

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Posgrado en Biotecnología

**PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS PROMOTORES DEL  
CRECIMIENTO VEGETAL POR UN CULTIVO ALGA-  
BACTERIA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

**I.B.I Isaias De la sancha Sierra**

Matrícula: 2202800513

Contacto: i.dlsancha@gmail.com

Asesores:

Dra. Nancy Velasco Alvarez

Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

Jurado:

Presidenta: Dra. Nancy Velazco Alvarez

Secretario: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

Vocal: Dr. Oskar Alejandro Palacios López

Vocal: Dr. Cesar Cuauhtémoc Rojas Loria

21 de diciembre 2022, Iztapalapa. Ciudad de México.



UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

**PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS PROMOTORES DEL  
CRECIMIENTO VEGETAL POR UN CULTIVO ALGA-  
BACTERIA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

**I.B.I Isaias De la sancha Sierra**

Directora: Dra. Tania Volke Sepúlveda

Asesores: Dra. Nancy Velasco Alvarez

Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

## **Dedicatoria.**

Este trabajo está dedicado a mi familia y amigos. Sin su apoyo nada de esto habría sido posible.

A mi madre Josefina y a mi padre Isaias, que sin ellos no sería lo que soy y no hubiese llegado hasta este punto.

A mi hermana Carolina, que aún con nuestras diferencias conté con su ayuda en los momentos complicados.

A esas uamistades que nunca terminan: a Lilith, que desde la Licenciatura la carrera fue un gran apoyo en cada examen y tarea olvidada. A Regina por enseñarme que siempre se puede seguir después de un tropiezo. A Tania, que, aunque hay poco tiempo de conocernos ya la considero una parte importante de este viaje. A mi amiguita de CSH Aidee, que tanto me ha enseñado fuera de lo académico.

A todas esas amistades que siempre me dieron un pequeño empujón para seguir adelante. Mis amigos de la semana de biotecnología de la vieja y nueva guardia: Emma, Gabriel, Grecia, Byanca, Yuri, Óscar, Richie, Nuria, Lu, Miguel, Coria, Paola, Fany, Cristina, Meli; que en algún momento me dieron un consejo y una conversación necesaria.

Y a todas las personas que, aunque no recuerde claramente en este momento, aportaron ese granito de arena para que hoy estuviera terminando este proyecto.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico recibido durante la realización de este trabajo de investigación a través de la beca otorgada.

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por permitirme realizar las actividades requeridas para este proyecto, así como las acciones tomadas para protegernos ante la pandemia derivada de la enfermedad covid-19.

A la doctora Tania Volke por su paciencia, dedicación y esfuerzo que hicieron posible la terminación de este trabajo.

A la doctora Nancy Velasco por su infinita paciencia y apoyo durante la realización de todo el trabajo.

Al doctor Francisco Figueroa por todos sus consejos tanto técnicos como académicos.

A mis compañeros de los laboratorios de biotecnología ambiental y residuos sólidos por sus consejos y enseñanzas de vuelta a las actividades presenciales.

## Contenido

1	Introducción .....	7
2	Marco teórico.....	8
2.1	Microorganismos endófitos.....	8
2.2	Microorganismos promotores de crecimiento vegetal .....	9
2.3	Compuestos reguladores de crecimiento vegetal .....	14
2.4	Asociaciones microalga-bacteria.....	16
2.5	Inmovilización de microorganismos .....	18
2.6	Estrés abiótico por la aplicación de un campo eléctrico eléctrico de baja intensidad.....	20
3	Antecedentes directos.....	22
4	Justificación .....	23
5	Hipótesis .....	23
6	Objetivos.....	24
6.1	Objetivo general.....	24
6.2	Objetivos específicos.....	24
7	Métodos y materiales .....	25
7.1	Estrategia experimental .....	25
7.2	Material biológico .....	26
7.3	Condiciones experimentales .....	28
7.4	Caracterización de los microorganismos .....	29
7.5	Tratamiento electroquímico .....	31
7.6	Producción de AIA por un cocultivo inmovilizado .....	32
7.7	Evaluación de la regulación del crecimiento por el cocultivo tratado .....	33
7.8	Métodos analíticos .....	34
7.9	Análisis estadísticos.....	35
8	Resultados y discusión .....	36
8.1	Caracterización del crecimiento .....	36
8.2	Producción de AIA por <i>M. oryzae</i> .....	39
8.3	Efecto de un campo eléctrico en el crecimiento microbiano.....	41
8.4	Evaluación de la producción de AIA por un cocultivo inmovilizado.....	49
8.5	Evaluación de los extractos obtenidos del cultivo sobre el crecimiento vegetal ..	51
9	Conclusiones .....	57
10	Bibliografía.....	58
11	Anexos.....	68

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Auxinas producidas por diferentes microorganismos.....	15
<b>Tabla 2.</b> Parámetros cinéticos obtenidos para <i>Methylobacterium oryzae</i> y <i>Coccomyxa sp.</i> en función de la composición del medio.....	38
<b>Tabla 3.</b> Efecto de la intensidad de corriente y la concentración de sacarosa sobre la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación (td) de <i>Coccomyxa sp.</i> .....	45
<b>Tabla 4.</b> Efecto de la intensidad de corriente y la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación (td) de <i>M. oryzae</i> .....	47
<b>Tabla 5.</b> Efecto de la intensidad de corriente y la fuente de carbono sobre la producción de AIA por <i>M. oryzae</i> después de 12 días de cultivo.....	48
<b>Tabla 6.</b> Efecto de extractos de cultivos axénicos y cocultivos sobre el índice de germinación, la elongación y el peso de raíces de semillas de rábano. ....	54

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama de la estrategia experimental propuesta para el estudio.....	25
<b>Figura 2.</b> Reactor utilizado en el tratamiento electroquímico.....	31
<b>Figura 3.</b> Cinética de crecimiento para <i>Coccomyxa sp.</i> en función de diferentes fuentes de carbono.....	37
<b>Figura 4.</b> Cinética de crecimiento de <i>M. oryzae</i> en función de las fuentes de carbono.....	39
<b>Figura 5.</b> Producción de Biomasa y de AIA por <i>M. oryzae</i> en función de la concentración de triptófano.....	40
<b>Figura 6.</b> Comportamiento de la diferencia de potencial en relación con la intensidad de corriente aplicada en los diferentes medios analizados.....	42
<b>Figura 7.</b> Configuración del reactor para el tratamiento electroquímico de <i>M. oryzae</i> y <i>Coccomyxa sp.</i> .....	43
<b>Figura 8.</b> Curvas de crecimiento de <i>Coccomyxa sp.</i> en ausencia y en presencia del tratamiento electroquímico.....	44
<b>Figura 9.</b> Cambio de coloración en <i>M. oryzae</i> posterior al tratamiento eléctrico.....	46
<b>Figura 10.</b> Curvas de crecimiento de <i>M. oryzae</i> sin tratamiento electroquímico y tratada con una corriente eléctrica.....	46
<b>Figura 11.</b> Efecto de la intensidad del tratamiento electroquímico sobre la producción de ácido indolacético (AIA) por <i>M. oryzae</i> con sacarosa o metanol como fuente de carbono.....	49
<b>Figura 12.</b> Crecimiento de <i>Coccomyxa sp.</i> en perlas de alginato.....	50
<b>Figura 13.</b> Efecto de la inmovilización en perlas de alginato sobre la producción de AIA por <i>M. oryzae</i> y el cocultivo alga-bacteria.....	51
<b>Figura 14.</b> Concentración promedio de biomasa de <i>Coccomyxa sp.</i> y <i>M. oryzae</i> para los cultivos axénicos y los cocultivos a los 21 días.....	52
<b>Figura 15.</b> Relación biomasa producida con respecto a la concentración inicial de sustrato para <i>Coccomyxa sp.</i> y <i>M. oryzae</i> .....	53
<b>Figura 16.</b> Relación peso-longitud de raíces de rábano y producción de AIA en extractos.....	55

## Resumen

Los endófitos son organismos endosimbiontes, generalmente hongos y bacterias, que habitan dentro de los tejidos de las plantas sin producir daños aparentes. Los endófitos establecen relaciones complejas con las plantas que habitan y les confieren una serie de ventajas adaptativas como la protección ante factores de estrés y la promoción del crecimiento vegetal. En este trabajo, se estudiaron dos microorganismos endófitos – una microalga y una bacteria promotora del crecimiento vegetal (BPCV) - aislados del arbusto *Acacia farnesiana*. El objetivo general fue evaluar el efecto de las condiciones nutrimentales y de la aplicación de una corriente eléctrica de baja intensidad como condición de estrés sobre el establecimiento de un cocultivo entre *Methylobacterium oryzae* y *Coccomyxa sp.* y la producción de compuestos PCV. Se caracterizó el crecimiento de ambos organismos y la producción de ácido indolacético (AIA) por *M. oryzae* en función de diferentes fuentes de carbono. Se analizó el efecto de un tratamiento electroquímico – como factor de estrés abiótico – sobre la producción de compuestos PCV y el crecimiento de los microorganismos en cultivo axénico y en cocultivo. Los ensayos se llevaron a cabo por 15 o 21 días, en medio Murashige-Skoog líquido, bajo condiciones de iluminación LED (40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) con un fotoperiodo de 12 h. Los compuestos PCV fueron evaluados en extractos de 21 días mediante bioensayos con semillas de rábano.

Se encontraron cambios significativos en el crecimiento de ambos microorganismos por efecto de la fuente de carbono. Para *Coccomyxa sp.*, se encontró una tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) máxima (0.376  $\text{días}^{-1}$ ) con 10 g/L de sacarosa, alcanzando un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 1.84 días; en contraste, con urea como fuente de carbono y nitrógeno, el  $t_d$  aumentó a 5.19 días. Para *M. oryzae*, no se encontraron diferencias significativas en los valores de  $\mu$  y  $t_d$  ( $\sim 0.45 \text{ días}^{-1}$  y  $\sim 1.5$  días, respectivamente) cuando se usó sacarosa (1.5 o 10 g/L) o metanol (0.5%, v/v) como única fuente de carbono. El aumento en la concentración de triptófano (Trp) mejoró la producción de AIA por *M. oryzae* sin modificar su crecimiento. El tratamiento electroquímico influyó en la producción de compuestos PCV y el crecimiento de ambos microorganismos. Para *Coccomyxa sp.*, la aplicación de 5 y 15 mA incrementó el  $\mu$  y disminuyó el  $t_d$  en un medio con 5 g/L de sacarosa. En *M. oryzae*, la aplicación de 5 mA redujo el  $t_d$  ( $\sim 29$  h) e incrementó la producción de AIA (hasta 7.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) cuando se usó sacarosa (1.5 g/L) en el medio de cultivo; el aumento en la intensidad de corriente a 15 mA, aumentó el  $t_d$  cerca de 18 h. El cocultivo, con y sin el tratamiento electroquímico, estimuló la producción de AIA y otros compuestos (no identificados) que mejoraron el crecimiento vegetal en base a la relación peso-longitud de los germinados.

## 1 Introducción

Los microorganismos endófitos tienen la capacidad de habitar dentro de los tejidos de las plantas sin generar ningún daño además de formar parte de las comunidades de microorganismos que habitan la rizosfera, es decir, la región cercana a las raíces (Hallmann *et al.*, 1997).

Estos microorganismos presentan diferentes y complejas relaciones con las plantas en las que se hospedan (Rodríguez *et al.*, 2009), en la que hay microorganismos que son capaces de promover el crecimiento de las plantas (Oteino *et al.*, 2015), otros que son capaces de fungir como competencia contra microorganismos patógenos (Romero *et al.* 2019) o incluso microorganismos capaces de proveer a las plantas protección contra estrés abiótico (Waller *et al.* 2005). Se han estudiado diversos mecanismos por los cuales los microorganismos presentan promoción de crecimiento vegetal; uno de ellos es la fitoestimulación, la cual se basa en la capacidad de los microorganismos de producir y/o modificar compuestos que tienen efectos similares a las fitohormonas (Hussain y Hasnain, 2011), estimulando directamente el crecimiento de las plantas que hospedan.

Por otro lado, se ha descubierto como este efecto de promoción de crecimiento no se da únicamente con plantas. El ejemplo de mayor relevancia biotecnológica para diversos investigadores es la asociación entre microalgas y bacterias. Esta asociación ha demostrado aumentar considerablemente la eficiencia de ambos cultivos debido a un intercambio de nutrientes (Kouzuma y Watanabe, 2015). A esta asociación entre dos organismos asociados se le conoce como cocultivos. Sin embargo, realizar cocultivos estables es complicado, entre otras razones, debido al espacio de cultivo. Para un cocultivo, es importante que ambos organismos interactúen físicamente por lo que una de las estrategias utilizadas es la inmovilización de los microorganismos con polímeros, como el quitosano o el alginato, que son capaces de mantener la interacción física, mientras se mantiene la transferencia de nutrientes (Lira-Angelim *et al.* 2013, Smidsrød y Skjåk-Braek, 1990).

## 2 Marco teórico

### 2.1 Microorganismos endófitos

Los microorganismos endófitos son aquellos organismos que habitan en los tejidos intercelulares de las plantas sin causar signos de enfermedad (Hallmann *et al*, 1997). Pueden habitar internamente en las raíces, hojas y tallos de las plantas. La gran variedad de microorganismos endófitos ha llevado a numerosos investigadores a aislarlos y estudiarlos. Autores como Ulrich *et al*, (2008) y Sessitsch *et al*, (2004) han aislado decenas de especies diferentes de bacterias a partir de diferentes especies vegetales, estudiando de igual manera las interacciones que tienen estos organismos con las especies vegetales de las que fueron aisladas.

El mayor interés biotecnológico de los organismos endófitos se basa en que las relaciones entre estos organismos y las plantas que habitan se pueden aprovechar para estimular el crecimiento vegetal sin requerir compuestos sintéticos que alteren el equilibrio entre las especies vegetales y microbianas (Savci, 2012). Esta relación depende, entre otros factores, de la región que habitan los microorganismos endófitos dentro de la planta. Usualmente esta relación se presenta en regiones de alto intercambio de compuestos como la zona límite del suelo con la raíz llamada rizosfera. Es en esta zona en la que se produce la relación mutualista de los microorganismos con la planta en la que se hospedan (Sánchez-Fernández *et al*, 2013).

Los mecanismos mediante los cuales ocurre el mutualismo dependen tanto del microorganismo, como de la planta hospedera y de las condiciones medioambientales en las que habitan. De hecho, hay organismos endófitos que presentan actividades similares en diferentes especies vegetales, lo que permite extrapolar su efecto de una planta a otra. Visto desde otra perspectiva, los organismos endófitos no colonizan una planta en solitario. De forma natural, se da la presencia de diversos organismos endófitos de manera simultánea dentro del mismo hospedero, permitiendo obtener de una muestra vegetal diferentes organismos que tengan relaciones simbióticas similares que en conjunto potencian estas características como la protección de la planta (Martínez-Álvarez *et al*. 2013).

Por ejemplo, Tilak *et al*. realizaron un estudio en 2006. En este trabajo, a partir de los nódulos que se formaron en las raíces de plantas de chícharo (*Cajanus cajan*), aislaron bacterias del género *Rhizobium* y algunas rhizobacterias. Los investigadores observaron cómo los brotes obtuvieron mayor nodulación y mayor crecimiento cuando fueron

coinoculadas con las bacterias *Rhizobium spp.* y *Pseudomonas putida*, comparado con la nodulación y el crecimiento de los brotes cuando fueron inoculados con una sola bacteria. Además, se observó como estos 2 microorganismos eran capaces de aumentar la concentración de nitrógeno dentro de los brotes. De acuerdo con sus resultados, concluyeron que entre estos 2 organismos endófitos existe una interacción sinérgica.

Por otra parte, Bilal *et al*, (2018) describieron el efecto de la interacción de 2 organismos: el hongo *Paecilomyces formosus* y la bacteria *Sphingomonas sp.* sobre plantas de soya (*Glycine max*); en condiciones normales y bajo condiciones de estrés por aluminio y zinc. Estos dos microorganismos en conjunto promovieron un mayor crecimiento de brotes y raíces de la soya, aun bajo condiciones de estrés por metales. Comparativamente la inoculación con organismos por separado sí promovió el crecimiento, siendo menor el crecimiento al obtenido con la coinoculación. En este caso, la presencia de ambos organismos además de promover el crecimiento de los brotes, le otorgaron una resistencia al estrés inducido por la presencia de metales como aluminio y zinc.

De igual forma, las plantas no son las únicas beneficiadas por su interacción con las bacterias. Las microalgas también pueden ser potenciadas por su interacción con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Byung-Hyuk *et al*, 2014).

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal también promueven el crecimiento de algunas microalgas, así como también son capaces de potenciar la producción de compuestos como algunos pigmentos y compuestos antioxidantes. Esta característica se ha aprovechado por Win *et al* (2018) mediante su estudio de biofertilizantes comerciales producidos con biomasa de microalgas. De acuerdo con lo mencionado con los autores, las microalgas proveen a otros microorganismos de nutrientes, compuestos nitrogenados, así como de fuentes de carbono y energía (Garcia-Gonzalez y Sommerfeld, 2016; Godlewska *et al*, 2016; Mógor *et al*, 2018).

## 2.2 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal

Las bacterias (BPCV) y hongos (HPCV) promotores de crecimiento vegetal son dos grupos de microorganismos que tienen la capacidad de facilitar la obtención de nutrientes y aumentar el crecimiento de diferentes especies vegetales. Estos organismos pueden colonizar el tejido de la planta formando nódulos o encontrarse de forma libre en el sustrato cercano al sistema radicular de las plantas (Suzaki & Kawaguchi, 2014; Foyer *et al*, 2018). Uno de los grupos de bacterias más estudiados son las denominadas rizobacterias. Son bacterias de vida libre presentes en la porción de suelo inmediato a las raíces llamado

rizosfera. El intercambio de nutrientes y diversos compuestos en esta región es muy alto por lo que existe una estrecha relación entre las bacterias y las raíces de las plantas (Bais *et al*, 2006; Doornbos *et al*, 2012). Entre los compuestos presentes en los exudados radiculares se encuentran diversos carbohidratos y algunos aminoácidos. Los microorganismos presentes en la rizosfera aprovechan estos compuestos como fuente de energía, como nutrientes o como precursores para producir compuestos que regulan el crecimiento de las plantas o le facilitan la asimilación de algunos nutrientes ya presentes en el sustrato (Glick, 2012).

Una característica interesante que se observa con diferentes especies de microorganismos promotores de crecimiento vegetal es que su efecto depende del estadio de crecimiento de las plantas. Es decir, hay microorganismos que promueven la germinación de las semillas y hay otros que promueven más el desarrollo de las plantas adultas (Díaz-Vargas *et al*, 2001). En 2001 se observó la promoción de crecimiento vegetal en cultivos de lechuga romana inoculados con BPCV. En dicho estudio se analizaron 30 especies bacterianas, de las cuales, algunas mejoraron la germinación de las semillas mientras que otras mejoraron exclusivamente el desarrollo de las hojas de las plantas adultas. Otro punto para tomar en cuenta es que, ya que las cepas bacterianas fueron aisladas de diferentes cultivos y que la mayoría presentó un efecto positivo en cuanto al crecimiento de la planta o la longitud de las raíces, Díaz-Vargas *et al* (2001) concluyeron que el efecto de las diferentes cepas bacterianas no era específico para la planta de la que fue aislada.

Existen diferentes mecanismos por los cuales se da la actividad de promoción de crecimiento vegetal. Desde el control de organismos competidores hasta la producción de compuestos que tienen el mismo efecto que los reguladores de crecimiento propios de las plantas, los mecanismos por los que los microorganismos endófitos y de vida libre promueven el crecimiento vegetal se pueden dividir en 3 tipos: el biocontrol, la biofertilización y la fitoestimulación (Martínez-Álvarez *et al*, 2013; Glick, 2012).

Algunos microorganismos incluso son capaces de presentar más de un mecanismo al mismo tiempo. Por ejemplo, en bacterias del género *Azospirillum* se ha descubierto su capacidad de fijación de nitrógeno, de solubilización de fosfatos y reducción de las concentraciones endógenas de etileno (Holguin *et al*, 2003). En nódulos de raíces de lentejas cultivadas en Pakistán se han aislado 5 especies de bacterias que promueven el crecimiento vegetal a través de la solubilización de fosfatos insolubles y la producción de compuestos reguladores de crecimiento vegetal (Zafar *et al*. 2012). De igual manera, Oteino *et al* (2015) observaron como diferentes cepas bacterianas aisladas de las raíces de la

planta *Miscanthus giganteus* producen ácido glucónico, y que este compuesto favorece la solubilización de fosfatos insolubles presentes en el sustrato.

Además de las bacterias, los hongos también han sido son organismos altamente estudiados debido a su capacidad de generar relaciones mutualistas con plantas. Se conoce mucho acerca de la relación mutualista entre hongos y plantas pues se ha acuñado el término “micorrizas” para esta relación. La interacción entre las plantas y algunos hongos micorrícicos es tan íntima y necesaria que son incapaces de sobrevivir sin una planta que hospedar (Parniske, 2008). Estos organismos son capaces de intercambiar una gran variedad de nutrientes como azufre, nitrógeno, carbono y otros micronutrientes (Lanfranco *et al*, 2016). Incluso, estos hongos tienen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas a través de la señalización de diferentes fitohormonas (Gutjahr, 2014).

