





Co-cultures of endophytic microorganisms: A strategy to produce bioestimulants and value-added compounds

Cocultivos de microorganismos endófitos: Estrategia para la producción de bioestimulantes y compuestos de valor agregado

Monserrat Guadalupe Velázquez-Rodríguez¹, Tania L. Volke-Sepúlveda¹, Francisco Javier Figueroa-Martínez^{2*}

¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa; Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1A Sección, Iztapalapa, 09310, Ciudad de México.

²Investigador por México CONAHCyT – Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1A Sección, Iztapalapa, 09310, Ciudad de México.

*Corresponding author

E-mail address: ffiguero@xanum.uam.mx; franfigmtz@gmail.com (F.J. Figueroa-Martínez)

Article history:

Received: 2 August 2024 / Received in revised form: 16 December 2024 / Accepted: 18 December 2024 / Published online: 20 January 2025.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2025.10.1.61>

ABSTRACT

Cocultures between algae and bacteria aim to harness the metabolic capabilities of both microorganisms for biotechnological purposes. However, establishing a successful coculture is challenging because of their different nutritional and environmental requirements. This work proposes the establishment of a coculture between the plant growth-promoting bacterium *Methylobacterium oryzae* and the unicellular green alga *Coccomyxa simplex*, both endophytes of *Vachellia farnesiana*, with the aim of using their metabolic capacities to produce value-added compounds. To achieve this, the conditions to obtain a stable alga-bacteria coculture were defined, and the effect of the coculture and the initial nutrient concentration on lipid and pigment production, as well as plant growth stimulation were evaluated. A stable coculture was successfully established enabling the growth of both microorganisms even in the absence of carbon and nitrogen sources. The

coculture stimulated lipid production (up to 43%) and pigment production (by 2.5 to 4.8 times). Additionally, the coculture's supernatant improved the growth of radish seedlings, suggesting that the coculture promotes the production of biostimulant compounds with potential to enhance crop yields and reduce the use of chemical fertilizers.

Keywords: Biostimulant, cocultures, lipid production, pigment production, plant growth-promoting compounds.

RESUMEN

Los cocultivos entre algas y bacterias buscan aprovechar las capacidades metabólicas de ambos microorganismos con fines biotecnológicos. No obstante, establecer un cocultivo es desafiante debido a sus distintos requerimientos nutricionales y ambientales. En este estudio se propuso establecer un cocultivo entre la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Methylobacterium oryzae* y el alga verde unicelular *Coccomyxa simplex*, ambos endófitos de *Vachellia farnesiana*, con el objetivo de aprovechar sus capacidades metabólicas para la producción de compuestos de valor agregado. Para ello, se definieron las condiciones para obtener un cocultivo estable, y se evaluó el efecto del cocultivo y la concentración inicial de nutrientes sobre la producción de lípidos, pigmentos y la estimulación del crecimiento vegetal. Se logró establecer un cocultivo que permitió el crecimiento de ambos microorganismos incluso en ausencia de fuente de carbono y de nitrógeno. El cocultivo estimuló la producción de lípidos (hasta un 43%) y de pigmentos (entre 2.5 a 4.8 veces más). Además, el sobrenadante del cocultivo mejoró el crecimiento de germinados de rábano, sugiriendo que el cocultivo estimula la producción de compuestos bioestimulantes con potencial para incrementar el rendimiento de cultivos y disminuir el uso de fertilizantes químicos.

Palabras Clave: Bioestimulante, cocultivos, compuestos promotores del crecimiento vegetal, producción de lípidos, producción de pigmentos.

1. INTRODUCCIÓN

El uso biotecnológico de microalgas para la producción de biocombustibles y otros compuestos de valor agregado, el tratamiento de aguas, la alimentación animal y como bioestimulante agrícola ha ganado gran auge durante el último siglo (Rizwan *et al.*, 2018). Sin embargo, muchas veces no se logra el crecimiento deseado para su aplicación industrial (Hoang *et al.*, 2022), por lo que se han utilizado diversas estrategias para mejorar la productividad de biomasa y de compuestos de interés; éstas van desde la modificación de las condiciones físicas del cultivo y el desarrollo de distintos medios de cultivo, hasta la ingeniería genética (Khan *et al.*, 2018).

Ciertas bacterias heterótrofas desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y la supervivencia de diversas especies de microalgas (Ramanan *et al.*, 2016), pues pueden establecer asociaciones basadas en el intercambio de nutrientes y metabolitos (Wang *et al.*, 2014). Varios autores han propuesto el aprovechamiento de este tipo de interacciones como una alternativa ecológica y sustentable para mejorar la producción de biomasa microalgal (Peng *et al.*, 2020), para la producción de bioestimulantes y de diversos

compuestos de valor biotecnológico (González-González *et al.*, 2021, Choix *et al.*, 2018, Palacios *et al.*, 2016, Higgins *et al.*, 2014, Kang *et al.*, 2021). Además, los cocultivos se pueden utilizar para incrementar la tolerancia de ambos microorganismos a condiciones ambientales adversas (Tong *et al.*, 2023) o su eficiencia para la remoción de contaminantes (Verma *et al.*, 2020).

Los cocultivos microalga – bacteria pueden ser formados por microorganismos que coexisten de manera natural en el mismo medio ambiente, a los que se considera “cocultivos naturales”, o por especies aisladas de distintos ambientes, denominados “cocultivos artificiales” (Palacios *et al.*, 2022); sin embargo, las especies específicas de bacterias y algas que pueden formar asociaciones simbióticas deben determinarse experimentalmente, pues mientras que algunas especies bacterianas tienen un efecto positivo en la producción de biomasa de algas, otras inhiben su crecimiento, aun cuando sean aisladas del mismo medio ambiente (Cho *et al.*, 2015, Lian *et al.*, 2021).

Un ejemplo de cocultivo natural es el del alga verde *Tetrademus obliquus* y la proteobacteria *Variovorax paradoxus*, ambas aisladas de aguas residuales; este consorcio se ha utilizado para la biorremediación de efluentes agrícolas (Perera *et al.*, 2022). El consorcio microbiano formado por *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella* sp. y las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter calcoaceticus*, todos aislados de las aguas residuales de una refinería, se han utilizado para la producción de biomasa de algas y la remediación de aguas residuales (Makut *et al.*, 2019). Por otra parte, entre los cocultivos artificiales, puede mencionarse el formado entre *Characium* sp. y *Chlorella pyrenoidosa* con *Pseudomonas* sp., utilizado para incrementar la producción de lípidos (Berthold *et al.*, 2019, Zhou *et al.*, 2020); el cocultivo de *Phaeodactylum tricornutum* y *Stappia* sp. para mejorar la producción de pigmentos fotosintéticos (Vuong *et al.*, 2019), y el cocultivo de *Scenedesmus obliquus* y *Bacillus megaterium*, para el tratamiento de altas concentraciones de biogás. Los cocultivos entre *Haematococcus pluvialis* y *Achromobacter* sp. (Lee *et al.*, 2019), así como el de tres microalgas marinas (*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri*) con *Flavobacterium* sp. (Cho *et al.*, 2015) se han utilizado para aumentar la biomasa microalgal.

A pesar de los numerosos ejemplos de cocultivos microalga-bacteria, establecer un cocultivo exitoso es una tarea desafiante, pues se debe equilibrar la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo, la intensidad de la luz, el fotoperíodo y la temperatura (Wang *et al.*, 2015, Berthold *et al.*, 2019, Suastes *et al.*, 2020) para evitar que una de las especies supere el crecimiento de la otra, dificultando su coexistencia (Tong *et al.*, 2023); además, se debe considerar que tanto las microalgas como las bacterias pueden secretar compuestos que afectan el crecimiento y la actividad metabólica de la otra especie (Berthold *et al.*, 2019).

En estudios previos en el grupo de trabajo, se demostró la presencia de *Methylobacterium oryzae* y *Coccomyxa* sp. como endófitos de *Vachellia farnesiana*, y que ambos endófitos tienen un papel crucial en el crecimiento y la resistencia al estrés de su hospedero (Alcántara-Martínez *et al.*, 2018; Alcántara-Martínez *et al.*, 2022). El género *Methylobacterium* comprende varias especies bacterianas con pigmentación rosada debida a la alta producción de carotenoides; estas bacterias son ubicuas en la naturaleza y el género incluye varias especies diazótroficas con características promotoras del crecimiento vegetal (PCV). Entre éstas, se ha reportado la producción de hormonas

vegetales y el aumento en la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés abiótico causado por la alta salinidad, condiciones de sequía o la presencia de elementos tóxicos (Palberg *et al.*, 2022, Alcántara-Martínez *et al.*, 2018). Por su parte, el género *Coccomyxa* comprende un grupo de microalgas unicelulares de vida libre, capaces de tolerar condiciones extremas de pH, altas concentraciones de elementos tóxicos (Fuentes *et al.*, 2016) y altas dosis de radiación (Rivasseau *et al.*, 2016). La naturaleza extremófila de algunas especies de *Coccomyxa* ha despertado el interés en su aplicación para la producción de lípidos (Soru *et al.*, 2019) y otros compuestos de valor agregado como la luteína (Bermejo *et al.*, 2018). Además, este género tiene una notable capacidad para formar asociaciones simbióticas con diversos organismos; se han descrito varias especies de *Coccomyxa* asociadas con bacterias y hongos formando líquenes (Tagirdzhanova *et al.*, 2018) y en asociación con algunas plantas terrestres (Alcántara-Martínez *et al.*, 2022; Sciuto *et al.*, 2019; Trémouillaux *et al.*, 2007).

Considerando la capacidad del género *Coccomyxa* para formar asociaciones simbióticas, las características PCV del género *Methylobacterium* y, dado que ambos microorganismos fueron aislados de la misma planta, se planteó la hipótesis de que es posible el cocultivo entre la microalga *Coccomyxa simplex* y la bacteria *Methylobacterium oryzae* para la producción de un bioinoculante agrícola, así como para estimular la producción de compuestos de valor agregado. Con base en esto, el objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones de cultivo que permitan obtener un cocultivo mutualista microalga-bacteria, y evaluar el efecto del cocultivo sobre la producción de lípidos, pigmentos fotosintéticos y sobre el crecimiento vegetal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos

Las dos cepas utilizadas en el estudio (*Coccomyxa simplex* y *Methylobacterium oryzae* AFM14) fueron aisladas de plántulas de *Vachellia farnesiana* que crecieron durante al menos 50 días, bajo condiciones *in vitro* en medio Murashige-Skoog (MS, M5519, Sigma) con 10 g/L de sacarosa (S9378, Sigma) (Alcántara-Martínez *et al.*, 2018; 2022).

Para los ensayos, el inóculo de *C. simplex* se preparó en medio MS líquido con 10 g/L de sacarosa (pH 5.7). Los cultivos se mantuvieron en agitación (30 rpm, SI 600R, Lab. Companion) por 8 días a 27°C y un fotoperiodo de 18 h luz / 6 h oscuridad (luz LED, intensidad de 40 μmol fotones / $\text{m}^2\cdot\text{s}$). Para el inóculo bacteriano, *M. oryzae* se cultivó en caldo nutritivo durante 72 h a 27°C con agitación (100 rpm). La biomasa obtenida de cada microorganismo se centrifugó (3500 rpm, 15min) y la pastilla se resuspendió en 5 mL de solución isotónica (NaCl 0.9%, p/v).

2.2. Establecimiento de cocultivos alga-bacteria

2.2.1. Medio de cultivo

Todos los cultivos se llevaron a cabo usando medio MS, que se preparó a partir de una solución de micronutrientes (M0529, Sigma) a la que se agregaron los macronutrientes del medio MS clásico, con excepción de las fuentes de nitrógeno (NH_4NO_3 y KNO_3). La

concentración de las fuentes de nitrógeno y de carbono (sacarosa) se ajustó de acuerdo con las condiciones especificadas en el diseño experimental.

2.2.2. Selección de la proporción de inóculos en el cocultivo

Para definir la proporción de inóculo de cada microorganismo, se evaluó el efecto de la concentración de inóculo de cada microorganismo y de la concentración de carbono (C) y nitrógeno (N), usando un diseño factorial fraccionado 3^{4-1} con los siguientes factores y niveles: (i) *M. oryzae* (0, 5×10^5 y 1×10^6 UFC/mL); (ii) *C. simplex* (0, 5×10^5 y 1×10^6 cel/mL); (iii) concentración de C, adicionada como sacarosa, (0, 1.05 y 2.11 g C/L); (iv) concentración de N (0, 0.42 y 0.84 g N/L). Se evaluó como variable de respuesta la producción de biomasa de la microalga. El diseño resultó en un total de 27 tratamientos que se llevaron a cabo (por triplicado) en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio MS (pH 5.7). Cada tratamiento se incubó por 22 días a 27 °C con agitación orbital (30 rpm) y un fotoperiodo de 12 h ($40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, con luz LED roja, azul, rosa y amarilla).

2.2.3. Efecto de la concentración de nutrientes sobre el establecimiento del cocultivo

Una vez definida la concentración del inóculo de cada microorganismo en el cocultivo (8.2×10^5 cel/mL y 5.0×10^5 UFC/mL para *C. simplex* y *M. oryzae*, respectivamente), se analizó el efecto de diferentes concentraciones de N (0, 0.42 y 0.84 g/L) y de C (0, 1.05 y 2.11 g/L) en la producción de biomasa, lípidos y pigmentos utilizando un diseño factorial 3^2 . Se realizaron 9 tratamientos (por triplicado) en matraces Erlenmeyer con 60 mL de medio MS (pH 5.7) durante 22 días a 27°C en agitación orbital (30 rpm) con un fotoperiodo de 18 h ($40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$). Se consideraron como control los monocultivos de cada microorganismo cultivados bajo las condiciones descritas.

Al finalizar los ensayos, la biomasa de ambos microorganismos se recuperó por centrifugación diferencial; primero se recuperaron las células de la microalga por centrifugación a 1000 rpm por 7 min y posteriormente las células bacterianas a 3500 rpm por 15 min.

2.2.4. Efecto de filtrados libres de células sobre el crecimiento vegetal

Después de recuperar la biomasa, el sobrenadante se filtró ($0.22 \mu\text{m}$) para obtener el filtrado libre de células (FLC), que se utilizó para evaluar su efecto sobre el crecimiento vegetal mediante bioensayos con semillas de rábano (*Raphanus sativus*, Vita). Las semillas se esterilizaron superficialmente (detergente comercial 1%, 5 min; etanol 70%, 5 s) para limitar contaminación microbiana durante el ensayo. El bioensayo consistió en utilizar 30 semillas tratadas, consideradas como unidades experimentales independientes, distribuidas en cajas Petri estériles (90 mm, 10 semillas por caja), cada una conteniendo un papel filtro (Whatman 2) impregnado con 3 mL del FLC. Las cajas se mantuvieron a 27°C en la oscuridad por 5 días. Al cabo del tiempo de incubación, con un calibrador Vernier, se midió la longitud de la radícula y del tallo de todas las semillas germinadas para obtener la longitud total del germinado. El análisis estadístico se realizó considerando únicamente las semillas germinadas.

2.3. Métodos analíticos

2.3.1. Estimación de biomasa

El número de células/mL de la microalga y las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) bacterianas, se cuantificaron por densidad óptica (DO) a 600 nm (UV-VIS 1900i, Shimadzu), utilizando una curva de calibración para cada microorganismo. De manera similar, se utilizó una curva de calibración de biomasa (peso seco, PS) vs. DO, para estimar la biomasa seca producida por el alga.

2.3.2. Lípidos neutros

El contenido de lípidos neutros se cuantificó mediante fluorescencia con rojo Nilo (Bertozzini *et al.*, 2011), en microplacas de 96 pozos. Para la reacción, la biomasa liofilizada (aprox. 5 mg) se resuspendió en 4 mL de solución salina (NaCl 0.9%). A 198 µL de la suspensión se adicionaron 2 µL de una solución de rojo Nilo en acetona (0.25 mg/mL). Las microplacas se incubaron en oscuridad durante 10 min y se cuantificó la fluorescencia en un fluorómetro (Synergy HT, BioTek) con longitud de onda de excitación de 547 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm. La concentración de lípidos se determinó por interpolación en una curva de calibración (0-50 mg/L), utilizando como estándar trioleína (T7140, Sigma) preparada en 2-propanol.

2.3.3. Pigmentos fotosintéticos

Para la extracción y estimación de clorofilas *a* (C_a), *b* (C_b) y carotenoides (C_{x+c}), se suspendieron 5 mg de biomasa liofilizada en 10 mL de etanol al 96% (v/v). La suspensión se sonicó durante 3 minutos con un equipo de ultrasonido por sonda (UP400S Hielscher) en ciclo continuo y a una amplitud de 30 cm⁻¹. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante, cuya absorbancia se midió a 665, 649 y 470 nm. El contenido de pigmentos se estimó utilizando las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler (1987):

$$C_a = 13.36A_{665} - 5.19A_{649}$$
$$C_b = 27.43A_{649} - 8.12A_{665}$$
$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 2.13C_a - 97.634C_b}{209}$$

2.4. Análisis estadístico

Para los diseños experimentales se usó el programa Statistica (versión 2007, USA) y el análisis estadístico de resultados se realizó con el programa estadístico SAS (SAS Institute Inc. Cary, USA). Para establecer diferencias significativas ($p < 0.001$) entre la producción de biomasa, lípidos y pigmentos fotosintéticos en monocultivos y cocultivos, así como del efecto de sus respectivos sobrenadantes (FLC) sobre el crecimiento vegetal, se utilizó una prueba de Duncan.

3. RESULTADOS

Con el fin de evaluar la producción de lípidos y pigmentos, así como el efecto bioestimulante de filtrados libres de células (FLC) producidos por *C. simplex* y *M. oryzae* en monocultivo o cocultivo, en primer lugar, se definió la proporción de inóculos que permitiera el crecimiento equitativo de ambos microorganismos en un cocultivo estable. Posteriormente, se comparó la producción de lípidos y pigmentos, y el efecto bioestimulante de los FLC en los monocultivos y el cocultivo en función de las condiciones nutrimentales.

3.1 Concentración de inóculos para establecer el cocultivo

Para determinar las proporciones de inóculo, se utilizó un diseño factorial 3^{4-1} en el que se analizó el efecto de tres niveles de C, tres de N y tres de inóculo de cada microorganismo sobre la producción de biomasa del alga y la bacteria en el cocultivo. Debido a que *C. simplex* es la principal productora de lípidos y pigmentos (carotenoides y clorofilas *a* y *b*), se priorizó su crecimiento como variable de respuesta.

El análisis estadístico de la biomasa de *C. simplex* indicó que la concentración de los inóculos fue la única variable con efecto significativo sobre la producción de biomasa, mientras que las concentraciones de N y de C no mostraron efecto significativo bajo las condiciones probadas (Tabla S1). A partir del ANOVA, se generó una ecuación cuadrática (Ec.1) con la que se estimaron las concentraciones de inóculo de cada microorganismo que permiten la máxima producción de biomasa del alga en cocultivo: 8.2×10^5 cel/mL de *C. simplex* y 5.0×10^5 UFC/mL de *M. oryzae*. Estas concentraciones de inóculo se utilizaron en todos los experimentos posteriores.

$$C. simplex = -7.52 \times 10^5 + 20.2 X_1 - 1.77 \times 10^{-5} X_1^2 + 16 X_2 - 1.61 \times 10^{-5} X_2^2 + 6.94 \times 10^5 \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde X_1 corresponde al inóculo de *C. simplex* y X_2 al de *M. oryzae*.

3.2. Efecto de la concentración de carbono y nitrógeno sobre el crecimiento

Después de 22 días, *M. oryzae* en monocultivo creció en todas las condiciones evaluadas, excepto en ausencia de C y N en el medio, mientras que en ausencia de N mostró un crecimiento limitado (Fig. 1a). En cocultivo con la microalga, el crecimiento bacteriano aumentó significativamente, particularmente en el nivel medio de N (0.42 g/L) con 2.11 g C/L, donde la biomasa bacteriana fue 8.3 veces mayor respecto a lo observado en monocultivo bajo las mismas condiciones nutrimentales (Fig. 1b). Por otro lado, *C. simplex* en monocultivo no presentó crecimiento en ausencia de N, independientemente de la concentración de C, pero el aumento en la concentración de N favoreció significativamente (hasta 7.8 veces) su producción de biomasa (Fig. 1c). En contraste, *C. simplex* fue capaz de crecer en ausencia de N en cocultivo con *M. oryzae*, aunque se registró una ligera disminución en el crecimiento de la microalga en comparación con el monocultivo, cuando se cultiva con una fuente de nitrógeno en el medio (Fig. 1d).

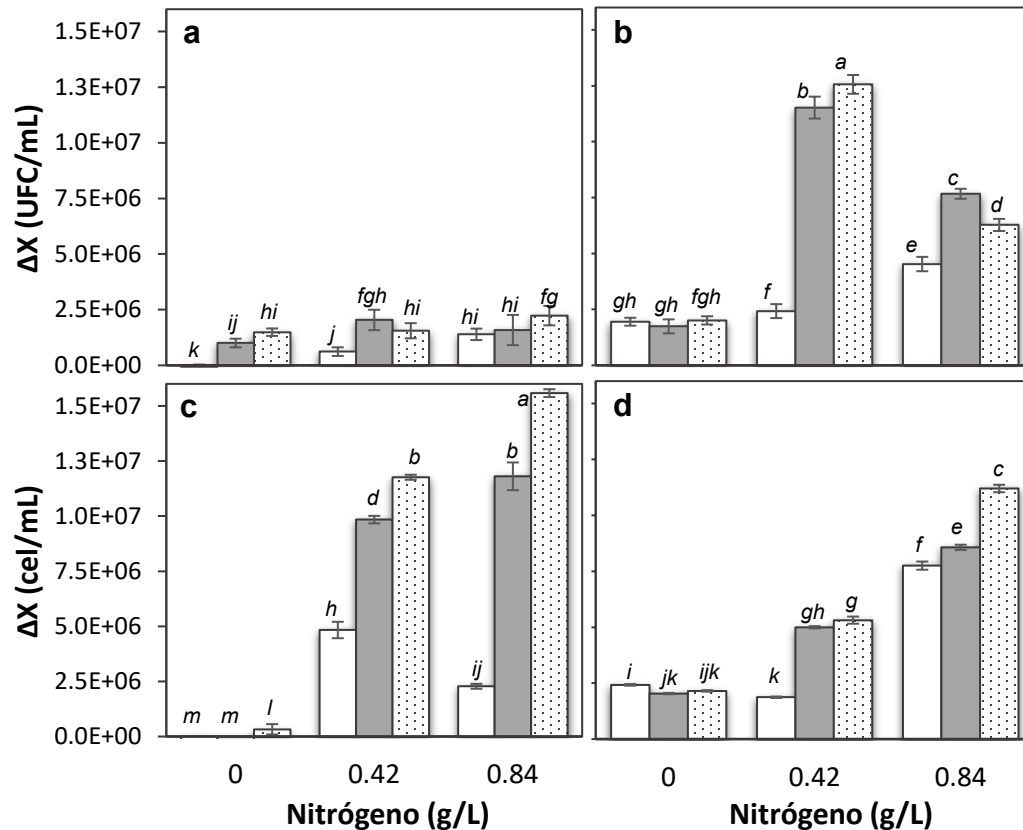


Fig. 1. Efecto de la concentración inicial de la fuente de carbono (C) y de nitrógeno (N) sobre la producción de biomasa (ΔX) después de 22 días: *M. oryzae* en monocultivo (a) y en cocultivo (b), y *C. simplex* en monocultivo (c) y en cocultivo (d). Las barras blancas, grises y punteadas indican 0, 1.05 y 2.11 g C/L, respectivamente. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.001$) entre tratamientos.

Fig. 1. Effect of the initial carbon (C) and nitrogen (N) source concentration on biomass production (ΔX) after 22 days of incubation: *M. oryzae* in monoculture (a) and coculture (b), and *C. simplex* in monoculture (c) and coculture (d). White, grey and dotted bars indicate 0, 1.05 and 2.11 g C/L, respectively. Data correspond to the mean \pm standard deviation of three replicates. Different letters indicate significant differences ($p < 0.001$) between treatments.

3.3. Producción de lípidos y pigmentos

Se investigó el efecto de la concentración de las fuentes de C y de N, así como del monocultivo de *C. simplex* o su cocultivo con *M. oryzae* sobre la producción de lípidos (Fig. 2) y de pigmentos fotosintéticos (Tabla 1) después de 22 días de incubación. Se encontró un incremento significativo en la producción de lípidos por la microalga en cocultivo con *M. oryzae*; el mayor nivel de lípidos se alcanzó en los tratamientos sin N y éste disminuyó al aumentar la concentración de N en el medio, encontrando los mayores valores (22.3 y 28.3%, respectivamente) en los tratamientos sin N con 2.11 g C/L, tanto en los

monocultivos como en los cocultivos (Fig. 2). En dichas condiciones, la producción de lípidos en el cocultivo fue entre 24 y 43% mayor que en los monocultivos de *C. simplex*.

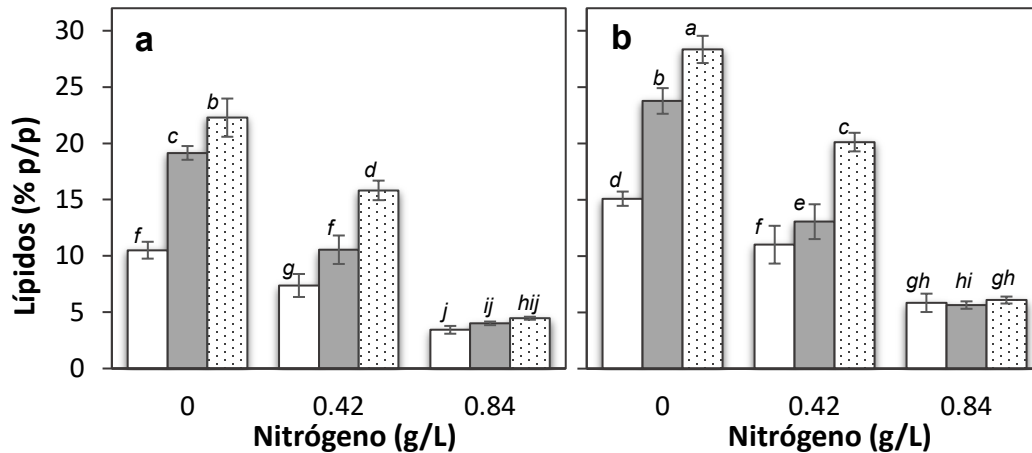


Fig.2. Efecto de la concentración inicial de carbono (C) y nitrógeno (N) sobre la producción de lípidos por *C. simplex* en monocultivo (a) y en cocultivo (b) después de 22 días de incubación. Las barras blancas, grises y punteadas indican 0, 1.05 y 2.11 g C/L, respectivamente. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.001$) entre tratamientos.

Fig. 2. Effect of initial carbon (C) and nitrogen (N) concentration on lipid production by *C. simplex* in monoculture (a) and coculture (b) after 22 days. White, grey and dotted bars indicate 0, 1.05 and 2.11 g C/L, respectively. Data corresponds to the mean \pm standard deviation of three replicates. Different letters indicate significant differences ($p < 0.001$) between treatments.

Por otra parte, la producción de pigmentos fotosintéticos en *C. simplex* fue mejorada significativamente por el aumento en la concentración de C y de N en el medio (Tabla 1). En general, las concentraciones de clorofila *a* y *b* obtenidas con 0.84 g N/L fueron entre 1.2 y 2.5 veces mayores con respecto a las registradas en ausencia de N, mientras que la concentración de carotenoides aumentó entre 2.1 y 4.9 veces cuando hay una fuente de N en el medio. También se encontró que el cocultivo tuvo un efecto positivo y significativo en la producción de clorofilas *a* y *b*, y de carotenoides, alcanzando valores hasta 2.5, 3.7 y 2.8 veces mayores, respectivamente, que las concentraciones determinadas en los monocultivos.

Tabla 1. Efecto de la concentración de nitrógeno (N) y carbono (C) sobre la producción de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b) y carotenoides (C_{x+c}) en monocultivos de *C. simplex* y cocultivos de *C. simplex*-*M. oryzae**

Table 1. Effect of nitrogen (N) and carbon (C) concentration on the production of chlorophyll *a* (C_a), chlorophyll *b* (C_b) and carotenoids (C_{x+c}) in *C. simplex* monocultures and *C. simplex*-*M. oryzae* cocultures*

Nutrientes		Monocultivo (mg/g PS)			Cocultivo (mg/g PS)		
N (g/L)	C (g/L)	C_a	C_b	C_{x+c}	C_a	C_b	C_{x+c}
0	0	14.35(0.04) ^l	14.59 (0.29) ^{kl}	1.94(0.16) ^j	24.82(0.28) ⁱ	27.31(0.92) ^h	5.46(0.48) ^h
	1.1	14.51(0.46) ^l	25.89 (0.63) ^j	3.82(0.37) ⁱ	36.36(0.44) ^g	42.15(0.67) ^e	6.45(0.41) ^g
	2.2	17.95(0.37) ^k	26.45 (0.37) ^{hi}	4.30(0.18) ^j	39.98(0.27) ^f	43.02(0.36) ^e	6.96(0.27) ^g
0.42	0	18.00(0.29) ^k	15.28(0.87) ^k	9.30(0.22) ^f	40.61(0.59) ^{ef}	44.50(0.47) ^d	11.44(0.51) ^{cd}
	1.1	23.16(0.32) ^j	13.60(0.27) ^l	9.84(0.30) ^{ef}	40.87(0.48) ^e	49.76(0.58) ^{bc}	11.82(0.65) ^{bc}
	2.2	24.48(0.33) ^j	18.30(0.53) ^j	10.17(0.33) ^e	44.43(0.61) ^d	49.30(0.54) ^c	12.35(0.26) ^a
0.84	0	23.09(0.32) ^j	36.05(0.51) ^g	9.46(0.17) ^{ef}	45.54(0.39) ^c	49.28(0.68) ^b	13.12(0.15) ^a
	1.1	25.11(0.75) ⁱ	38.71(0.45) ^f	9.65 (0.48) ^{ef}	46.58 (0.59) ^b	51.07 (0.71) ^{ab}	13.30(0.35) ^a
	2.2	26.74(0.42) ^h	43.22(0.86) ^{de}	9.57 (0.42) ^{ef}	48.53 (0.46) ^a	52.23 (0.41) ^a	12.89(0.32) ^{ab}

* Medias con letra diferente indican diferencias significativas entre tratamientos para cada pigmento ($p < 0.001$; $n = 3$). Los valores de la desviación estándar (DE) se muestran entre paréntesis. PS: peso seco

* Means with different letters indicate significant differences between treatments for each pigment ($p < 0.001$; $n = 3$). Standard deviation (SD) values are shown in parentheses. PS: dry weight

3.4. Efecto bioestimulante de filtrados libres de células

Se evaluó el efecto de los filtrados libres de células (FLC) obtenidos al final del periodo de incubación de monocultivos y cocultivos sobre la elongación de germinados de semillas de rábano. El FLC del cultivo de *C. simplex* causó una disminución significativa en la longitud de los germinados cuando se cultivó sin N y con 0.42 g N/L (Fig. 3a). Por otro lado, el FLC obtenido a partir de monocultivos de *M. oryzae* incrementó significativamente la longitud de los germinados cuando la concentración inicial de N en el medio fue de 0.42 g/L y la disminuyó (80 – 85% respecto al control) cuando el cultivo se llevó a cabo en ausencia de N, independientemente de la concentración inicial de C (Fig. 3b). En el caso de los cocultivos, en general, el FLC tuvo un efecto bioestimulante en todas las condiciones probadas, obteniendo la mayor elongación (36 – 128% más que el control) en los cultivos con 0.42 g N/L (Fig. 3c).

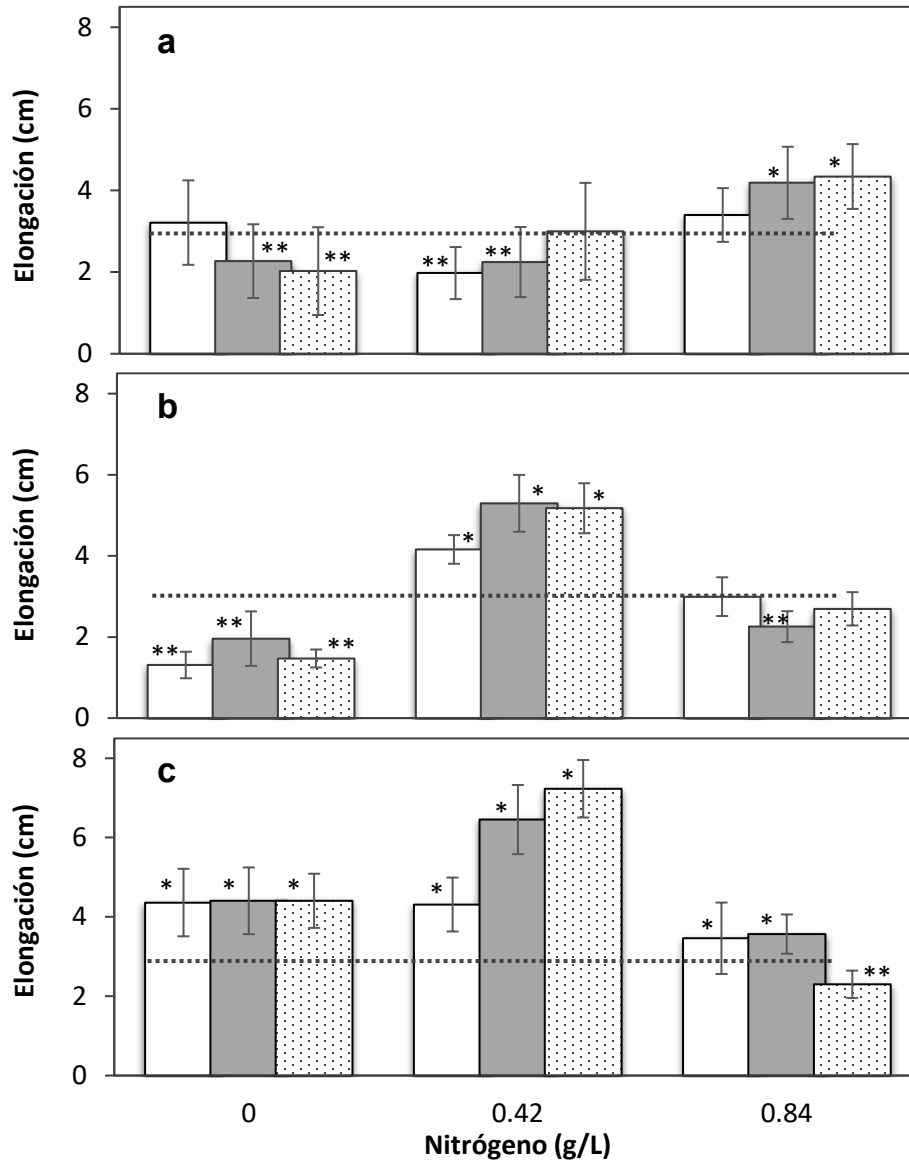


Fig. 3. Efecto de filtrados libres de células (FLC) de monocultivos de *C. simplex* (a) y *M. oryzae* (b), y de cocultivos microalga-bacteria (c) obtenidos con diferente concentración inicial de C y N sobre la elongación de germinados de semillas de rábano. Las barras blancas, grises y punteadas indican 0, 1.05 y 2.11 g C/L, respectivamente, adicionado como sacarosa. La línea punteada muestra la elongación de germinados obtenidos en medio MS sin C y N (control). Medias con (*) y (**) indican un aumento o disminución (respectivamente) significativos en la elongación de germinados con respecto a la media del control ($p < 0.001$; $n \geq 10$).

Fig. 3. Effect of cell-free filtrates (CFL) obtained from monocultures of *C. simplex* (a) and *M. oryzae* (b), and microalga-bacteria cocultures (c) under different initial concentrations of C and N on the elongation of radish seed germs. White, grey and dotted bars indicate 0, 1.05 and 2.11 g C/L, respectively, added as sucrose. Dotted line shows the total length of germinated seeds obtained in MS medium without C and N. Means with (*) and (**) indicate significant increase or decrease (respectively) in the elongation of germinated seeds with respect to the control mean ($p < 0.001$; $n \geq 10$).

indicate a significant increase or decrease (respectively) in the elongation of germinates with respect to the mean of the control ($p < 0.001$; $n \geq 10$).

4. DISCUSIÓN

Establecer un cocultivo microalga-bacteria puede ser desafiante ya que deben considerarse los requerimientos ambientales y nutricionales particulares de cada microorganismo (Tong *et al.*, 2023) y la posibilidad de que algún compuesto secretado por uno de ellos afecte el metabolismo del otro (Berthold *et al.*, 2019). Además, si uno de los microorganismos tiene una mayor tasa de crecimiento que el otro agotará los recursos disponibles antes de establecer una interacción mutualista (Gao *et al.*, 2021), por lo que se debe tener en cuenta de la proporción de inóculos de cada microorganismo y su influencia sobre la estructura y función de la comunidad microbiana (Gao *et al.*, 2021) para favorecer la formación del cocultivo.

En este estudio, la relación de inóculos microalga-bacteria de 1.6:1 permitió el crecimiento equilibrado de ambos microorganismos, aun cuando el tiempo de duplicación de *M. oryzae* es casi 4 veces menor que el de *C. simplex* (datos no mostrados); el crecimiento proporcional de ambos microorganismos en un medio con nutrientes definidos se considera un cocultivo estable (Bashan *et al.*, 2021, Mujtaba *et al.*, 2016). Otros autores han demostrado la importancia de determinar la proporción de inóculos adecuados para formar un cocultivo, por ejemplo, la bacteria *Alteromonas macleodii* mejoró el crecimiento de la cianobacteria *Prochlorococcus* sp. al inocularse en una proporción 1:10 o 1:1, pero lo inhibió cuando la proporción fue de 10:1 (Aharonovich y Sher, 2016); la bacteria *Mesorhizobium sangaii*, mejoró la producción de biomasa y de lípidos de *Chlorella vulgaris*, cuando se inoculan en una proporción de 1:40 (bacteria-microalga). En general, para lograr la interacción mutualista de un cocultivo estable, se requiere un inóculo mayor del microorganismo con mayor tiempo de duplicación.

El cocultivo de *M. oryzae* y *C. simplex*, permitió el crecimiento y supervivencia del alga y de la bacteria, aún en un medio que carece de N y/o de C. Estos resultados aportan evidencia de una interacción metabólica y mutualista entre ambos microorganismos, considerando que *C. simplex* y *M. oryzae* dependen de fuentes externas de N y de C, respectivamente, en los monocultivos. Bajo estas condiciones, la carencia de N en el medio puede ser superada por *M. oryzae* debido a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico (Torres *et al.*, 2024), mientras el carbono es suministrado por la capacidad fotosintética del alga.

La modulación del crecimiento de ambos microorganismos también es indicador del establecimiento de un cocultivo estable (Mujtaba *et al.*, 2016). Los resultados muestran un incremento en la biomasa de *M. oryzae* en cocultivo respecto al cultivo axénico tras 22 días de cultivo (Fig. 1 a y b); en contraste, la producción de biomasa por *C. simplex* en cocultivo se reduce respecto a la observada en los monocultivos en los medios con N (Fig. 1 c y d). El bajo crecimiento de *M. oryzae* en monocultivo puede ser resultado de un agotamiento de la fuente de carbono y posterior muerte celular, pues se ha observado que, tras 10 días de incubación en monocultivo, la biomasa de *M. oryzae* comienza a disminuir como resultado de la lisis celular (datos no mostrados). La acumulación de

biomasa de la bacteria en cocultivo a tiempos de incubación largos es evidencia de la modulación en su crecimiento y del mantenimiento de la biomasa bacteriana gracias a su interacción con el alga. Aunque se han reportado múltiples cocultivos alga-bacteria en donde ambos microorganismos fueron aislados del mismo medio ambiente, este es el primer reporte en el que se establece una interacción de esta naturaleza entre microorganismos endófitos de la misma planta. Por otro lado, la disminución en la producción de biomasa de *C. simplex* en cocultivo podría atribuirse a la competencia por luz o por nutrientes durante la fase de crecimiento inicial. Similar a estos resultados, Krug *et al.* (2023), observaron una reducción en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cocultivo con diferentes cepas de *Methylobacterium* spp.; esta respuesta fue parcialmente atribuida a que las metilobacterias que producen β -carotenos pueden obstaculizar la actividad fotosintética de microalgas a través de la competencia por la luz.

El cocultivo de algas y bacterias se ha propuesto como una estrategia para mejorar la producción de algunos compuestos de valor biotecnológico (Wang *et al.*, 2015; Vuong *et al.* 2019), por lo que se evaluó la producción de lípidos y pigmentos por *C. simplex* en monocultivo y en cocultivo. La mayor acumulación de lípidos se obtuvo cuando había baja disponibilidad de nitrógeno, mientras que en presencia de este nutriente se obtuvo la mayor producción de pigmentos tanto en monocultivo como en cocultivo.

Se ha reportado la influencia de la concentración de N sobre la producción de pigmentos y lípidos. Por ejemplo, la limitación de N disminuye el contenido de clorofila en *Scenedesmus dimorphus* (Ferreira *et al.*, 2016), *Chlorella vulgaris* (Ikarán *et al.*, 2016) y *Chlorella sorokiniana* (Zhang *et al.*, 2019). