGM) de los genes *mdh* (a), *phaZ* (b) y *phbC* (c) en los distintos tratamientos en dos tiempos de crecimiento (12 y 24 horas)……..33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de cuantificación de carbohidratos en *Chlorella sp*. por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) y por cromatografía de alta eficiencia con detección por índice de refracción (HPLC-RI). (+) Detectado, (-) no detectado. *Reportados como fuentes de carbono para *Azospirillum brasilense*…….....10

Tabla 2. Tiempos de retención detectados por el método por medio de HPLC–IR y el método de Tarczynski *et al*., 1992…….……..22

Tabla 3. Primers para corrida de PCR en tiempo real……...…24

Tabla 4. Resultados de análisis de varianza con contrastes ortogonales para cada tiempo de crecimiento. Significancia p<0.05 (*) y p<0.01(**)……...29

Tabla 5. Eficiencia de la reacción calculada para los dos modelos de preprocesamiento de datos. Arriba: significancia de la regresión r^2, abajo: eficiencia de la reacción (%). Regresión no significativa (*)……..31

Tabla 6. Matriz de correlación de la expresión relativa de los genes a las 12 y 24 horas. Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Spearman y la significancia de la correlación *(p<0.05) y **(p<0.01)……..34

RESUMEN.

Son muchos los mecanismos que sostienen la interacción mutualista sintética entre la bacteria *Azospirillum brasilense* y la microalga *Chlorella sorokiniana*. Esta relación, ha sido estudiada como modelo para entender la relación de las PGPB (Bacterias promotoras de crecimiento vegetal, por sus siglas en inglés) con las plantas superiores y para potenciar aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. El metabolismo de polihidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* es importante durante su interacción con las plantas, el PHB proporciona a la bacteria capacidad de sobrevivir bajo condiciones de inanición y estrés, al servir como fuente de carbono y energía, favoreciendo su crecimiento, proliferación, la competencia con otros microorganismos y consecuentemente la interacción con las raíces de las plantas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos microalgas en el metabolismo de PHB y la interacción de este con el ciclo de Krebs. Para este fin, se evaluó el crecimiento de la bacteria y, la expresión de los genes que codifican para las enzimas poli-β-hidroxibutirato sintasa (*phbC*) y poli-β-hidroxibutirato depolimerasa (*phaZ*), involucradas en el metabolismo de PHB, y de la enzima malato deshidrogenasa (*mdh*), involucrada en el ciclo de Krebs, usando la técnica de PCR en tiempo real, a las 12 y 24 horas de crecimiento. Para establecer los tratamientos, se hizo una búsqueda previa de los carbohidratos presentes en los exudados de la microalga a las 72 horas de crecimiento por medio de HPLC-IR, obteniendo como resultado la detección de ácido galacturónico (0,1 $mg \cdot mL^{-1}$). A partir de esta información, se probaron 5 tratamientos que consistieron en: 1) la bacteria creciendo en un medio sintético de crecimiento (SGM) suplementado con los exudados de dos cepas de microalga; 2) en co-cultivo con dos cepas de microalga; 3) en SGM suplementado con ácido galacturónico a una concentración similar a la presente en los exudados analizados de las microalgas (0,1 $mg \cdot mL^{-1}$) y 4) en SGM sin suplementar (control). Como resultado se observó que la bacteria tuvo un mejor crecimiento en los tratamientos con la microalga o sus exudados, en comparación con el medio suplementado con ácido galacturónico y el medio sin suplementar. El crecimiento fue mejor en los exudados en comparación con los co-cultivos a las 24 horas de crecimiento y no hubo diferencias entre las cepas. El análisis de expresión relativa de los genes *phbC*, *phaZ* y *mdh* reveló que el metabolismo de PHB está activo durante la interacción con la microalga y que además está altamente relacionado con el ciclo de Krebs. Estos resultados demuestran que la síntesis y

catabolismo de PHB es importante para sostener el mutualismo sintético *Azospirillum brasilense-Chlorella sorokiniana*.

Palabras clave: Metabolismo PHB, *Azospirillum brasilense*, *Chlorella sorokiniana*, ciclo de Krebs, mutualismo sintético.

ABSTRACT.

There are many mechanisms supporting the mutual synthetic interaction between the bacterium *Azospirillum brasilense* and the microalgae *Chlorella sorokiniana*. This relationship has been studied as a model to understand the relationship between PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) and plants and to enhance biotechnological applications of microalgae. The metabolism of polyhydroxybutyrate (PHB) in *Azospirillum brasilense* is important during the interaction with plants, it was found that PHB provides the bacteria the ability to survive under conditions of starvation and stress by serving as the source of carbon and energy, promoting the growth, proliferation, the competition with other microorganisms and consequently the interaction with plant roots. The objective of the study was to evaluate the effect of the two microalgae on PHB metabolism and their interaction with the Krebs cycle. To this end, the growth of the bacteria and the expression of the genes encoding for the enzymes poly-β-hydroxybutyrate synthase (*phbC*), poly-β-hydroxybutyrate depolymerase (*phaZ*) both involved in the metabolism of PHB, and of the enzyme malate dehydrogenase (*mdh*) involved in the Krebs cycle, were evaluated using the real-time PCR technique, at 12 and 24 hours of growth. To establish the treatments, a presearch of the carbohydrates present in the exudates of the microalgae at 72 hours of growth was made by using the HPLC-IR technique, obtaining as a result the detection of galacturonic acid (0.1 $mg \cdot mL^{-1}$). Based on this information, five treatments were tested consisting of: 1) the bacteria growing in a synthetic growth medium (SGM) supplemented with the exudates of the two strains of microalgae; 2) in co-culture with the two strains of microalgae; 3) in SGM supplemented with galacturonic acid at a concentration similar to that present in the analyzed exudates of the microalgae (0.1 $mg \cdot mL^{-1}$) and 4) in the unsupplemented SGM medium (control). As a result, the bacteria had better growth in the treatments with the microalgae or the exudates, compared to the medium supplemented with galacturonic acid and the unsupplemented medium. The growth was better in the exudates compared to the co-cultures at 24 hours of growth and there were no differences between the strains. Analysis of the relative expression of the genes *phbC*, *phaZ* and *mdh* showed that PHB metabolism was active during interaction with microalgae and it is highly related to the Krebs cycle. These results show that the synthesis and catabolism of PHB is important to sustain the synthetic mutualism *Azospirillum brasilense-Chlorella sorokiniana*.

Key words: PHB metabolism, *Azospirillum brasilense*, *Chlorella sorokiniana*, Krebs cycle, synthethic mutualism.

1. INTRODUCCIÓN.

El modelo de mutualismo sintético *Azospirillum brasilense-Chlorella sorokiniana* ha sido estudiado con el fin de dilucidar los mecanismos que sostienen la interacción de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB, siglas en inglés) como *Azospirillum brasilense*, y las plantas superiores. El uso de microalgas en este modelo tiene como antecedentes estudios filogenéticos que demostraron que las plantas terrestres evolucionaron partir de microalgas clorófitas (Graham 1996, Leliaert *et al*., 2012), razón por la cual exhiben similitudes estructurales y fisiológicas con las células fotosintéticas de las plantas superiores (Sorensen *et al*., 2011). Además, el hecho de que tienen rápidas tasas de crecimiento incluso en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, y a que se pueden cultivar en condiciones de laboratorio o a nivel industrial ha conducido a que hayan sido estudiadas ampliamente. De igual manera, esta interacción ha sido útil para potenciar diferentes aplicaciones biotecnológicas de las microalgas, principalmente la producción de biocombustibles (Leyva *et al*., 2014) y el tratamiento terciario de aguas residuales (de-Bashan y Bashan 2010).

Tras comprobarse el efecto promotor de *Azospirillum brasilense* Cd en la microalga *Chlorella sorokiniana* durante el tratamiento terciario de aguas residuales (de-Bashan *et al*., 2002, 2004, 2008), varios estudios se han enfocado en comprobar la influencia de la bacteria en el crecimiento, el intercambio de metabolitos y fisiología de la microalga (Hernández *et al.*, 2006, Leyva *et al*., 2006, Choix *et al*., 2012a, Choix *et al*., 2012b, Choix *et al*., 2014, Meza *et al*., 2015, de-Bashan *et al*., 2016, Amavizca *et al*., 2017, Palacios *et al*., 2016 Palacios *et al*., 2019, Lopez *et al*., 2019). No obstante, el efecto de la microalga sobre varios procesos metabólicos de la bacteria permanece sin esclarecer. Entre uno de los mecanismos que sustentan la simbiosis tanto con las plantas como con *Chlorella sorokiniana* está la producción de fitohormonas por parte de la bacteria. Al estudiar el papel del ácido indolacético (AIA) en la interacción mutualista sintética con la microalga por medio de análisis de expresión relativa se demostró que el AIA producido por la bacteria tenía un efecto en la producción de triptófano y tiamina por parte de

la microalga y que estas vitaminas podían ser usadas nuevamente como precursores de la síntesis de AIA en *Azospirillum brasilense* (Palacios *et al*., 2016).

Otro proceso importante en la interacción *Azospirillum brasilense*-planta, es el metabolismo de poli-β-hidroxibutirato (PHB) en la bacteria (Muller-Santos *et al*., 2015). Se sabe que la acumulación y uso de PHB puede favorecer el establecimiento, proliferación, supervivencia y competencia principalmente en ambientes donde la energía y los nutrientes son limitados (Kadouri *et al*., 2003). Al igual que las raíces de las plantas, las microalgas exudan compuestos producto de sus procesos metabólicos, los cuales pueden cumplir un papel importante en los procesos simbióticos, estos compuestos son principalmente carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas, lípidos (Watanabe *et al*., 2006, Templeton *et al*., 2012), vitaminas, fitohormonas (Palacios *et al*., 2016), entre otros. Dentro de los compuestos reportados a la fecha producidos por la microalga, se conoce que la bacteria tiene la capacidad de metabolizar ácido galacturónico, arabinosa y galactosa (Myers y Hubbell 1987, Hartmman *et al*., 1994).

No obstante, no hay antecedentes del estudio del metabolismo de PHB de *Azospirillum brasilense* en interacción con *Chlorella sorokiniana*, así como también son limitados los estudios que expliquen qué tipo de compuestos exudados por *Chlorella sorokiniana*, pueden ser usados como fuente de carbono por *Azospirillum brasilense*, así como de qué manera se da su metabolismo y cuál es su relación con la síntesis y consumo de PHB. Para resolver parte de estas incógnitas el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de las dos microalgas en el metabolismo de síntesis y catabolismo de PHB y su relación con el ciclo de Krebs en la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.

2.1. *Azospirillum brasilense.*

Es una de las bacterias de importancia agrícola más estudiadas. Se le clasifica dentro del grupo de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés). Fue aislada de pastizales en Brasil (de ahí su nombre) en 1978 por Tarrand y colaboradores. Es de particular interés debido a que presenta múltiples mecanismos por medio de los cuales puede favorecer a las plantas. La hipótesis aditiva (Bashan y de-Bashan 2010) menciona que algunos de estos mecanismos pueden operar sinérgicamente generando un efecto positivo en las plantas. Estos mecanismos pueden variar dependiendo de la especie de planta, la cepa de la bacteria y las condiciones ambientales. Dentro de los principales mecanismos se encuentran la fijación de nitrógeno (Okon *et al*., 1983), la solubilización de fósforo, la mitigación de diferentes tipos de estrés ambiental, la producción de fitohormonas y otros compuestos, tales como auxinas (Fukami *et al*., 2017) citoquininas (Tien *et al*., 1979), giberelinas (Piccoli *et al*., 1996), etileno (Strzelczyk *et al*., 1994), ácido abcísico y ácido salicílico (Sahoo *et al*., 2014), entre otros. Estos mecanismos promueven el crecimiento vegetal y también ayudan al control directo e indirecto de fitopatógenos (Bashan y de-Bashan 2002), entre otros beneficios.

Azospirillum brasilense no tiene especificidad con las plantas por lo que puede tener efecto en diversas especies (Pereg *et al*., 2016) e inclusive puede interactuar con microalgas (de-Bashan *et al*., 2004). Se encuentra clasificada dentro de la subclase alfa de las proteobacterias y la familia Rhodospirillaceae (Brenner *et al*., 2005). Las características para su identificación son: forma de bacilo ligeramente curveado (1µm de ancho y 2-3 µm de longitud), el pleomorfismo y su movilidad en espiral mediada por un flagelo polar, células de tipo gram negativo (Bergey 1974) que pueden presentar cantidades elevadas de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta 50% del peso seco celular (Okon e Itzigsohn 1992). La cepa *A. brasilense* Cd cultivada en placas de medio mineral OAB (Okon *et al*., 1977) presenta colonias redondeadas, mucosas y con una pigmentación rosada, el paquete celular obtenido por centrifugación en caldo de cultivo BTB-1 (Bashan *et al*., 2011) tras 18 horas de incubación, es rosado.

2.2 *Chlorella sorokiniana.*

Por su importancia comercial, el género *Chlorella* es uno de los más cultivado y estudiado (Masojídek y Torzillo 2014), se encuentra clasificado dentro de la división *Chlorophyta* y la familia *Trebouxiophyceae* (Lizzul *et al*., 2018). Estas microalgas están distribuidas en distintos hábitats tales como aguas continentales, aguas marinas (Darienko *et al*., 2019), ambientes edáficos o como endosimbiontes (Bock *et al*., 2011) y crecen bien entre 15 y 40 °C. Son unicelulares o coloniales con un solo cloroplasto y un pirenoide (Bock *et al*., 2011), se reproducen asexualmente por mitosis por medio de autosporas y poseen altas cantidades de pigmentos fotosintéticos verdes (clorofila a y b). La forma de las células puede ser esférica u ovoide y presentan pared celular lisa (Lizzul *et al*., 2018). Las especies de *Chlorella* son cultivadas masivamente para la producción de biocombustibles (Safi *et al*., 2014), pigmentos (Ip *et al*., 2004), proteínas como suplemento alimenticio (Li *et al*., 2013), bioremediación (Lim *et al*., 2010), entre otras aplicaciones. Este género posee similitudes estructurales y metabólicas con las plantas superiores, razón por la cual, han sido ampliamente estudiadas como un modelo para estudiar el aparato fotosintético y la asimilación de carbono (Masojídek y Torzillo 2014).