### 2.2.1 Biocontrol y control de estrés abiótico

Las condiciones de estrés a las que están sujetos todos los organismos modifican su crecimiento y metabolismo. Estas condiciones inducen cambios complejos que en la mayoría de las ocasiones estimulan la producción de compuestos como respuesta contra estas condiciones de estrés (Shulaev *et al*, 2009). Algunos factores de estrés abiótico, como la presencia de metales pesados, pH o la salinidad, pueden ser toleradas por las propias plantas dependiendo de su intensidad. Sin embargo, diversos organismos pueden aumentar la tolerancia contra dichos factores de estrés (Waller *et al*, 2005). Esta capacidad ha sido estudiada para ser aplicada en fitorremediación, ya que la presencia de organismos endófitos en las plantas incrementa la tolerancia ante la presencia de diferentes metales pesados en el suelo (Ying *et al*, 2016). En una aproximación para aislar organismos de plantas tolerantes a metales pesados, Alcántara-Martínez *et al*. (2018) obtuvo diferentes aislados microbianos a partir de la leguminosa *Acacia farnesiana*, la cual es tolerante a altas concentraciones de arsénico. Una de las hipótesis que tienen los investigadores es que esos microorganismos aislados pueden proveer protección a otras plantas.

Las condiciones de estrés biótico se presentan en las plantas cuando son atacadas por otros organismos, causando enfermedades. Sin embargo, la presencia de ciertos microorganismos es benéfica para las plantas al reducir la reproducción de las especies patógenas. Vetrivelkai *et al* (2010), trabajaron con diferentes bacterias endófitas aisladas de diversas regiones de India y encontraron que algunas cepas, entre ellas una identificada como *Methylobacterium sp.*, redujeron significativamente la cantidad de huevos y hembras adultas del nemátodo *Meloidogyne incognita*, un conocido parásito presente a nivel mundial

en plantas de Okra (*Abelmoschus esculentus L.*). De acuerdo con los autores, esta capacidad se debe a la producción de metabolitos como amoníaco, cianuro de hidrógeno y enzimas hidrolíticas por los organismos endófitos, afectando negativamente a los nemátodos.

### 2.2.2 Biofertilización

En los sustratos en los que de forma natural habitan las plantas existen nutrientes que son bioaccesibles, pero no están biodisponibles. En otras palabras, los nutrientes no pueden ser aprovechados por las plantas debido a una baja solubilidad, a que forman agregados con el sustrato o incluso a su complejidad química. Sin embargo, algunos microorganismos son capaces de mejorar la biodisponibilidad de estos nutrientes. A este mecanismo de promoción de crecimiento vegetal se le conoce como biofertilización. Por ejemplo, se ha demostrado como la presencia de bacterias de vida libre como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus pumilus* en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) permitía obtener el mismo rendimiento que plantas fertilizadas con productos químicos con base en nitrógeno. Ya que ambas bacterias tenían como característica la fijación de nitrógeno, proveían a las plantas de nitrógeno que fijaban del nitrógeno gaseoso presente en el aire (Adesemoye *et al*, 2009). De igual forma las bacterias fijadoras de nitrógeno que habitan en la filósfera de las plantas, principalmente en las hojas, son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico transformándolo en nutrientes que las plantas puedan asimilar. Además, debido a que la región de las plantas que habitan suelen ser las hojas y tallos, estos organismos cuentan con pigmentos que los protegen de la radiación solar (Mayz-Figueroa, 2004).

Los organismos fijadores de nitrógeno pueden presentar endofitismo o habitar de forma superficial en raíces y hojas. Otro trabajo que ha evidenciado la presencia de estos organismos fue presentado por Moyes *et al*, (2016) en el que compararon muestras tratadas con desinfección superficial y esterilización por autoclave. Su estudio evidenció la presencia de diferentes bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en las agujas de *Pinus flexilis*.

Por otro lado, el intercambio de nutrientes entre plantas y hongos se ha estudiado ampliamente llegando a exponer algunos de los mecanismos (Behie y Bidochka, 2014; Wang *et al*, 2017; ). Ferrol *et al*. (2002) determinaron que existe un efecto positivo de hongos micorrícicos sobre el transporte activo de fosfatos solubles del suelo a la planta, mientras que las raíces excretan azúcares como la sacarosa, que los hongos aprovechan como fuente de carbono y de energía. Arias-Mota *et al*, (2019) observaron que el intercambio de nutrientes puede promover el crecimiento de las plantas inoculadas con estos hongos. Ellos demostraron como la inoculación de hongos micorrícicos favorece el crecimiento de plantas

de tomate (*Solanum lycopersicum*) desde la germinación de las semillas. Esto debido a la capacidad de solubilización de fósforo, demostrado con el aumento de la concentración de fósforo en las hojas. De igual manera, la actividad saprófita de estos organismos les permite descomponer la materia orgánica presente en los sustratos produciendo compuestos de fácil asimilación para las plantas. Este efecto se demostró en un estudio realizado en Ecuador, acerca del crecimiento de Raygrass (*Lolium perenne*) y Trébol blanco (*Trifolium repens*) en presencia de un sustrato rico en materia orgánica. Se inocularon plantas con 2 hongos pertenecientes al género *Trichoderma*: *T. harzianum* y *T. viride* (Acurio-Vásconez y España-Imbaquingo, 2017). Las plantas inoculadas con los hongos presentaron un crecimiento mayor comparado a aquellas no inoculadas; al agregar materia orgánica al sustrato el efecto de la inoculación se acentuó demostrando el efecto positivo en la promoción de crecimiento vegetal por parte de los hongos en presencia de materia orgánica en el sustrato.

### 2.2.3 Fitoestimulación

La presencia de hormonas vegetales endógenas modifica la forma en que crecen diferentes sistemas celulares de las plantas. Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir compuestos que generan efectos similares en las plantas y, al tener relaciones cercanas con especies vegetales, regulan el crecimiento de estas (Dodd *et al*, 2010; Dudeja *et al*, 2021). Por ejemplo, organismos de vida libre como *Bacillus spp.* y *Pseudomonas putida* han demostrado tener la capacidad de producir auxinas, como ácido indol acético, el cual favorece el crecimiento de los sistemas de raíces permitiendo a la planta obtener nutrientes con mayor facilidad (Leveau y Lindow, 2005; Kumar *et al*, 2011). Existen diferentes fitohormonas, como las auxinas, las citoquininas, las giberelinas y el etileno. Todas estas hormonas se producen y regulan de forma organizada a lo largo del ciclo vital de una planta. Sin embargo, diversos microorganismos, así como condiciones medioambientales, pueden modificar la concentración de estas hormonas.

El etileno, es una hormona ligada al proceso de defensa de las plantas contra algunos insectos en especies vegetales como el maíz (Harfouche *et al*, 2006; Louis *et al*, 2015). También participa en la maduración de frutos y promueve la senescencia celular (Grbić y Bleecker, 1995; Lelievre *et al*, 1997), es decir, la muerte programada de las células de las plantas, usualmente ocasionada por estrés. Es por esta razón que diversos investigadores como Glick (2005), Glick *et al.* (2007) y Gontia-Mishra *et al.* (2014) han trabajado en la manera de reducir la concentración de etileno, mejorando la supervivencia de las plantas

en condiciones de estrés. Entre sus resultados, observaron como algunas BPCV eran capaces de producir la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa, que interrumpe la ruta biosintética del etileno produciendo amonio, reduciendo así la concentración de etileno en las plantas y aportando amonio como nutriente extra.

## 2.3 Compuestos reguladores de crecimiento vegetal

La fitoestimulación se refiere a la capacidad de ciertos microorganismos para modificar la concentración de compuestos reguladores de crecimiento vegetal. Como se mencionó anteriormente, los organismos promotores de crecimiento vegetal tienen la capacidad de producir algunos de estos compuestos.

Químicamente, los compuestos producidos por estos organismos pueden ser idénticos a algunas hormonas vegetales, o ser químicamente diferentes, pero tener efectos similares a compuestos endógenos.

### 2.3.1 Auxinas

Las auxinas fueron las primeras hormonas vegetales en ser caracterizadas y aisladas, siendo el ácido indol-3-acético (AIA) el primer compuesto de este tipo. Las plantas principalmente presentan esta forma, pero se ha descubierto que compuestos como el 4-cloro-indolacético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico son otras formas químicas naturales de las auxinas (Ludwig-Müller y Cohen, 2002). Las auxinas tienen un efecto muy variado en el crecimiento vegetal. Pueden promover la elongación de las células, la diferenciación celular, la dominancia apical, la promoción del desarrollo de raíces laterales y estimular la formación de nuevas raíces. De acuerdo con Jenik y Barton (2005) este efecto sobre las raíces se da desde el desarrollo embrionario de las células que da a lugar a la diferenciación celular, permitiendo una diferenciación dirigida. Posterior al descubrimiento de las auxinas se comenzaron a usar compuestos sintéticos con efectos similares, tales como el ácido indolbutírico o el ácido naftalenacético. Sin embargo, como ya se mencionó, diversos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar auxinas.

En algunos casos la producción de auxinas por parte de los microorganismos depende de otros compuestos como el triptófano que actúa como precursor, el cual es transformado mediante diferentes rutas hasta producir AIA (Spaepen y Vanderleyden, 2010). En la Tabla 1 se presentan diversas investigaciones asociadas con organismos productores de auxinas.

**Tabla 1.** Auxinas producidas por diferentes microorganismos.

<b>Bacteria</b>	<b>Producción de AIA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Tiempo de cultivo (h)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	2.23 $\pm$ 0.20	24	(Wang <i>et al</i> , 2020)
<i>Bacillus subtilis</i>	14.23 $\pm$ 0.32	24	(Wang <i>et al</i> , 2020)
<i>Pseudomonas putida</i>	0.5 $\pm$ 0.1	42	(Patten & Glick, 2002)
<i>Pseudomonas putida</i>	14.5 $\pm$ 0.5	42	(Patten & Glick, 2002)
<i>Pseudomonas putida</i>	26.2 $\pm$ 0.3	42	(Patten & Glick, 2002)
<i>Methylobacterium. mesophilicum</i>	2 - 14	-	(Ivanova <i>et al</i> , 2001)

### 2.3.2 Giberelinas

Las giberelinas se aislaron por primera vez de un cultivo del hongo patógeno *Gibberella fujikuroi*, el cual debido a la producción elevada de ácido giberélico producía plantas de un tamaño mayor, pero mermando la producción de granos de arroz (Malonek *et al.* 2005). En este estudio se buscó el mecanismo de acción de ácido giberélico, para desarrollar un compuesto antagonista a la producción de giberelinas evitando así la merma del desarrollo del grano.

También se ha visto un efecto positivo sobre la germinación de semillas, ya se ha demostrado su efecto en semillas latentes de *Jeffersonia dubia*, reduciendo el tiempo que les toma de forma natural para germinar (11 meses) a sólo 3 meses (Rhie *et al*, 2015).

### 2.3.3 Citoquininas

Las citoquininas son otro tipo de hormonas vegetales reportadas con actividad biológica. Químicamente son similares a la adenina, pero teniendo sustituyentes en el nitrógeno 6 lo que le da la actividad hormonal. Su efecto se centra en la proliferación celular de tejidos vegetales ya que en combinación con las auxinas promueven el inicio de un nuevo ciclo celular. Otro de sus efectos es la reducción de la dominancia apical, favoreciendo el crecimiento de yemas laterales. Actualmente se utilizan en la reproducción de tejidos *in vitro* y estudios de regeneración de tejidos vegetales (Cheng *et al*, 2010).

## 2.4 Asociaciones microalga-bacteria

La formación de una asociación microalga-bacteria, también llamada cocultivo, es una alternativa novedosa que se está aplicando en biotecnología. La aplicación de estas asociaciones consiste en estimular una relación simbiótica entre una especie de microalga y una especie de bacteria con el objetivo de que ambos microorganismos mejoren su crecimiento entre sí.

Este efecto en el crecimiento fue reportado por Gonzalez-Bashan *et al* (2000) quienes estudiaron la producción de pigmentos fotosintéticos por parte de la microalga *Chlorella vulgaris* cuando se encontraba en un cocultivo con la bacteria fijadora de nitrógeno *Phyllobacterium myrsinacearum*; este grupo observó un aumento significativo en la concentración de clorofila,  $\beta$  caroteno y luteína. Este incremento es un efecto del aumento en la actividad biológica de la microalga, la cual fue estimulada por la presencia de la bacteria.

Calatrava *et al* (2018) estudiaron el efecto de condiciones nutricionales limitantes sobre el establecimiento de una relación entre la bacteria *Methylobacterium spp* y el alga *Chlamydomonas*, lo que favoreció un crecimiento más rápido del cocultivo comparado con cultivos axénicos de *Methylobacterium spp*. Los autores mencionan que la limitación de los nutrientes es un factor clave para poder inducir una relación estable entre los microorganismos en un cocultivo.

Las asociaciones microalga-bacteria también puede aplicarse de forma exitosa para la remoción de contaminantes presentes en aguas residuales, como el amonio. Wanga *et al* (2015) reportaron un proceso de nitrificación usando un consorcio de bacterias nitrificantes de un reactor co-inoculado con las microalgas *Chlorella spp*, *Chlamydomonas sp*, *Stichococcus sp*. En este caso, el proceso consiguió eficiencias de nitrificación de hasta el 90% sin necesidad de aireación externa, debido al acoplamiento respiratorio de las bacterias con los microorganismos productores de oxígeno como son las microalgas.

### 2.4.1 Intercambio nutrimental

Las microalgas, debido a que son organismos autótrofos, tienen la capacidad de producir sus propios carbohidratos a partir de CO<sub>2</sub>, agua y energía lumínica. Por otro lado, las bacterias son organismos heterótrofos, por lo que requieren de carbohidratos externos para realizar los procesos bioquímicos necesarios para su reproducción, produciendo CO<sub>2</sub> como compuesto de desecho. En las interacciones microalga-bacteria ocurre un intercambio de compuestos entre ambos microorganismos, en donde, cada uno aprovecha los residuos del

otro y establecen un mutualismo nutrimental, en el que un organismo puede asimilar un nutriente y producir residuos aprovechables por el otro organismo. Uno de estos residuos es oxígeno producido mediante la fotosíntesis por las microalgas que, al estar en el medio donde habitan las bacterias, mejoran su biodisponibilidad para bacterias aerobias. De esta forma en un cocultivo microalga-bacteria se favorece el crecimiento de las bacterias.

Esta estrategia se ha probado y aprovechado para el tratamiento aguas residuales donde la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es muy alta. Para estos procesos, una fuente de oxígeno independiente a sistemas de aireación mecánicos aumenta la eficiencia. Por ejemplo, Karya *et al* (2013) propusieron un cocultivo de microalgas con bacterias nitrificantes para optimizar el proceso de nitrificación en aguas residuales, logrando obtener un 100% de nitrógeno nitrificado sin necesidad de aireación externa. La aplicación de este protocolo permitiría una reducción en los costos de operación de plantas de tratamiento de aguas residuales al no requerir sistemas complejos de aireación.

Otro ejemplo de la relación mutualista entre los organismos alga-bacteria es la modificación fisicoquímica de los compuestos en su medio. Se ha demostrado por Rengifo-Gallego, *et al* (2012) que la bioacumulación de cromo por parte del alga *Bostrychia calliptera* es mayor cuando se encuentra unida a una biopelícula en la que se encuentra un consorcio bacteriano que interactúa con el alga facilitando la incorporación del metal. La eliminación de esta biopelícula a través del uso de antibióticos revirtió esta captación. Sin embargo, dado que se trabajó con un consorcio bacteriano natural, es importante trabajar con el aislamiento, y posterior estudio, de un cocultivo alga-bacteria más controlado con respecto a los organismos que lo conforman, para identificar las interacciones que tienen las diferentes bacterias con las microalgas.

#### 2.4.2 Establecimiento de asociaciones microalga-bacteria

Para establecer un co-cultivo estable entre una microalga y una bacteria se requiere estimular una asociación entre ambos organismos. Como ya se ha mencionado, los microorganismos que establecen una relación mutualista intercambian nutrientes. Una forma de estimular esta relación es a través de la limitación de nutrientes, donde uno de los organismos es capaz de asimilarlos o sintetizarlos (Contreras-Angulo *et al*, 2019). Incluso hay nutrientes específicos, como las vitaminas, las cuales son un factor de crecimiento importante para las microalgas y que, de no suplementarse a los medios de cultivo, no crecen o mueren. Sin embargo, estos nutrientes pueden ser suplementados por una

bacteria que lo sintetice, produciendo una asociación basada en el intercambio de vitaminas (Kazamia *et al*, 2012).

Otro factor para tener en cuenta es el favorecimiento de las interacciones entre los microorganismos participantes en el cocultivo a través de la interacción física. Gonzalez y Bashan (2000) propusieron la inmovilización como técnica para asegurar la interacción física entre una microalga y una bacteria. Más adelante, Laxman Pachapur *et al*, (2015) propusieron esta técnica como una forma de reducción de los efectos inhibitorios durante la producción de metabolitos secundarios, ya que se reducía el efecto de inhibición por producto final.

## 2.5 Inmovilización de microorganismos

La técnica de inmovilización de microorganismo consiste en crear una película de un polímero que mantenga los organismos confinados físicamente. Las películas o soportes son inertes y permiten la libre difusión de los nutrientes y los desechos biológicos los organismos (Gonzalez y Bashan, 2000). La inmovilización es una técnica muy utilizada en múltiples industrias, como la alimentaria, la farmacéutica o el tratamiento de aguas residuales, ya que reduce la dificultad de separar los microorganismos de su medio de cultivo y de los compuestos de interés (Tatsuo Sumino, 1992). De acuerdo con Bouabidi *et al* (2018), para el tratamiento de aguas residuales se conoce el uso de diversos soportes de inmovilización de microorganismos. Dependiendo de si son soportes orgánicos e inorgánicos, cada uno cuenta con características fisicoquímicas específicas como la porosidad, la permeabilidad a los compuestos o la resistencia al pH que le permiten ser utilizados en diferentes condiciones.

El soporte o matriz de inmovilización más estudiado actualmente es el alginato de sodio que además de mantener estable un cultivo tiene la función de proteger el microorganismo de los compuestos tóxicos que se presenten en el medio de cultivo. Esto fue demostrado y aprovechado por Keweloh *et al* (1989) quienes usaron la inmovilización con alginato como matriz de inmovilización. En este estudio se observó como el fenol resulta un compuesto tóxico para los microorganismos pues inhibía su crecimiento. Sin embargo, se demostró que al aplicar una técnica de inmovilización se redujo el efecto negativo del fenol para el crecimiento bacteriano. El mismo efecto de protección contra la toxicidad del fenol fue reportado por Nazos y Ghanotakis (2021) quienes durante la biorremediación de fenol usando *Chlamydomonas reinhardtii* observaron como la cantidad de fenol degradado era mayor con matrices de alginato más concentradas. El alginato de sodio es un soporte

altamente usado por la facilidad de inmovilización y la alta disponibilidad, pero se continúan estudiando nuevas matrices. Chanratana *et al* (2018) estudiaron una alternativa para inocular suelos de cultivo. En su estudio usaron 2 matrices diferentes, Alginato y quitosano, para inmovilizar *Methylobacterium oryzae*. Estudiando la capacidad de liberación de la bacteria cuando se inoculó el suelo, se determinó que las propiedades del quitosano mejoraban la liberación del *M. oryzae* al medio al ser degradado en el suelo a menor velocidad, permitiendo una liberación lenta y prolongada. Además, se observó cómo la concentración de quitosano para inmovilizar al microorganismo afectaba también en su viabilidad, pues a partir de 2% (p/v) empezaba a reducir la supervivencia de los organismos, siendo mejor la concentración de 1.5%.

Las matrices anteriormente presentadas son de origen biológico, pero también se ha estudiado la aplicación de matrices sintéticas. Un ejemplo es el alcohol polivinílico (PVA) el cual es un polímero no tóxico y económico. Hanaki *et al.* (1994) estudiaron el efecto del pH y la presencia de compuesto tóxicos en bacterias metanogénicas, observaron como el PVA ha demostrado ser una buena matriz de inmovilización al no afectar negativamente a la supervivencia de los organismos inmovilizados.

Usualmente los cultivos a los que les aplica estas técnicas son cultivos axénicos por lo que el tratamiento tiene como función principal la protección de los organismos de las condiciones de su medio. Sin embargo, en el caso de la inmovilización de consorcios y cocultivos el principal objetivo de la inmovilización es el confinamiento de las diferentes especies de organismos dentro de un espacio reducido, manteniendo la estabilidad del cocultivo por más tiempo. Gonzalez y Bashan (2000) tomaron esto en consideración al aplicar sobre un cocultivo alga-bacteria una técnica de inmovilización utilizando alginato como matriz. Sus resultados indican al estar coinmovilizadas se aumentó la interacción entre los 2 organismos mejorando en este caso la producción de pigmentos fotosintéticos por parte del alga *Chlorella vulgaris*.

Este tratamiento también se ha visto en producción de otros compuestos de interés como la celulosa bacteriana. Se ha estudiado la producción de celulosa bacteriana potenciada por microalgas inmovilizadas que facilitan el reciclaje del carbono y oxígeno aumentando la eficiencia del proceso (Barroeta-Bonilla *et al.* 2019). En este caso la inmovilización se aplicó para proteger a las células del alga de las condiciones de cultivo de las bacterias productoras de celulosa, obteniendo de esta forma un cocultivo estable y eficiente.

La inmovilización de microorganismos se puede aprovechar incluso para su almacenamiento. Para mantener un cultivo celular es importante mantener las condiciones

de su medio estables, suministrando una fuente de carbono y energía constantemente. Sin embargo, un grupo de investigadores analizó la viabilidad de un cultivo de 3 cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal inmovilizadas. en perlas de alginato y demostraron que las rizobacterias inmovilizadas mantienen su viabilidad sin cambios después de 5 meses de almacenamiento, demostrando que la inmovilización de los cultivos también se aplica para el almacenamiento eficaz de los cultivos celulares (Quiroz-Sarmiento *et al.* 2019).

Por último, otro ejemplo es su aplicación en tratamientos microbiológicos de aguas residuales donde se han aplicado la inmovilización con polímeros de polietilenglicol sobre consorcios de bacterias nitrificantes. Las células inmovilizadas ahora podían ser contenidas en reactores de flujo continuo, manteniéndolas en confinamiento, evitando de esta forma pérdidas en la concentración celular del consorcio y aumentando la eficiencia del tratamiento (Tatsuo Sumino, 1992).

## 2.6 Estrés abiótico por la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad

Todos los organismos requieren ciertas condiciones que les permitan crecer de manera saludable. Cuando existe un cambio en estas condiciones, los organismos en respuesta activan una serie de mecanismos que les permita tolerar este cambio en el ambiente (Chee-Hock *et al.*, 2013). Estos mecanismos resultan en la producción de compuestos que, en muchos casos, son de interés biotecnológico (D'Alessandro y Antoniosi Filho, 2016; Jackson *et al.*, 2003). Las condiciones de estrés pueden tener 2 orígenes: la presencia de otro organismo, en cuyo caso es estrés biótico, o cambios en las condiciones ambientales, como temperatura, pH, humedad, etc., que generan estrés abiótico.

Como ya se mencionó, hay organismos endófitos que al establecer una relación mutualista con su hospedero les otorgan la capacidad para soportar diversas condiciones de estrés. La tolerancia a las sequías o a la alta salinidad de los suelos son algunos ejemplos de características de interés para los investigadores (Armada *et al.*, 2018; Sánchez-López *et al.* 2016). Los sustratos con alta salinidad o la presencia de elementos tóxicos, como el plomo, inducen la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en las plantas, pero los organismos endófitos que promueven el crecimiento vegetal pueden mejorar la tolerancia de las plantas ante estas condiciones (Li y Jiang, 2017).

Existen formas de generar condiciones de estrés que no dependan del sustrato o la infección de un organismo patógeno. Una de ellas es a través de la aplicación de una

corriente eléctrica de baja intensidad. Este tratamiento también puede conducir a la sobreproducción de ROS que generan un estrés oxidativo en los organismos (Velasco-Alvarez *et al*, 2017). Se ha visto que como una respuesta al estrés oxidativo, organismos como el hongo *Aspergillus niger* acelera su metabolismo. Esto se ha aprovechado como una estrategia de biorremediación, ya que al aplicar una corriente eléctrica de baja intensidad como condición de estrés se ve mejorada la degradación de hexadecano por este hongo (Velasco-Álvarez *et al*. 2011).

Sin embargo, los organismos tienen un límite en cuanto a la concentración de ROS y radicales libres que llegan a dañar las membranas de los organismos, produciendo una inactivación del cultivo (Zheng-Yang *et al*, 2018).

### 3 Antecedentes directos

Recientemente, en el laboratorio de residuos sólidos de la UAM-Iztapalapa, se aisló una microalga a partir de cultivos *in vitro* de *Acacia farnesiana*. Desde 2008, se han estudiado los mecanismos que le permiten a *A. farnesiana* tolerar y estabilizar elementos como plomo (Maldonado *et al.* 2011) y arsénico (Alcántara-Martínez *et al.* 2016, 2018). En el transcurso de varias pruebas *in vitro*, se observó la aparición de microorganismos unicelulares fotosintéticos en las raíces. Lo anterior no fue observado al inicio de las pruebas, demostrando que la proliferación iniciaba a partir de los tejidos de la leguminosa, similar a lo observado por Tremouillax-Guiller *et al.* (2002). El microorganismo se aisló y se identificó como un alga verde unicelular no móvil, perteneciente al género *Coccomyxa* (Alcántara-Martínez *et al.* 2022). Dicho género tiene una amplia distribución, gran amplitud ecológica (Malvasi *et al.* 2016) y es identificada comúnmente en ambientes terrestres y como fotobionte en líquenes (Tremouillax-Guiller y Huss, 2007). Este género ha mostrado resistencia y capacidades metabólicas importantes, desde la adaptabilidad a condiciones extremas como a ambientes ácidos (Ruiz-Domínguez *et al.* 2015) y altas concentraciones de elementos tóxicos (Koechler *et al.* 2016). Basado en lo anterior, la caracterización bioquímica y fisiológica de esta alga endófito es relevante debido a que, como habita en los tejidos de una planta que acumula altas concentraciones de Pb y As (Maldonado *et al.* 2011; Alcántara-Martínez *et al.* 2016, 2018), es probable que tenga un mecanismo para tolerar tales condiciones.

Así mismo, durante los ensayos con *A. farnesiana*, además del alga, también se aisló una bacteria del género *Methylobacterium*. Esta bacteria con pigmentos de color rosa es metilótrofa facultativa, es decir, tiene la capacidad de aprovechar fuentes de carbono de un único carbono, como metanol, formaldehído y metilamina (Kwak *et al.*, 2014). Está reportada como una BPCV, a través de mecanismos como fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas (Madhaiyan *et al.*, 2010). Se demostró que esta cepa de *Methylobacterium* – *M. oryzae* – contribuye a la adaptación y tolerancia de *A. farnesiana* a condiciones de estrés por arsénico, ya que su presencia estimula la producción de proteínas, clorofila y glutatión. Esta cepa también contribuye a mantener la salud de la planta en presencia de arsénico a través de un incremento en el mantenimiento energético y la homeostasis redox (Alcántara-Martínez *et al.* 2018). Basado en lo anterior, es probable que también exista una asociación mutualista entre el alga y la bacteria, por lo que es importante analizar la posibilidad de establecer una relación que permita aprovechar las capacidades de estos organismos para mejorar el crecimiento vegetal.

## 4 Justificación

Los organismos promotores de crecimiento vegetal (PCV) es una alternativa ecológica para aumentar el crecimiento de los cultivos vegetales, así como para enfrentar diferentes condiciones de estrés, por lo que la producción y uso de estos organismos representa una alternativa para producir cultivos saludables sin necesidad de la aplicación de agroquímicos. A su vez, el uso de una asociación simbiótica de una BPCV con una microalga es una estrategia que puede aprovecharse para estimular el metabolismo de ambos organismos, por lo que una asociación de *Coccomyxa sp.* con *M. oryzae* podría hacer más eficiente la producción de compuestos PCV.

Además, la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad como una condición de estrés puede modificar el metabolismo celular, por lo que al aplicarlo sobre *M. oryzae* podría mejorar la producción de auxinas, mientras que la aplicación en *Coccomyxa sp.* puede mejorar el intercambio nutrimental entre ambos organismos, mejorando la capacidad para producir compuestos que favorezcan el crecimiento vegetal.

## 5 Hipótesis

Con base en los antecedentes, este trabajo tuvo como hipótesis que: (i) la modificación de las condiciones nutrimentales favorecerá el intercambio de nutrientes entre *M. oryzae* y *Coccomyxa sp.*, permitiendo establecer un cocultivo estable y aumentará la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal; (ii) la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad, como condición de estrés abiótico, favorecerá la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal.

## 6 Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las condiciones nutrimentales y de un campo eléctrico de baja intensidad sobre el establecimiento de un cocultivo entre *Methylobacterium oryzae* y *Coccomyxa sp.* y la producción de compuestos promotores de crecimiento vegetal.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Analizar el crecimiento de *M. oryzae* y *Coccomyxa sp.* en función de las condiciones nutrimentales.
2. Caracterizar el reactor electroquímico con el medio de cultivo a diferentes densidades de corriente
3. Seleccionar al menos 2 intensidades de corriente para evaluar su efecto sobre *M. oryzae* y *Coccomyxa sp.*
4. Evaluar el efecto del campo eléctrico de baja intensidad sobre el crecimiento y la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal por *M. oryzae* y *Coccomyxa sp.* solas o en cocultivo.
5. Analizar cuantitativamente la producción de ácido indol acético como compuesto promotor de crecimiento vegetal en extractos del cocultivo.

## 7 Métodos y materiales

### 7.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental que se estableció para el cumplimiento de los objetivos propuestos se dividió en 3 etapas. En la Figura 1 se presenta un diagrama que permite observar el curso de estas etapas.

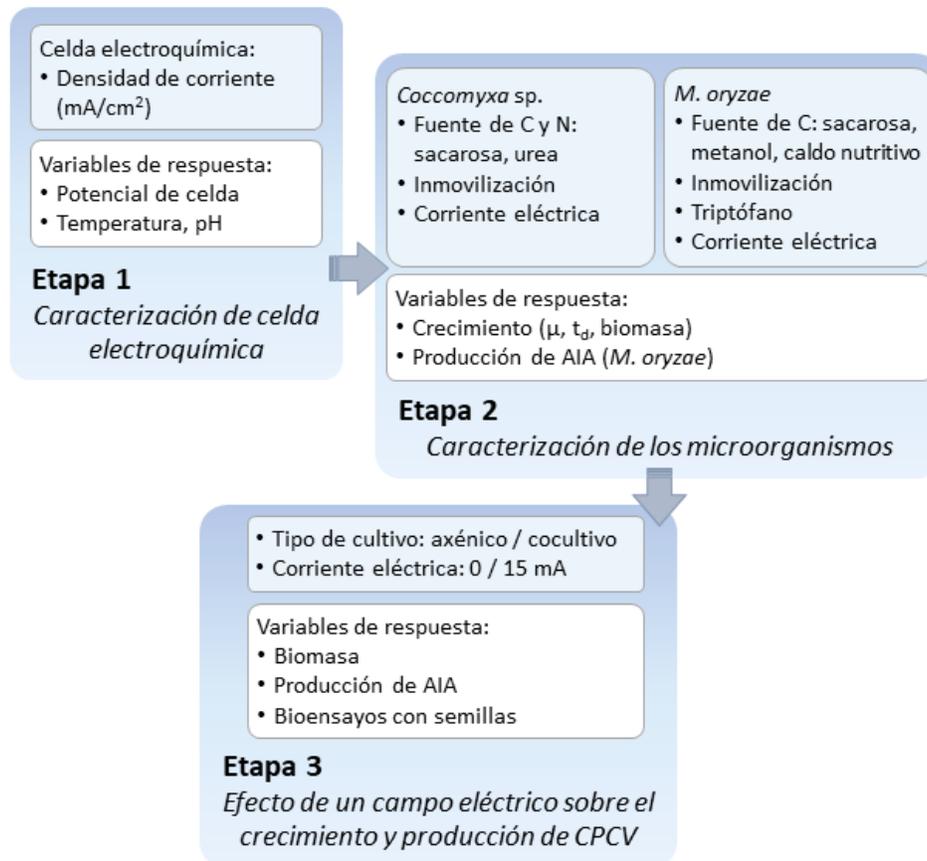


Figura 1. Diagrama de la estrategia experimental propuesta para el estudio.

En la primera etapa se realizó la caracterización del reactor electroquímico. La caracterización se realizó imponiendo diferentes intensidades de corriente eléctrica en condiciones abióticas y registrando el pH, la temperatura y el potencial de celda para cada intensidad, obteniendo una gráfica de densidad de corriente ( $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) contra potencial de celda (V) con la finalidad de seleccionar las densidades de corriente. Estos resultados

permitieron seleccionar al menos 2 densidades de corriente que se estudiaron sobre los microorganismos en la siguiente etapa.

En la segunda etapa se realizó una caracterización de *M. oryzae* y *Coccomyxa* sp. Se caracterizó sus parámetros de crecimiento ( $\mu$  y  $t_d$ ) y la producción de AIA como variables de respuesta. En esta etapa las variables independientes fueron la fuente de carbono, la aplicación de las densidades de corriente previamente seleccionadas en la etapa 1 y la inmovilización de los organismos. Con los resultados obtenidos en esta etapa, se seleccionó un medio de cultivo para los ensayos posteriores, así como una densidad de corriente para el tratamiento electroquímico.

Por último, en la tercera etapa se analizó el efecto tanto del campo eléctrico como de la formación del cocultivo sobre la producción de compuestos promotores de crecimiento vegetal y su efecto sobre la germinación de semillas de rábano (*Raphanus sativus*). En esta etapa, se establecieron como variables independientes el tipo de cultivo (axénico o cocultivo) y la aplicación del tratamiento eléctrico y como variables de respuesta se midió la producción de biomasa, la producción de AIA y el efecto de extractos del cultivo sobre semillas de rábano (bioensayos).

## 7.2 Material biológico

### 7.2.1 Bacteria endófitas

La bacteria endófitas *Methylobacterium oryzae* fue aislada de acuerdo con el protocolo de Alcántara-Martínez *et al* (2018). Fue aislada de plántulas de *Acacia farnesiana* cultivadas en medio Murashige-Skoog (MS, Sigma) en condiciones in vitro por 60 días. *M. oryzae* es una bacteria Gram negativa, aerobia, pigmentada rosa y metilótrofa facultativa. Se caracteriza por asimilar fuentes de carbono que contienen un átomo de carbono. Forma colonias de color rosa a rojo, de crecimiento lento, con temperatura de crecimiento óptimo de 28°C y un pH óptimo de 6.8 (Munusamy *et al.* 2007). Las bacterias del género *Methylobacterium* tienen reportadas una variedad de actividades como la fijación de nitrógeno (Madhaiyan *et al.* 2015) o la producción de fitohormonas como el AIA y citocininas (Palberg *et al.* 2022). Para la conservación de *M. oryzae* se hizo un cultivo por estría en cajas de Petri con agar nutritivo (BD Bioxon) y se mantuvieron en incubación a 28°C por 5 días. Posteriormente las cajas se sellaron con Parafilm, se metieron en bolsas de polipapel y se guardaron en refrigeración a 4°C.

Para la preparación del inoculo de *M. oryzae*, con una asa bacteriológica se tomó una colonia aislada de una de las cajas de Petri y se resuspendió en un matraz de 250mL que contenía 60mL de caldo nutritivo (BD Bioxon). El medio inoculado se mantuvo en incubación en un agitador orbital (Lab companion) a 28°C con una agitación de 100rpm durante 3 días. Dado que el crecimiento de la bacteria posterior a la refrigeración es más lento, se tomaron 500 µL del inoculo de *M. oryzae* para inocular otro matraz de 250 mL con 60mL de caldo nutritivo.

### 7.2.2 Alga endófito

La microalga *Coccomyxa sp.* fue aislada de plántulas de *Acacia farnesiana* cultivadas in vitro en medio MS en condiciones in vitro por 60 días (Alcántara-Martínez *et al.* 2022). *Coccomyxa sp.* es una microalga verde unicelular de forma redonda a ovalada (Řezanka *et al.* 2019). Suele habitar en ambientes ácidos que pueden llegar hasta un pH de 3 (Casal *et al.* 2011, (Garbayo *et al.* 2012). Las microalgas del género *Coccomyxa* han sido estudiadas debido a su capacidad para acumular lípidos (Wang *et al.* 2017; Wang *et al.* 2019; Aburai *et al.* 2020). Otra característica de interés para los investigadores es la capacidad de las algas del género *Coccomyxa* de crecer en medios con metales pesados como arsénico, cobalto, cadmio ; por lo que ha desarrollado la capacidad de producir compuestos antioxidantes (Tripathi *et al.* 2022; Pasqualetti *et al.* 2015; Řezanka *et al.* 2019).

Para la conservación de *Coccomyxa sp.* se cultivó en cajas Magenta (Sigma) con medio Murashige-Skoog (Sigma) adicionado con 10g/L de sacarosa y Phytigel (Sigma) con una concentración de 1.8g/L. Se incubaron en una cámara de crecimiento a 25°C iluminada con lámparas LED blancas con una intensidad de 40 µmol/m<sup>2</sup>s. Para reactivarla, se tomó parte de la biomasa conservada y se resuspendió en un matraz de 250mL que contenía 60mL de medio MS líquido adicionado con sacarosa 10 g/L a un pH de 5.8. El medio líquido se incubó en las mismas condiciones de manera estática.

### 7.2.3 Preparación de los inóculos

Los inóculos de cada organismo se prepararon de la siguiente forma: Para *M. oryzae*, se prepararon matraces de 250mL con 60mL de caldo nutritivo (BD Bioxon) estéril. El medio se inoculó con 500µL de un cultivo en fase exponencial (48 h) y se mantuvo en incubación a 28°C por 48 horas. Para *Coccomyxa sp.* se prepararon matraces de 250mL con 60mL de medio Murashige-Skoog (MS, Sigma) suplementado con sacarosa (Sigma) a una concentración de 10 g/L ajustando el pH a 5.8, e inoculando con 500µL de un medio fresco y se mantuvieron en incubación durante 7 días a 28°C. Para todos los ensayos, los cultivos

axénicos fueron inoculados hasta obtener una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL (para la microalga) o UFC/mL (para la bacteria). Cuando ambos organismos se cultivaron en cocultivo, se utilizó un inóculo 1:1 de cada organismo hasta obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  ( $0.5 \times 10^6$  células o UFC/mL).

### 7.3 Condiciones experimentales

#### 7.3.1 Condiciones de cultivo

A menos que se indiquen otras condiciones, todos los ensayos se incubaron en un agitador orbital (Lab companion) a 28°C, sin agitación o con agitación de 30 rpm (cuando así se indique) y bajo condiciones de iluminación artificial LED roja-azul con una intensidad de 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  con un fotoperiodo de 12 horas.

#### 7.3.2 Tratamiento electroquímico

Para la aplicación del tratamiento electroquímico se utilizaron células en la fase exponencial de crecimiento. Para tratar a cada microorganismo se tomaron 180 mL de inóculo el cual se distribuyó en tubos para centrifuga (Nest®) de 50ml (30 mL por cada tubo) y se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y el pellet de biomasa de cada tubo se resuspendió en 80mL de solución buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1M, el cual se vació en un reactor electroquímico. Para evitar contaminación, se sellaron las aberturas de los brazos del matraz con silicón y la boca del reactor se cubrió con un tapón de gasa y algodón. Una vez sellados los reactores se procedió a aplicar la corriente eléctrica durante 24 horas usando una fuente de poder (GPD-3303S GW Instek), ajustando la intensidad de corriente de acuerdo con tratamiento establecido. Posterior a los 24 horas, se desconectó el reactor de la fuente de poder, se retiró el contenido de los reactores con una pipeta de 10 mL estéril y se dividió en tubos para centrifuga de 50mL (40mL por cada tubo) los cuales se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de biomasa con 5mL de solución salina (NaCl 0.9%) estéril. Esta biomasa fue utilizada como inóculo para los experimentos que lo requirieron.

#### 7.3.3 Condiciones de inmovilización

Para inmovilizar las células de la microalga y de la bacteria, se modificó el protocolo propuesto por Gonzalez y Bashan (2000). Se recolectó la biomasa centrifugando las muestras a 3500 rpm durante 15 minutos y se retira el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 4 mL de una solución de alginato al 4% (p/v). La solución de alginato con biomasa se deja gotear mediante una jeringa hipodérmica de 5 mL sobre una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% (p/v). La solución con

las perlas se mantuvo en agitación durante 15 minutos para endurecerlas. Posteriormente, se filtraron y se enjuagaron con agua destilada estéril. En el caso de la inmovilización de un cocultivo, se resuspendieron ambos pellets en la solución de alginato.

#### 7.3.4 Separación de los organismos cultivados en cocultivo

Para separar los organismos del cocultivo y cuantificar el crecimiento de cada uno, se tomó una muestra de 10 mL en un tubo de 50mL. La muestra se centrifugó durante 7 minutos a 1000rpm. Posterior a ese tiempo se separó el sobrenadante, el cual contenía la biomasa de la bacteria y el pellet contenía la biomasa de *Coccomyxa sp.* El pellet se resuspendió en 10 mL de solución salina estéril. A ambas suspensiones se les midió la densidad óptica a 600nm.

### 7.4 Caracterización de los microorganismos

#### 7.4.1 Cinéticas de crecimiento con diferentes condiciones nutrimentales

Para caracterizar ambos microorganismos se realizaron cinéticas de crecimiento modificando las condiciones nutrimentales. Para el caso de la microalga, se utilizaron matraces de 250mL con 60mL de medio MS suplementado con sacarosa (Sigma-Aldrich) con una concentración de 1.5 g/L o 10 g/L. Además, se utilizó medio MS modificado, sustituyendo la fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y el  $\text{KNO}_3$ ) por urea (Merck), con una concentración de 3.5 g/L, que corresponde a la concentración de nitrógeno del medio original. Estos medios de cultivo se prepararon por triplicado y en todos los casos se ajustó el pH de los medios de cultivo a 5.8 usando una solución 1M de NaOH (J.T. Baker). Los matraces fueron inoculados con 1mL de cultivos de 7 días, que corresponde a una concentración inicial de  $2 \times 10^6$  células/mL. Los medios de cultivo inoculados se mantuvieron sin agitación a 28°C bajo una iluminación LED blanca ( $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) con un fotoperiodo de 12 h. Cada 8 horas se tomó una muestra de 1 mL, a la cual se le midió la densidad óptica (DO a 600 nm) para relacionarla con la concentración celular (células/mL) mediante una curva patrón.

En el caso de *M. oryzae* se usaron matraces de 250mL con 60mL de medio MS. Este medio fue suplementado con 1.5 g/L o 10 g/L de sacarosa. Para asegurar el crecimiento de la bacteria, también se evaluó el crecimiento en caldo nutritivo (BD Bioxon). En el caso del medio MS se ajustó el pH a 5.8 usando una solución 1M de NaOH. Cada matraz se inoculó con 250 $\mu\text{L}$  de un medio de cultivo de *M. oryzae*, que corresponde con una concentración

inicial de  $2 \times 10^6$  UFC/mL. Los medios de cultivo inoculados se mantuvieron con una agitación de 100 rpm a 28°C (Jeio tech). Para las cinéticas de crecimiento se tomaron muestras de 1mL cada 8 horas y se midió la densidad óptica para relacionarla con la concentración celular (UFC/mL) mediante una curva patrón. Cada condición se evaluó por triplicado.

