

Capítulo 2

BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS Y MICROALGAS VERDES: UN MODELO CONVENIENTE PARA EL ESTUDIO BÁSICO DE LAS INTERACCIONES PLANTA-BACTERIA

de Bashan, Luz E. & Bashan, Yoav*

Departamento de Suelo, Agua y Ciencias Ambientales, Universidad de Arizona, Tucson, Arizona 85721, EUA, y Grupo de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S. 23090, Mexico.

*Autor para correspondencia: Departamento de Suelo, Agua y Ciencias Ambientales, Universidad de Arizona, Tucson, Arizona 85721, EUA, Tel: 520-621 3670, Fax: 520-621-1647.

E-mail: bashan@cibnor.mx

RESUMEN

Proponemos un modelo experimental simple que permite realizar de manera conveniente estudios básicos en la interacción planta-bacteria. Este modelo involucra a la microalga dulceacuícola unicelular *Chlorella* sp., la cual actúa como la planta, y a la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Azospirillum* sp., inmovilizadas de manera conjunta en pequeñas esferas de alginato, lo cual les permite una estrecha interacción y previene la interferencia externa de otras bacterias contaminantes.

Las ventajas de este modelo son numerosas. Los dos microorganismos son unicelulares, lo cual los hace de fácil cultivo y mantenimiento en el laboratorio, aun en casos en los que solo se cuenta con una infraestructura básica. Las condiciones de cultivo para los dos organismos se han conocido por décadas, son simples y pueden ser tanto autótrofos como heterótrofos. Aunque en general los dos organismos consumen sales inorgánicas similares, cada uno puede consumir diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, lo cual crea numerosas oportunidades para la investigación. El tiempo de experimentación es corto, generalmente de una semana. De acuerdo con nuestros estudios, la microalga responde a la presencia de *Azospirillum* de manera similar a las plantas superiores, aumentando su crecimiento y cambiando su metabolismo.

Por otro lado, la tecnología de inmovilización y liberación de los dos microorganismos de las esferas de alginato es usada comúnmente en la producción de inoculantes microbianos.

Este modelo experimental es altamente cuantitativo; el número de células puede medirse directamente por microscopía de luz, por técnicas microbiológicas básicas, o con cualquier equipo que

sea capaz de medir partículas, tal como un analizador de imágenes. De esta manera la variación entre replicas es mínima, permitiendo así utilizar un menor número de repeticiones; la unidad experimental es tan pequeña como un matraz erlenmeyer.

INTRODUCCIÓN

Un importante obstáculo en el estudio de las interacciones entre organismos procariotas y eucariotas es la complejidad del componente eucariota, el cual es generalmente de alguna importancia económica. Los estudios básicos de las interacciones entre la bacteria promotora de crecimiento de plantas (PGPB por sus siglas en inglés) *Azospirillum* y plantas (realizados principalmente con cereales) son difíciles debido a las múltiples funciones de los tejidos vegetales, a las numerosas posibles interacciones con las raíces de la planta y a la interferencia con la matriz del suelo. De esta manera, existe una significativa mayor cantidad de información sobre la bacteria que sobre la interacción misma (Steenhoudt & Vanderleyden 2000; Bashan & col. 2004; Spaepen & col. 2007).

En este sentido, el problema fundamental en los estudios de interacción planta-bacteria es el tamaño del genoma de la planta. La planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado extensamente principalmente debido al hecho de que su genoma es pequeño (125 Mb; *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000), se ha secuenciado y hay disponibles numerosos mutantes de la mayoría de sus vías metabólicas. La reciente secuenciación del gran genoma del arroz, (389 Mb; International Rice Genome Sequencing Project 2005) podría proporcionar oportunidades de investigación con PGPBs. Sin embargo, es improbable que en un futuro cercano se logren entender los genomas más grandes de plantas con las cuales las PGPB interactúan comúnmente tales como maíz (2.5 Gb); avena (11.4 Gb) (Arumuganathan & Earle, 1991) y trigo (16 Gb; Gill & col. 2004), aun cuando algunos de estos genomas están ya en proceso de secuenciación. Por otro lado, las microalgas, y en especial *Chlorella*, son una alternativa potencial para interactuar con PGPB, debido a que poseen el genoma de menor tamaño entre las plantas (cerca de 40 Mb), que según lo que conocemos, es el más pequeño entre los organismos eucarióticos fotosintéticos caracterizados hasta el momento (Higashiyama & Yamada 1991).