Chlorella sorokiniana es una especie termotolerante de 2–4.5 µm de diámetro, tiene altas tasas de crecimiento en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas (Kim *et al*. 2013), también puede crecer en ambientes extremos como las aguas residuales (de-Bashan *et al*., 2004, Ramanna *et al*., 2014). Su crecimiento óptimo se da en 35–40°C (de-Bashan *et al*., 2008). La cepa *Chlorella sorokiniana* Beijerinck UTEX 2714 es nativa de aguas continentales y fue aislada de la planta de tratamiento de aguas residuales de Bogotá, Colombia, en 1994, desde entonces ha sido reportada en estudios de ciencia básica (Bashan *et al*., 2016), aplicaciones biotecnológicas y estudios ambientales y agrícolas (López *et al*., 2013). Aunque la mayoría de las cepas de *C. sorokiniana* son termotolerantes esta cepa tiene dificultad para crecer en temperaturas elevadas y crece óptimamente en condiciones autotróficas a 27 ± 2 °C bajo agitación y una intensidad lumínica de 60 µmol photon·m^{-2}·s^{-1} (Bashan *et al*., 2016). *Chlorella sorokiniana* Shihhara et Krauss UTEX 2805 fue aislada en 2003 de aguas residuales de la planta de tratamiento de la ciudad de La Paz, México, en un área con condiciones extremas de desierto, temperatura y radiación muy elevadas. Esta cepa es termotolerante y puede crecer en temperaturas de hasta 42°C y radiación de hasta 2500 µmol photon· m^{-2}·s^{-1} (de-Bashan *et al*.,

2008). Esta cepa ha sido estudiada principalmente para potenciar la producción de biomasa por medio de la fotosíntesis (Morita *et al*., 2000), la bioremediación de suelos áridos degradados inmovilizada con *Azospirillum brasilense* Cd (Trejo *et al*., 2012, López *et al*., 2013), entre otras aplicaciones.

2.3. Estudios de la interacción *Azospirillum brasilense- Chlorella sorokiniana*

Debido a que estos microorganismos no se encuentran interactuando de forma natural, la asociación se catalogó como modelo de mutualismo sintético (de-Bashan *et al*., 2011). Este modelo fue probado inicialmente para el tratamiento terciario residuales, donde se demostró el efecto positivo de la bacteria en la remoción de compuestos como amonio, nitrato y fósforo por parte de la microalga (de-Bashan *et al*., 2004).

La interacción ha sido estudiada usando principalmente un medio oligotrófico, llamado Medio Sintético de Crecimiento (Synthetic Growth Medium- SGM) sin fuente de carbono disponible, tanto en cultivos en suspensión como mediante la co-inmovilización de los dos microorganismos en esferas de alginato (González y Bashan 2000, de-Bashan y Bashan 2008). Se ha probado el efecto de la bacteria en el metabolismo de la microalga; por ejemplo, el efecto positivo sobre el ciclo del nitrógeno (Meza *et al*., 2015), en la producción total de carbohidratos y almidón bajo condiciones autotróficas (Choix *et al*., 2012a) y heterotróficas (Choix *et al*., 2012b), en la producción de ácidos grasos (Leyva *et al*., 2014), de lípidos, de pigmentos fotosintéticos (de-Bashan *et al*., 2002), vitaminas (Palacios *et al*., 2016), en el transporte de carbono y nitrógeno (de-Bashan *et al*., 2016); también se ha estudiado el efecto positivo de compuestos volátiles producidos por la bacteria (Amavizca *et al*., 2017), la respuesta de la interacción bajo diferentes condiciones de crecimiento (Palacios *et al*., 2019) y el efecto de vitaminas producidas en *Azospirillum* sobre el crecimiento y metabolismo de la microalga (Lopez *et al*., 2019), entre otros.

Un primer acercamiento al metabolismo de *Azospirillum brasilense* Cd durante la interacción con *C. sorokiniana* fue descrito por Palacios y colaboradores (2016) quienes evaluaron el efecto la tiamina y el triptófano, compuestos exudados por *C. sorokiniana*, en la producción de ácido indol-3-acético (AIA) de *Azospirillum brasilense* Cd por medio de PCR en tiempo real, a través de la expresión del gen *ipdC* y la actividad de la enzima triptófano sintasa. En este estudio, se

concluyó que el triptófano y la tiamina liberados por *C. sorokiniana* son moléculas que *A. brasilense* puede utilizar con precursores para sintetizar AIA, el cual que a su vez promueve el crecimiento de la microalga (fig. 1).

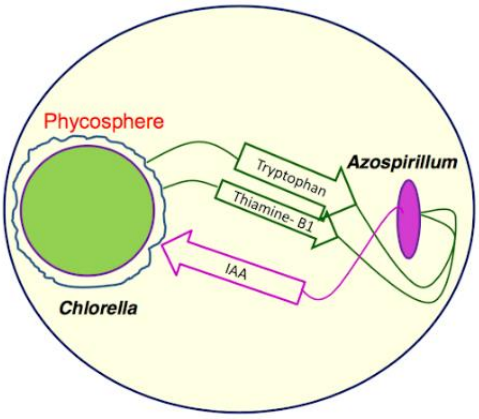


Figura 1. Efecto de la producción ácido indol-3-acético durante la interacción *Azospirillum-Chlorella.* (Tomado de http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/iprojects.html).

Si bien ya existe información útil sobre esta interacción, se requieren aún más estudios que muestren el efecto de la microalga sobre la fisiología de la bacteria y viceversa, para lo cual los estudios de expresión relativa mediante PCR en tiempo real pueden aportar a el entendimiento del papel de ciertas enzimas en los procesos metabólicos que ocurren durante la interacción.

2.4. Fuentes de carbono exudadas por *Chlorella* spp.

Los carbohidratos pueden constituir una gran fracción del peso seco en las microalgas. Estos son sintetizados y almacenados a través de la fotosíntesis y otras rutas metabólicas en forma de polisacáridos como almidón (Choix *et al*., 2012b) u otros monosacáridos. La composición de los carbohidratos exudados puede variar en función de la especie y de la cepa de microalga (Takeda 1988) y pueden indicar el tipo de microorganismo con el que interactuan en un ambiente especifico y también cómo se da la interacción (Kamilova *et al*., 2006).

Templeton y colaboradores (2012) estudiaron la composición de carbohidratos exudados por *Chlorella vulgaris* y encontraron en mayor proporción galactosa (27.8%) y glucosa (23.4%), seguido de ácido galacturónico (10.2%), manosa (9.7%), ramnosa (9.2%), ácido glucurónico (5.3%), arabinosa (3.4%) junto a otros monosacáridos como xilosa, ribosa, ficosa y

glucosamina. Estos resultados contrastan con la composición de azucares en *Chlorella sorokiniana* descrita por primera vez por Watanabe y colaboradores (2006a), donde la sacarosa fue el carbohidrato más abundante, seguido del ácido galacturónico y los azucares de alcohol xilitol y inositol. En este último estudio también se detectaron galactosa, arabinosa, fructosa, ramnosa y manosa en menor proporción. Una síntesis de estos estudios puede verse en la Tabla 1. De las fuentes antes mencionadas se ha reportado que *Azospirillum* tiene la capacidad de metabolizar arabinosa (Novick y Tyler, 1982, Watanabe *et al*., 2006b), ácido galacturónico (Hartmann *et al*., 1994), galactosa (Hartmann *et al*., 1994) y fructosa (Goebel y Krieg 1984).

Tabla 1. Estudios de cuantificación de carbohidratos en *Chlorella sp*. por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) y por cromatografía de alta eficiencia con detección por índice de refracción (HPLC-RI). (+) Detectado, (-) no detectado. *Reportados como fuentes de carbono para *Azospirillum brasilense*.

Instrumento/método de detección	HPAEC-PAD	HPAEC-PAD	HPLC-RI
Cepa	*Chlorella sorokiniana*	*Chlorella vulgaris*	*Chlorella vulgaris*
Sacarosa	+	-	-
Ácido galacturónico*	+	+	-
Xilitol/xilosa	+	+	+
Glucosa	-	+	+
Inositol	+	-	-
Ribosa	+	+	-
Manosa	+	+	+
Galactosa*	+	+	+
Arabinosa*	+	+	+
Ramnosa	+	+	-
Fructosa*	+	-	-
Fucosa	-	+	-

Referencia	Watanabe *et al*., (2006a)	Templeton *et al*., (2012)	Templeton *et al*., (2012)

2.5. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* Cd en distintas fuentes de carbono.

Azospirilllum brasilense tiene la capacidad de usar un amplio número de fuentes de carbono como sustrato de crecimiento. Puede consumir azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y polímeros como xilano, almidón, celulosa y carboximetil celulosa para crecer (Hartmman *et al*., 1994). Al estudiar el crecimiento de la cepa Sp7 en distintas fuentes de carbono, se demostró que la bacteria tiene la capacidad de crecer usando algunos componentes monómericos de los polisacáridos que componen la pared celular de las raíces de las plantas (Myers y Hubbell, 1987).

De la misma manera, *Azospirillum brasilense* tiene la capacidad de producir, almacenar y consumir polihidroxibutirato (PHB) (Muller-Santos *et al*., 2015), compuesto que también es usado por la bacteria como fuente de carbono, cuando se dan ciertas condiciones.

2.5.1. Metabolismo de β-polihidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense.*

El poli D (-) 3-hidroxibutirato (PHB) es un poliéster alifático producido por algunos microorganismos. Sirve como un producto de almacenamiento de energía y como fuente de carbono. El PHB es relativamente abundante en el medio ambiente y se puede encontrar en bacterias del suelo, en la microflora estuarina y algas verdiazules, entre otros organismos (Barham *et al*., 1984).

Este compuesto es producido y acumulado como polímero de reserva bajo condiciones de inanición (Steinbüchel y Hein, 2001), cuando hay exceso de nutrientes, una baja concentración de oxígeno o una alta relación carbono/nitrógeno (Tal y Okon 1985, Muller-Santos *et al*., 2015). El PHB es almacenado en forman de gránulos intracelulares con una cubierta proteica (fig. 2). La cepa *Azospirillum brasilense* Cd puede acumular PHB en hasta un 75% de su peso seco (Tal y Okon 1985). Se sabe que el metabolismo de PHB favorece el establecimiento y supervivencia

de *Azospirillum brasilense* en ambientes competitivos como la rizosfera y también potencia la viabilidad celular en inoculantes comerciales (Kadouri *et al*., 2003, Santos *et al*., 2017)

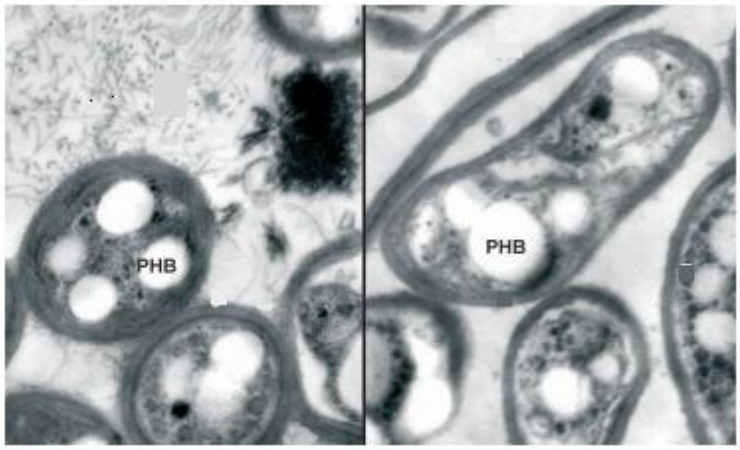


Figura 2. Gránulos intracelulares de polihidroxibutirato en *Azospirillum brasilense*. Modificado de Caiola *et al*., 2004.

La síntesis de PHB fue inicialmente descrito para *Alcaligenes eutrophus* donde se describieron seis enzimas que catalizan el metabolismo de PHB (Slater *et al*., 1988). Paralelamente, se describieron las enzimas encargadas de su metabolismo en *Azospirillum brasilense* (Tal y Okon 1985, Tal *et al*., 1990a, Tal *et al*., 1990b). De manera general, el metabolismo se da de la siguiente manera: el PHB es sintetizado cuando hay un exceso de acetil-CoA, molécula que es a su vez precursora del ciclo Krebs. Bajo estas condiciones, dos moléculas de acetil-CoA son convertidas a acetoacetil-CoA a través de una reacción de condensación de Claisen catalizada por la enzima β-cetolasa (*phbA*). Posteriormente, el acetoacetil se reduce a D(-)-3-hidroxibutiril-CoA con catálisis de la enzima acetoacetil-CoA reductasa (*phbB*). Finalmente, este compuesto es polimerizado en una reacción catalizada por la enzima PHB sintasa (*phbC*) para formar el poli-β-hidroxibutirato. Cuando la bacteria enfrenta una condición desfavorable, el PHB sintetizado puede reconvertirse en acetil- CoA y NAD(P)H. La primera enzima que participa en este proceso es la PHB depolimerasa (*phaZ*) catalizando el proceso de degradación del PHB a unidades monoméricas de D(-)-3-hidroxibutirato, luego este se oxida a acetoacetato por la enzima β-polihidroxibutirato deshidrogenasa (BOHB-DH) con la consecuente reducción de NADH. A continuación, la acetoacetato-succinato-CoA transferasa cataliza la transferencia de CoA del succinil-CoA hacia el acetoacetato para obtener acetoacetil-CoA. Por último, si la

bacteria lo requiere, el acetoacil-CoA es convertido a acetil-CoA a través de una escisión tioclástica catalizada la β-cetolasa, produciéndose dos moléculas de este último, compuesto que puede ser usado para sostener el crecimiento vía ciclo de Krebs.

2.5.2. Metabolismo de carbohidratos en *Azospirillum brasilense.*

Dependiendo de su estructura química, los carbohidratos son inicialmente metabolizados a través de varias rutas, por ejemplo, la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para el metabolismo de fructosa y glicerol, la ruta de Entner-Doudoroff (ED) para el metabolismo de gluconato, la ruta de DeLey Doudoroff (DD) para el metabolismo de galactosa y otras rutas alternativas para el metabolismo de arabinosa (ruta de L-arabinosa) y de ácido galacturónico (ruta isomerasa). Estas rutas requieren una serie de pasos que demandan energía para producir precursores de otras rutas, tales como el piruvato el cual se oxida para formar acetil-CoA, el principal precursor ciclo de Krebs. En consecuencia, si bien *Azospirillum* tienen la capacidad de metabolizar distintos carbohidratos, se ha comprobado que su crecimiento se da mejor cuando usa ácidos orgánicos como fuente de carbono, ya que estos no requieren rutas previas de síntesis y pueden entrar directamente a el ciclo de Krebs y otras rutas. Se ha comprobado un buen crecimiento y un aumento en la capacidad para fijar nitrógeno (Novik y Tyler 1982) cuando la bacteria crece en ácidos orgánicos como succinato, piruvato (Papen y Werner, 1982), malato (Cassan *et al.*, 2008), fumarato y lactato (Hartmann *et al*., 1994). Por otro lado, se ha verificado la dificultad para crecer en otros carbohidratos debido a que no posee las enzimas para degradar glucosa (Tarrand *et al*., 1978), así también crece con dificultad en ribosa, manosa, sorbosa (Martinez-Drets *et al.*, 1984) y en algunos disacáridos como la sacarosa (Sahoo *et al*., 2014). Sin embargo, es capaz de metabolizar gluconato (Westby *et al*., 1983), fructosa (Goebel y Krieg 1984, Mukherjee y Ghosh 1987, Brenholtz *et al*., 2017), galactosa (Van Dommelen *et al*., 1997, Van Bastelaere *et al*., 1999), arabinosa (Novick y Tyler 1982, Watanabe *et al*. ,2006b) y ácido galacturónico (Hartmann *et al*., 1994), entre otros carbohidratos.

Parte del metabolismo de fuentes de carbono se da a través del ciclo de Krebs, cuya función es la producción de energía en forma de poder reductor (NADH y FADH) y precursores metabólicos. Wetbsy y colaboradores (1983) describieron todas las enzimas implicadas en ciclo de Krebs presentes en *Azospirillum brasilense*. Una de estas, la enzima malato deshidrogenasa

(*mdh*) cataliza la oxidación (NAD(P)$^+$/NAD(P)H dependiente) de malato a oxaloacetato. La expresión del gen que codifica para esta enzima fue comprobada en *Azospirillum brasilense* creciendo en malato como fuente de carbono (Carrasco-Espinoza *et al*., 2015), su actividad puede sugerir un ciclo de Krebs activo.

La posible relación del ciclo de PHB con el ciclo de Krebs se puede observar en la figura 3. La enzima β-cetolasa es clave debido a que esta se encarga de dos reacciones: 1- bajo condiciones de estrés la bacteria puede convertir a los PHB almacenados en acetil-CoA a través de una escisión tioclástica del acetoacil-CoA y 2- cuando hay exceso de nutrientes disponibles para la bacteria el acetil-CoA producido en exceso se convierte en acetoacetil-CoA a través de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA mediada por la misma enzima.

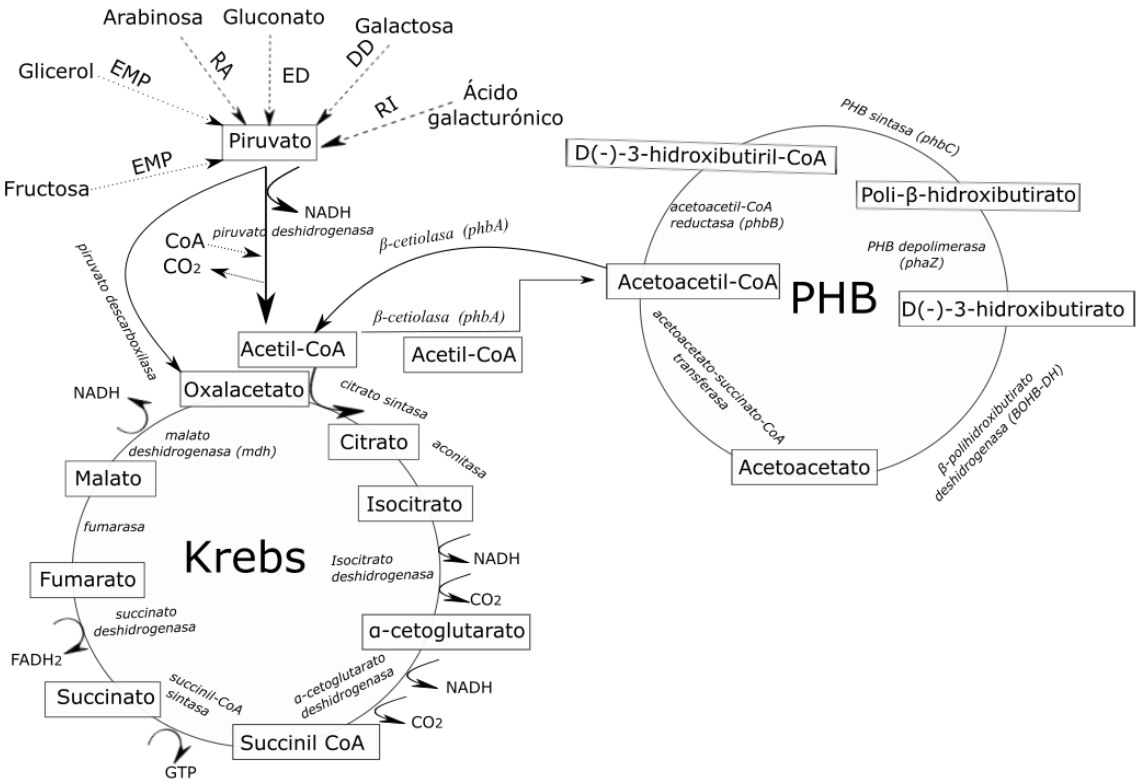


Figura 3. Metabolismo de carbohidratos y polihidroxibutirato en *Azospirillum brasilense*. Ruta de Embder Meyenorf Parnas (EMP), ruta de Embder Doudoroff (ED), ruta de Deley Doudoroff (DD), ruta isomerasa (RI), ruta L-arabinosa (RA) (Elaboración propia).

2.5.3. Metabolismo de ácido galacturónico en *Azospirillum*.

Las pectinas son polímeros naturales que se encuentran en la pared celular de las células vegetales. Uno de los componentes principales de las pectinas son los monómeros de ácido D-galacturónico. El ácido galacturónico es un residuo de azúcar principal de los polisacáridos pépticos de plantas (Mohnen 2002). El metabolismo de esta fuente no ha sido evaluado a profundidad en *Azospirillum brasilense*; sin embargo, se ha descrito que la cepa Sp245 posee las 5 enzimas de la ruta ‘‘isomerasa’’, previamente reportada para *E. coli*. En esta vía se produce piruvato y D-gliceraldehido-3P (fig. 4). El ácido galacturónico es uno de los compuestos más comunes en la pared celular de las plantas y puede ser una fuente importante para la interacción *Azospirillum* con las raíces de las plantas.

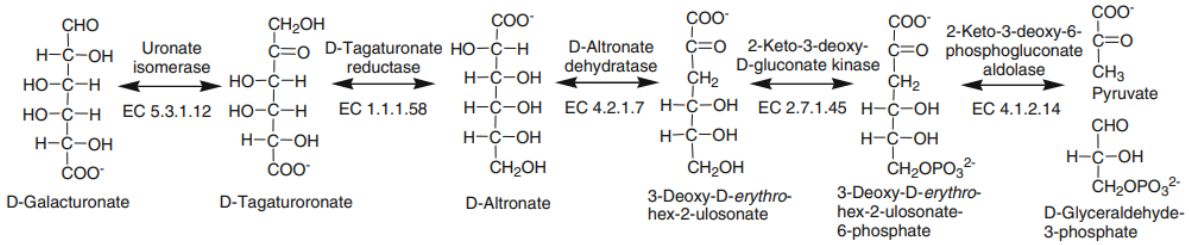


Figura 4. Ruta de síntesis de ácido galacturónico en *E.coli* (Richard y Hilditch, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN.

El modelo de interacción *Azospirillum-Chlorella* ha sido útil para el entendimiento de la relación que establecen las bacterias con las plantas superiores. En la actualidad, a pesar de que se ha avanzado considerablemente en el entendimiento de esta relación y se ha evaluado el intercambio de algunos metabolitos entre las dos especies, las investigaciones continúan con el fin de entender todos los factores que sostienen la interacción. Un mecanismo que ha sido estudiado en *Azospirillum* con relación a las plantas superiores, es el metabolismo de poli-β-hidroxibutirato, el cual se sabe cumple un papel importante en la interacción con las plantas superiores favoreciendo la supervivencia y competencia de la bacteria en la rizosfera, aún bajo condiciones de estrés. Por esta razón, este trabajo pretende aportar conocimiento para entender el papel del PHB y su relación con el ciclo de Krebs durante la interacción con la microalga, ya que la síntesis y uso de este compuesto podría ser fundamental para sostener la relación mutualista sintética entre los dos microorganismos.

4. PREGUNTA DE LA INVESTIGACION:

¿Cuál es el efecto de dos cepas de *Chlorella sorokiniana* en el metabolismo de síntesis y catabolismo de PHB y su interacción con el ciclo de Krebs en la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd?

5. HIPOTESIS:

El metabolismo de PHB en *Azospirillum brasilense* Cd es un proceso importante para sostener la interacción con las dos cepas *Chlorella sorokiniana*. Las fuentes de carbono exudadas por la microalga favorecerán la síntesis y catabolismo de PHB, rutas que están relacionadas con el metabolismo de carbohidratos a través del ciclo de Krebs.

6. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Evaluar el efecto de dos cepas *Chlorella sorokiniana* en el metabolismo de PHB en la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd.

Objetivos específicos:

1-Caracterizar los exudados de dos cepas de *Chlorella sorokiniana* por medio de HPLC para obtener un perfil de carbohidratos presentes.

2-Analizar el crecimiento de *Azospirillum brasilense* en interacción con *Chlorella sorokiniana* bajo diferentes condiciones de crecimiento.

3-Comparar dos modelos de pre-procesamiento de datos para el análisis de la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real.

4-Analizar la expresión relativa de dos genes involucrados en el metabolismo de PHB (*phbC* y *phaZ*) y el ciclo de krebs (*mdh*) en *Azospirillum brasilense* Cd durante la interacción con *Chlorella sorokiniana*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Microrganismos y condiciones de cultivo

Las dos cepas de la microalga *Chlorella sorokiniana* fueron obtenidas de la colección de algas de la Universidad de Texas (UTEX 2714, UTEX 2805, University of Texas, Austin, TX). Las microalgas se cultivaron en medio mineral (C30) bajo condiciones autotróficas a 27±2 °C a 125 rpm con una intensidad de luz de 60 µmol fotones m^{-2} s^{-1} durante 7 días. La composición del medio fue (en $g.L^{-1}$): KNO_3 (25), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10), KH_2PO_4 (4), K_2HPO_4 (1), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) y (en $\mu g.L^{-1}$) H_3BO_3 (2.86), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1.81), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.11), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.09), y $NaMoO_4$ (0.021).

La bacteria *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843; Leibniz-Institut DMSZ, Braunschweig, Germany) se reactivó en medio BTB-2 (Bashan *et al*., 2011) él cuál se compone de (en g L^{-1}): NaCl (1.2), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.25), K_2HPO_4 (0.13), $CaCl_2$ (0.22), K_2SO_4 (0.17), NH_4Cl (1), Na_2SO_4 (2.4), $NaHCO_3$ (0.5), Na_2CO_3 (0.09), Fe-EDTA (0.07), triptona (5), extracto de levadura (5) y gluconato de sodio (5) . El pH se ajustó a 7 con KOH, y la bacteria se incubó a 30 °C y 120 rpm durante 18 h.

7.2. Caracterización de carbohidratos en exudados de *Chlorella sorokiniana* por Cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC)

Después de cultivar las dos cepas de microalga por 7 días en medio C30, 10 mL de cada cultivo se transfirieron a tres matraces de 250 mL con 90 mL de medio residual sintético (SGM) el cual contenía (mg. L^{-1}) NaCl (7), $CaCl_2$ (4), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2), K_2HPO_4 (217), KH_2PO_4 (8.5), Na_2HPO_4 (33.4) y NH_4Cl (191) donde se dejaron incubando durante 72 horas a 27±2 °C, 125 rpm y una intensidad de luz de 60 µmol fotones m^{-2} s^{-1}. Pasado este tiempo, los cultivos se filtraron en un matraz kitasato con una bomba de vacío a 80psi y un filtro de porosidad 0.22µm y diámetro de 47mm (Whatman®). Posteriormente, los exudados se transfirieron a frascos de vidrio, previamente lavados y descontaminados con etanol y acetona, se congelaron a -80°C durante 24 horas y se liofilizaron para su posterior análisis. Para la detección, las muestras fueron re suspendidas en agua grado HPLC y se inyectaron en el equipo de HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, USA). Se usaron 7 estándares previamente seleccionados por bibliografía (Watanabe *et al*., 2006, Templeton *et al*., 2012): glucosa, fructosa, acido málico,

ácido galacturónico, galactosa, arabinosa y ácido láctico (Sigma®). El HPLC se equipó con una columna de fase reversa Aminex® HPX-87C (Bio-rad) y las muestras se evaluaron de acuerdo con el método descrito por Tarczynski *et al*., (1992) de la siguiente manera: tiempo de cada corrida 20 minutos, detección por índice de refracción, condición isocrática, fase móvil agua grado HPLC, inyección de 20µL, temperatura de columna de 85ºC, flujo de 0.6ml/min y presión de 279psi (20kg/cm^3). Los cromatogramas resultantes se analizaron por medio del software Agilent ChemStation (fig. 5).

Este análisis se llevó a cabo antes de establecer los tratamientos. De acuerdo con los estándares usados, se detectó un solo pico que correspondía al tiempo de retención mostrado por el estándar de ácido galacturónico (fig. 6, tabla 2). No se observaron diferencias en la composición de los exudados de las dos cepas, pues las dos presentaron el mismo pico en concentración similar. La concentración de ácido galacturónico detectada fue de 0.1mg mL. Teniendo en cuenta este resultado, se planteó añadir el tratamiento SGM + ácido galacturónico.

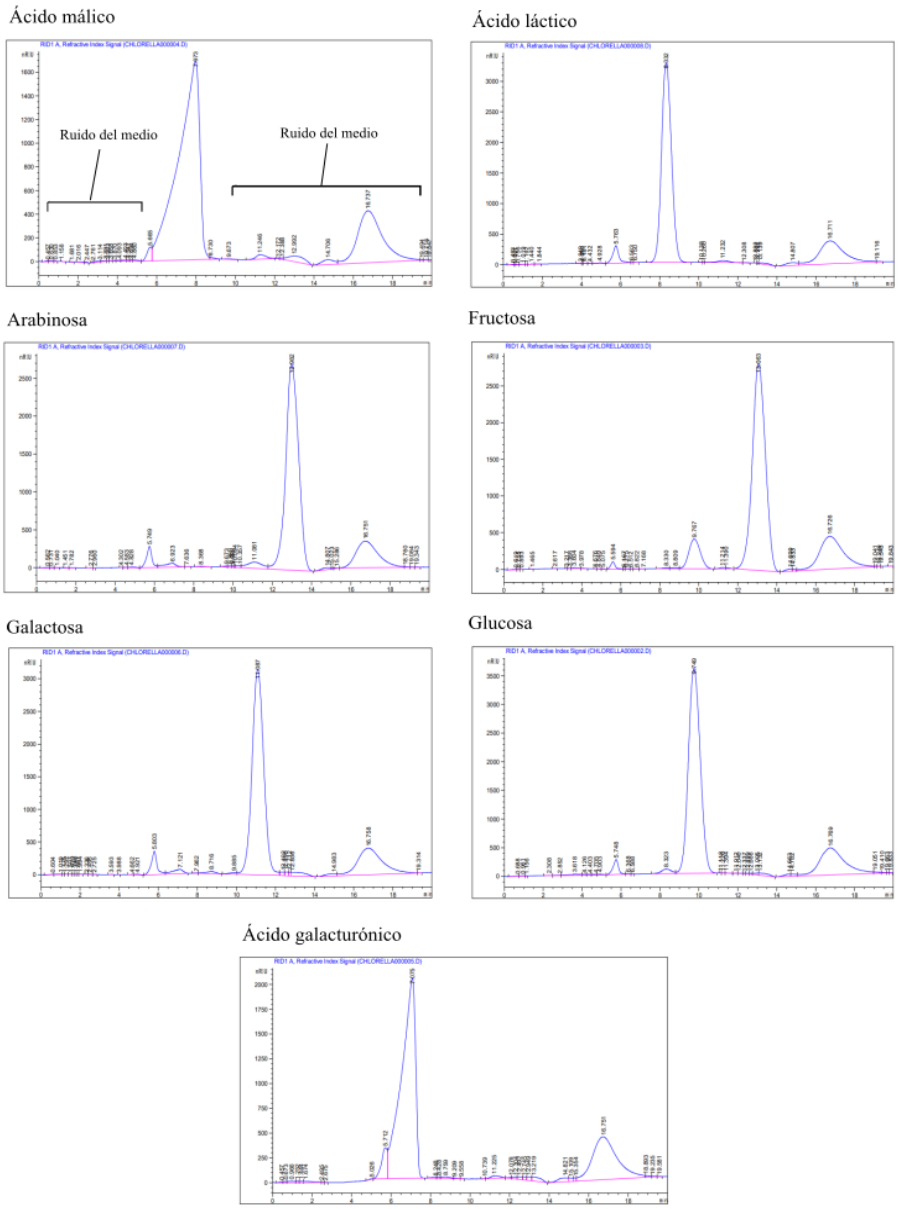
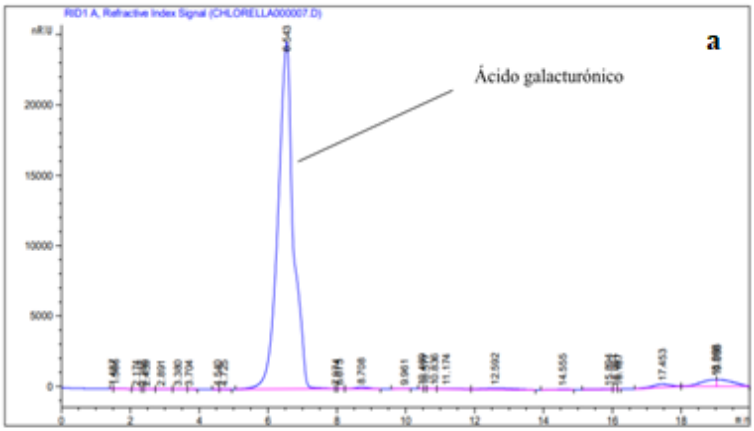


Figura 5. Cromatogramas de los estándares usados. (Método de Tarczynski *et al*., 1992).

Chlorella sorokiniana 2714



Chlorella sorokiniana 2805

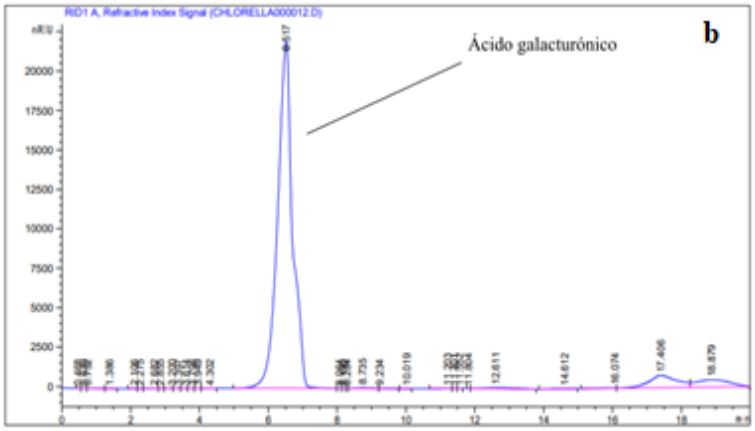


Figura 6. Cromatogramas obtenidos por HPLC para cada cepa de microalga en contraste con los estándares. *C. sorokiniana* 2714 (a), *C. sorokiniana* 2805 (b).

Tabla 2. Tiempos de retención detectados por el método por medio de HPLC–IR y el método de Tarczynski *et al*., 1992. No detectado (ND).

Estándares	Tiempo de retención (minutos)		
	Sin muestra	*C. sorokiniana* 2714	*C. sorokiniana* 2805
Ácido galacturónico	6.77	6.54	6.51
Ácido málico	7.97	ND	ND
Ácido láctico	8.33	ND	ND
Arabinosa	12.98	ND	ND
Galactosa	11.08	ND	ND
Fructosa	13.06	ND	ND
Glucosa	9.75	ND	ND

7.3. Interacción *Azospirillum-Chlorella* en cultivo en suspensión. Condiciones experimentales

Azospirillum brasilense Cd se reactivó en matraces de 125 mL con 50 mL de medio BTB-2 líquido y se dejó creciendo durante 18 horas a 120rpm y 30°C; posteriormente el cultivo se centrifugó a 6000 ^{x} g por 6 minutos y se realizaron dos lavados con solución salina 0,85% (P/V). El cultivo lavado se ajustó a una densidad óptica de 1 a 540nm (~$1^{x}10^{9}$ UFC·mL^{-1}) (Bashan *et al*., 2011). La bacteria se inoculó en matraces de 250 mL, teniendo como base el medio sintético de crecimiento (SGM), de la siguiente manera: Control (10 mL bacteria: 90 mL SGM), 1- exudados de *C. sorokiniana* 2714 (10 mL bacteria: 90 mL exudados), 2- exudados *C. sorokiniana* 2805 (10 mL bacteria: 90 mL exudados), 3- co-cultivo *C. sorokiniana* 2714 (10 mL bacteria: 10 mL microalga: 80 mL SGM), 4- co-cultivo *C. sorokiniana* 2805 (10 mL bacteria: 10 mL microalga: 80 mL SGM) y 5- SGM + ácido galacturónico (10 mL bacteria: 90 mL SGM + ácido galacturónico). Los exudados de las microalgas se tomaron después de 72 horas de crecimiento usando el método mencionado anteriormente y los cultivos fueron tomados después de su cultivo en medio C30 por 7 días. Los tratamientos se dejaron incubando durante 24h a 27±2 °C, 125 rpm y una intensidad de luz de 60 µmol fotones m^{-2} s^{-1}. Los conteos poblaciones se realizaron en las horas 0, 6, 12, 18 y 24 de incubación, y se tomaron muestras para análisis de expresión de genes en las horas 0, 12 y 24 de incubación.

7.4. Conteos poblaciones de *Azospirillum* bajo los tratamientos evaluados.

Los conteos se hicieron siguiendo el método de diacetato de fluoresceína (FDA) modificado (Chrzanowski *et al*., 1984). Se realizaron diluciones seriadas 1:10, y muestras de 1 ml se centrifugaron a 10500 ^{x} g durante 2 minutos, el botón celular se resuspendió en 250 µL de la solución de trabajo compuesta de diacetato de fluoresceína (20mg de FDA en 10ml de acetona a 4ºC) y buffer de fosfatos (KH_2PO_4 y K_2HPO_4) en relación 1:10 FDA/Buffer de fosfatos. La solución se mezcló con ayuda de un vórtex y se dejó reposar durante 2 minutos. Pasado esto, la mezcla se centrifugó a 10500 ^{x} g por 2 minutos, se decantó la solución de trabajo y el botón celular se resuspendió en 500 µL de buffer de fosfato. La solución se mezcló con el vórtex y se tomaron muestras de 20µL para agregarlas a un portaobjetos, el cual se cubrió con un cubreobjetos para realizar el conteo en el microscopio óptico de fluorescencia (OLYMPUSBX41) a magnificación de 100x con aceite de inmersión para fluorescencia. La fluorescencia se detectó en filtro verde (FITC), un rango de excitación de luz de 460nm-490nm y un máximo de emisión de luz 520IF. La cuantificación de las células (células·mL^{-1}) se realizó registrando el promedio del conteo de células fluorescentes en 10 campos multiplicado por la constante: 12733.39 y el factor de dilución.

7.5. Análisis de expresión de genes por medio de PCR en tiempo real.

7.5.1. Diseño de primers:

Se evaluaron los genes que codifican para las enzimas malato deshidrogenasa (*mdh*), polihidroxibutirato sintasa (*phbC*) y polihidroxibutirato depolimerasa (*phaZ*), como gen de referencia se utilizó el gen *recA*, previamente validado como normalizador para el análisis de expresión relativa en *Azospirillum brasilense* (Pereg *et al*., 2016). Dado que el genoma de la cepa *A. brasilense* Cd no se ha descrito en su totalidad, algunos primers se diseñaron (por medio del software libre "Primer3") usando las secuencias disponibles dentro de los genomas de dos especies cercanamente relacionadas, *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp7 y otros fueron retomados de trabajos previamente publicados (Tabla 3).

Para este estudio se diseñaron los primers para los genes *phbC* y *phaZ* usando la herramienta en línea https://www.idtDNA.com/Primerquest/Home/Index, tomando como referencia las

siguientes condiciones reportadas para *Azospirillum brasilense* (Pereg *et al*., 2016): 18-25 bases, temperatura melting primer: 58-60°C, Tm entre uno y otro: 4C, proporción GC entre 40-60%.

Tabla 3. Primers para corrida de PCR en tiempo real

Gen	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')	Referencia
mdh	AGATGGCCGAGTCCTACCTG	GATCTTCTCGACGCCACCG	Carrasco-Espinoza *et al*., 2015
phbC	AGCTTCTACCTGCGCAACAT	AAGAAGGACGGGGTCTTCAC	Este estudio
phaZ	GGTTATGACGAAAGCCGTGT	GAACCAGAGGCAAAATGCTC	Este estudio
recA	GTCGAACTGCCTGGTGAT	GACGGAGGCGTAGAACTT	Pereg *et al*., 2016

7.5.2. Análisis de expresión relativa:

A las 0, 12 y 24 horas de incubación se tomaron 10 mL de cultivo de cada matraz y se centrifugaron en tubos de rosca de 50 mL a 5000 ^{x} g por 10 min; posteriormente se extrajo el ARN ribosomal de las muestras de acuerdo con las indicaciones del método de Trizol® (Thermo Fisher, USA). El ARN se visualizó en un fotodocumentador en un gel de agarosa 1,2% (100 V, 60min), usando como referencia una escalera de peso molecular 100bp (ADN ladder, Invitrogen, Life technologies, USA), adicionando 2 µL de muestra y 2 µL de SYBR GOLD (Anexo 2). El ARN se cuantifico usando un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher, USA) (Anexo 2). La síntesis de cADN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del Kit Promega®. Luego al cADN se le aplico el kit TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli ARNseH Plus): volumen total (20µL): cebador derecho (10µM) 0.8 µL, cebador izquierdo (10 µM) 0.8 µL, tinte de referencia ROX (50x) 0.08 µL, templado (50ng.reacción^{-1}) 2 µL, agua purificada estéril (6.32 µL). El experimento de PCR se realizó por triplicado usando controles sin templado para cada primer y el gen referencia *recA* (Pereg *et al*., 2016) bajo las siguientes condiciones (Palacios *et al*., 2016): equipo Applied Biosystems 7500 software 7500 FAST (Applied Biosystems, USA): 95°C por 1 min; 95°C por 10 s; 58°C por 15 s; 72°C por 20 s (40 ciclos); 72°C por 5 min. Para determinar la expresión relativa se usó como como control la bacteria creciendo medio SGM. La expresión relativa se calculó mediante el método de 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ (ecuaciones 1-4) (Livak y Schmittgen 2001).

Ecuación 1. $\Delta CT_1 = CT_{(genT)} - CT_{(genrefT)}$

Ecuación 2. $\Delta CT_2 = CT_{(genC)} - CT_{(genrefC)}$

Ecuación 3. $\Delta\Delta CT = \Delta CT_1 - \Delta CT_2$

Ecuación 4. Expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta CT}$

Dónde:

-$CT_{(genT)}$ = Ciclo umbral gen 1 o gen 2 o gen 3 en el tratamiento n1…n5
-$CT_{(genrefT)}$ = Ciclo umbral gen de referencia en el tratamiento n1…n5
-$CT_{(genC)}$ = Ciclo umbral gen 1 o gen 2 o gen 3 en el tratamiento control SGM
-$CT_{(genrefC)}$ = Ciclo umbral gen de referencia en el tratamiento control SGM.

7.5.3. Comparación de modelos para determinar la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real.

El método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ asume que la eficiencia de la reacción del gen de referencia es igual a la eficiencia del gen de interés (Livak y Schmittgen 2001), mismas que además deben ser mayores al 90%. Se verificó esta premisa y además se compararon dos modelos de preprocesamiento de datos de acuerdo con el método propuesto por Chen y Huang (2015). Para estimar la eficiencia de la reacción se debe graficar el log de la concentración del ADN contra el ciclo. El primer modelo ‘‘Background’’ ajusta los datos tomando cada uno y restándole el promedio de los tres primeros valores de la concentración de ADN (fluorescencia basal). El segundo modelo ‘‘Taking difference’’ tomando cada dato y le resta el valor del ciclo inmediatamente anterior. (fig. 7).

Para determinar la eficiencia de la reacción de la PCR en tiempo real se debe graficar el valor del log de la concentración del ADN contra su respectivo ciclo de reacción. Los dos modelos hacen un ajuste previo a generar la ecuación de la gráfica, el primero donde a cada dato del log de la concentración de ADN (log [ADN]) se le restó el valor de la fluorescencia basal (valor promedio de los tres primeros ciclos) y el segundo en el cual se restó el valor del log [ADN] del ciclo (CT+1) menos el valor del ciclo anterior (CT). Posteriormente, se determinó la pendiente de la recta al graficar el log [ADN] contra el ciclo de reacción tomando 7 puntos a partir del valor del CT obtenido en la PCR en tiempo real. Luego, el valor de la pendiente (m) obtenida

se usó como exponente en base diez: 10^m. Finalmente a el valor obtenido se le resto 1 y se multiplico por 100 para obtener la eficiencia de la reacción. Los criterios para la comparación de los modelos fueron: la significancia de la regresión, la eficiencia de la reacción y el coeficiente r^2.

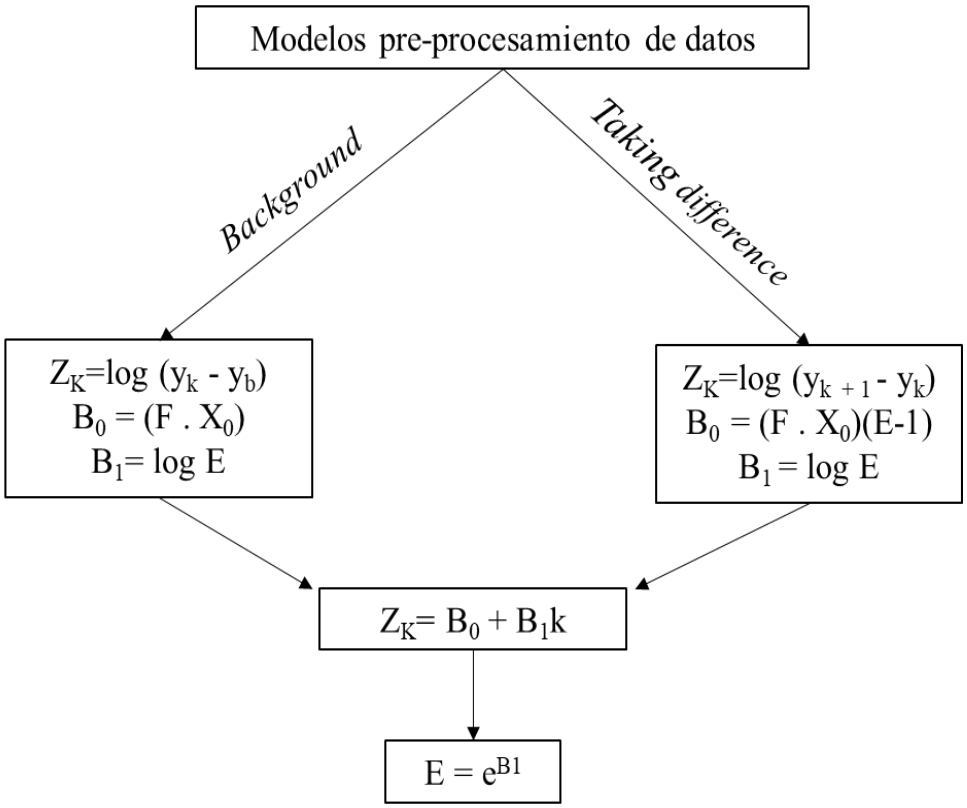


Figura 7. Modelos de preprocesamiento de datos para el cálculo de la eficiencia de reacción de PCR en tiempo real.

Donde:

Y_k = Intensidad de la fluorescencia en el ciclo K_1….K_{40}

Y_B = Intensidad de la fluorescencia basal (background)

Y_{k+1} –Y_k= Intensidad de la fluorescencia tomando la diferencia (taking the difference)

Z_k= Estimación de la fluorescencia para cada modelo.

F= Factor de conversión entre el número de moléculas target y la intensidad de la fluorescencia

B_0= Coeficiente de regresión (background ó taking the difference)

B_1= Pendiente de la recta (background ó taking the difference)

X_o= Cantidad inicial de ADN

E=Eficiencia de la reacción

7.6. Diseño experimental.

Se evaluaron los tratamientos mencionados anteriormente de la siguiente manera: cada tratamiento consistió en tres replicas experimentales. Se usaron como unidades experimentales matraces de 250 mL con 90 mL de medio y como unidad muestral la bacteria creciendo en los distintos medios de cultivo. Las unidades se distribuyeron usando un diseño completamente al azar (Figura 6). El experimento tuvo una duración de 24 horas y una repetición. Las variables respuesta fueron el crecimiento bacteriano y la expresión de genes. Para la primera, se tomaron muestras en las horas 0, 6, 12, 18 y 24 y para la segunda en las horas 0, 12 y 24. Debido a la heterogeneidad de los tratamientos, el análisis de datos se llevó a cabo por medio de un análisis de varianza con contrastes ortogonales y un post-hoc de Duncan con una confianza del 95% en el software SAS®. Los contrastes evaluados fueron:

1- Sin microalga vs con microalga: compara el tratamiento control y el tratamiento 5 (SGM+ ácido galacturónico) contra los tratamientos donde hay exudados o microalga (tratamientos 1, 2, 3 y 4)

2 - Exudados vs co-cultivo: compara los tratamientos con exudados (tratamiento 1 y 2) contra los tratamientos con co-cultivo (tratamiento 3 y 4).

3- Cepas dentro de exudados: compara al tratamiento 1 contra el tratamiento 2.

4- Cepas dentro de co-cultivo: compara al tratamiento 3 contra el tratamiento 4.

5- Control vs ácido galacturónico: compara al tratamiento control contra el tratamiento 5.

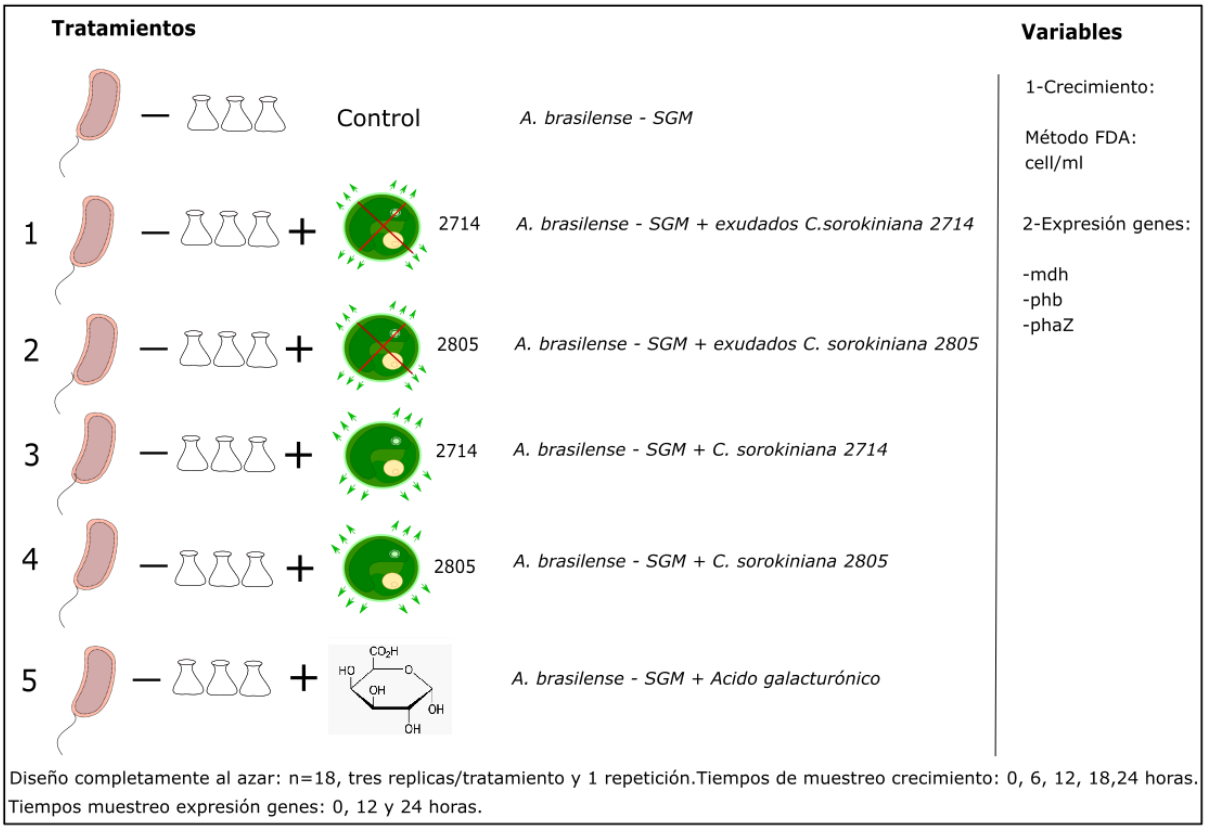


Figura 8. Diseño experimental. Interacción mutualista sintética *Azospirillum-Chlorella*.

8. RESULTADOS:

8.1. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* Cd en distintas fuentes

El crecimiento de la bacteria fue significativamente mayor en los tratamientos que contenían exudados de microalga (tratamientos 1 y 2) y microalga (tratamientos 3 y 4), en contraste con el tratamiento control y el medio suplementado con ácido galacturónico (tratamiento 5). Estas diferencias se observaron en todos los tiempos de crecimiento, siendo más significativas en los tiempos 18 y 24 horas ($p<0.01$). Al contrastar el crecimiento en exudados contra el crecimiento en co-cultivo se evidenciaron diferencias altamente significativas únicamente a las 24 horas de crecimiento ($p<0.01$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ningún tiempo de crecimiento tanto entre cepas dentro de exudados como entre cepas dentro de co-cultivo. Por último, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento suplementado con ácido galacturónico (Tabla 4, anexo 2).

Tabla 4. Resultados de análisis de varianza con contrastes ortogonales para cada tiempo de crecimiento. Significancia $p<0.05$ (*) y $p<0.01$(**).

	CRECIMIENTO BACTERIA (log cel·mL^{-1} x 10^7)							
Contrastes	**6 horas**		**12 horas**		**18 horas**		**24 horas**	
Con microalga y exudados vs sin microalga	2,26± 1.05*	2,54± 1.05*	2,37± 1.04*	2,72± 1.08*	2,52± 1.03**	3,11± 1.07**	2,59± 1.06**	3,51± 1.04**
Exudados vs co-cultivo	2,57± 1.06	2,51± 1.04	2,84± 1.08	2,61± 1.08	3,18± 1.05	3,05± 1.08	3,81± 1.03**	3,24± 1.04**
Cepas dentro exudados	2,55± 1.09	2,60± 1.03	2,87± 1.05	2,81± 1.11	3,17± 1.06	3,20± 1.04	3,69± 1.03	3,92± 1.03
Cepas dentro co-cultivo	2,48± 1.03	2,55± 1.05	2,55± 1.05	2,66± 1.11	3,07± 1.1	3,02± 1.06	3,32± 1.05	3,17± 1.04
Control vs Acido galacturónico	2,21± 1.03	2,31± 1.07	2,37± 1.04	2,38± 1.04	2,46± 1.03	2,58± 1.04	2,53± 1.05	2,66± 1.06

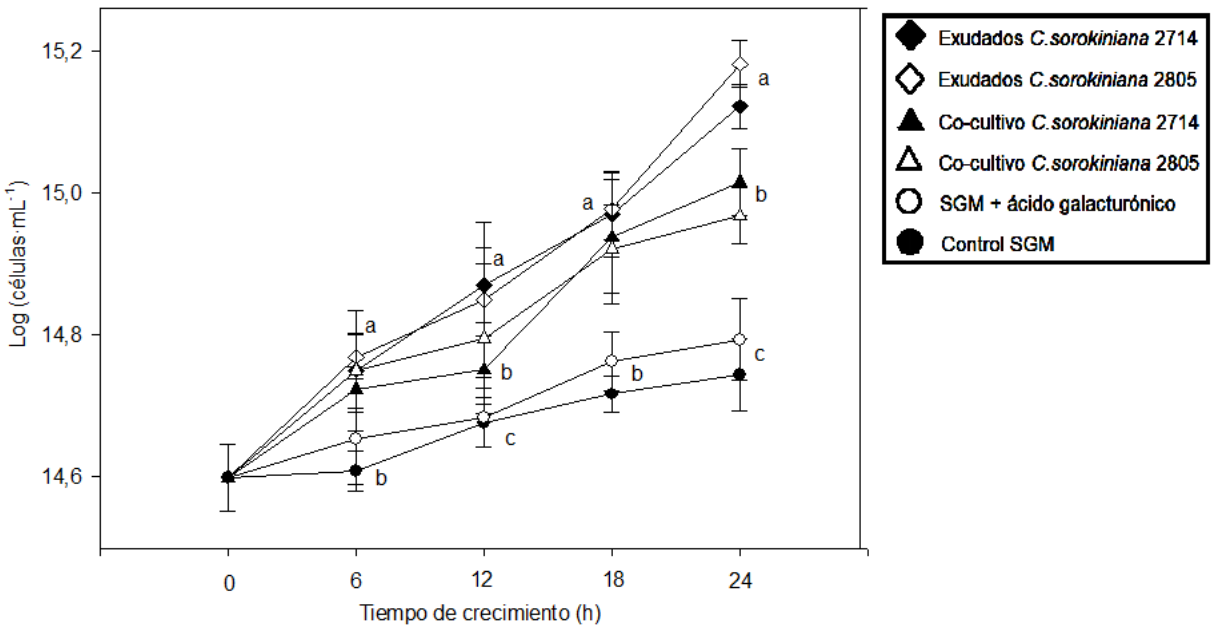


Figura 9. Crecimiento *Azospirillum brasilense* Cd en distintos medios de cultivo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre tratamientos medidas por medio del ANOVA y la prueba post-hoc de Duncan (α=0.05).

8.2. Comparación de modelos de preprocesamiento de datos para el cálculo de la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real.

Se comprobó que el mejor modelo de procesamiento de datos para estimar la eficiencia de la reacción post-corrida es el modelo ‘‘Background’’, el cual ajusta los datos de cada reacción restándole el valor de la fluorescencia basal. La regresión fue significativa para todos los modelos, exceptuando en los valores del gen de referencia para el tratamiento 2 tanto a las 12 horas como a las 24 horas de crecimiento. El segundo modelo ‘‘Taking the difference’’ no fue un buen estimador de la eficiencia pues se observaron valores menores tanto en el coeficiente r^2 como en el porcentaje de la eficiencia de la reacción (tabla 5). Se detectó que el valor de la eficiencia de la reacción para el gen de referencia *recA* en el tratamiento 2 fue muy baja, además de que no fue significativa en ninguno de los dos modelos. Esto quiere decir que los resultados de la expresión de genes en el tratamiento 2 (exudados de *Chlorella sorokiniana* 2805) no fueron tomados en cuenta para su análisis.

Tabla 5. Eficiencia de la reacción calculada para los dos modelos de preprocesamiento de datos. Arriba: significancia de la regresión r^2, abajo: eficiencia de la reacción (%). Regresión no significativa (*****).

Tiempo (horas)	**Tratamiento**	**Modelo 1 (tomando fluorescencia basal)**				**Modelo 2 (tomando diferencia)**			
		recA	*phbC*	*phaZ*	*mdh*	*recA*	*phbC*	*phaZ*	*mdh*
12	**Control**	0.99 84%	0.97 90%	0.99 93%	0.99 87%	0.89 68%	0.78 65%	0.94 78%	0.90 82%
	1	0,99 86%	0.99 90%	0.99 103%	0,97 81.6%	0.73 72%	0.95 29%	0.77 81%	0.79 70%
	2	**0.50*** **30%**	0,99 98%	0.97 117%	0.98 104%	**0.60*** **35%**	0.95 75%	0.97 55%	0.76 82%
	3	0.97 85%	0.98 90%	0,99 90%	0,99 91%	0.82 85%	0.72 71%	0.75 69%	0.97 70%
	4	0.98 94%	0.99 102%	0.98 81%	0.98 98%	0.55 88%	0.87 78%	0.94 60%	0.65 96%
	5	0.99 98%	0.97 86%	0.97 102%	0,98 91%	0.83 29%	0.98 77%	0.64 88%	0.86 90%
24	**Control**	0.96 98%	0.90 94%	0.98 99%	0.95 97%	0.92 70%	0.88 95%	0.78 75%	0.97 92%
	1	0,97 96%	0.83 95%	0.99 103%	0,97 92%	0.81 55%	0.91 79%	0.75 75%	0.89 60%
	2	**0.59*** **12%**	0,96 91%	0.99 99%	0.97 95%	**0.43*** **15%**	0.90 77%	0.92 90%	0.86 78%
	3	0.99 97%	0.98 102%	0,99 93%	0,98 89%	0.75 55%	0.7 81%	0.7 60%	0.98 32%
	4	0.99 104%	0.98 97%	0.97 90%	0.95 89%	0.77 88%	0.83 29%	0.97 60%	0.75 42%
	5	0.91 88%	0.94 91%	0.99 99%	0,97 97%	0.83 79%	0.87 65%	0.77 78%	0.91 59%

8.3. Análisis de expresión relativa mediante PCR en tiempo real y correlación en la expresión de genes

A las 24 horas de crecimiento en el tratamiento exudados de *C. sorokiniana* 2714 y en el medio suplementado con ácido galacturónico el gen *mdh* (malato deshidrogenasa) se sobreexpresó. Así mismo, se observó que en los demás tratamientos hubo una tendencia al aumento de la expresión de este gen a medida que el tiempo de crecimiento aumentaba (fig. 10a). Algo similar ocurrió con el gen *phbC*, en el cual se observó sobreexpresión en los exudados de *C. sorokiniana* 2714 a las 24 horas, pero también, la tendencia a aumentar su expresión en el tiempo en los demás tratamientos (fig. 10b). Esta tendencia se mantuvo en la expresión del gen *phaZ* donde se evidencio la sobreexpresión de este gen en todos los tratamientos a las 24 horas (fig 10c).

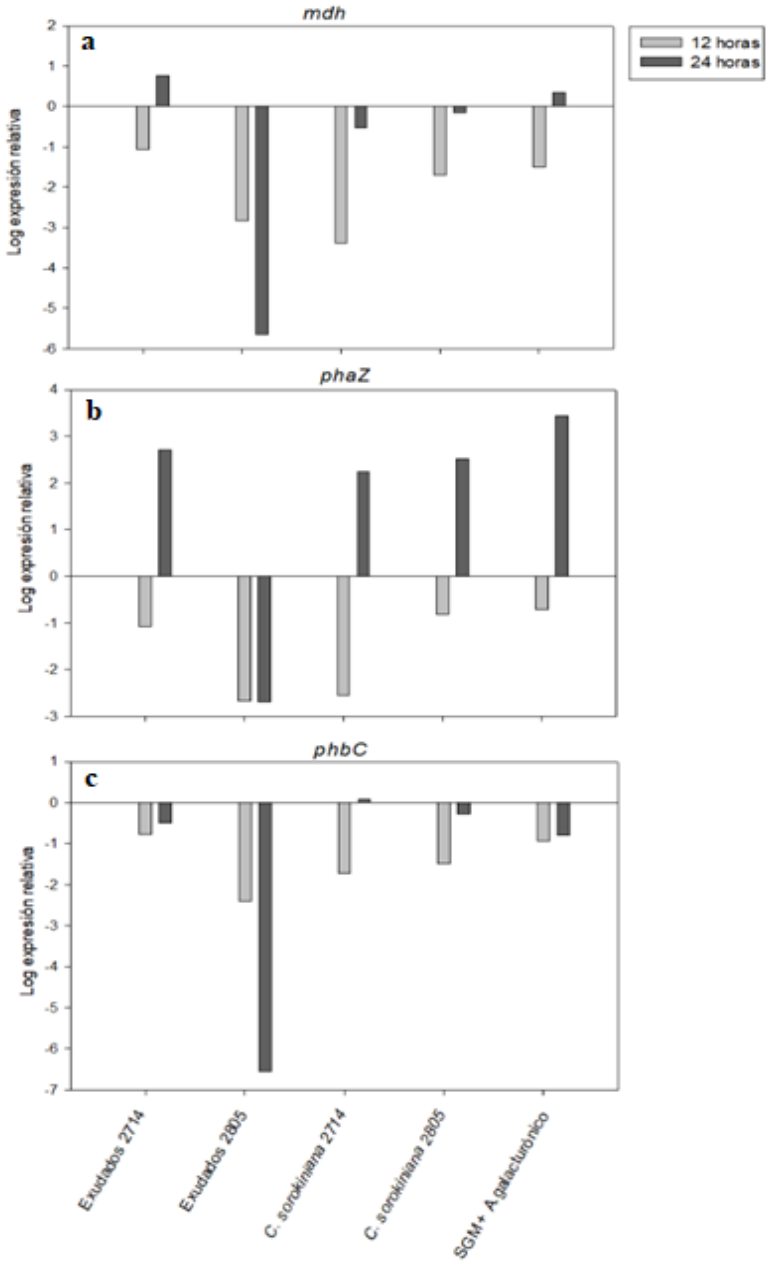


Figura 10. Expresión relativa con respecto al tratamiento control (SGM) de los genes *mdh* (a), *phaZ* (b) y *phbC* (c) en los distintos tratamientos en dos tiempos de crecimiento (12 y 24 horas).

Debido a que se observó una tendencia similar en la expresión de los tres genes, se realizó un análisis de correlación entre los valores de expresión reportados para cada gen independientemente de los tratamientos (tabla 6). A las 12 horas de crecimiento, se encontró que la expresión de los genes *mdh* y *phaZ* está correlacionada significativamente ($p<0.05$). A las 24 horas hubo correlación significativa entre la expresión de los tres genes, resaltando que

los valores de correlación fueron altamente significativos entre el gen *phbC* y el gen *phaZ* ($p<0.01$).

Tabla 6. Matriz de correlación de la expresión relativa de los genes a las 12 y 24 horas. Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Spearman y la significancia de la correlación *($p<0.05$) y **($p<0.01$).

12 horas			
	mdh	***phaZ***	***phbC***
mdh		0.902 (p=0.036*)	0.805 (p=0.1)
phaZ	0.902 (p=0.036*)		0.823 (p=0.087)
phbC	0.805 (p=0.1)	0.823 (p=0.087)	
24 horas			
phbC		0.987 (p=0.002**)	0.946 (p=0.015*)
phaZ	0.987 (p=0.002**)		0.943 (p=0.016*)
mdh	0.946 (p=0.015*)	0.943 (p=0.016*)	

9. DISCUSIÓN:

9.1. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* Cd en interacción con *Chlorella sorokiniana*

Azospirillum brasilense puede usar una gran variedad de fuentes de carbono para su crecimiento; esta característica le permite establecer simbiosis mutualistas con diversas especies de plantas (Pereg *et al*., 2016). A pesar de que la mayoría de los estudios se han enfocado en el efecto de la bacteria sobre el crecimiento de plantas a través de la raíz, cabe subrayar que la bacteria puede establecer relaciones simbióticas con organismos con los cuales no interactúa de manera natural y que no poseen sistema radical tal como la microalga *Chlorella sorokiniana* (de-Bashan *et al*., 2004). Para evaluar este mutualismo, se ha usado el medio sintético mineral de crecimiento (SGM), el cual no tiene fuente de carbono disponible, con el fin de garantizar que la simbiosis se sostenga por el intercambio de metabolitos entre los dos microorganismos y no por los componentes del medio (de Bashan *et al*., 2011, Palacios *et al*., 2019). Como se observó en este estudio, la bacteria creció mejor en co-cultivo con la microalga o en medio suplementado con exudados de la microalga, en contraste con el crecimiento en medio sin suplementar o suplementado con ácido galacturónico; estas diferencias se hicieron significativamente ($p<0.01$) mayores después de las 18 horas de crecimiento.

Bajo las condiciones probadas es posible que la bacteria haya tenido la capacidad de usar efectivamente fuentes derivadas de la microalga para su crecimiento de manera similar a como lo hace con las raíces de las plantas superiores. Los resultados de este estudio concuerdan con estudios preliminares donde se observó un crecimiento mayor de la bacteria cultivada en los exudados de la microalga *C. sorokiniana* 2714 (Palacios *et al*., 2016) ó en co-cultivos (Perez-Garcia *et al*., 2010, de-Bashan *et al*., 2011, Palacios *et al*., 2019), en comparación con el medio SGM sin suplementar.

Por otra parte, se observó que los tratamientos con exudados tuvieron un crecimiento mayor que los tratamientos en co-cultivo a las 24 horas de crecimiento. Lo anterior, podría explicarse por la eventual competencia de recursos que supone el crecimiento simultáneo de dos microorganismos en un mismo medio, que, si bien puede ser benéfico, puede tender a regularse en función de otros factores como la capacidad de carga, la disponibilidad de nuevos nutrientes y el tiempo (Goelzer y Fromion 2010). También, cabe resaltar que a pesar de que se detectó ácido galacturónico en los exudados de la microalga, compuesto previamente reportado como

abundante en los exudados de *Chlorella sorokiniana* (Watanabe *et al*., 2006, Templeton *et al*., 2012) la bacteria no tuvo un buen crecimiento en el medio suplementado con este compuesto; una explicación puede ser que la síntesis de ácido galacturónico como única fuente, puede producir piruvato con una menor eficiencia pues en su degradación también produce gliceraldehido-3P (Richard y Hilditch, 2009), precursor de otras rutas. Por otra parte, en los tratamientos con microalga o sus exudados, la bacteria pudo haber metabolizado además de ácido galacturónico otras fuentes carbono que pudieron producir piruvato y poder reductor de forma más eficiente; sin embargo, estas fuentes no pudieron ser detectadas mediante la técnica de HPLC-IR. En la actualidad, para dilucidar con exactitud que otras fuentes derivadas de la microalga podría usar la bacteria, se están probando otros métodos como la espectrofotometría nuclear resonancia magnética (comunicación personal E.A. Amavizca).

9.2. Importancia de la eficiencia de la reacción para validar los resultados de PCR en tiempo real

De acuerdo con los parámetros de comparación seleccionados, el modelo de preprocesamiento de datos ‘‘Background’’ fue el que mejor estimó la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real. Este procedimiento fue de gran importancia para el análisis de la expresión de genes puesto que, tras la validación de la eficiencia de la reacción post-corrida, se determinó que los resultados de la expresión de los genes evaluados en el tratamiento 2 (exudados de *Chlorella sorokiniana* 2805) no eran fiables pues los parámetros evaluados en el gen de referencia *recA* para ese tratamiento estuvieron por fuera de los valores esperados. En el análisis de expresión génica mediante cuantificación relativa, la expresión de genes se normaliza en función de un gen de referencia (Livak y Schmittgen 2001); sin embargo, como se pudo constatar, aunque la eficiencia de cada gen en este tratamiento estuvo dentro de los parámetros, no fue así para el gen de referencia en el tratamiento 2. El método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen 2001) asume que la eficiencia de la reacción es mayor al 90%; sin embargo, como se comprobó, esto solo ocurre en condiciones óptimas pues durante procedimiento de PCR en tiempo real existen varios factores que aportan variabilidad a la técnica, tales como la calidad del ARN, la heterogeneidad de los tratamientos, la contaminación de las muestras o errores en el pipeteo durante el procedimiento de PCR en tiempo real (Tailor *et al*., 2010). Por las razones antes mencionadas, los resultados de expresión de genes asociados al tratamiento 2 no se discutieron a profundidad.

9.3. Metabolismo de PHB y relación con el ciclo de Krebs en *Azospirillum brasilense* Cd durante la interacción con *Chlorella sorokiniana*

Se ha descrito que el metabolismo de PHB es importante para la interacción PGPB-planta (Okon e Itzigshon 1992). Además de ser un mecanismo para la acumulación de una fuente de carbono, poder reductor y energía, se ha postulado que posee una función regulatoria de la fijación de nitrógeno (Quagliano, 1998). El metabolismo de este compuesto permite una mayor sobrevivencia y adaptabilidad en la rizosfera en donde las bacterias debe competir con otros microorganismos (Kadouri *et al*., 2003). Se sabe que *Azospirillum brasilense* sintetiza PHB como elemento de reserva de carbono y de energía alcanzado hasta 75% de su peso seco. Este compuesto es metabolizado cuando existe una elevada relación C/N o una baja presión parcial de oxígeno (Tal y Okon 1985). En este estudio se comprobó que el ciclo de PHB y el ciclo de Krebs están activos cuando la bacteria interactúa con la microalga *Chlorella sorokiniana*, con sus exudados o con un medio suplementado con un ácido orgánico durante 24 horas en condiciones controladas. Se conoce que *Azospirillum brasilense* no produce óptimamente PHB cuando crece en carbohidratos o aminoácidos, mientras que esta producción se ve favorecida cuando la bacteria crece en ácidos orgánicos (Tal y Okon 1985), por lo que se podría sugerir que la bacteria metabolizo principalmente ácidos orgánicos provenientes de la microalga, compuestos que posteriormente pudo usar como precursores para la síntesis de PHB *de novo*. En este estudio, se evaluó la expresión de dos de las seis enzimas encargadas del metabolismo de PHB en *Azospirillum brasilense* Cd. La primera, la enzima poli-β-hidroxibutirato sintasa (*phbC*) que cataliza la síntesis de PHB *de novo* y la segunda, la enzima poli- β-hidroxibutirato depolimerasa (*phaZ*) que cataliza la degradación de este compuesto para que la bacteria lo pueda usar como fuente de carbono.

Al evaluar la expresión del gen *phbC*, se observó una sub-expresión en la mayoría de los tratamientos; esto podría explicarse porque el medio de reactivación de la bacteria fue el medio BTB, un medio rico en fuentes de carbono (Bashan *et al*., 2011), condición que pudo favorecer una síntesis previa de PHB en la bacteria debido a la alta relación C/N. Sin embargo, es importante resaltar que según se evidenció en este estudio, durante la interacción con la microalga, con sus exudados o con el medio suplementado con ácido galacturónico, la bacteria pudo haber sintetizado nuevo PHB diferente al generado en el proceso de reactivación, pues se

pudo dar una síntesis de PHB *de novo* a partir de otras fuentes de carbono que posiblemente sean ácido galacturónico o bien otros compuestos derivados de la microalga como otros carbohidratos o ácidos grasos, a partir de los cuales se produce acetil-CoA, precursor importante del ciclo de PHB y del ciclo de Krebs. Lo anterior también se comprobó por el mayor crecimiento observado en los tratamientos con la microalga o sus exudados en todos los tiempos de crecimiento. Las diferencias en el crecimiento poblacional fueron mayores después de las 18 horas debido a que el PHB comenzó a acumularse y también a consumirse (como se explicará más adelante) durante la fase exponencial de crecimiento. Esto ha sido previamente descrito en *Azospirillum brasilense* Cd (Tal y Okon 1985) y en otras especies fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azotobacter* (Quagliano, 1998). De manera interesante, el único tratamiento donde se observó una sobreexpresión de este gen fue en el co-cultivo con *C. sorokiniana* 2714 a las 24 horas de crecimiento. Esto sugiere que, en interacción directa con la microalga, se generan altas cantidades acetil-CoA que favorecen la síntesis de PHB y no inhiben el ciclo de Krebs permitiendo también un buen crecimiento de la bacteria.

Por otra parte, el gen *phaZ* mostró una sobreexpresión en todos los tratamientos a las 24 horas exceptuando en los exudados de *C. sorokiniana* 2805. Esto quiere decir que la bacteria uso efectivamente el PHB previamente almacenado para sostener su crecimiento, particularmente durante el intervalo comprendido entre las 12 y las 24 horas de crecimiento donde hubo una correlación positiva entre el gen encargado de la síntesis (*phbC*) y el encargado del consumo (*phaZ*). Este balance síntesis-consumo puede explicar el crecimiento mayor observado en los tratamientos que contenían a la microalga o sus exudados después de las 18 horas de crecimiento.

Adicionalmente, para analizar el metabolismo de carbohidratos vía ciclo de Krebs en *Azospirillum brasilense* Cd, se evaluó la actividad de la enzima malato deshidrogenasa (*mdh*), la cual ha sido previamente evaluada como un indicador de la actividad del ciclo de Krebs en *A. brasilense* Sp245 (Goebel y Krieg 1984). Esta enzima cataliza la oxidación (NAD(P)+/NAD(P)H dependiente) de malato a oxaloacetato. En este estudio, se evidenció una sobreexpresión de este gen en los tratamientos exudados *C. sorokiniana* 2714 y medio SGM suplementado con ácido galacturónico. Igual que con el gen *phbC*, su expresión tuvo una tendencia a aumentar en función del tiempo. La sobreexpresión de este gen en el tratamiento

exudados de *Chlorella sorokiniana* 2714 podría indicar que parte del acetil-CoA generado se sintetiza en el ciclo de PHB y otra que entra en el ciclo de Krebs; la alta actividad de este último ciclo puede explicar el mejor crecimiento poblacional en este tratamiento. Aun así, no se observó un buen crecimiento en el medio suplementado con ácido galacturónico, posiblemente porque a partir de este compuesto, el ciclo de Krebs se redirecciona hacia la producción de precursores de otras rutas. Esto fue previamente demostrado en *Azospirillum brasilense* Sp7 (Loh *et al*., 1984) creciendo en succinato como fuente de carbono donde los productos del ciclo de Krebs se dirigieron principalmente hacia la síntesis de lípidos.

Para este estudio en particular, la relación metabólica entre los genes analizados cuando la bacteria interactúa con la microalga podría de la siguiente manera: En interacción con la microalga o sus exudados, en un medio mínimo, se genera una alta relación C/N, derivada de la disponibilidad de fuentes de carbono en la microalga que pueden ser metabolizadas por la bacteria. Como se ha descrito previamente, *Azospirillum* puede metabolizar carbohidratos a través de varias rutas preliminares las cuales tienen como finalidad producir piruvato, mismo que es convertido en acetil-CoA a través de un proceso de oxidación mediado por la enzima piruvato deshidrogenasa, para ser metabolizado en el ciclo de Krebs. Sin embargo, cuando se produce acetil-CoA en exceso, derivado de la síntesis efectiva de fuentes de carbono y la consecuente producción de poder reductor, este compuesto puede ser usado también para síntesis de PHB *de novo*. Este proceso es catalizado por la enzima β-cetiolosa, siendo la primera en catalizar la síntesis de PHB y también la última encargada del proceso de degradación. Se observó una correlación negativa entre los valores de expresión de los genes *phbC* y *phaZ*, pues un aumento en la expresión del gen *phaZ* está relacionada con una disminución en la expresión del gen *phbC*, posiblemente la enzima β-cetiolasa regula la expresión de estos genes en función de los requerimientos metabólicos y la disponibilidad de poder reductor, el cual es esencial para la síntesis de PHB (Malinich y Bauer, 2018). Interesantemente, también se observó una alta correlación positiva entre los genes *phaZ* y *mdh* a las 24 horas de crecimiento, lo que puede indicar que parte el PHB depolimerizado es sintetizado directamente en el ciclo de Krebs.

Los resultados de este trabajo sugieren que el balance entre el ciclo de PHB y el ciclo de Krebs es importante para sostener la interacción de *Azospirillum brasilense* Cd-*Chlorella sorokiniana*. Además, el ciclo de Krebs también puede producir precursores (NADH y FADH2) de otras rutas

importantes tales como la fosforilación oxidativa, la cual a través de la cadena de transporte de electrones produce ATP, compuesto que posteriormente es esencial para la fijación de nitrógeno y otros procesos (Trainer y Charles, 2006). Estos ciclos a su vez podrían estar relacionados con los efectos benéficos sobre la microalga principalmente la fotosíntesis y el crecimiento.

10. CONCLUSIONES:

- El metabolismo de PHB y el ciclo de Krebs están altamente relacionados y cumplen un papel importante en el sostenimiento de la interacción *Chlorella-Azospirillum.* La relación metabólica entre estos ciclos se hace más significativa a medida que aumenta el tiempo de interacción entre los dos microorganismos.

-Bajo las condiciones estudiadas, se comprobó que *Azospirillum brasilense* Cd puede utilizar efectivamente fuentes de carbono producidas por la microalga, en este caso ácidos orgánicos, para su crecimiento y otros procesos metabólicos, tales como la síntesis de PHB y el ciclo de Krebs. Estos procesos metabólicos pueden producir precursores para otros procesos importantes en la bacteria, como la fosforilación oxidativa y la fijación de nitrógeno.

-En los experimentos se comprobó que las dos cepas de *Chlorella sorokiniana* probadas, no producen diferencias en el crecimiento y expresión de los genes analizados en *A. brasilense*.

-El mejor modelo de preprocesamiento de datos fue el modelo ‘‘Background’’, que ajusta los valores con respecto a la fluorescencia basal. Esta validación fue fundamental para el análisis de expresión de los genes analizados

-*Azospirillum brasilense* puede usar ácido galacturónico para la síntesis de PHB pero este no es metabolizado efectivamente para sostener su crecimiento; posiblemente es usado como precursor en otros procesos.

11. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS:

-Estandarizar las técnicas cromatográficas existentes y probar nuevas tecnologías para la detección de compuestos carbonados (especialmente ácidos orgánicos) en los exudados de *Chlorella sorokiniana*.

-Verificar la eficiencia de la reacción post-corrida usando el modelo ‘‘Back-ground’’ para garantizar el correcto análisis de los datos.

-Evaluar la expresión relativa de todas las enzimas involucradas en la síntesis de PHB y carbohidratos durante la interacción *Chlorella-Azospirillum* especialmente la enzima clave: β-cetiolasa.

-Evaluar la expresión de los genes evaluados en la bacteria durante tiempos de crecimiento prolongados con la microalga y sus exudados.

-Incluir ensayos *in vitro* para medir la actividad enzimática de las enzimas malato deshidrogenasa, polihidroxibutirato sintasa y polihidroxibutirato depolimerasa, así como la cuantificación de PHB *in vitro* para complementar los resultados de PCR en tiempo real.

-Incluir como variable de estudio la presión parcial de oxígeno en el medio.

12. REFERENCIAS:

Amavizca, E., Bashan, Y., Ryu, C. M., Farag, M. A., Bebout, B. M., & de-Bashan, L. E. (2017). Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.

Bashan Y, & de-Bashan LE (2002) Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv tomato) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum brasilense*, streptomycin sulfate, and chemothermal seed treatment. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 821–829.

Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *In Advances in Agronomy* (Vol. 108, pp. 77-136). Academic Press.

Bashan, Y., Lopez, B. R., Huss, V. A., Amavizca, E., & de-Bashan, L. E. (2016). *Chlorella sorokiniana* (formerly C. vulgaris) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 113-121.

Bashan, Y., Trejo, A., & de-Bashan, L. E. (2011). Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum spp.* and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 47(8), 963-969.

Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L., & Holmes, P. A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*, 19(9), 2781-2794.

Bock, C., Krienitz, L., & Proeschold, T. (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, 11(2), 293-312.

Brenholtz, G. R., Tamir-Ariel, D., Okon, Y., & Burdman, S. (2017). Carotenoid production and phenotypic variation in *Azospirillum brasilense*. *Research in Microbiology*, 168(5), 493-501.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., & Garrity, G. M. (Eds.). (2005). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part A Introductory Essays. Springer-Verlag US.

Bergey, D. H., Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., & American Society for Microbiology. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins.

Caiola, M. G., Canini, A., Botta, A. L., & Del Gallo, M. (2004). Localization of *Azospirillum brasilense* Cd in inoculated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. *Annals of Microbiology*, 54(4), 365-80.

Carrasco-Espinosa, K., García-Cabrera, R. I., Bedoya-López, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2015). Positive effect of reduced aeration rate on growth and stereospecificity of DL-malic acid consumption by *Azospirillum brasilense*: improving the shelf life of a liquid inoculant formulation. *Journal of Biotechnology*, 195, 74-81.

Cassan, F. D., & Garcia de Salamone, I. (2008). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 266.

Chen, P., & Huang, X. (2015). Comparison of analytic methods for quantitative real-time polymerase chain reaction data. *Journal of Computational Biology*, 22(11), 988-996.

Choix, F. J., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2012a). Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 51(5), 294-299.

Choix, F. J., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2012b). Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 51(5), 300-309.

Choix, F. J., Bashan, Y., Mendoza, A., & De-Bashan, L. E. (2014). Enhanced activity of ADP glucose pyrophosphorylase and formation of starch induced by *Azospirillum brasilense* in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Biotechnology*, 177, 22-34.

Chrzanowski, T. H., Crotty, R. D., Hubbard, J. G., & Welch, R. P. (1984). Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microbial Ecology*, 10(2), 179-185.

Darienko, T., Rad-Menéndez, C., Campbell, C., & Pröschold, T. (2019). Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella*-like organisms, including a description of *Droopiella* gen. nov. *Systematics and Biodiversity*, 17(8), 811-829.

de-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernández, J. P., & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, 36(12), 2941-2948.

de-Bashan L.E., Hernandez J.-P., Morey, T., & Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus for municipal wastewater. *Water Research* 38, 466-474.

de-Bashan, L. E., Trejo, A., Huss, V. A., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2008). *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*, 99(11), 4980-4989.

de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2008). Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6797-6802.

de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611-1627.

de-Bashan, L. E., Mayali, X., Bebout, B. M., Weber, P. K., Detweiler, A. M., Hernandez, J. P., ... & Bashan, Y. (2016). Establishment of stable synthetic mutualism without co-evolution between microalgae and bacteria demonstrated by mutual transfer of metabolites (NanoSIMS isotopic imaging) and persistent physical association (Fluorescent in situ hybridization). *Algal Research*, 15, 179-186.

de-Bashan, L.E., Schmid, M., Rothballer, M., Hartmann, A., and Bashan Y., 2011. Cell-cell interaction in the eukaryote-prokaryote model using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the bacterium *Azospirillum brasilense* immobilized in polymer beads. *Journal of Phycology* 47, 1350-1359.

Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2017). Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7(1), 153.

Graham, L. E. (1996). Green algae to land plants: an evolutionary transition. *Journal of Plant Research*, 109(3), 241-251.

Goebel, E. M., & Krieg, N. R. (1984). Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 159(1), 86-92.

Gonzalez, L.E., and Bashan, Y. (2000). Increased growth of the *microalga Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1527-1531.

Hartmann, A., and Zimmer, W. (1994). Physiology of *Azospirillum*. In *Azospirillum*/plant associations. Edited by Y. Okon. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 15-39.

Hernández, J. P., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 190-198.

Ip, P. F., Wong, K. H., & Chen, F. (2004). Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Process Biochemistry*, 39(11), 1761-1766.

Kadouri, D., Jurkevitch, E., & Okon, Y. (2003). Involvement of the reserve material poly-β-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3244-3250.

Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables

growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), 250-256.

Kim, S., Park, J. E., Cho, Y. B., & Hwang, S. J. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 144, 8-13.

Leyva, L. (2006). Efecto del ácido glucónico sobre la actividad de las enzimas encargadas de su metabolismo, en la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Azospirillum brasilense* Cd asociada a plantas de mezquite. Tesis de Maestría. México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 79p.

Leyva, L. A., Bashan, Y., Mendoza, A., & de-Bashan, L. E. (2014). Accumulation fatty acids of in *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions in relation to activity of acetyl-CoA carboxylase, temperature, and co-immobilization with *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften*, 101(10), 819-830.

Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Pant Sciences*, 31(1), 1-46.

Li, C., Yang, H., Li, Y., Cheng, L., Zhang, M., Zhang, L., & Wang, W. (2013). Novel bioconversions of municipal effluent and CO2 into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass. *Bioresource technology*, 132, 171-177.

Lim, S. L., Chu, W. L., & Phang, S. M. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource technology*, 101(19), 7314-7322.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Lizzul, A. M., Lekuona-Amundarain, A., Purton, S., & Campos, L. C. (2018). Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology*, 7(2), 25.

Loh, W. H., Randles, C. I., Sharp, W. R., & Miller, R. H. (1984). Intermediary carbon metabolism of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 158(1), 264-268.

Lopez, B. R., Bashan, Y., Trejo, A., & de-Bashan, L. E. (2013). Amendment of degraded desert soil with wastewater debris containing immobilized *Chlorella sorokiniana* and *Azospirillum brasilense* significantly modifies soil bacterial community structure, diversity, and richness. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), 1053-1063.

Lopez, B. R., Palacios, O. A., Bashan, Y., Hernández-Sandoval, F. E., & de-Bashan, L. E. (2019). Riboflavin and lumichrome exuded by the bacterium *Azospirillum brasilense* promote growth and changes in metabolites in *Chlorella sorokiniana* under autotrophic conditions. *Algal Research*, 44, 101696.

Malinich, E. A., & Bauer, C. E. (2018). Transcriptome analysis of *Azospirillum brasilense* vegetative and cyst states reveals large-scale alterations in metabolic and replicative gene expression. *Microbial Genomics*, 4,8.

Martinez-Drets, G., Del Gallo, M., Burpee, C., & Burris, R. H. (1984). Catabolism of carbohydrates and organic acids and expression of nitrogenase by *Azospirilla*. *Journal of Bacteriology*, 159(1), 80-85.

Masojídek J, Torzillo G.(2014). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. On-line database Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier, 2nd edition, 13 p.

Meza, B., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2015). Involvement of indole-3-acetic acid produced by *Azospirillum brasilense* in accumulating intracellular ammonium in *Chlorella vulgaris*. *Research in Microbiology*, 166(2), 72-83.

Myers, M. L., & Hubbell, D. H. (1987). Plant cell wall carbohydrates as substrates for *Azospirillum brasiliense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2745-2748.

Mohnen, D. (2002). Biosynthesis of pectins. Pectins and Their Manipulation. Blackwell Publishing and CRC Press, *Oxford*, 52-98.

Morita, M., Watanabe, Y., & Saiki, H. (2000). Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(6), 693-698.

Mukherjee, A. M. I. T., & Ghosh, S. U. D. H. A. M. O. Y. (1987). Regulation of fructose uptake and catabolism by succinate in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 169(9), 4361-4367.

Müller-Santos, M., de Souza, E. M., de Oliveira Pedrosa, F., & Chubatsu, L. S. (2015). Polyhydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense*. In Handbook for *Azospirillum* (pp. 241-250). Springer, Cham.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Novick NJ, Tyler ME (1982) L-Arabinose metabolism in *Azospirillum brasiliense*. *Journal of Bacteriology*, 119:336–338.

Goelzer, A., & Fromion, V. (2011). Bacterial growth rate reflects a bottleneck in resource allocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(10), 978-988.

Okon, Y., & Itzigsohn, R. (1992). Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Reviews*, 9(2-4), 131-139.

Okon, Y., Heytler, P. G., & Hardy, R. W. F. (1983). N2 fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3), 694-697.

Palacios, O. A., Gomez-Anduro, G., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2016). Tryptophan, thiamine and indole-3-acetic acid exchange between *Chlorella sorokiniana* and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6).

Palacios, O. A., Lopez, B. R., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2019). Early changes in nutritional conditions affect formation of synthetic mutualism between *Chlorella sorokiniana* and the bacterium *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecology*, 77(4), 980-992.

Papen, H., & Werner, D. (1982). Organic acid utilization, succinate excretion, encystation and oscillating nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* under microaerobic conditions. *Archives of Microbiology*, 132(1), 57-61.

Perez-Garcia, O., De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2010). Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense* 1. *Journal of Phycology*, 46(4), 800-812.

Pereg, L., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2016). Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil*, 399(1-2), 389-414.

Piccoli P, Masciarelli O and Bottini R (1996) Metabolism of 17,17[2H2]-Gibberellins A4, A9 and A20 by *Azospirillum lipoferum* in Chemically-Defined Culture Medium. *Symbiosis* 21: 263–274.

Quagliano, Javier Carlos. (1998). Producción microbiológica del poliester biodegradable poli-3- hidroxibutirato (PHB) a partir de *Azotobacter chroococcum* 6B. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I., & Bux, F. (2014). The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 168, 127-135.

Richard, P., & Hilditch, S. (2009). D-galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(4), 597-604.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.

Sahoo R. K., Ansari M. W., Pradham M., Dangar T. K., Mohanty S., Tuteja N. (2014). Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoplasma* 251, 943–953.

Santos, M. S., Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2017). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and biofilm by *Azospirillum brasilense* aiming at the development of liquid inoculants with high performance. *African Journal of Biotechnology*, 16(37), 1855-1862.

Slater, S. C., Voige, W. H., & Dennis, D. E. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology*, 170(10), 4431-4436.

Sorensen, I., Pettolino, F. A., Bacic, A., Ralph, J., Lu, F., O'Neill, M. A., ... & Willats, W. G. (2011). The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *The Plant Journal*, 68(2), 201-211.

Steinbüchel, A., & Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. In Biopolyesters (pp. 81-123). Springer, Berlin, Heidelberg.

Strzelczyk, E., Kampert, M., & Li, C. Y. (1994). Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, 149(1), 55-60.

Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1-S5.

Takeda, H. (1988). Classification of *Chlorella* strains by means of the sugar components of the cell wall. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16(4), 367-371.

Tal, S., & Okon, Y. (1985). Production of the reserve material poly-β-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(7), 608-613.

Tal, S., Smirnoff, P., & Okon, Y. (1990a). Purification and characterization of D (-)-β-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Azospirillum brasilense* Cd. *Microbiology*, 136(4), 645-649.

Tal, S., Smirnoff, P., & Okon, Y. (1990b). The regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation. *Microbiology*, 136(7), 1191-1196.

Tarczynski, M. C., Byrne, D. N., & Miller, W. B. (1992). High performance liquid chromatography analysis of carbohydrates of cotton-phloem sap and of honeydew produced by *Bemisia tabaci* feeding on cotton. *Plant Physiology*, 98(2), 753-756.

Tarrand, J. J., Krieg, N. R., & Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(8), 967-980.

Templeton, D. W., Quinn, M., Van Wychen, S., Hyman, D., & Laurens, L. M. (2012). Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *Journal of Chromatography* A, 1270, 225-234.

Tien, T. M., Gaskins, M. H., & Hubbell, D. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 1016-1024.

Trainer, M. A., & Charles, T. C. (2006). The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 377-386.

Trejo, A., De-Bashan, L. E., Hartmann, A., Hernandez, J. P., Rothballer, M., Schmid, M., & Bashan, Y. (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. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 65-73.

Van Bastelaere, E., Lambrecht, M., Vermeiren, H., Van Dommelen, A., Keijers, V., Proost, P., & Vanderleyden, J. (1999). Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Molecular microbiology*, 32(4), 703-714.

Van Dommelen, A., Van Bastelaere, E., Keijers, V., & Vanderleyden, J. (1997). Genetics of *Azospirillum brasilense* with respect to ammonium transport, sugar uptake, and chemotaxis. In Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes (pp. 155-160). Springer, Dordrecht.

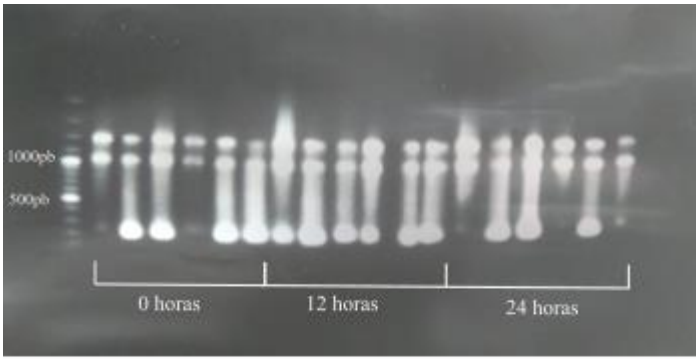
Watanabe, K., Imase, M., Sasaki, K., Ohmura, N., Saiki, H., & Tanaka, H. (2006a). Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(5), 538-543.

Watanabe, S., Shimada, N., Tajima, K., Kodaki, T., & Makino, K. (2006b). Identification and Characterization of l-Arabonate Dehydratase, l-2-Keto-3-deoxyarabonate Dehydratase, and l-Arabinolactonase Involved in an Alternative Pathway of l-Arabinose Metabolism NOVEL EVOLUTIONARY INSIGHT INTO SUGAR METABOLISM. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33521-33536.

Westby, C. A., Cutshall, D. S., & Vigil, G. V. (1983). Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 156(3), 1369-1372.

13. ANEXOS:

Anexo 1. Visualización de muestras de ARN en gel de agarosa 1.2% (arriba), concentración de las muestras de cADN sintetizado (abajo).



Tiempo	Tratamiento	[ng/µL]	A(260/280)
0 horas	Control	254,4	1,54
	1	399,5	1,84
	2	566,3	1,67
	3	827,5	1,65
	4	410,2	1,93
	5	349,7	1,83
12 horas	Control	499	1,59
	1	749,2	1,61
	2	885,9	1,64
	3	358,9	1,78
	4	779,9	1,63
	5	519,7	1,61
24 horas	Control	434,8	1,89
	1	337,4	1,78
	2	413,9	1,89
	3	512,8	1,53
	4	827,7	1,65
	5	623,4	1,55

Anexo 2. Resultados de análisis de varianza con contrastes ortogonales para cada tiempo de crecimiento. (Software SAS®).

---------- tiempo=6 ----------

Procedimiento GLM

Variable dependiente: crec

Contraste	DF	Contraste SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EXUDADO VS COCULTIVO	1	0.00212521	0.00212521	0.19	0.6683
CEPAS DENTRO DE EXUDADO	1	0.00072010	0.00072010	0.06	0.8027
CEPAS DENTRO COCULTIVO	1	0.00144453	0.00144453	0.13	0.7237
SIN MICROALGA VS CON MICROALGA	1	0.07396270	0.07396270	6.60	0.0193
CONTROL VS GALACTURONICO	1	0.00419528	0.00419528	0.37	0.5481

---------- tiempo=12 ----------

Procedimiento GLM

Variable dependiente: crec

Contraste	DF	Contraste SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EXUDADO VS COCULTIVO	1	0.03037178	0.03037178	1.47	0.2403
CEPAS DENTRO DE EXUDADO	1	0.00093312	0.00093312	0.05	0.8338
CEPAS DENTRO COCULTIVO	1	0.00392055	0.00392055	0.19	0.6678
SIN MICROALGA VS CON MICROALGA	1	0.09899925	0.09899925	4.81	0.0417
CONTROL VS GALACTURONICO	1	0.00011781	0.00011781	0.01	0.9405

---------- tiempo=18 ----------

Procedimiento GLM

Variable dependiente: crec

Contraste	DF	Contraste SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EXUDADO VS COCULTIVO	1	0.00770006	0.00770006	0.57	0.4605
CEPAS DENTRO DE EXUDADO	1	0.00011476	0.00011476	0.01	0.9277

CEPAS DENTRO COCULTIVO	1	0.00054285	0.00054285	0.04	0.8435
SIN MICROALGA VS CON MICROALGA	1	0.23783936	0.23783936	17.57	0.0005
CONTROL VS GALACTURONICO	1	0.00431521	0.00431521	0.32	0.5793

---------- tiempo=24 ----------

Procedimiento GLM

Variable dependiente: crec

Contraste	DF	Contraste SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EXUDADO VS COCULTIVO	1	0.10307310	0.10307310	13.26	0.0019
CEPAS DENTRO DE EXUDADO	1	0.00719400	0.00719400	0.93	0.3488
CEPAS DENTRO COCULTIVO	1	0.00451725	0.00451725	0.58	0.4558
SIN MICROALGA VS CON MICROALGA	1	0.49045633	0.49045633	63.08	<.0001
CONTROL VS GALACTURONICO	1	0.00496008	0.00496008	0.64	0.4349