#### 7.4.2 Producción de AIA en un medio con triptófano

El triptófano se ha reportado como un precursor de AIA en bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Khan *et al*, 2020; Patten y Glick, 2002; Kravchenko *et al*. 2004). Por lo tanto, con la finalidad de estudiar la producción de AIA y el crecimiento de *M. oryzae* en presencia de este aminoácido, se prepararon 3 medios MS con metanol (0.5% v/v) como única fuente de carbono y tres concentraciones de triptófano. En matraces de 125 mL se vaciaron 35mL de medio MS con pH de 5.8. Posterior a la esterilización, se agregaron 200  $\mu$ L de metanol y 5mL de solución de triptófano (Sigma-Aldrich) esterilizado por filtración, usando una membrana de esteres de celulosa con tamaño de poro de 0.22 $\mu$ m (Merk Milipore), obteniendo concentraciones finales de 0, 200 y 500  $\mu$ g/mL. Cada matraz se inoculó con 500 $\mu$ L de inóculo con concentración celular de  $6.25 \times 10^7$  UFC/mL para obtener una concentración final de  $7.8 \times 10^5$  UFC/mL. Los cultivos se mantuvieron por 7 días a 28°C con una agitación de 100rpm. Al finalizar el tiempo de cultivo se midió la densidad óptica y la producción de AIA.

#### 7.4.3 Cálculo de parámetros cinéticos

Para calcular los parámetros cinéticos, se utilizaron los datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento. Se realizó una transformación de estos datos, calculando el logaritmo natural de la biomasa para cada tiempo y se graficó con respecto al tiempo. A partir de estos datos, en una gráfica semilogarítmica se determinó el tiempo de la fase exponencial y se realizó una regresión lineal de forma:

$$\ln x = \mu \cdot t + \ln x_0$$

Donde  $x$  es la biomasa;  $\mu$  es la tasa específica de crecimiento (1/hora), calculada de la pendiente;  $t$  es el tiempo (h);  $x_0$  es la biomasa inicial. Además, el tiempo de duplicación ( $td$ ) se calculó a partir de la tasa específica de crecimiento de la siguiente forma:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

## 7.5 Tratamiento electroquímico

### 7.5.1 Reactor electroquímico

La unidad experimental utilizada en el presente estudio, consistió en una botella Wheaton de 250mL, adaptada con dos bocas a los costados para conectar los electrodos con la fuente de poder. Los electrodos utilizados como ánodo y cátodo fueron contruidos a partir de una placa de titanio recubiertos con óxido de rutenio ( $21\text{cm}^2$ ), colocados a los costados del interior del reactor y con una distancia de 2.5cm entre ambos electrodos.

Este tipo de electrodos favorecen las reacciones de oxidación y reducción del agua al cerrar el circuito eléctrico, además de presentar una alta resistencia a la corrosión y gran estabilidad. En la siguiente imagen se muestra el diseño del reactor electroquímico (Figura 2).

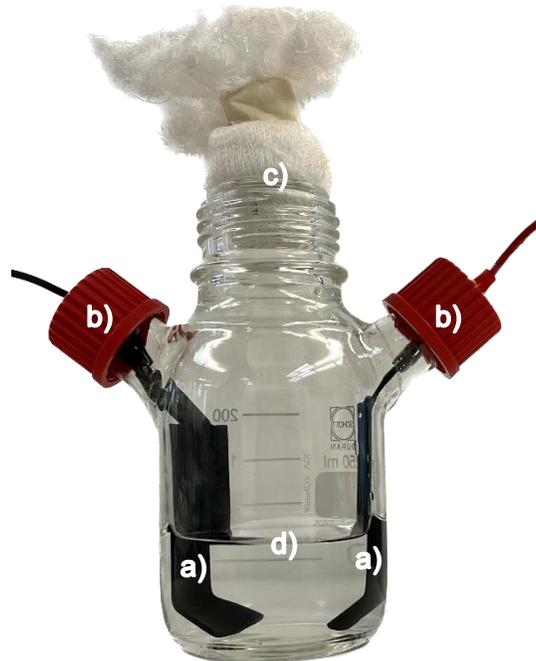


Figura 2. Diseño del reactor para los tratamientos electroquímicos. a) Electrodos de titanio recubiertos con óxido de rutenio. b) Tapa conexión de los electrodos con la fuente de poder. c) Tapón de algodón para evitar la contaminación del reactor. d) Volumen de la solución electrolítica.

### 7.5.2 Caracterización del reactor electroquímico

La caracterización del reactor electroquímico se realizó aplicando diferentes intensidades de corriente eléctrica (0 – 20 mA), a través de los electrodos colocados en el interior del reactor. La corriente eléctrica fue aplicada utilizando una fuente de poder (GPD-3303S GW Instek), y se dejó estabilizar durante 5 min antes de tomar la lectura del potencial de celda (V). Durante la aplicación de las distintas intensidades de corriente eléctricas, los potenciales de celda (V) se registraron por medio de la propia fuente de poder obteniéndose una gráfica de densidad de corriente ( $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) contra potencial de celda (V), a partir de la cual se seleccionaron las intensidades de corriente para los experimentos posteriores. Las variables de respuesta fueron; potencial de celda (V), cambios de temperatura en el interior del reactor y pH.

Las consideraciones realizadas para la selección de las intensidades de corriente fueron las siguientes: intervalos en donde se conserva la linealidad entre la corriente impuesta y el potencial de celda, y aumentos de temperatura dentro del sistema. La caracterización se realizó utilizando diferentes medios de cultivo y se realizó por triplicado

### 7.5.3 Efecto del tratamiento electroquímico

Con el objetivo de analizar el efecto del tratamiento electroquímico sobre el crecimiento de los microorganismos y la producción de AIA por *M. oryzae*, se trató electroquímicamente biomasa de cada microorganismos por separado. El tratamiento se realizó de acuerdo con lo descrito en la Sección 7.3.2. Los medios de cultivo se inocularon con la biomasa tratada con 5 y 15mA. En el caso de *Coccomyxa sp.* se usó medio MS con 1.5 o 5 g/L de sacarosa. Los medios de cultivo se inocularon con una concentración inicial de  $2.6 \times 10^6$  células/mL. Los medios inoculados se incubaron 12 días y se tomaron muestras de 1 mL cada 48 horas para medir la densidad óptica (600nm). Para *M. oryzae* se usó medio MS con 1.5g/L de sacarosa o 0.5% de metanol v/v como fuente de carbono. En ambos casos se adicionaron 500mg/L de triptófano. Los medios fueron inoculados con  $2.5 \times 10^6$  UFC/mL e incubados durante 12 días (Sección 7.3.1). Se tomaron muestras cada 24 horas a las cuales se les midió la densidad óptica a 600nm y la producción de AIA. Como control se siguió el mismo procedimiento que en la sección 7.3.2. pero sin aplicar una corriente eléctrica (0 mA).

### 7.6 Producción de AIA por un cocultivo inmovilizado

Para evaluar la producción de AIA *M. oryzae* y el cocultivo (*M. oryzae* – *Coccomyxa sp.*), se realizaron cuatro tratamientos: i) cocultivo libre, ii) cocultivo inmovilizado, iii) *M. oryzae*

libre y iv) *M. oryzae* inmovilizada. Para cada condición se prepararon 35mL de medio MS en matraces de 125mL, con 1.5g/L de sacarosa y triptófano con una concentración de 500µg/mL

Para establecer el cocultivo se inocularon los medios con un volumen determinado de inóculo concentrado hasta obtener una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  UFC/mL o células/mL siguiendo una proporción 1:1 (Sección 7.1.3). Para la inmovilización del cocultivo, se usó el mismo volumen para el inóculo del cocultivo libre, pero se le realizó el tratamiento de inmovilización (Sección 7.3.3). Las perlas obtenidas se agregaron al medio de cultivo.

Para el cultivo de *M. oryzae* libre, se inocularon los medios hasta obtener una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Para la inmovilización de la bacteria se siguió el mismo procedimiento descrito para el cocultivo (Sección 7.3.3). Las perlas obtenidas se agregaron al medio de cultivo.

Los medios inoculados (libres e inmovilizados) se incubaron por 16 días (Sección 7.3.1). Se tomó una muestra de 1 mL cada 24 horas y se le midió la producción de AIA.

## 7.7 Evaluación de la regulación del crecimiento por el cocultivo tratado

Para evaluar si los extractos producidos tienen efecto sobre el crecimiento vegetal, se realizaron bioensayos con semillas de rábano (*Rhapanus sativus*, Vita) (Leveau & Lindow, 2005) usando extractos de cultivos. Este ensayo se llevó a cabo en medio MS con 500 mg/L de triptófano y 5 g/L de sacarosa para los cultivos axénicos, y 1.5 g/L de sacarosa en el caso del cocultivo. Se inocularon los medios (Sección 7.2.3) de tal manera que se evaluaron seis tratamientos: (i) y (ii) *Coccomyxa* sp. con y sin tratamiento eléctrico; (iii) y (iv) *M. oryzae* con y sin tratamiento eléctrico; (v) y (vi) cocultivo alga-bacteria con y sin tratamiento eléctrico. Los inóculos para estos ensayos se trataron con un campo eléctrico con una intensidad de 15mA. Se tomaron muestras cada a los 7, 11, 15 y 21 días para estimar la biomasa microbiana y una muestra a los 21 días para obtener los extractos para los bioensayos. La biomasa de cada tratamiento fue cuantificada mediante la densidad óptica. Para el caso del cocultivo, una muestra de 15 mL se centrifugó durante 7 minutos a 1000 rpm con el fin de separar la biomasa bacteriana de la biomasa del alga. En el sobrenadante aún se encuentra en suspensión la bacteria, por lo que se tomó 1mL de este sobrenadante para estimar la biomasa mediante la densidad óptica. El pellet obtenido, correspondiente a la microalga se resuspendió en 15 mL de solución salina y, de igual manera, se tomó 1mL para estimar la biomasa mediante la densidad óptica.

Para la obtención de los extractos, se tomó una muestra de 15mL a los 21 días de cultivo y se centrifugó a 3500rpm por 15 minutos para retirar toda la biomasa. Se recuperó el sobrenadante al cual se le midió el pH, concentración de AIA y se usaron para realizar los bioensayos (sección 7.9.4). Cada extracto se preparó por triplicado y se contrastó con medio MS con triptófano (500mg/L) sin fuente de carbono y agua como controles.

## 7.8 Métodos analíticos

### 7.8.1 Cuantificación de biomasa

#### 7.8.1.1 *Methylobacterium oryzae*.

Para cuantificar la biomasa de *M. oryzae* se realizó una curva patrón que relaciona la biomasa (UFC/mL) con la densidad óptica. La biomasa se calculó por el método de dilución y recuento en placa, usando agar nutritivo. La densidad óptica se midió por espectrofotometría (UV-1900i Shimadzu) de la misma muestra a una longitud de onda de 600nm.

#### 7.8.1.2 *Coccomyxa sp.*

Para cuantificar la concentración celular de *Coccomyxa sp.* se realizó una curva patrón que relaciona la densidad celular (células/mL) con la densidad óptica. La biomasa fue cuantificada mediante el conteo directo en cámara de Neubauer. Para ello, se tomó la biomasa de un cultivo de *Coccomyxa sp.* de 7 días sobre medio MS con 10 g/L de sacarosa. La biomasa fue diluida con solución salina para obtener suspensiones con diferente concentración de biomasa. En cada suspensión se contaron las células usando una cámara de Neubauer y se midió la densidad óptica a 600nm.

### 7.8.2 pH

Para medir el pH de los medios de cultivo, se centrifugaron las muestras a 3500rpm por 15 minutos. El sobrenadante se traspasó a otro tubo donde se pudiera introducir el electrodo del potenciómetro Oakton 1100 calibrado usando soluciones estándar de 4.01 y 7.

### 7.8.3 Ácido indol acético (AIA)

La determinación cuantitativa de AIA se realizó mediante la técnica propuesta por Glickmann y Dessaux (1995) que, además de AIA, cuantifica indol-piruvato e indol-acetamida a través de su reacción con el reactivo de Salkowski (4.5 g/L de FeCl<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10.8 M) que resulta en la formación de complejos con color, que se cuantifican a 530 nm.

Una muestra de 1 mL se centrifugó a 10,000 rpm para retirar la biomasa. La mezcla de reacción se preparó con 500µL del sobrenadante de muestras libres de biomasa y 1000µL del reactivo de Salkowski. Una vez homogeneizadas, las muestras se incuban 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 530nm. La concentración de compuestos indólicos en las muestras se calcularon con el uso de una curva patrón (0.23 – 7.65 mg AIA/L) preparada con AIA (306 mg/L).

#### 7.8.4 Bioensayo con semillas

Con el propósito de evaluar el efecto que tienen los extractos obtenidos de los cultivos sobre el crecimiento vegetal se llevó a cabo un bioensayo con semillas de rábano (*Rhapanus sativus*, Vita) (Leveau & Lindow, 2005). Las pruebas se llevaron a cabo en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con un disco de papel filtro de 9 cm (Whatman 113). Con la finalidad de reducir la contaminación fúngica durante el bioensayo, las semillas se desinfectaron superficialmente con detergente comercial (1 g/L, 15 min), NaHClO (2%, 5 min) y etanol (70%, 1 min). Entre cada lavado las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril. A cada caja se le adicionaron 2.5mL del extracto a evaluar y se colocaron 10 semillas. Las cajas se cerraron con Parafilm y se mantuvieron en oscuridad durante 72 horas a temperatura ambiente (26°C) y posteriormente se colocaron bajo iluminación artificial LED durante 24 horas más. Como variables de respuesta se consideraron el índice de germinación, la elongación de raíces y el peso seco de las semillas germinadas. Se consideró que una semilla germinó cuando su raíz fue de al menos el doble de la longitud de la semilla. Las raíces se midieron usando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Para estimar el peso promedio de las semillas germinadas, cada papel filtro se secó (60°C, 72 h) y se registró el peso seco.

#### 7.9 Análisis estadísticos

El análisis estadístico para establecer diferencias significativas entre medias se realizó mediante el programa NCSS 2020 mediante ANOVA de una vía ( $\alpha=0.05$ ), y los grupos de diferencias significativas se analizaron mediante una prueba de Tukey-Kramer. El ANOVA se realizó al tiempo final establecido en cada experimento.

## 8 Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de cada experimento, así como una interpretación y discusión de éstos.

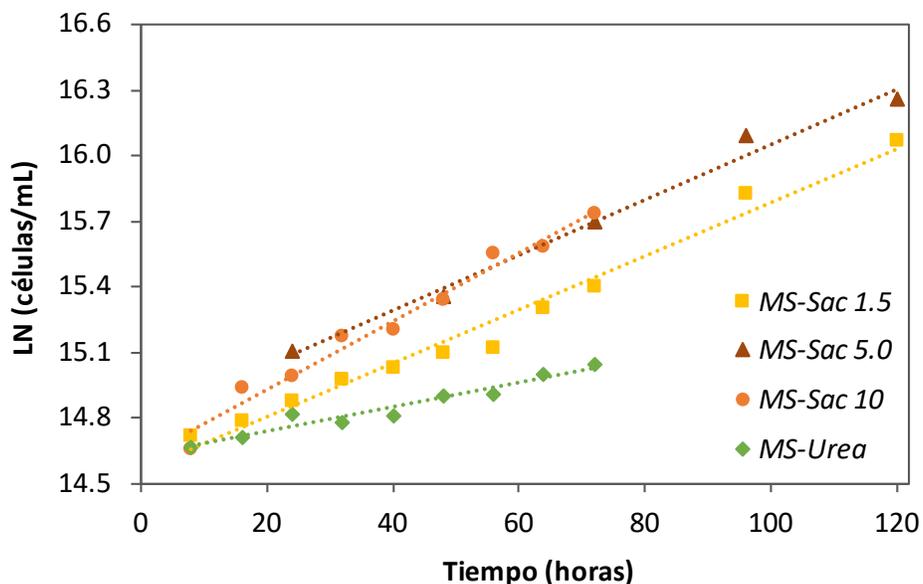
### 8.1 Caracterización del crecimiento

El crecimiento es el resultado de la división celular y, en el caso de microorganismos, se define como un aumento en el número de células. Las células microbianas tienen una vida finita y una especie se mantiene debido al crecimiento continuo de su población. En las bacterias, durante la división celular, una célula se divide en dos en un tiempo determinado, que se conoce como tiempo de duplicación; durante este tiempo, tanto el número total de células como la masa bacteriana se duplican. Este patrón repetitivo, en el que las células se duplican en un intervalo de tiempo constante, se denomina crecimiento exponencial. El tiempo de duplicación y el tiempo de la fase de crecimiento exponencial en una bacteria son variables y dependen de factores nutricionales y genéticos, además de las condiciones ambientales particulares (Madigan *et al.* 2018). En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización del crecimiento de *Coccomyxa sp.* y *M. oryzae* en función de diferentes fuentes de carbono, crecidas en cultivos axénicos y en cocultivo.

#### 8.1.1 *Coccomyxa sp.*

El crecimiento de *Coccomyxa sp.* se determinó usando medio MS con 1.5, 5 y 10 g/L de sacarosa como fuente de carbono y medio MS con urea como única fuente de carbono y nitrógeno. A partir de los datos de producción de biomasa, durante la fase de crecimiento exponencial, se estimaron la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación (td) para cada condición evaluada (Tabla 2). En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos para cada medio evaluado.

Como se observa (Figura 3 y Tabla 2), el crecimiento exponencial de *Coccomyxa sp.* inició desde las 24 horas del cultivo y se mantuvo hasta las 120 excepto para el medio MS con una concentración de sacarosa de 5g/L. La concentración de sacarosa en el medio MS sólo tuvo efecto significativo sobre el crecimiento cuando se encontró en 10 g/L, encontrando que  $\mu$  disminuyó de forma inversa a la sacarosa, mientras que td se incrementó de 1.84 (10 g/L de sacarosa) a 2.92 días (1.5 g/L de sacarosa). Para el caso de la urea, utilizada como única fuente de nitrógeno y de carbono, la  $\mu$  fue la más baja encontrada y el tiempo de duplicación aumentó a 5.19 días (Tabla 2).



**Figura 3.** Cinética de crecimiento para *Coccoomyxa sp.* en función de diferentes fuentes de carbono. Se muestran los datos promedio del ln de la biomasa (n = 3) en función del tiempo del cultivo, así como los datos considerados para el ajuste lineal. MS: Murashige-Skoog; Sac: sacarosa.

Lo anterior indica que *Coccoomyxa sp.* es una microalga verde mixótrofa (Casal et al. 2011), que puede crecer tanto en condiciones autótrofas como heterótrofas aprovechando el carbono orgánico en el medio. Los valores del td obtenidos en este trabajo son entre 2 y 3 veces menores que los reportados para la misma cepa de *Coccoomyxa sp.* crecida con 10 g/L de sacarosa en presencia de arsenato (Alcántara-Martínez et al. 2022), lo que podría atribuirse a las diferentes condiciones de cultivo, como el tipo de iluminación utilizada o la temperatura de cultivo. La sacarosa no es la única fuente de carbono que puede ser usada por las microalgas de este género. Por ejemplo, *Coccoomyxa subellipsoidea* es capaz de utilizar glicerol (Yu et al, 2018) y una combinación de glucosa con acetato de sodio (Wang et al, 2019) como fuentes de carbono. En contraste con los resultados de este estudio, Casal et al. (2011) compararon el crecimiento de *Coccoomyxa acidophila* en función de diferentes fuentes de nitrógeno, encontrando el máximo crecimiento en presencia de urea, mientras que el amonio (presente en el medio MS) favoreció la producción de clorofila y carotenoides, pero no encontró diferencias significativas en las tasas de crecimiento en cultivos con urea como fuente de N, con respecto los cultivos con nitrato y aire como fuentes de nitrógeno y carbono. Sin embargo en el presente estudio si se observó una diferencia significativa cuando la fuente de nitrógeno cambió de nitratos y amonio a urea. Esto se puede deber a que, a diferencia de *C. acidophila*, *Coccoomyxa sp.* analizada en este

proyecto no es capaz de usar con eficiencia la urea como fuente de carbono y nitrógeno. Otro aspecto a analizar es que, en este estudio la urea también contempló como fuente de carbono, por lo que no hubo suplemento de carbono inorgánico u orgánico para su crecimiento.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos obtenidos para *Methylobacterium oryzae* y *Coccomyxa sp.* en función de la composición del medio.

<b><i>Coccomyxa sp.</i></b>	<b><math>\mu</math> (días<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>t_d</math> (días)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
MS-Sac 1.5	0.295±0.021 <sup>a</sup>	2.35±0.275 <sup>a</sup>	0.979
MS-Sac 5	0.274±0.001 <sup>a</sup>	2.53±0.010 <sup>a</sup>	0.995
MS-Sac 10	0.376±0.028 <sup>b</sup>	1.84±0.147 <sup>b</sup>	0.978
MS-Urea	0.133±0.015 <sup>c</sup>	5.19±0.598 <sup>c</sup>	0.950
<b><i>M. oryzae</i></b>			
MS-Sac 1.5	0.482±0.066 <sup>a</sup>	1.55±0.171 <sup>a</sup>	0.975
MS-Sac10	0.449±0.059 <sup>a</sup>	1.45±0.186 <sup>a</sup>	0.985
MS-Metanol 0.5% v/v	0.380±0.010 <sup>a</sup>	1.83±0.156 <sup>a</sup>	0.983
Caldo nutritivo	1.415±0.231 <sup>b</sup>	0.49±0.077 <sup>b</sup>	0.950

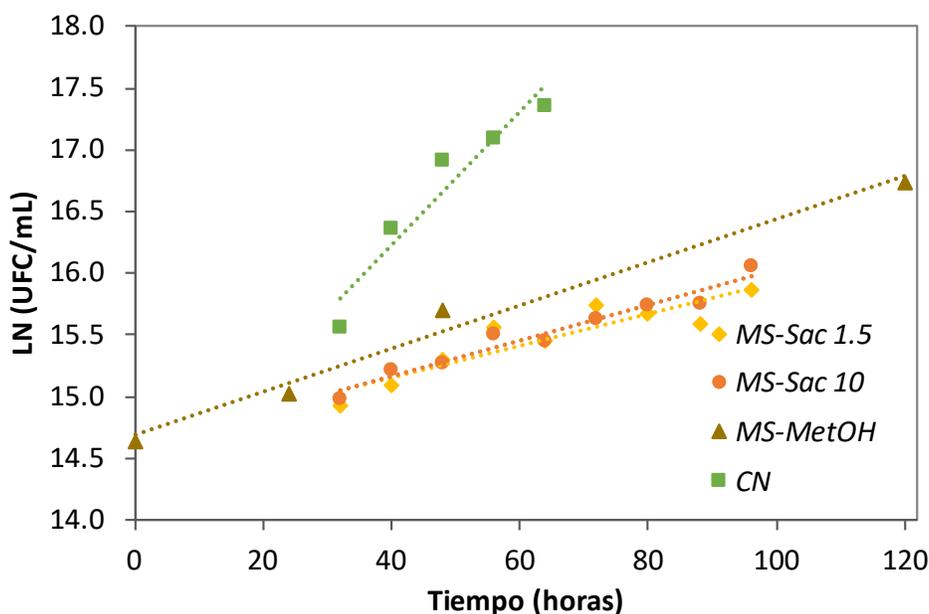
Se muestra promedio y desviación estándar de 3 repeticiones. Letras por columnas indican diferencias significativas entre medias.

### 8.1.2 *Methylobacterium oryzae*

El crecimiento de *M. oryzae* se determinó en medio MS con 1.5 y 10 g/L de sacarosa y 0.5% de metanol como únicas fuentes de carbono. A partir de los datos del crecimiento de biomasa durante el crecimiento exponencial de la bacteria, se estimaron la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) para cada condición. En la Figura 4 y en la Tabla 2 se presentan los datos obtenidos de los medios de cultivo evaluados.

Como se observa, la concentración de sacarosa en este caso no tuvo un efecto significativo sobre la velocidad de crecimiento, así como el metanol como fuente de carbono. El único medio de cultivo que presentó una diferencia significativa fue el caldo nutritivo (CN), obteniendo una  $\mu$  aproximadamente 3.5 veces mayor que las  $\mu$  del medio MS. El CN es un medio rico en aminoácidos, mientras que el MS contiene casi exclusivamente minerales. Por lo tanto, la mayor limitante del crecimiento de *M. oryzae* en medio MS es la síntesis de aminoácidos requeridos para su crecimiento. Sin embargo, en cuanto a la fuente de carbono, el cambio de sacarosa a metanol no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento.

Como se observa, el crecimiento exponencial de *M. oryzae* comienza desde las 32 horas manteniéndose hasta las 64 horas en el CN y hasta 96 horas en el medio MS. El crecimiento de *M. oryzae* en CN es mayor, por lo que se llega a la fase estacionaria del crecimiento en un periodo más corto que en el medio MS (Madigan *et al.* 2018).



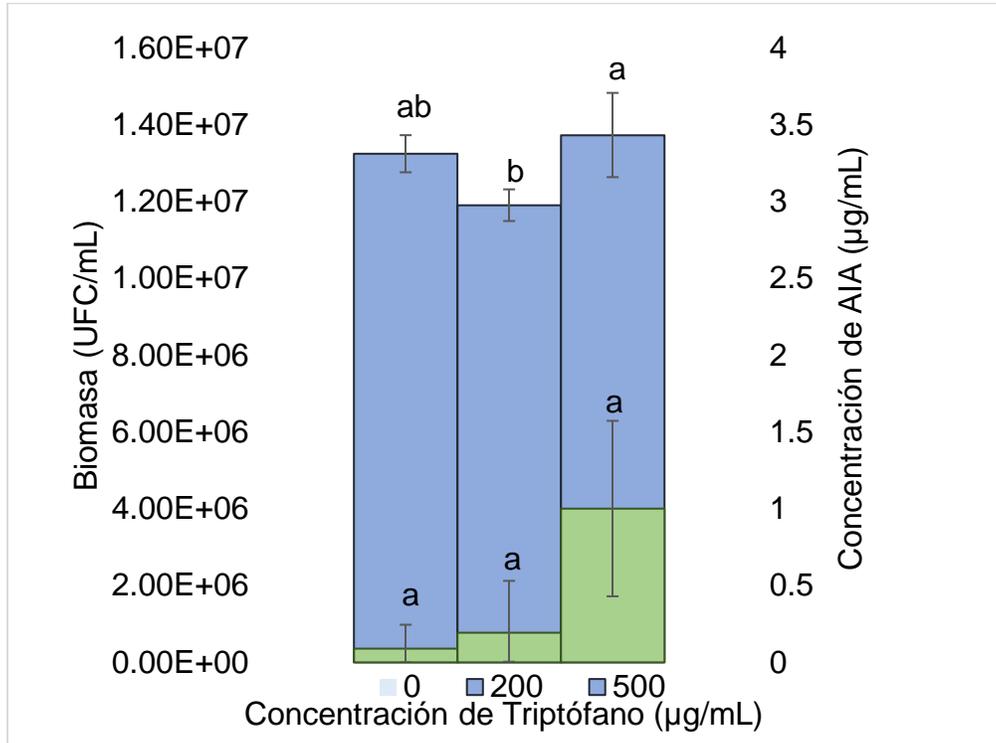
**Figura 4.** Cinética de crecimiento de *M. oryzae* en diferentes en función de las fuentes de carbono. Se muestran los datos promedio del ln de la biomasa (n=3) en función del tiempo del cultivo, así como de los datos considerados para el ajuste lineal.

## 8.2 Producción de AIA por *M. oryzae*

El género *Methylobacterium* está conformado por bacterias metilótrofas facultativas, capaces de consumir fuentes de carbono de un solo carbono, y las cuales tienen la capacidad de producir diversas enzimas que inducen a la resistencia sistémica o compuestos como citoquininas, auxinas y giberelinas que promueven el crecimiento de las plantas con las que se asocian (Ivanova *et al.*; 2001. Palberg *et al.*; 2022).

Se analizó la producción de AIA por parte de *M. oryzae* en presencia de triptófano (Trp), considerado como un precursor de AIA, ya que estimula su producción en diversos organismos (Kravchenko *et al.* 2004; Patten y Glick, 2002). El crecimiento de la bacteria en presencia de Trp se muestra en la Figura 5. La concentración del aminoácido modificó significativamente la producción de biomasa cuando se suplementó el medio MS con 200 y 500 mg/L, obteniendo concentraciones de  $1.19 \times 10^7$  y  $1.37 \times 10^7$  UFC/mL respectivamente.

Sin embargo, el análisis estadístico indica que el medio MS sin Trp no presentó una diferencia significativa con los medios con Trp. En el caso de la producción de AIA, tampoco existe una diferencia significativa de la producción de AIA a los 9 días entre las 3 condiciones.



**Figura 5.** Producción de Biomasa (barras verdes) y de AIA (barras azules) por *M. oryzae* en función de la concentración de triptófano. Crecimiento de 9 días en medio MS con metanol 0.5% como única fuente de carbono. Letras en cada grupo de barras indican diferencias significativas.

Estos resultados difieren con lo mencionado por Palberg et al. (2022), quienes no detectaron producción de AIA por *M. oryzae* en un medio con 0.5% v/v de metanol, como única fuente de carbono, suplementando con 510 mg/mL de Trp. Esta diferencia podría atribuirse a la diferente composición de los medios de cultivo utilizados, así como a las características particulares de cada cepa de *M. oryzae* estudiada. En este caso y, dado que buscamos la producción de CPCV, la cepa utilizada en este estudio produce AIA por lo que es importante manejar las mismas condiciones en un futuro.

### 8.3 Efecto de un campo eléctrico en el crecimiento microbiano

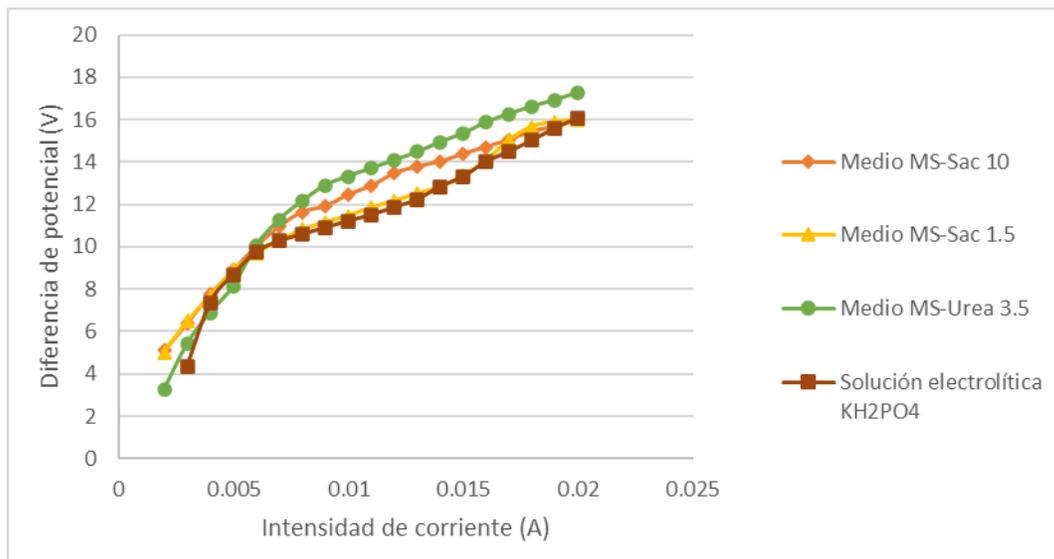
La aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad es una forma de generar estrés abiótico sobre los organismos, con la finalidad de favorecer cambios en su metabolismo que puedan ser aprovechados para mejorar la producción de metabolitos o el consumo de ciertas fuentes de carbono (Velasco-Alvarez *et al.* 2011), por lo que es importante seleccionar adecuadamente la intensidad y el tiempo de exposición de la corriente eléctrica pues, de ser demasiado alta puede provocar muerte celular (Brinkman *et al.* 2016). Para evitar este tipo de efectos en las células realizar la caracterización del reactor electroquímico y seleccionar las intensidades de corriente para los tratamientos posteriores.

#### 8.3.1 Caracterización del reactor y selección de las intensidades de corriente eléctrica

La caracterización del reactor electroquímico fue realizada con el fin de determinar los valores que adquiere el potencial de celda, al imponer diferentes intensidades de corriente eléctrica. Esto se hace por medio de los electrodos a través del medio de cultivo. En este experimento, se obtuvo una gráfica (Figura 6) de densidad de corriente ( $\text{mA/cm}^2$ ) contra potencial de celda (V).

La caracterización se realizó sobre 4 medios diferentes medios MS con sacarosa a diferentes concentraciones (1.5, 10 g/L), medio MS con urea (3.5 g/L) y solo solución electrolítica ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1M), observando un incremento en el potencial de celda (V) conforme aumenta la densidad de corriente ( $\text{mA/cm}^2$ ) en todos los casos.

Al inicio de la caracterización se logra preciar un cambio en la pendiente a partir de 5 –6mA. Esto puede deberse principalmente a que la fuente de poder utilizada no tiene la suficiente resolución para aplicar intensidades de corriente tan bajas (menores a 4mA), por lo que fue complicado estabilizar la intensidad de corriente eléctrica. Sin embargo, a partir de 5-6mA la aplicación de la corriente eléctrica fue estable. En el caso del medio MS con urea se observó el mayor potencial de celda con respecto a los otros medios. Esto se debe a que a este medio se le sustituyó con urea las otras fuentes de nitrógeno como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , obteniendo una menor concentración de sales presentes, y por ende una mayor resistencia al paso de la corriente eléctrica. Mientras tanto, los otros medios la concentración de sales es mayor, y por ende funcionan mejor como un electrolito, disminuyendo la diferencia de potencial. Sin embargo, podemos observar como en la Figura 6 no hay una diferencia notable entre el potencial de celda y los medios de cultivo a diferentes intensidades de corriente aplicadas.



**Figura 6.** Comportamiento de la diferencia de potencial en relación con la intensidad de corriente aplicada en los diferentes medios analizados. Los datos representan la diferencia de potencial promedio (n=4) medida para cada intensidad de corriente. Realizado en condiciones abióticas.

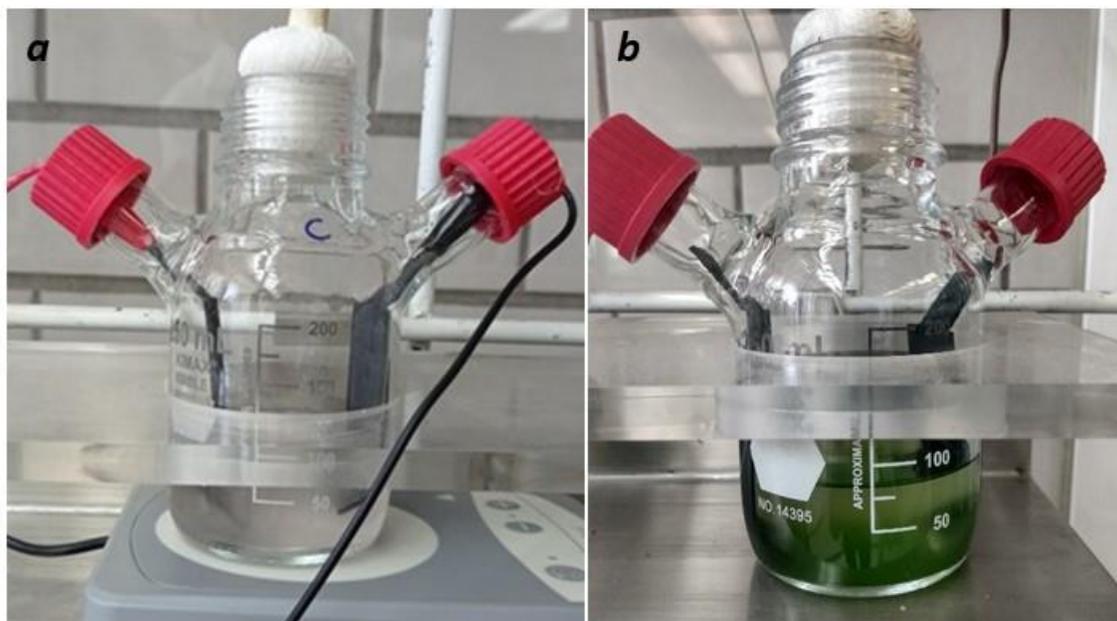
A partir de estos resultados (Figura 6) se seleccionaron las intensidades de corriente para los tratamientos posteriores. La selección se realizó considerando los intervalos de potencial de celda (V), temperatura y con base en intensidades de corriente utilizadas en trabajos similares al presente estudio.

Durante la caracterización se observó una temperatura constante (27 °C) y un aumento lineal del potencial de celda a medida que la intensidad de la corriente aumentaba. El intervalo seleccionado fue entre 5 y 20 mA, intervalo donde se observó un comportamiento como una resistencia al paso de la corriente, es decir, una estabilidad en la intensidad de corriente.

Dentro del intervalo de corriente seleccionado, se eligieron dos intensidades de corriente para los tratamientos, para evaluar el efecto de la corriente sobre el crecimiento de los organismos y la producción de AIA. Las dos intensidades de corriente seleccionadas fueron de 5 mA y 15 mA, que de acuerdo con el área de los electrodos corresponden a 0.24 y 0.71 mA/cm<sup>2</sup> respectivamente.

### 8.3.2 Efecto del tratamiento electroquímico sobre el crecimiento microbiano

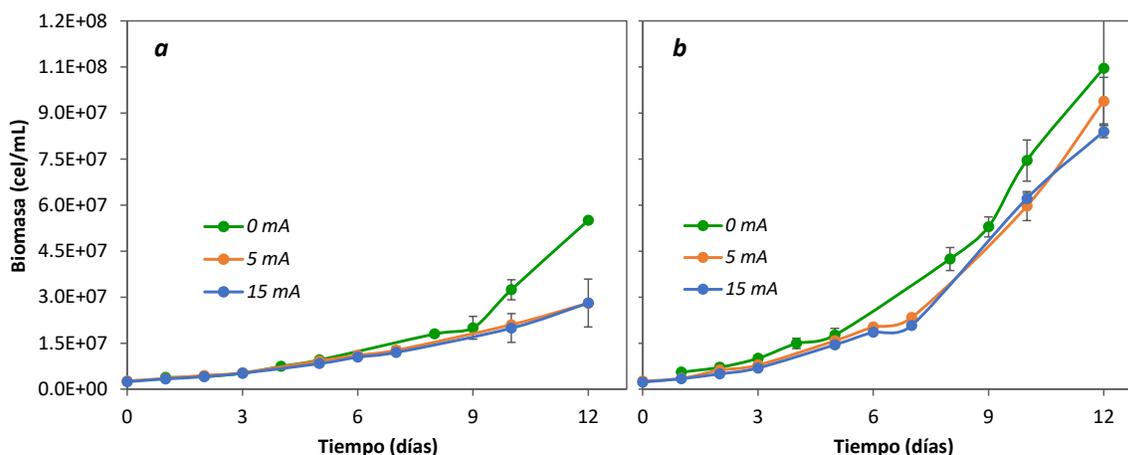
El tratamiento electroquímico tiene diversos efectos sobre el crecimiento de los organismos. Estos efectos dependen, entre otros factores, de la intensidad de la corriente eléctrica, del microorganismo y del tiempo de aplicación (Krishnamurthi *et al.* 2020). Con el objetivo de determinar el efecto de un campo eléctrico de baja intensidad sobre el crecimiento de *M. oryzae* y *Coccomyxa sp.* bajo diferentes condiciones de cultivo y, con base en los resultados de la caracterización (Figura 6), la biomasa de cada organismo se trató previamente con una de las intensidades de corriente (5 y 15 mA) durante 24 h. La aplicación fue durante la fase de crecimiento exponencial, y la biomasa resultante se utilizó como inóculo para evaluar el efecto del campo eléctrico en diferentes condiciones de concentraciones de sacarosa (1.5 y 5 g/L).



**Figura 7.** Configuración del reactor para el tratamiento electroquímico de *M. oryzae* (a) y *Coccomyxa sp.* (b).

En el caso de *Coccomyxa sp.*, se cuantificó el crecimiento utilizando dos concentraciones de sacarosa (1.5 y 5 g/L) ya que, con la finalidad de posteriormente estimular el intercambio de nutrientes entre los organismos cuando se forme el cocultivo, se limitó la concentración de fuente de carbono. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. Como se observa (Figura 8a), la aplicación de corriente eléctrica causó una disminución en el crecimiento de *Coccomyxa sp.* a partir de los 7 días de cultivo independientemente de la

concentración de sacarosa, y la intensidad de corriente aplicada (5 y 15mA) con respecto al control. Asimismo, se observó que el aumento en la concentración de sacarosa incrementó la tasa de crecimiento a partir de los 7-8 días de cultivo (Figura 8b). A pesar de que la corriente eléctrica disminuyó el crecimiento, en presencia de 5 g/L de sacarosa, este cambio no fue evidente con respecto al control sin corriente a los 12 días de cultivo.



**Figura 8.** Curvas de crecimiento de *Coccoxyxa sp.* en ausencia (0mA) y en presencia del tratamiento electroquímico (5mA y 15mA) crecida en medio MS con dos concentraciones de sacarosa: (a) 1.5g/L y (b) 5 g/L. Se muestra el promedio del crecimiento (n=3).

En la Tabla 3 se presentan los parámetros cinéticos estimados con los datos de crecimiento de *Coccoxyxa sp.* Estos datos indican que la aplicación de una corriente eléctrica de baja intensidad tuvo un efecto negativo sobre la  $\mu$  y el  $td$  en el medio con 1.5 g/L de sacarosa. En este caso el tratamiento eléctrico disminuyó significativamente la  $\mu$  (~10%) e incrementó el  $td$  (~12h). Sin embargo, con la concentración de sacarosa de 5g/L se registró un efecto positivo en el valor de  $\mu$  (~15%) y una disminución en el  $td$  (~15%).

Estos resultados han sido estudiados y aprovechados por Choi *et al.* (2019) quienes mejoraron la producción ácidos grasos poli-insaturados en *Chlorella sp.* KR-1 mediante la aplicación de una corriente eléctrica de 31mA (81 mA/cm<sup>2</sup>) por 4 h. En comparación, en nuestro trabajo se aplicó una densidad de corriente similar (0.71 mA/cm<sup>2</sup>) pero por un periodo de tiempo mayor (24 h), por lo que este efecto podría observarse dentro de este trabajo.

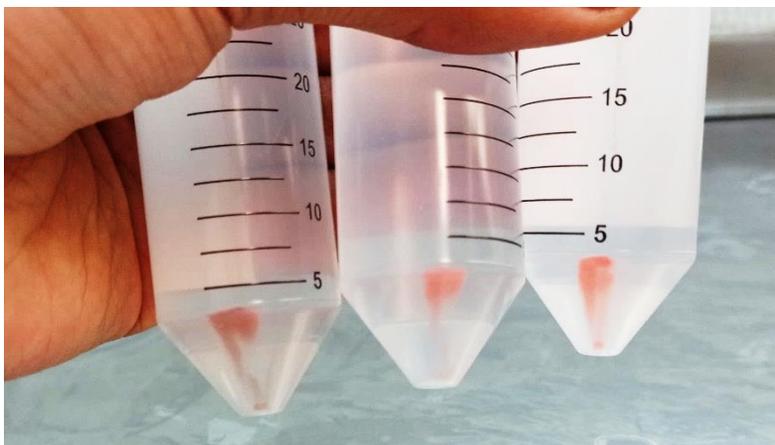
**Tabla 3.** Efecto de la intensidad de corriente y la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de *Coccomyxa sp.*

Intensidad de corriente (mA)	Concentración de sacarosa (g/L)	$\mu$ (días <sup>-1</sup> )	$t_d$ (días)	R <sup>2</sup>
0	1.5	0.229±0.001 <sup>a</sup>	3.01±0.01 <sup>a</sup>	0.990
	5.0	0.253±0.006 <sup>a</sup>	2.74±0.06 <sup>a</sup>	0.995
5	1.5	0.199±0.008 <sup>b</sup>	3.47±0.13 <sup>b</sup>	0.987
	5.0	0.294±0.002 <sup>c</sup>	2.35±0.02 <sup>c</sup>	0.990
15	1.5	0.199±0.011 <sup>b</sup>	3.46±0.20 <sup>b</sup>	0.990
	5.0	0.307±0.008 <sup>c</sup>	2.25±0.06 <sup>c</sup>	0.990

Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones  $\pm$  la desviación estándar. La R<sup>2</sup> indica el ajuste para el rango de datos considerado para obtener  $\mu$  y  $t_d$ . Letras diferentes por columna indican diferencias significativas.

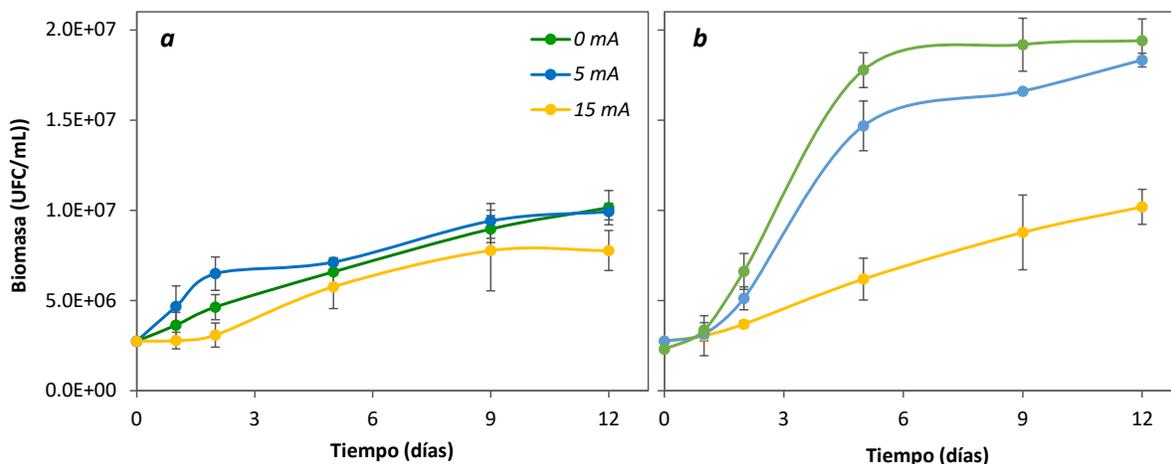
Otro resultado interesante es que en el medio con 1.5g/L de sacarosa, la fase Lag se extendió hasta los nueve días, mientras que en medio con 5g/L de sacarosa prácticamente no se presentó fase Lag. Esta fase Lag no se presentó a la hora de realizar la caracterización del crecimiento de *Coccomyxa sp.* por lo que el pretratamiento con la corriente eléctrica puede ser la responsable de la extensión y detección de esta fase en estos cultivos.

Para el caso de *M. oryzae*, se evaluó el crecimiento con metanol (0.5% v/v) como única fuente de carbono y con 1.5 g/L de sacarosa, aplicando 5 y 15 mA. En ambos casos y con el fin de promover la producción de AIA, los medios fueron adicionados con triptófano (Patten y Glick, 2002). Un efecto que se observó justo después del tratamiento electroquímico fue una pérdida de la pigmentación rosa de las células bacterianas concentradas (Figura 9) que también estuvo relacionada con la intensidad de la corriente aplicada, es decir, las células que fueron tratadas con una mayor intensidad (15mA) fueron las que presentaron mayor pérdida de pigmentación. Este cambio en la coloración indica un cambio en la producción de pigmentos por parte de *M. oryzae* o un cambio en la concentración. El color rosa de esta bacteria se atribuye a la producción de carotenoides (Van Dien *et al.* 2003), por lo que el tratamiento eléctrico de alguna manera influye en las rutas biosintéticas de estos pigmentos o en su acción como antioxidantes.



**Figura 9.** Cambio de coloración en *M. oryzae* posterior al tratamiento eléctrico. De izquierda a derecha: Tratamiento de 15mA, tratamiento de 5 mA, control sin tratamiento.

Con el fin de cuantificar los efectos de la corriente eléctrica y la fuente de carbono sobre el metabolismo de *M. oryzae*, se estimaron los parámetros cinéticos en la fase de crecimiento exponencial (Tabla 4). Se observó que el crecimiento bacteriano a los 12 días de cultivo fue mayor (1.9 veces) en el medio con metanol con respecto al medio con sacarosa (Figura 10). En este caso, la aplicación de corriente eléctrica tuvo un efecto más marcado que para el caso de *Coccomyxa* sp. y, al aumentar la intensidad, el crecimiento disminuyó significativamente con respecto a los respectivos controles, registrándose la menor producción de biomasa en los tratamientos con 15 mA.



**Figura 10.** Curvas de crecimiento de *M. oryzae* sin tratamiento electroquímico (0 mA) y tratada con una corriente eléctrica (5 y 15 mA), crecida en medio MS suplementado con triptófano (500 mg/L) y con (a) sacarosa o (b) metanol como única fuente de carbono.

Como se observa, tanto la fuente de carbono como el tratamiento electroquímico tuvieron un efecto significativo sobre la  $\mu$  y el  $t_d$ . En los medios sin corriente eléctrica, el metanol aumentó la  $\mu$  y disminuyó el  $t_d$  (~1 día) con respecto al medio con sacarosa. En los medios con sacarosa, la fase exponencial se registró hasta las 48 h de cultivo, excepto en el tratamiento con 15 mA, en donde hubo una fase *Lag* de 24 h y la bacteria creció exponencialmente hasta las 120 h. En el caso del metanol, no hubo cambios significativos en  $\mu$  ni  $t_d$  por efecto del tratamiento con 5 mA con respecto al control sin corriente. Sin embargo, el tratamiento con 15 mA disminuyó significativamente la  $\mu$  y aumentó el  $t_d$  en 2.5 días con respecto al tratamiento control. La fase exponencial para el metanol se registró entre 0 y 120 h. La diferencia de velocidades de crecimiento tan marcadas entre la sacarosa y el metanol como únicas fuentes de carbono se puede deber al hábitat de la bacteria. Comúnmente se suelen encontrar especies de bacterias metilótrofas en la rizosfera, en la cual también se puede encontrar metanol como exudado radicular por parte de las plantas (Doornbos *et al.* 2012, Dourado *et al.* 2014), por lo que es de esperarse que estas bacterias estén más adaptadas a aprovechar esta fuente de carbono. Por otro lado, el efecto de la corriente eléctrica tuvo un efecto variado, siendo remarcable el efecto que tuvo en el medio con metanol como única fuente de carbono. En este medio, el efecto de la aplicación de la corriente eléctrica disminuyó significativamente la  $\mu$ , llegando a disminuirla un 55% en el tratamiento con 15mA.

**Tabla 4.** Efecto de la intensidad de corriente y la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de *M. oryzae*.

Intensidad de corriente (mA)	Fuente de carbono	$\mu$ (días <sup>-1</sup> )	$t_d$ (días)	R <sup>2</sup>
0	Sac.	0.258±0.078 <sup>ab</sup>	2.899±1.05 <sup>ab</sup>	0.989
	Met.	0.380±0.032 <sup>a</sup>	1.832±0.157 <sup>a</sup>	0.980
5	Sac.	0.427±0.073 <sup>a</sup>	1.657±0.306 <sup>a</sup>	0.985
	Met.	0.350±0.016 <sup>a</sup>	1.984±0.088 <sup>a</sup>	0.986
15	Sac.	0.221±0.054 <sup>b</sup>	3.257±0.77 <sup>ab</sup>	0.967
	Met.	0.167±0.054 <sup>b</sup>	4.496±1.649 <sup>b</sup>	0.961

Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones  $\pm$  la desviación estándar. La R<sup>2</sup> indica el ajuste para el rango de datos considerado para obtener  $\mu$  y  $t_d$ . Letras diferentes por columna indican diferencias. Sac: Sacarosa, Met: Metanol

La tasa de crecimiento en el medio con metanol cuando *M. oryzae* fue tratada con 15mA fue más de 3 veces menor comparada con la velocidad en el mismo medio con biomasa tratada con 5mA, por lo que cuando el metanol es la única fuente de carbono el tratamiento con 15mA tuvo un efecto más marcado que en los medios con sacarosa.

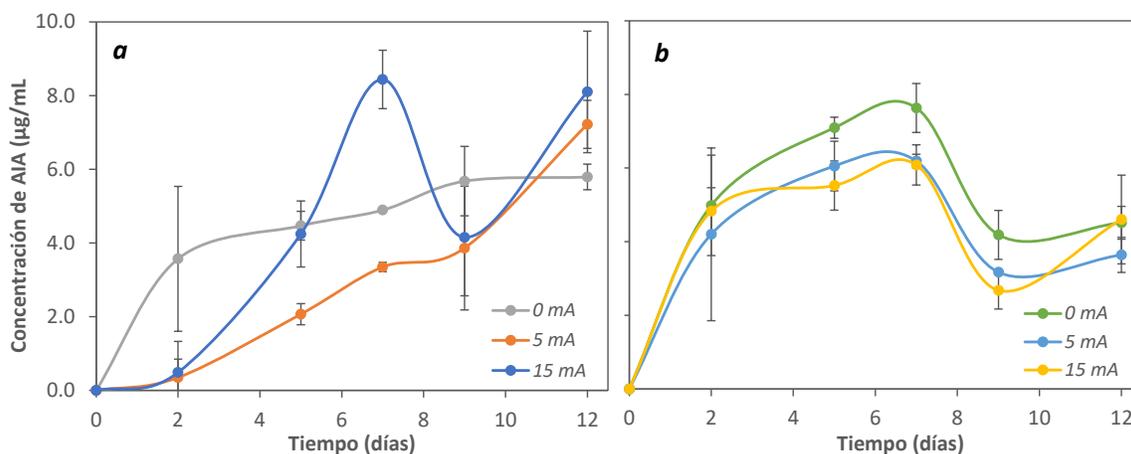
### 8.3.3 Producción de AIA

Con el propósito de determinar el efecto de la corriente eléctrica sobre la producción de AIA por *M. oryzae*, se iniciaron cultivos en medio MS con Trp (500mg/L) y sacarosa o metanol como única fuente de carbono, utilizando como inóculo biomasa pretratada con bajas intensidades de corriente eléctrica (5 y 15 mA) durante 24 horas. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento y se realizó un control sin corriente eléctrica. La concentración de AIA producido en ambos medios de cultivo fue similar. Sin embargo, en los medios con metanol se observó una disminución en la concentración de AIA a partir de los 7 días de cultivo, independientemente de la intensidad del tratamiento electroquímico (Figura 11). Cuando se usó sacarosa como fuente de carbono, la producción de AIA en el control se mantuvo sin diferencias significativas desde los 5 días. En los cultivos con inóculos tratados con 5 y 15 mA se registró un aumento significativo en la concentración de AIA a los 12 días, independientemente de la intensidad aplicada (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efecto de la intensidad de corriente y la fuente de carbono sobre la producción de AIA por *M. oryzae* después de 12 días de cultivo\*

Intensidad de corriente (mA)	Producción de AIA (µg/mL)	
	Sacarosa (1.5 g/L)	Metanol (0.5%, v/v)
0	4.65 ± 1.99 <sup>a</sup>	5.87 ± 2.38 <sup>a</sup>
5	7.22 ± 0.65 <sup>a</sup>	4.30 ± 1.20 <sup>a</sup>
15	6.83 ± 2.49 <sup>a</sup>	5.47 ± 1.73 <sup>a</sup>

\* Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes por columna indican diferencias significativas.



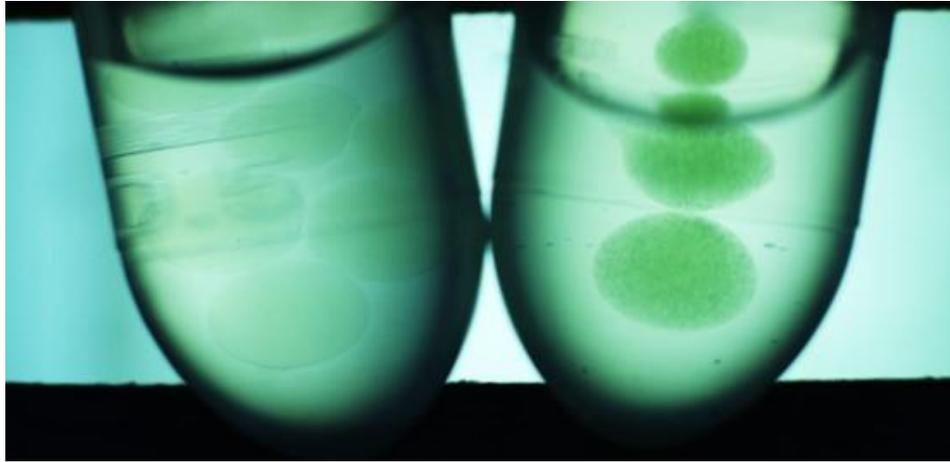
**Figura 11.** Efecto de la intensidad del tratamiento electroquímico sobre la producción de ácido indolacético (AIA) por *M. oryzae* en medio Murashige-Skoog con (a) sacarosa o (b) metanol como fuente de carbono y triptófano como inductor de la producción de AIA.

Un componente importante cuando se utiliza sacarosa como fuente de carbono es la posibilidad de la síntesis de compuestos que no deriven en AIA. La presencia de disacáridos como la lactosa o la sacarosa estimulan la producción de un polímero (Nath *et al.* 2008). La producción de este polímero, afecta además la producción de biomasa y la producción de AIA. Sin embargo, la producción de AIA en el medio con sacarosa resulta ser mayor que en el medio con metanol.

#### 8.4 Evaluación de la producción de AIA por un cocultivo inmovilizado

Con la finalidad de comparar la producción de AIA entre el cocultivo alga-bacteria y el cultivo axénico de *M. oryzae*, se midió la producción de AIA durante 16 días y se analizó el efecto de la inmovilización sobre la producción de este compuesto.

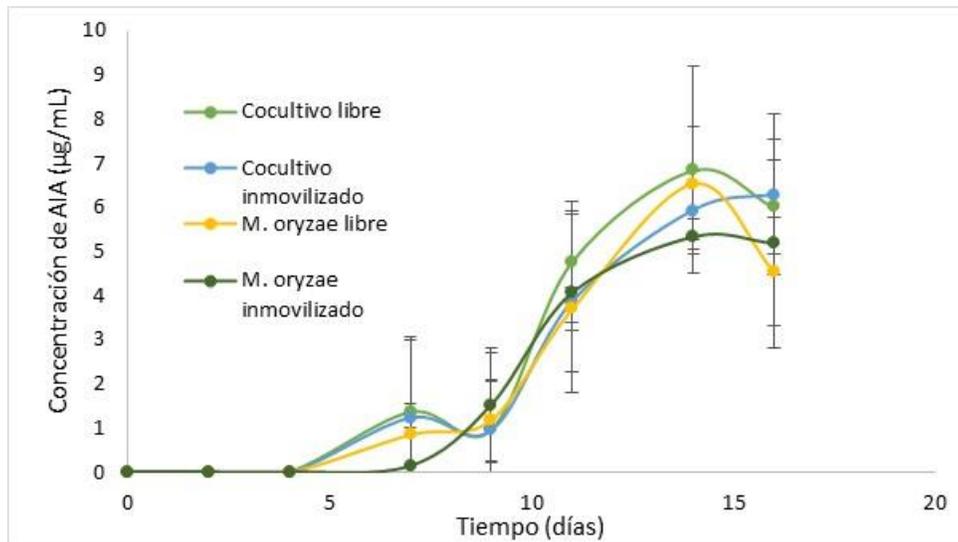
Después de 16 días de cultivo, no se encontraron diferencias significativas en la producción de AIA independientemente de la inmovilización del cocultivo obteniendo en promedio 5 µg/mL (Figura 13). De acuerdo con lo expresado por de-Bashan *et al.* (2016), para el correcto establecimiento de un cocultivo, se requiere la proximidad entre los organismos. Por ese motivo, una de las estrategias seleccionadas para este estudio fue la inmovilización de ambos organismos en perlas de alginato.



**Figura 12.** Crecimiento de *Coccomyxa sp.* en perlas de alginato a los 7 días de cultivo en medio MS líquido con 1.5 g/L de sacarosa (derecha). En la imagen de la izquierda se muestran las perlas recién inoculadas con el alga.

En el caso particular de las condiciones de cultivo, se sabe que algunas especies de bacterias del género *Methylobacterium* son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Madhaiyan *et al.* 2015), por lo que los cocultivos de *M. oryzae* y *Coccomyxa sp.* bajo condiciones limitadas de nitrógeno podrían estimular el intercambio de nutrientes entre ambos microorganismos. Esta condición puede no ser la mejor para la producción de AIA, ya que en las microalgas, las condiciones de limitación de nitrógeno reducen la producción de enzimas, como la subunidad  $\beta$  de la triptófano sintasa, y aumenta la concentración de otros compuestos como ácidos grasos y almidón (Msanne *et al.*, 2012). Así, la baja producción de triptófano, puede causar una disminución en la producción de AIA. Sin embargo, la acumulación de ácidos grasos puede ser aprovechada posteriormente. En cuanto a la producción de fitohormonas por *Coccomyxa sp.*, por el género *Coccomyxa*, se reportó que la cepa MACC-535 de *Coccomyxa sp.* es capaz de producir AIA, IAM (indol acetamida) y diversas citoquininas que la microalga regula para su propio crecimiento, pero que pueden ser aprovechadas como biofertilizantes o mejoradores de suelos (Stirk *et al.*, 2013). Por lo tanto, al no encontrarse una diferencia significativa sobre la producción de AIA del cocultivo inmovilizado y el cocultivo libre se consideró que: (i) las condiciones de cultivo no fueron las adecuadas para establecer el intercambio nutrimental entre los microorganismos involucrados; (ii) que la microalga no tiene un efecto significativo sobre la producción de AIA por *M. oryzae*; y (iii) *Coccomyxa sp.* consume parte del AIA, nivelando la concentración de este compuesto libre en el medio independientemente de si el cocultivo se inmovilizó o no, razón por la cual para los siguientes ensayos en los que se evaluó el

efecto del campo eléctrico sobre la producción de biomasa y AIA se decidió no continuar con la inmovilización.



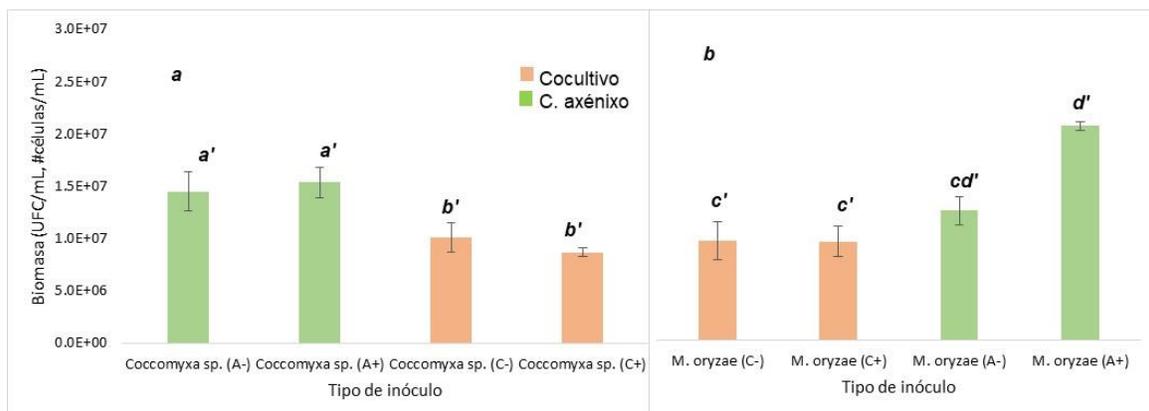
**Figura 13.** Efecto de la inmovilización en perlas de alginato sobre la producción de AIA por *M. oryzae* y el cocultivo alga-bacteria. Se muestra el promedio de 3 muestras para cada tratamiento (n=3).

### 8.5 Evaluación de los extractos obtenidos del cultivo sobre el crecimiento vegetal

Para evaluar el efecto que tienen los extractos de los cultivos axénicos y en cocultivo sobre la germinación de semillas de rábano, se usaron las condiciones de cultivo seleccionadas en etapas previas. Para los cultivos axénicos (*Coccomyxa sp.* y *M. oryzae*) se utilizó una concentración inicial de inóculo de  $1 \times 10^6$  UFC/mL o células/mL sin pretratar y pretratado con la corriente eléctrica (15mA, 24h). Para el cocultivo, el inóculo de cada organismo fue de  $0.5 \times 10^6$  UFC/mL o células/mL sin pretratamiento y pretratada. Todos los cultivos se mantuvieron en incubación durante 21 días. Posterior a ese tiempo se obtuvieron los extractos y se midieron la concentración de biomasa, la producción de AIA y se realizaron los bioensayos.

En la Figura 14 se muestra el efecto del campo eléctrico sobre el crecimiento de los cultivos axénicos y el cocultivo. Después de los 21 días de cultivo se observó un aumento en la concentración de biomasa del alga (Figura 14a) de aproximadamente 0.5 veces con respecto a los cocultivos, independiente del tratamiento electroquímico. Este comportamiento está ligado a la proporción de inóculo utilizado cada cultivo. Sin embargo, al comparar el crecimiento de los dos microorganismos en conjunto, estimado mediante la

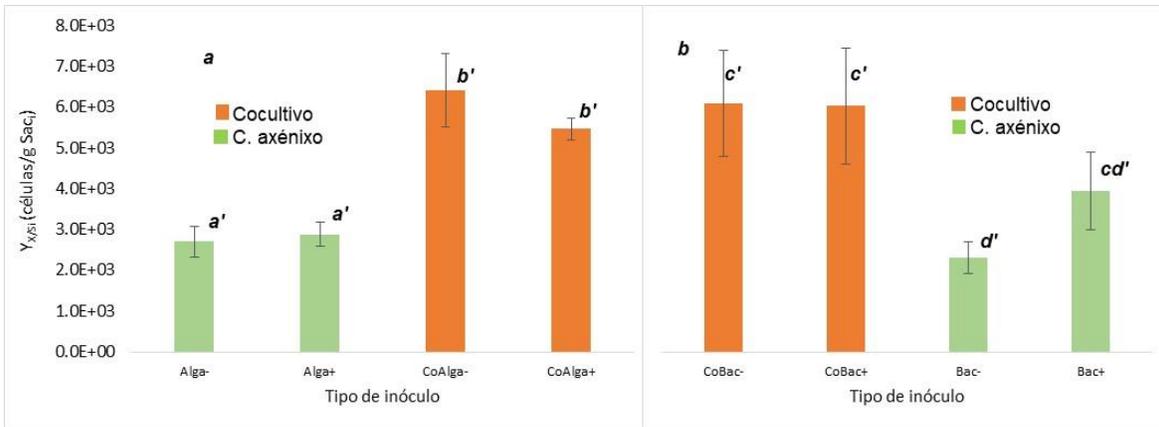
DO, se registró un incremento significativo (37%) en la DO final (21 días) por efecto del tratamiento electroquímico.



**Figura 14.** Concentración promedio de biomasa de *Coccomyxa sp.* (a) y *M. oryzae* (b) para los cultivos axénicos y los cocultivos a los 21 días. Se muestra el promedio de 3 muestras para cada tratamiento (n=3). Tratamientos (-) sin y (+) con corriente eléctrica (15 mA); (A) Cultivos axénicos y en (C)cocultivo.

Para poder comparar los datos de la producción de biomasa con respecto a la concentración de sustrato inicial, se calculó una relación de la biomasa producida con respecto a la concentración inicial de sustrato ( $Y_{X/S}$ ). En la figura 15 se puede observar la relación  $Y_{X/S}$  para cada tipo de inóculo. Como se puede apreciar, la biomasa producida en los cocultivos con respecto a la concentración inicial de sacarosa fue mayor que en los cultivos axénicos. Además, observamos como el cultivo de *M. oryzae* previamente tratada electroquímicamente con concentraciones de sacarosa a 5g/L mejora el crecimiento y la eficiencia del cultivo. Este efecto resulta similar al observado en la caracterización de *Coccomyxa sp.* en el que, con el tratamiento electroquímico y sacarosa con una concentración de 5g/L observamos una  $\mu$  mayor, lo que se podría traducir en una velocidad de crecimiento mayor.

Estos resultados con respecto a la producción de biomasa y su relación con la concentración inicial de fuente de carbono implican que, tanto el tratamiento electroquímico seleccionado como la formación de cocultivos resultan en cultivos más eficientes con respecto a la concentración inicial de fuente de carbono. Sin embargo, durante este trabajo se continuó analizando como objetivo la producción de compuestos promotores de crecimiento vegetal.



**Figura 15.** Relación biomasa producida con respecto a la concentración inicial de sustrato ( $Y_{xsi}$ ) para *Coccomyxa sp.* (a) y *M. oryzae* (b) para los cultivos axénicos y los cocultivos a los 21 días. Se muestra el promedio de 3 muestras para cada tratamiento ( $n=3$ ). Tratamientos (-) sin y (+) con corriente eléctrica (15 mA); (A) Cultivos axénicos y en (C)cocultivo.

Se analizó el efecto de extractos obtenidos al final de los cultivos y cocultivos sobre la germinación, la elongación y el peso seco de los germinados de semillas de rábano (Tabla 6). El AIA tiene un efecto positivo sobre la germinación y la elongación de las raíces, pero llega a inhibir su crecimiento dependiendo de la concentración y del tiempo de contacto (Leveau y Lindow, 2005), por lo que es de gran importancia analizar el efecto directo que tienen los extractos sobre semillas. Se encontró que, aunque se esperaba un índice de germinación del 96% (de acuerdo con el proveedor), la desinfección de las semillas influyó negativamente en la germinación, reduciéndola alrededor de 10 unidades en los controles con agua destilada. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas por efecto de los diferentes extractos sobre esta variable. Para el caso de la elongación de raíces, medida a los 5 días de incubación a 26°C, se registró una disminución significativa (>28%) en los extractos con respecto a las semillas germinadas en agua (control). En el medio MS se observó una reducción del 28.3% en la elongación con respecto a las semillas control, mientras la variable disminuyó entre 55.4 y 71.0% en los extractos libres de células de los cultivos con respecto al control (Tabla 6). La disminución de la elongación de las raíces de rábano podría atribuirse a la disminución en los valores del pH en los extractos, ya que el pH tiene influencia sobre esta variable, encontrando generalmente óptimos entre 6.5 y 7. Como se puede observar, el medio donde se midió un valor de pH menor (bacteria con corriente eléctrica), se encontró también la menor elongación de raíz. Cuando se

observaron las raíces mediante el procesador de imágenes se observó que, aunque las raíces en contacto con los extractos tuvieron una menor longitud, su grosor fue mayor que los observados en el tratamiento control. De tal manera se estimó la relación peso-longitud para las semillas germinadas (Figura 16).

**Tabla 6.** Efecto de extractos de cultivos axénicos y cocultivos alga-bacteria de 21 días sobre el índice de germinación, la elongación y el peso de raíces de semillas de rábano. Se muestra también el pH final de cada extracto.\*

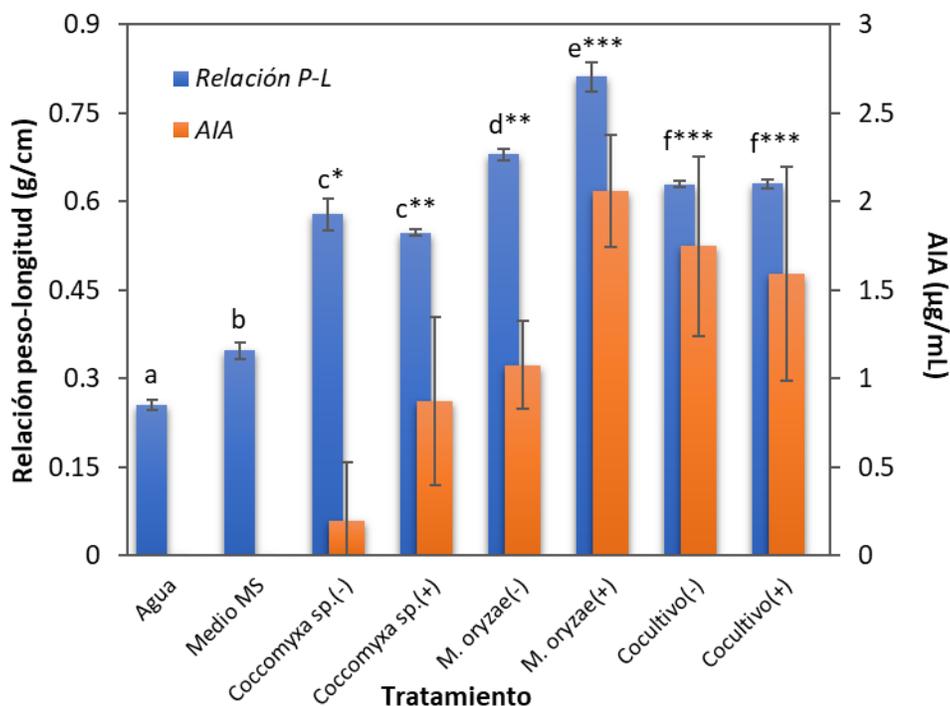
Tratamiento	Índice de germinación (%)	Elongación de raíces (cm)	Peso del germinado (g)	pH
Control	83.3±5.7 <sup>a</sup>	2.386±0.528 <sup>a</sup>	0.611±0.020 <sup>a</sup>	6.80 <sup>a</sup>
Medio MS	83.3±20.8 <sup>a</sup>	1.710±0.398 <sup>b</sup>	0.595±0.024 <sup>ab</sup>	5.82 <sup>b</sup>
<i>Coccomyxa sp.</i> (-)	70.0±17.3 <sup>a</sup>	0.693±0.198 <sup>c</sup>	0.563±0.017 <sup>ab</sup>	4.91±0.04 <sup>b</sup>
<i>Coccomyxa sp.</i> (+)	83.3±11.5 <sup>a</sup>	0.830±0.293 <sup>c</sup>	0.565±0.008 <sup>ab</sup>	4.95±0.20 <sup>b</sup>
<i>M. oryzae</i> (-)	80.0±10.0 <sup>a</sup>	0.921±0.391 <sup>c</sup>	0.580±0.007 <sup>ab</sup>	5.51±0.09 <sup>b</sup>
<i>M. oryzae</i> (+)	76.6±5.7 <sup>a</sup>	0.903±0.300 <sup>c</sup>	0.569±0.004 <sup>b</sup>	3.86±0.06 <sup>d</sup>
Cocultivo (-)	70.0±10.0 <sup>a</sup>	1.063±0.344 <sup>c</sup>	0.582±0.006 <sup>ab</sup>	4.68±0.30 <sup>bc</sup>
Cocultivo (+)	63.3±11.5 <sup>a</sup>	0.999±0.394 <sup>c</sup>	0.578±0.027 <sup>ab</sup>	5.34±0.74 <sup>b</sup>

\*Se muestran los resultados promedio ± la desviación estándar de 3 cajas de Petri cada una con 10 semillas (n=3). Tratamientos sin (-) y con (+) corriente eléctrica (15 mA).

Como se observa (Figura 15), el extracto con el que se obtuvo mayor relación peso-longitud fue el de *M. oryzae* tratada electroquímicamente, registrando un aumento significativo de más de 3 veces con respecto al control (agua). Esto indica que, a pesar de que el extracto no estimuló la elongación de las raíces, sí se favoreció su engrosamiento. Este efecto puede atribuirse a la producción de compuestos promotores de crecimiento vegetal, como auxinas y citocininas. De hecho, se ha reportado la producción de auxinas y citocininas (CKs) por muchas cepas del género *Methylobacterium*. Varias especies del género pueden secretar una amplia gama de CKs, entre ellas la forma más activa (trans-zeatina), en niveles mayores que otras BPCV (Palberg *et al.* 2022).

Las CKs estimulan la división celular, la iniciación de brotes y el aumento de biomasa, además de incrementar la capacidad antioxidante, mientras que las auxinas estimulan el

crecimiento de tallos y raíces y la producción de biomasa e inhiben el crecimiento de brotes laterales (Sytar *et al.* 2018). De tal manera, el incremento significativo de la relación peso-longitud, particularmente en los cultivos con *M. oryzae* pueden relacionarse con la producción de AIA y, probablemente CKs (Figura 16). Asimismo, puede verse que el tratamiento electroquímico estimuló significativamente dicha variable y, de hecho, es donde se encontró la mayor concentración de AIA en el extracto.



**Figura 16.** Relación peso-longitud de raíces de rábano y producción de ácido indolacético (AIA) en extractos libres de células obtenidos después de 21 días de cultivo bajo diferentes condiciones. Tratamientos sin (-) y con (+) corriente eléctrica (15 mA); Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en Relación peso-longitud. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos en AIA.

La estimulación del crecimiento y la producción de diversos metabolitos por un tratamiento electroquímico es algo que se ha estudiado tanto en microalgas como en bacterias. En microalgas se ha visto como un tratamiento eléctrico de baja intensidad (31mA) aumentó la producción de triacilglicerol por *Chlorella sp.* (Choi *et al.* 2019). También se observó que el efecto del tratamiento depende de la intensidad de la corriente y del tiempo de aplicación de la misma. En el presente trabajo se observó que el tratamiento eléctrico de 5 y 15mA aplicados durante 24 horas disminuyó significativamente el crecimiento. Sin embargo, un tratamiento de 100mA aplicados durante 1 minuto sobre *Haematococcus pluvialis* mejoró

la producción de biomasa y de compuestos antioxidantes (Kim *et al.* 2018). Esto indica que, al aplicar una corriente eléctrica sobre algunas microalgas se favorece la producción de compuestos de interés como lípidos y antioxidantes que, en un cocultivo, pueden intercambiarse mejorando el crecimiento y la producción de otros compuestos de interés (Cho *et al.* 2015).

Aunque es necesario realizar más estudios con respecto al establecimiento de este cocultivo alga-bacteria en particular, tal que estimule la producción de compuestos promotores de crecimiento vegetal (CPCV), así como optimizar las condiciones para su producción, este estudio demuestra la capacidad de esta cepa de *M. oryzae* para producir dichos compuestos. Asimismo, los resultados indican que la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad (15mA) tiene un efecto favorable sobre la producción de CPCV. No obstante, aún es necesario conocer el tipo y la concentración de otros compuestos además del AIA, producidos por esta cepa de *M. oryzae* ya que, de acuerdo con lo reportado por Jorge *et al.* (2019) y Palberg *et al.* (2022), la especie *oryzae* del género se encuentra entre las cepas que más CKs produjeron en sus estudios, principalmente trans-zeatina.

## 9 Conclusiones

1. *Methylobacterium oryzae* crece con metanol como única fuente de carbono, sin cambios significativos en la  $\mu$  y el  $t_d$  en comparación con sacarosa; y que además produce ácido indolacético en presencia de triptófano.
2. El incremento en la concentración de sacarosa (1.5 a 10 g/L) en el medio estimula el crecimiento de *Coccomyxa* sp. y disminuye su  $t_d$ . El uso de urea como única fuente de carbono y nitrógeno causa un incremento significativo el  $t_d$  del alga.
3. En el medio con 5g/L de sacarosa, la aplicación de un campo eléctrico a células de *Coccomyxa* sp. estimula su crecimiento disminuyendo su  $t_d$ , independientemente de la intensidad del tratamiento (5-15mA).
4. En el medio con sacarosa, el tratamiento de células de *M. oryzae* con un campo eléctrico de 5mA incrementa la  $\mu$ , reduce el  $t_d$  y mejora la producción de AIA. El aumento en la intensidad del tratamiento causa una disminución en el tratamiento microbiano (15mA).
5. El cocultivo mejora la producción de AIA y otros compuestos que promueven el crecimiento vegetal, así como la eficiencia de conversión de sacarosa a biomasa para ambos microorganismos.
6. El tratamiento electroquímico en *M. oryzae* estimula la producción de AIA y otros compuestos que promueven el crecimiento vegetal.

## 10 Bibliografía

- Aburai, N., Kunishima, R., Iijima, F., & Fujii, K. (2020). Effects of light-emitting diodes (LEDs) on lipid production of the aerial. *Journal of Biotechnology*, 274-282.
- Acurio-Vásconez, R., & España-Imbaquingo, C. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trebol blanco (*Trifolium repens*). *La granja: revista de ciencias de la vida*, 53-61.
- Adams, F. (1971). Ionic concentrations and activities in soil solutions. *Soil Science Society of America Journal*, 420-426.
- Adesemoye, A., Torbert, H., & Kloepper, J. (2009). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial ecology*, 921–929.
- Alcántara-Martínez, N., Guizar, S., Rivera-Cabrera, F., Anicacio-Acevedo, B., Buendía-González, L., & Volke-Sepúlveda, T. (2016). Tolerance, arsenic uptake, and oxidative stress in *Acacia farnesiana* under arsenate-stress. *Int J Phytoremediation*, 671-678.
- Alcántara-Martínez, N., Figueroa-Martínez, F., Rivera-Cabrera, F., Gutiérrez-Sánchez, G., & Volke-Sepúlveda, T. (2018). An endophytic strain of *Methylobacterium* sp. increases arsenate. *Science of the Total Environment*, 762-774.
- Alcántara-Martínez, N., Figueroa-Martínez, F., Rivera-Cabrera, F., & Volke-Sepúlveda. (Abril de 2022). An unexpected guest: a green microalga associated with the arsenic-tolerant shrub *Acacia farnesiana*. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(4). doi:10.1093/femsec/fiac041
- Arias-Mota, R. M., Romero-Fernández, A., Bañuelos-Trejo, J., & De-la-Cruz-Elizondo, Y. (2019). Inoculación de hongos solubilizadores de fósforo y micorrizas arbusculares en plantas de jitomate. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*(10(8)), 1747-1757. doi:10.29312/remexca.v10i8.1558
- Armada, E., Leite, M., Medina, A., Azcon, R., & Kuramae, E. (2018). Native bacteria promote plant growth under drought stress condition without impacting the rhizomicrobiome. *FEMS Microbiology Ecology*, 1-13.
- Bais, H., Weir, T., Perry, L., Gilroy, S., & Vivanco, J. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 233-266.
- Barroeta-Bonilla, D., Vinalay-Romero, K., Arteaga-Ballesteros, B., & Ramírez Rodríguez, R. (2019). Obtención de celulosa bacteriana en co-cultivo de microalgas inmovilizadas en alginato. *Acontacs*, 1-6.
- Behie, S., y Bidochka, M. (Noviembre de 2014). Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends in Plant Science*, 19, 734-740.
- Bilal, S., Shahzad, R., Khan, A., Kang, S.-M., Imran, Q., Al-Harrasi, A., . . . Lee, I.-J. (04 de Septiembre de 2018). Endophytic Microbial Consortia of Phytohormones-Producing Fungus *Paecilomyces formosus* LHL10 and Bacteria *Sphingomonas* sp. LK11 to *Glycine max* L. Regulates Physio-hormonal Changes to Attenuate Aluminum and Zinc Stresses. *Frontiers in*

*Plant Science*, 9, 1273. Obtenido de  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01273>

- Bouabidi, Z., El-Naas, M., & Zhang, Z. (2018). Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 1-17.
- Brinkman, C., Schmidt-Malan, S., Karau, M., Greenwood-Quaintance, K., Hassett, D., Mandrekar, J., & Patel, R. (2016). Exposure of Bacterial Biofilms to Electrical Current Leads to Cell Death Mediated in Part by Reactive Oxygen Species. *PLoS One*, 1-23.
- Byung-Hyuk, K., Rishiram, R., Dae-Hyun, C., Hee-Mock, O., & Hee-Sik, K. (Octubre de 2014). Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Bioenergy*, 69, 95-105.
- Calatrava, V., Hom F. Y., E., Llamas, A., Fernandez, E., & Galvan, A. (2018). OK, thanks! A new mutualism between Chlamydomonas and methylobacteria facilitates growth on amino acids and peptides. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 1-9.
- Casal, C., Cuaresma, M., Vega, J. M., & Vilchez, C. (2011). Enhanced Productivity of a Lutein-Enriched Novel Acidophile Microalga Grown on Urea. *Marine Drugs*, 29-42.
- Chanratana, M., Hyun-Han, G., Melvin-Joe, M., Roy-Choudhury, A., Sundaram, S., Abdul-Halim, M., & Sa, T. (2018). Evaluation of chitosan and alginate immobilized Methylobacterium oryzae CBMB20 on tomato plant growth. *Archives of Agronomy and Soil Science*.  
doi:10.1080/03650340.2018.1440390
- Chee-Hock, H., Carsten, A., Timofey, S., & Thean-Hock, T. (2013). Bacterial sRNAs: Regulation in stress. *International Journal of Medical Microbiology*, 217-229.
- Cheng, Z., Zhu, S., Gao, X., & Zhang, X. (2010). Cytokinin and auxin regulates WUS induction and inflorescence regeneration in vitro in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* , 927–933.
- Cho, D.-H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B.-H., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2015). Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource Technology*, 578-585.
- Choi, S.-A., Lee, S., Lee, J., Cho, J., Lee, J.-S., Kim, S., . . . Oh, Y.-K. (2019). Rapid induction of edible lipids in Chlorella by mild electric stimulation. *Bioresource Technology*.
- Contreras-Angulo, J., Mata, T., Cuellar-Bermudez, S., Caetano, N., Chandra, R., Garcia-Perez, J., . . . Parra-Saldivar, R. (2019). Symbiotic Co-Culture of Scenedesmus sp. and Azospirillum brasilense on N-Deficient Media with Biomass Production for Biofuels. *Sustainability*.
- D’Alessandro, E., & Antoniosi Filho, N. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 832-841.
- de-Bashan, L., Mayali, X., Bebout, B., Weber, P., Detweiler, A., 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*, 179–186.
- Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J., & Alcántar-González, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana*, 327-335.
- Dodd, I., Zinovkina, N., Safronova, V., & Belimov, A. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology* 1, 361–379.
- Doornbos, R., van Loon, L., & Bakker, P. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 227-243.
- Dudeja, S., Suneja-Madan, P., Paul, M., Maheswari, R., & Kothe, E. (2021). Bacterial endophytes: molecular interactions with their hosts. *J Basic Microbiol.* , 475– 505.
- Ferrol, N., Barea, J., & Azcón-Aguilar, C. (2002). Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*(244), 231–237 . doi:10.1023/A:1020266518377
- Foyer, C., Nguyen, H., & Lam, H.-M. (2018). A seed change in our understanding of legume biology from genomics to the efficient cooperation between nodulation and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell Environ*, 1949-1954.
- Garbayo, I., Torronteras, R., Forjan, E., Cuaresma, M., Casal, C., Mogedas, B., . . . Vílchez, C. (2012). Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain). *Journal of phycology* , 607–614.
- García-González, J., & Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J Appl Phycol*, 1051-1061.
- Glick, B. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 1–7. doi:doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.030
- Glick, B. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 1-15.
- Glick, B., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (05 de 07 de 2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*, 329-339.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 793–796.
- Godlewska, K., Michalak, I., Tuhy, A., & Chojnacka, K. (2016). Plant Growth Biostimulants Based on Different Methods of Seaweed Extraction with Water. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2016/5973760
- Gontia-Mishra, I., Sasidharan, S., & Tiwar, S. (2014). Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*, 36, 889–898.

- Gonzalez, L. E., & 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*, 1627-1531.
- Gonzalez-Bashan, L., Lebsky, V., Hernandez, J., Bustillos, J., & Bashan, Y. (2000). Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Can. J. Microbiol.* , 653-659.
- Grbić, V., & Bleecker, A. (Octubre de 1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The plant journal*, 8(4), 595-602.
- Gutjahr, C. (2014). Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhiza development. *Current Opinion in Plant Biology*, 26–34.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W., & Kloepper, J. (Octubre de 1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 895-814.
- Hanaki, K., Hirunmasuwan, S., & Matsuo, T. (1994). Protection Of Methanogeni Bacteria From Low pH And Toxic Materials By Inmovilization Using Polyvinyl Alcohol. *Water Research*, 28, 877-885. doi:10.1016/0043-1354(94)90094-9
- Harfouche, A., Shivaji, R., Stocker, R., Williams, P., & Luthe, D. (2006). Ethylene Signaling Mediates a Maize Defense Response to Insect Herbivory. *The American Phytopathological Society*, 19, 189-199.
- Holguin, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvay, G., Rojas, A., . . . Hernandez, J. (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizósfera. *Agricultura Técnica en México*, 201-211.
- Hussain, A., & Hasnain, S. (01 de Enero de 2011). Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 85–92.
- Ivanova, E., Doronina, N., & Trotsenko, Y. (2001). Aerobic Methylobacteria Are Capable of Synthesizing Auxins. *Mikrobiologiya*, 452-458.
- Jackson, L., Calderon, F., Steenwerth, K., Scow, K., & Rolston, D. (2003). Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. *Geoderma*, 305-317.
- Jenik, P., & Barton, M. (2005). Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development*, 3577–3585.
- Jorge, G., Kisiala, A., Morrison, E., Aoki, M., Oliveira Nogueira, A., & Neil Emery, R. (2019). Endosymbiotic *Methylobacterium oryzae* mitigates the impact of limited water availability in lentil (*Lens culinaris* Medik.) by increasing plant cytokinin levels. *Environmental and Experimental Botany*, 525-540.
- Karya, N., van der Steen, N., & Lens, P. (2013). Photo-oxygenation to support nitrification in an algal–bacterial consortium treating artificial wastewater. *Bioresource Technology*(134), 244-250.

- Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T., Croft, M., Sherwood, E., Sasso, S., . . . Smith, A. (2012). Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental Microbiology*, 1466-1476.
- Keweloh, H., Heipieper, H., & Rehm, H. (1989). Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Applied Microbiology Biotechnology*, 383-389.
- Khan, M., Gao, J., Chen, X., Zhang, M., Yang, F., Du, Y., . . . Zhang, X. (27 de Feb de 2020). Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria *Paenibacillus polymyxa* SK1 from *Lilium lancifolium*. *Biomed Res Int*. doi:10.1155/2020/8650957
- Kim, J., Lee, C., Jeon, M., Park, J., & Choi, Y.-E. (2018). Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. *Bioresource Technology*, 815-819.
- Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2015). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 125–129.
- Kravchenko, L., Azarova, T., Makarova, N., & Tikhonovich, I. (2004). The Effect of Tryptophan Present in Plant Root Exudates on the Phytostimulating Activity of Rhizobacteria. *Mikrobiologiya*, 195-198.
- Krishnamurthi, V., Rogers, A., Peifer, J., Niyonshuti, I., Chen, J., & Wang, Y. (2020). Microampere Electric Current Causes Bacterial Membrane Damage and Two-Way Leakage in a Short Period of Time. *Appl Environ Microbiol.*, 1-10.
- Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. (2011). *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems*, 37-59.
- Kwak, M.-J., Jeong, H., Madhaiyan, M., Lee, Y., Sa, T.-M., Oh, T., & Kim, J. (2014). Genome Information of *Methylobacterium oryzae*, a Plant-Probiotic Methylophile in the Phyllosphere. *PLoS ONE*, 1-9.
- Lanfranco, L., Bonfante, P., & Genre, A. (2016). The Mutualistic Interaction between Plants and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Microbiology Spectrum*, 12-23.
- Laxman Pachapur, V., Jyoti Sarma, S., Kaur Brar, s., Le Bihan, Y., Ricardo Soccol, C., Buelna, G., & Verma, M. (2015). Co-culture strategies for increased biohydrogen production. *International Journal of Energy Research*, 1479–1504.
- Lelievre, J.-M., Latche, A., Brian, J., Bouzayen, M., & Pech, J.-C. (1997). Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 101, 727-739.
- Leveau, J., y Lindow, S. (2005). Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2365–2371.
- Li, H., & Jiang, X. (2017). Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) Improves Salt Tolerance of Maize Seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*, 235-241.

- Lira-Angelim, A., Pinheiro-Costa, S., Soares-Farias, B., Freitas-Aquino, L., & Maciel-Melo, V. (2013). An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. *Journal of Environmental Management*, 10-17. doi:10.1016/j.jenvman.2013.04.014
- López-Elías, J., González-Vega, R., Márquez-Ríos, E., & Torres-Arreola, W. (2015). Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 331-337.
- Louis, J., Basu, S., Varsani, S., Castano-Duque, L., Jiang, V., Williams, W., . . . Luthe, D. (Septiembre de 2015). Ethylene Contributes to maize insect resistance1-Mediated Maize Defense against the Phloem Sap-Sucking Corn Leaf Aphid. *Plant Physiology*, 169, 313-324.
- Ludwig-Müller, J., & Cohen, J. (2002). Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*(115), 320–329.
- Madhaiyan, M., Alex, T., Ngoh, S., Prithiviraj, B., & Ji, L. (2015). Leaf-residing *Methylobacterium* species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas*. *Biotechnology for Biofuels*, 1-14.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kang, B.-G., Lee, Y.-J., Chung, J.-B., & Sa, T.-M. (2010). Effect of co-inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. *Plant Soil*, 71-82.
- Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D., & Sattley W.M. (2018). *Brook Biology of Microorganisms*. Pearson.
- Malonek, S., Bömke, C., Bornberg-Bauer, E., Rojas, M., Hedden, P., Hopkins, P., & Tudzynski, B. (2005). Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry*(66), 1296–1311. doi:10.1016/j.phytochem.2005.04.012
- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R., & Sanz-Ros, A. (2013). Antagonismo in vitro de hongos endófitos frente a *Fusarium circinatum*.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Mógor, Á., Ördög, V., Pereira, G., Molnár, Z., & Mógor, G. (2018). Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *J Appl Phycol*, 453–460.
- Moyes, A., Kueppers, L., Pett-Ridge, J., Carper, D., Vandehey, N., O'Neil, J., & Frank, A. (2016). Evidence for foliar endophytic nitrogen fixation in a widely distributed subalpine conifer. *New Phytologist Trust*(210), 657-668.
- Msanne, J., Xu, D., Konda, A., Casas-Mollano, J., Awada, T., Cahoon, E., & Cerutti, H. (2012). Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*, 50-59.

- Munusamy, M., Byung-Yong, K., Selvaraj, P., Soon-Wo, K., Myung-Hee, S., Jeoung-Hyun, R., . . . Tong-Min, S. (2007). *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 326–331.
- Nazos, T., & Ghanotakis, D. (2021). Biodegradation of phenol by alginate immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Archives of Microbiology*, 5805–5816.
- Oteino, N., Lally, R., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K., & Dowling, D. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 1-9.
- Palberg, D., Kisiąła, A., Jorge, G., & Emery, R. (8 de Feb de 2022). A survey of *Methylobacterium* species and strains reveals widespread production and varying profiles of cytokinin phytohormones. *BMC Microbiology*. doi:10.1186/s12866-022-02454-9.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol*, 763-775.
- Pasqualetti, M., Tempesta, S., Malavasi, V., Barghini, P., & Fenice, M. (2015). Lutein Production by *Coccomyxa* sp. SCCA048 Isolated from a Heavy Metal-Polluted River in Sardinia (Italy). *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 1262–1272.
- Patten, C., & Glick, B. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*, 3795-3801.
- Quiroz-Sarmiento, V., Almaraz-Suarez, J., Sánchez-Viveros, G., Argumedo-Delira, R., & González-Mancilla, A. (2019). Biofertilizantes de rizobacterias en el crecimiento de plántulas de Chile Poblano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1733-1745.
- Rengifo-Gallego, A., Peña-Salamanca, E., & Benitez-Campo, N. (2012). Efecto de la asociación alga-bacteria *Bostrychia calliptera* (Rhodomelaceae) en el porcentaje de remoción de cromo en laboratorio. *Revista de Biología Tropical*, 1055-1064.
- Řezanka, T., Nedbalová, L., Barcytė, D., Vítová, M., & Sigler, K. (2019). Arsenolipids in the green alga *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phytochemistry*, 243-251.
- Rhie, Y., Lee, S., & Kim, K. (2015). Seed dormancy and germination in *Jeffersonia dubia* (Berberidaceae) as affected by temperature and gibberellic acid. *Plant Biology*, 327–334.
- Rodriguez, R., White Jr, J., Arnold, A., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 314-330. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Romero, F., Rossi, F., Gárriz, A., Carrasco, P., & Ruíz, O. (2019). A bacterial endophyte from apoplast fluids protects canola plants from different phytopathogens via antibiosis and induction of host resistance. *Phytopathology*(109), 375-383. doi:10.1094/PHYTO-07-18-0262-R

- Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Sandoval-Espinosa, Y., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M., & Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos como utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 132-146.
- Sánchez-López, D., Pérez-Pazos, J., & David-Hinestroza, H. (2016). Efecto de las PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 65-72. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50413
- Savci, S. (2012). An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 77-80.
- Sessitsch, A., Reiter, B., & Berg, G. (Abril de 2004). Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 239-249.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., & Mittle, R. (2009). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132, 199-208.
- Smidsrød, O., & Skjåk-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *TIBTECH*, 71-78.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2010). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1-15.
- Stirk, W., Ördög, V., Novák, O., Rolčík, J., Strnad, M., Bálint, P., & van Staden, J. (2013). Auxin and Cytokinin Relationships in 24 Microalgal Strains. *Phycological Society of America*, 459-467.
- Suzaki, T., & Kawaguchi, M. (2014). Root nodulation: a developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 16-22.
- Sytar, O., Kumari, P., Yadav, S., Brestič, M., & Rastogi, A. (2018). Phytohormone Priming: Regulator for Heavy Metal Stress in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 739-752.
- Tatsuo Sumino, H. N. (1992). Immobilization of Nitrifying Bacteria by Polyethylene Glycol Prepolymer. *Journal of Fermentations and Bioengineering*, 37-42. doi:10.1016/0922-338X(92)90228-M
- Tilak, K. V., Ranganayaki, N., & Manoharachari, C. (02 de 2006). Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science*, 57(1), 67-71. doi:10.1111/j.1365-2389.2006.00771.x
- Tripathi, S., Behera, T., & Mohan Poluri, K. (2022). Biochemical insights into cadmium detoxification mechanism of *Coccomyxa* sp. IITRSTKM4. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1-15.
- Ulrich, K., Ulrich, A., & Ewald, D. (Febrero de 2008). Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown. *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 169-180.

- Van Dien, S., Marx, C., O'Brien, B., & Lidstrom, M. (2003). Genetic Characterization of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and Isolation of a Colorless Mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 7563–7566.
- Velasco-Alvarez, N., González, I., Damian-Matsumura, P., & Gutiérrez-Rojas, M. (2011). Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by. *Bioresource Technology*, 1509–1515.
- Velasco-Alvarez, N., Gutiérrez-Rojas, M., & González, I. (2017). Alterations in *Aspergillus brasiliensis* (niger) ATCC 9642 membranes associated to metabolism modifications during application of low-intensity electric current. *Bioelectrochemistry*, 1-7.
- Vetrivelkai, P., Sivakumar, M., & Jonathan, E. (2010). Biocontrol potential of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in bhendi. *Journal of Biopesticides*, 3(2), 452-457.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., . . . Kogel, K. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 13386–13391.
- Wang, C., Wang, Z., Luo, F., & Li, Y. (2017). The augmented lipid productivity in an emerging oleaginous model alga *Coccomyxa subellipsoidea* by nitrogen manipulation strategy. *World J Microbiol Biotechnol.*, 1-13.
- Wang, S., Ji, B., Su, X., Li, H., Dong, C., Chen, S., . . . Feng, W. (2020). Isolation of endophytic bacteria from *Rehmannia glutinosa* Libosch and their potential to promote plant growth. *Applied Microbiology*(66), 279–288.
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. (Septiembre de 2017). Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant*, 10, 1147-1158.
- Wang, Z., Luo, F., Wang, Z., Zhou, R., Tang, Y., & Li, Y. (2019). The potential growth and lipid accumulation in *Coccomyxa subellipsoidea* triggered by glucose combining with sodium acetate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2989–2996.
- Wanga, M., Yang, H., Erga, S., & van der Steenb, P. (2015). A novel shortcut nitrogen removal process using an algal-bacterial consortium in a photo-sequencing batch reactor (PSBR). *Water Research*, 87, 38-48.
- Win, T., Barone, G., Secundo, F., & Fu, P. (2018). Algal Biofertilizers and Plant Growth Stimulants for Sustainable Agriculture. *Industrial Biotechnology*, 203-211. doi:10.1089/ind.2018.0010
- Ying, M., Mani, R., Chang, Z., & Helena, F. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal. *Journal of Environmental Managemen*, 174, 14-25.
- Yu, Z., Liu, L., Chen, J., Wang, X., & Wei, D. (2018). Effect of crude glycerol on heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa* and *Coccomyxa subellipsoidea* C-169. *Journal of Applied Phycology*, 2989–2996.

Zafar, M., Abbasi, M., Khan, M., Khaliq, A., Sultan, T., & Aslam, M. (2012). Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Growth, Nodulation and Nutrient Accumulation of Lentil Under Controlled Conditions. *Pedosphere*(22), 848–859. doi:10.1016/s1002-0160(12)60071-x

Zheng-Yang, H., Guo-Qiang, L., Tong, Y., Chao, F., Yun, L., Yin-Hu, W., . . . Hong-Ying, H. (2018). Cell Transport Prompts the Cell Transport Prompts the Electroporation for Cell Inactivation. *Scientific reports*, 1-10.

## 11 Anexos

### Anexo 1. Curva estándar para la cuantificación de biomasa de *Coccomyxa sp.*

Para el realizar la cuantificación de la biomasa a partir de la absorbancia, se obtuvieron valores de absorbancia y de concentración celular, con los cuales se construyó la gráfica mostrada en la figura A1:

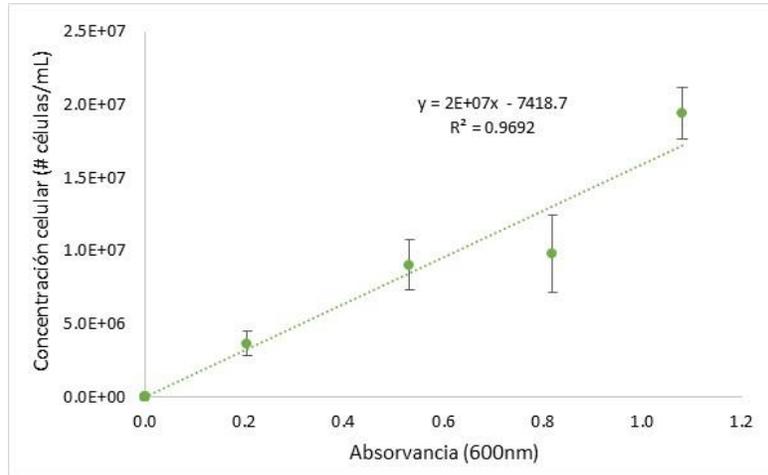


Figura A1. Curva patrón para calcular densidad celular de *Coccomyxa sp.* a partir de la densidad óptica.

De acuerdo con la gráfica, se realizó una regresión lineal para obtener una ecuación que nos permita calcular la concentración celular de *Coccomyxa sp.* La ecuación obtenida es:

$$\frac{\# \text{ células}}{\text{mL}} = 1.6 \times 10^7 \text{ Absorbancia} - 7418$$

## Anexo 2. Curva estándar para la cuantificación de biomasa de *Methylobacterium oryzae*.

Para poder cuantificar las unidades formadoras de colonias de *M. oryzae* a partir de la densidad óptica de una muestra se construyó una curva patrón. Para ello se realizó un conteo en placa de un inóculo el cual también se le midió la densidad óptica realizando diferentes diluciones. Esto con la finalidad de demostrar la linealidad de la DO al realizar las diluciones seriadas que permitieron contar las unidades formadoras de colonias.

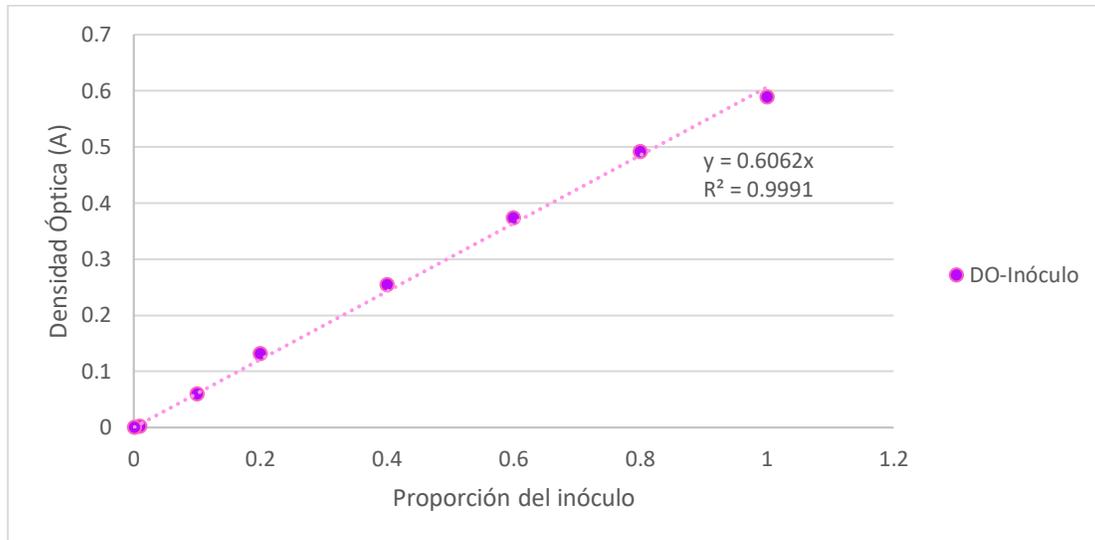


Figura A2. Gráfica de Densidad óptica vs la proporción de inóculo

Del conteo en placa se determinó que el inóculo tiene una concentración de  $5.54 \times 10^7$  UFCs/mL, mientras que el mismo inóculo tenía una densidad óptica de 0.6063. Este inóculo al ser diluido mantuvo la linealidad por lo que mientras las tenga una densidad óptica de 0.6063 o menor, se va a mantener la relación entre su concentración celular y la densidad óptica. De esta forma, la relación de UFCs vs DO queda de la siguiente forma:

$$\frac{UFC}{ml} = 9.137 \times 10^7 (Abs)$$

Esta ecuación es válida siempre que la muestra tenga una densidad óptica menor a 0.6063, ya que es en la región donde nosotros demostramos la linealidad.

### Anexo 3. Determinación de ácido indol acético (AIA)

Para la cuantificación del ácido indol acético a partir de la absorbancia a 530 nm tratada con el reactivo de Salkowski, se construyó la curva patrón mostrada en la figura A3.

Esta curva patrón se construyó con soluciones con concentraciones de AIA que fueron desde los 0.23 µg/mL hasta los 7.65 µg/mL. A partir de la regresión lineal de dicha curva se obtuvo la ecuación que nos permitió calcular la concentración de AIA en una muestra a partir de la densidad óptica.

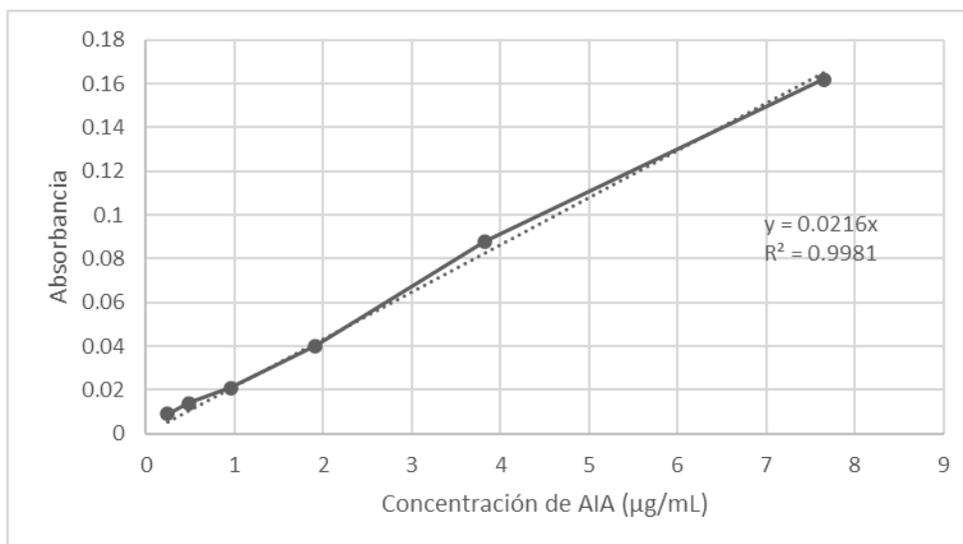


Figura A3. Curva patrón de

$$\frac{mg \text{ AIA}}{L} = 44.843 \text{ Absorbancia}$$



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00302

Matrícula: 2202800513

PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS  
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO  
VEGETAL POR UN CULTIVO  
ALGA-BACTERIA BAJO  
CONDICIONES DE ESTRÉS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 21 del mes de diciembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ  
DR. CESAR CUAHUTEMOC ROJAS LORIA  
DR. OSKAR ALEJANDRO PALACIOS LOPEZ  
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: ISAIAS DE LA SANCHA SIERRA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



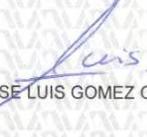
ISAIAS DE LA SANCHA SIERRA  
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ

VOCAL



DR. CESAR CUAHUTEMOC ROJAS LORIA

VOCAL



DR. OSKAR ALEJANDRO PALACIOS LOPEZ

SECRETARIO



DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