Chlorella sp. (Chlorophyceae) es una microalga acuática, unicelular, no motil. Fue una de las primeras en ser aisladas como cultivo puro por Beijerinck en 1890 (Oh-Hama & Miyachi, 1992). Ha sido ampliamente utilizada en estudios de fotosíntesis y respiración. (Ilangovanet & col. 1998) y mucho del conocimiento en la producción de carbohidratos por las microalgas se ha obtenido de esta especie (Hosono & col. 1994; Ramazanov & Ramazanov 2006). Desde finales de los años 1940s, la atención científica se ha encauzado hacia el potencial del cultivo masivo esta microalga para la producción de compuestos de alto valor económico y bajo volumen, tales como pigmentos para la industria alimenticia y para el mercado de productos para la salud (Richmond 1990), y su aplicación en el tratamiento de aguas residuales (Oswald 1992). *Azospirillum* sp. por su parte es la bacteria promotora de crecimiento en plantas más estudiada hasta el momento (Bashan & de-Bashan 2005). Es una bacteria de la rizosfera, fijadora de nitrógeno, muy versátil en su transformación de nitrógeno. Además de fijar nitrógeno bajo condiciones microaeróbicas, también desnitrifica bajo condiciones anaeróbicas o microaerofílicas, puede asimilar NH_4^+ , NO_3^- , o NO_2^- (Hartman & Zimmer, 1994) y actúa como un promotor de crecimiento de numerosas especies de plantas (Bashan & col. 2004) incluyendo *Chlorella* sp. (Gonzalez & Bashan 2000).

El alginato es el polímero más comúnmente utilizado para encapsular microorganismos, proceso también denominado inmovilización (Smidsrød & Skjak-Braek, 1990). La cadena polimérica del alginato esta compuesta de ácidos manurónico y gularónico en proporciones variables y arreglos

BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS Y MICROALGAS VERDES: UN MODELO CONVENIENTE PARA EL ESTUDIO BÁSICO DE LAS INTERACCIONES PLANTA-BACTERIA

Tipo de estudio	Especie microalgal	Cepa de PGPB	Referencia
Promoción del crecimiento (peso seco, número de células, tamaño colonial, tamaño celular)	<i>C. vulgaris</i> <i>C. sorokiniana</i>	<i>A. brasilense</i> Cd; Sp6; Sp 245 ; <i>A. lipoferum</i> JA-4 <i>A. brasilense</i> Cd; <i>B. subtilis</i> ; <i>P. chitinolyticus</i>	Gonzalez and Bashan 2000; de-Bashan et al. 2007 a de-Bashan et al. 2007b; de-Bashan et al. unpublished
Hormonas	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd, Sp 6; Sp 245; FAJ0009; SpM7918; <i>A. lipoferum</i> JA4; JA4::ngfp15	de-Bashan et al. 2007 a
Absorción de N y P	<i>C. vulgaris</i> ; <i>C. sorokiniana</i>	<i>A. brasilense</i> Cd, <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	de-Bashan et al. 2002b,2004; Gonzalez-Bashan et al. 2000; Hernandez et al. 2006; Yabur et al. 2007
Pigmentos fotosintéticos	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2002 a
Lípidos	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2002 a
Modificación de ácidos grasos	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2002 a
Interacciones célula-célula	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd; <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	Lebsky et al. 2001
Senescencia	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd; <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	Gonzalez-Bashan et al. 2000 ; Lebsky et al. 2001
Control poblacional	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2005
Dinámica de poblaciones	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2002 a
Mitigación de la temperatura e intensidad lumínica	<i>C. sorokiniana</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2007
Efecto del ayuno de nutrientes	<i>C. sorokiniana</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	Hernandez et al. 2006
Mitigación de la inhibición de crecimiento por pH	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2005
Mitigación de la inhibición de crecimiento por triptófano	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2007; no publicado
Enzimas del metabolismo del nitrógeno	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i> Cd	de-Bashan et al. 2007; no publicado

PGPB- Plant growth-promoting bacteria (Bashan and Holguin 1998).
C- *Chlorella*; A-*Azospirillum*; B-*Bacillus*; P-*Paenibacillus*.

secuenciales. Los monómeros pueden estar ligados por iones calcio constituyendo bloques consecutivos de ácido gúlico, para formar el gel (McHugh 2003).

La inmovilización de microorganismos atrapados en esferas de alginato es una técnica ampliamente utilizada para células microbianas viables (O'Reilly & Scott, 1995). Este método es utilizado en varios campos biotecnológicos como una forma práctica de producir metabolitos secundarios de valor comercial; también se utiliza como una herramienta en la manipulación genética para inmovilizar bacterias recombinantes ya que mejoran la estabilidad de los plásmidos (Romo & Perez-Martinez, 1997) y para inmovilizar microalgas con el fin de eliminar de aguas residuales compuestos inorgánicos y metales pesados (Tam & Wong, 2000). En este último caso, su mayor ventaja reside en el hecho de que facilita significativamente la cosecha de la biomasa de microalgas del agua después del tratamiento (de la Nouë & de Pauw, 1988).

Estos son los tres componentes básicos del modelo experimental que proponemos. Aunque ya hemos publicado varios aspectos técnicos de este modelo, como soporte a los estudios aplicados en tratamiento de aguas residuales (de-Bashan & col. 2002), esta es la primera presentación del modelo en su totalidad como un medio para el estudio de las interacciones planta-bacteria.

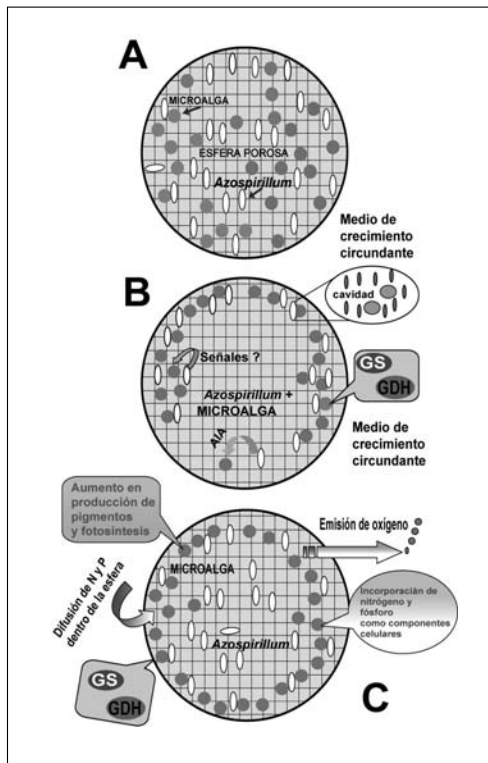


Figura 1. Modelo conceptual de la inmovilización conjunta en esferas de alginato de microalgas y bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB) (A) Los dos microorganismos son inmovilizados al azar en la matriz polimérica (B) Después de un período de tiempo de co-cultivo, los dos microorganismos comparten las cavidades dentro de la esfera donde la PGPB excreta ácido indolacético (y posiblemente otras hormonas vegetales) que aumentan el crecimiento microalgal. (C). Hay difusión de nutrientes del medio hacia el interior de la esfera y estos son incorporados como componentes celulares por la microalga, aumentando su población y liberando oxígeno al medio circundante. Tamaño no a escala.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones axénicas de cultivo

Se utilizaron las microalgas *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714, Universidad de Texas, Austin, TX) y *C. sorokiniana* Shih. et Krauss (UTEX 1602 y UTEX 2805). Antes de su inmovilización en las esferas, los cultivos de *Chlorella* se mantuvieron de manera estéril en el medio de crecimiento mineral C30, (composición: (en g/L) KNO_3 , 25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10; KH_2PO_4 , 4; K_2HPO_4 , 1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; (en $\mu\text{g/L}$) H_3BO_3 , 2.86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.11; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.09; NaMoO_4 , 0.021) por 5-6 días, bajo agitación continua (150 r.p.m.) a 27-30 °C e intensidad lumínica de 60 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$.

Se utilizaron también las siguientes cepas de bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB): las cepas silvestres *Azospirillum brasilense* Cd (DMS 1843, Braunschweig, Alemania) *A. brasilense* Sp245 (EMBRAPA-Rio de Janeiro, Brasil); *A. brasilense* Sp6 (Barbieri & Galli (1993) *A. lipoferum* JA4 (Castellanos & col. (1997); y las mutantes con producción de AIA atenuada *A. brasilense* FAJ0009 (Vande Broek & col. (1999) *A. brasilense* SpM7918 (Barbieri & Galli (1993) y *A. lipoferum* JA4::ngfp15 (Bacilio & col. (2004). Todas las cepas fueron cultivadas en caldo nutritivo (Sigma) o en medio OAB libre de nitrógeno (Bashan & col. 1993), composición (en g/L): KOH, 4.8; ácido málico, 5; NaCl, 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25; K_2HPO_4 , 0.13; CaCl_2 , 0.22; K_2SO_4 , 0.17; Na_2SO_4 , 2.4; NaHCO_3 , 0.5; Na_2CO_3 , 0.09; $\text{Fe}_{(III)}\text{EDTA}$ 0.07; (in mg/L): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2; H_3BO_3 , 0.2; ZnCl_2 , 0.15; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2) a 35 ± 2 °C y agitación (120 r.p.m.) por 17 horas (Bashan & col. 1993). Se utilizaron también las PGPB *Bacillus* Sp. y *Paenibacillus* Sp. (Puente & col. 2004). Estas se mantuvieron en medio soya triptica.

Inmovilización conjunta de los microorganismos

Los microorganismos fueron inmovilizados como se describe en de-Bashan & col. (2004): 100 ml del cultivo axénico de microalgas (con aprox. 6×10^6 cels/mL) se lavaron dos veces con solución salina estéril al 0.85% y se resuspendieron en 20 mL de la misma solución salina estéril. Este cultivo se mezcló con 80 mL de una solución estéril de alginato de 6,000 cP al 2% (una solución hecha de una mezcla de alginato de 14,000 y 3,500 cP), por 15 min. La solución se adicionó mediante una jeringa de 10 mL gota a gota a 100 mL de una solución CaCl_2 al 2%, mezclando periódicamente. Las esferas resultantes se dejaron en endurecimiento por una hora, al término de la cual se lavaron con solución salina estéril.

Para las cepas de *A. brasilense* y las otras PGPB, 50 mL de cultivo se lavaron con solución salina al 0.85 % y se resuspendieron en 20 mL de solución salina. A cada cultivo se le ajustó la densidad óptica a 1.0 a 540 nm (aprox. 10^9 cfu/mL), y posteriormente se inmovilizaron de la misma manera que *Chlorella*.

Para inmovilizar de manera conjunta a los dos microorganismos, después del lavado, cada uno de los cultivos se resuspendió en 10 mL de solución salina y se mezclaron junto con el alginato. Debido a que la inmovilización normalmente reduce el número de células de PGPB dentro de la esfera, se requiere una segunda incubación, en caldo nutritivo diluido (10% v/v), a 30 ± 2 °C y agitación (120 r.p.m.) por 17 horas.

Las condiciones de cultivo para microorganismos inmovilizados de manera conjunta fueron las siguientes: después de la incubación secundaria, las esferas fueron lavadas tres veces con solución salina estéril al 0.85 %; luego 4 g de esferas fueron inoculados en 100 mL de medio sintético de crecimiento (MSC) con la siguiente composición: (en mg/L) NaCl, 7; CaCl_2 , 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2; K_2HPO_4 , 21.7; KH_2PO_4 , 8.5; NaHPO_4 , 33.4; y NH_4Cl , 25.

Los cultivos semicontinuos fueron incubados en ciclos de 48 horas cada uno, reemplazando el MSC (en cada ciclo) para el próximo ciclo, pero usando las mismas esferas con los organismos inmovilizados. Los experimentos fueron realizados en matraces erlenmeyer, y se mantuvieron en agitación a 120 r.p.m. a 28 ± 2 °C e intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$.

Para los conteos celulares de rutina, las esferas se disolvieron, sumergiendo 5 esferas en 5 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 4% por 30 minutos. Todas las cepas de PGPB fueron contadas mediante plaqueo en agar nutritivo (Sigma) de diluciones seriadas (en solución salina). Para las microalgas, se contó el número de células y se midió el tamaño de cada una en un analizador de imágenes (Image Pro-Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Debido a que los cloroplastos de la microalga tienen una fluorescencia natural, se conectó el analizador de imágenes a un microscopio de fluorescencia Olympus BX41, permitiendo de esta manera contar las microalgas y medir cada célula de manera individual. El peso seco de la microalga fue determinado después de disolver las esferas de la siguiente manera: los cultivos se lavaron con solución salina al 0.85% y se filtraron en membranas de nitrocelulosa (Millipore HAWP 04700, Bedford, MA) de poro de $0.45\text{-}\mu\text{m}$ previamente pesados y secados. Una vez filtrada la muestra, los filtros se secaron a 60 °C por 72 h.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, donde un erlenmeyer sirvió como una réplica. Cada experimento fue repetido en su totalidad dos o tres veces. Los resultados entre tratamientos fueron analizados por un análisis de *t* de Student's a $P \leq 0.05$. Las diferencias entre los ciclos del mismo tratamiento fueron analizadas mediante un Análisis de Varianza de una Vía (ANDEVA) a $P \leq 0.05$ y posteriormente analizados por un análisis Tukey, usando el paquete Statistica™ software versión 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

Construcción y operación del modelo experimental involucrando a la microalga y a la bacteria.

Con base en los estudios publicados de los eventos específicos que ocurren durante la interacción de los dos microorganismos dentro de la esfera polimérica (Tabla 1), puede sugerirse la siguiente secuencia de eventos durante la interacción entre los dos microorganismos: la inmovilización conjunta inicial de *Chlorella* sp. con cualquiera de las cepas de PGPB puede caracterizarse como una inmovilización al azar de partículas dentro de la matriz de gel (Fig 1A). Los nutrientes en el medio circundante se difunden libremente dentro del gel poroso. Con tiempo, entre 6 y 48 horas dependiendo de la combinación específica de microalga-bacteria, los dos microorganismos se unen en la misma cavidad dentro de la esfera después de que se disuelven pequeñas partes de la estructura interna de la matriz (Fig 1B); la bacteria excreta AIA (y otras señales moleculares no definidas) posiblemente alcanzando a la célula microalgal cercana. En esta etapa, la actividad de las enzimas en la microalga (se han analizado dos hasta el momento: Glutamato sintetasa -GS- y Glutamato deshidrogenasa -GDH) no se ven afectadas (Fig 1B). En la última fase de la interacción, después de 48 horas de inoculación conjunta, aumentan tanto la actividad de la GS como la de la GDH, la producción de pigmentos fotosintéticos, la incorporación de nutrientes como componentes microalgales y el sistema coinmovilizado libera el oxígeno producido por *Chlorella* sp. como un subproducto de la fotosíntesis (Fig 1C). El efecto más notorio de la inmovilización conjunta es que la población de la microalga aumenta significativamente 2-3 veces en comparación con la microalga sola.

DISCUSIÓN

Es obvia la utilidad de un modelo experimental simple para los estudios básicos de la compleja interacción que ocurre entre plantas y bacterias. El modelo presentado involucra la interacción entre dos microorganismos bien estudiados, atrapados en una matriz de gel.

Los microorganismos, la microalga unicelular *Chlorella* sp. y la bacteria promotora de crecimiento en plantas (PGPB) *Azospirillum* sp. fueron escogidos debido a sus características únicas. Esta microalga posee uno de los genomas vegetales más pequeños conocidos (Higashiyama & Yamada 1991) y es una de las microalgas mejor estudiadas por cerca de un siglo; *Azospirillum* sp. por su parte es la PGPB más estudiada (Hartmann & Zimmer 1994; Bashan & col. 2004), hay numerosos mutantes disponibles de este género (Hartmann & col. 1983; Barbieri & Galli 1993; Landstein & col. 1993; Dobbelaere & col. 1999; Vande Broek & col. 1999; Burhenne & Tischner 2000; Steenhoudt & Vanderleyden 2000; Bottini & col. 2004; Ishikawa & col. 2004) y es fácil obtener las especies de colecciones. La inmovilización de los dos organismos dentro de la matriz de alginato, el cual es inocuo y no tóxico, asegura el establecimiento de esta asociación artificial y el efecto mutuo, ya que debido a que los microorganismos están atrapados dentro del gel, el movimiento de *Azospirillum* se ve limitado. El alginato, obtenido para estos estudios de la microalga *Macrocystis pyrifera*, es un ingrediente registrado común en la industria alimenticia, en las prácticas odontológicas y en la producción de pigmentos, que es fácil de manejar y muy económico (Mchugh 2003)

No obstante todas estas características favorables, el modelo no se restringe a la interacción *Chlorella vulgaris*-*Azospirillum brasilense* que engloba la mayoría de estudios hechos hasta ahora. Otras PGPB tales como *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus chitinolyticus* y otras especies de microalgas tales como *C. sorokiniana* se han probado de manera exitosa también (ver Tabla 1). Estas opciones abren la puerta a infinitas combinaciones de microalgas-PGPB considerando que hay numerosas especies de microalgas y PGPB para escoger. De manera similar, diferentes tipos de alginato derivados tanto de microalgas (Machugh 2003; Yabur & col. 2007) como de bacterias (Gacesa 1998) están disponibles

comercialmente, lo cual permite desarrollar las combinaciones de inmovilización que se deseen. Sin embargo, debido a que la inmovilización de microorganismos es también común utilizando otros polímeros (O'Reilly & Scott 1995), este modelo no está restringido al uso de alginato.

Además del fácil manejo técnico de este modelo experimental, el fundamento lógico de escoger microalgas como el componente vegetal de la interacción es simple. La definición más básica de plantas verdes es que tienen clorofila *a* y *b*, almidón como material de almacenamiento dentro del cloroplasto y pared celular celulósica (Raven & col. 1992). Como tal, las microalgas verdes cumplen con los requisitos básicos de una planta verde. Desde el punto de vista sistemático, las plantas superiores y las algas están clasificadas en un grupo único llamado Chlorobionta o plantas verdes. Hay entre un 70 a 98% de similitud genética entre las plantas superiores y las algas (Devereux & col. 1990). El tamaño del organismo, el número de células y la diferenciación celular no son parámetros que definan una planta. En consecuencia, una planta unicelular puede considerarse una planta. El componente bacteriano, *Azospirillum*, fue escogido porque aunque su origen y efectos principales se han reportado en plantas de interés agrícola (Bashan & col. 2004), también afecta el crecimiento de microalgas y ha sido clasificado en varios estudios como bacteria promotora de crecimiento en microalgas (de-Bashan & col. 2002 a,b, 2004, 2005, 2007). Como tal, es probable que esta especie bacteriana pueda tener un efecto significativo en muchas de las vías metabólicas durante su interacción con la microalga.

Proponemos además a la microalga verde como el componente vegetal para el estudio de la interacción planta-bacteria debido a ventajas prácticas que este modelo posee y que han sido ya estudiadas, por ejemplo: (i) las mismas fitohormonas que afectan a las plantas afectan a las microalgas (AIA, AIB, Ácido jasmónico, giberelinas, citocininas) (Dibb-Fuller & Morris 1992; Mazur & col. 2001; Oh-Hama & Miyachi 1992; Stirk & col. 2002); (ii) las enzimas asociadas con el metabolismo del nitrógeno (tales como la glutamato deshidrogenasa, la glutamato sintetasa y la glutamato sintasa) son similares en plantas y en microalgas verdes; (iii) los procesos de acumulación de lípidos son similares; (iv) los pigmentos fotosintéticos y la fotosíntesis son similares (Tabla 1); (v) hay numerosas especies de microalgas para escoger.

Los aspectos prácticos y el análisis estadístico de este modelo son considerables. Todos los componentes son de bajo costo, los dos microorganismos son fácilmente cultivables y para su análisis se utilizan técnicas estándar de microbiología. Los resultados se obtienen en escala de tiempo microbiana (días a semanas) y es un sistema libre de suelo. La reproducibilidad es muy alta y una réplica es simplemente un matraz erlenmeyer, lo que permite tener en un espacio reducido tantas réplicas como sean necesarias. Al analizar varios cientos de experimentos publicados en este sistema, encontramos que el error estándar es muy bajo permitiendo de esta manera detectar efectos mínimos que ocurren entre los dos componentes durante la interacción. Hasta el momento, y con experimentos desarrollados en los últimos 10 años, no hemos observado ninguna desventaja en este modelo.

En resumen, la microalga *Chlorella* spp. responde a la asociación con la PGPB *Azospirillum* spp. de manera similar a las plantas superiores. El sistema inmovilizado con los dos microorganismos es fácil de manejar, reproducible, se obtienen resultados rápidamente y es de bajo costo. Este sistema de dos organismos inmovilizados se presenta como un modelo experimental para los estudios básicos de fisiología y biología molecular de la interacción planta-bacteria.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Bashan Foundation, USA. El trabajo experimental en el cual se basa este modelo fue financiado principalmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT Investigación Científica Básica 2005 contrato 50560-Z) y la Secretaría de Medio Ambiente

y Recursos Naturales de México (SEMARNAT contrato 23510) de México.

REFERENCIAS

- Arabidopsis* Genome Initiative (AGI). 2000.
Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408:796-815.
- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. 1991.
Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:208-218.
- Bacilio, M., Rodríguez, H., Moreno, M., Hernández J-P., & Bashan, Y. 2004.
Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *gfp*-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biol. Fertil. Soils* 40:188-193.
- Barbieri, P., & Galli, E. 1993.
Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Res. Microbiol.* 144:69-75.
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. 2005.
Bacteria / Plant growth-promotion. En: Hillel, D. (ed). *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, U.K. Vol. 1., pp. 103-115.
- Bashan, Y., & Holguin, G. 1998.
Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30:1225-1228
- Bashan, Y., Holguin, G., & de-Bashan, L. E. 2004.
Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50:521-577.
- Bashan, Y., Holguin, G., & Lifshitz, R. 1993.
Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. En: Glick, B. R., & Thompson J. E. (eds). *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, USA. pp. 331-345.
- Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. 2004.
Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:497-503.
- Burhenne, N., & Tischner, R. 2000.
Isolation and characterization of nitrite-reductase-deficient mutants of *Chlorella sorokiniana* (strain 211-8k). *Planta* 211:440-445
- Castellanos, T., Ascensio, F., & Bashan, Y. 1997.
Cell-surface hydrophobicity and cell-surface charges of *Azospirillum* spp. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 24:159-172.
- de-Bashan, L. E., Antoun, H., & Bashan, Y. 2005.
Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54:197-203.
- de-Bashan, L. E., Antoun, H., & Bashan, Y. 2007.
Involvement of indole-3-acetic-acid produced by the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in growth promotion of *Chlorella vulgaris*. *J. Phycol.* (accepted).

- de-Bashan, L. E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V. K., & Bustillos, J. J. 2002a.
Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 48:514-521.
- de-Bashan L. E., Hernandez, J. P., Morey, T., & Bashan, Y. 2004.
Microalgae growth-promoting bacteria as «helpers» for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38:466-474.
- de-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. 2002b.
Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res.* 36:2941-2948.
- de-Bashan L.E., Trejo A., Huss V.A.R., Hernandez J.-P. and Bashan, Y. 2008. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology* 99: 4980-4989.
- de la Nouë, J., & de Pauw, N., 1988.
The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotech. Adv.* 6:725-770.
- Devereux, R., Loeblich, A. R. III., & Fox, G. E. 1990.
Higher plant origins and the phylogeny of green algae. *J. Mol. Evol.* 31:18-24.
- Dibb-Fuller, J., & Morris, D. A. 1992.
Studies on the evolution of auxins carriers and phototropin receptors: Transmembrane auxin transport in unicellular and multicellular Chlorophyta. *Planta* 186:219-226.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A., & Vanderleyden, J. 1999.
Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212: 155-164.
- Gacesa, P. 1998.
Bacterial alginate biosynthesis – recent progress and future prospects. *Microbiology* 144:1133-1143.
- Gill, B. S., Appels, R., Botha-Oberholster, A-M., Buell, C. R., Bennetzen, J. L., Chalhoub, B., Chumley, F., Dvořák, J., Iwanaga, M., Keller, B., Li, W., McCombie, W. R., Ogihara, Y., Francis, Q., & Takuji, S. 2004.
A Workshop Report on Wheat Genome Sequencing. *Genetics* 168:1087-1096.
- Gonzalez L. E., & Bashan, Y. 2000.
Growth promotion of the microalgae *Chlorella vulgaris* when co-immobilized and co-cultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1537-1541.
- Gonzalez-Bashan, L. E., Lebsky, V., Hernandez, J. P., Bustillos, J. J. & Bashan, Y. 2000.
Changes in the metabolism of the microalgae *Chlorella vulgaris* when co-immobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Can. J. Microbiol.* 46:653-659.
- Hartmann, A., Singh, M., & Klingmüller, W. 1983.
Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29:916-923.
- Hartmann, A., & Zimmer, W. 1994.
Physiology of *Azospirillum*. *En Okon, Y. (ed), Azospirillum/Plant Associations.* CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 15-39.

- Hernandez, J. P., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. 2006.
Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme Microb. Technol.* 38:190-198.
- Higashiyama, T., & Yamada, T. 1991.
Electrophoretic karyotyping and chromosomal gene mapping of *Chlorella*. *Nucl. Acid Res.* 19: 6191-6195.
- Hosono, H., Uemura, Takumi, T., Nagamune, T., Toshiko, Y., Kishimoto, Nagashima, H., Shimomura, N., Natori, M., & Endo, I. 1994.
Effect of culture temperature shift on the cellular sugar accumulation of *Chlorella vulgaris* SO-26. *J. Ferment. Bioeng.* 78:235-40.
- Ilangovan, K., Cañizares-Villanueva, R. O., González Moreno, S., & Voltolina, D. 1998.
Effect of cadmium and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60:936-943
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005.
The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793-800.
- Ishikawa, E., Sansawa, H., & Abe, H. 2004.
Isolation and characterization of a *Chlorella* mutant producing high amounts of chlorophyll and carotenoids. *J. Appl. Phycol.* 16:385-393.
- Landstein, D., Arad, S., Barak, Z., & Chipman, D. M. 1993.
Relationships among the herbicide and functional sites of acetohydroxy acid synthase from *Chlorella emersonii*. *Planta* 191:1-6.
- Lebsky, V. K., Gonzalez-Bashan, L.E., & Bashan, Y. 2001.
Ultrastructure of co-immobilization of the microalga *Chlorella vulgaris* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* and with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* in alginate beads. *Can. J. Microbiol.* 47:1-8.
- McHugh, D. J. 2003.
A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper No 441, Rome, Italy, 105 pp
- Mazur, A., Konop, A., & Synak, R. 2001.
Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* 13:35-42.
- Oh-Hama, T., & Miyachi, S. 1992.
Chlorella. *En: Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. (eds.), Microalgal Biotechnology.* Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 3-26.
- O'Reilly, A. M., & Scott, J. A. 1995.
Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 17:636-646.
- Oswald, W. J. 1992.
Micro-algae and waste-water treatment. *En Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. (eds.), Microalgal Biotechnology.* Cambridge University Press, Cambridge. UK. pp. 305-328.
- Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y., & Lebsky, V. K. 2004.
Microbial populations and activities in the rhizosphere of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6:629-642

- Ramazanov, A., & Ramazanov, Z. 2006.
Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. *Phycological Research* 54:255-259.
- Raven, P. H., Evert, R. H., & Eichhorn, S. E. 1992.
Biology of plants. 5th edition. Worth publishers, NY.
- Richmond, A. 1990.
Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press Boca Raton, Florida, 528 pp.
- Romo, S., & Perez-Martinez, C. 1997.
The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudoanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. *J. Phycol.* 33:1073-1076.
- Smidsrod, O., & Skjak-Braek, G. 1990.
Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8:71-78
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. 2007.
Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:425-448
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. 2000.
Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:487-506.
- Stirk, W. A., Ordog, V., Van Staden, J., & Jager, K. 2002.
Cytokinin-and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.* 14: 215-221.
- Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. 2000.
Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environ. Pollut.* 107:145-151.
- Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., & Vanderleyden, J. 1999.
Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 181:1338-1342.
- Yabur, R., Bashan, Y., & Hernández-Carmona, G. 2007.
Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *J. Appl. Phycol.* 19:43-53.

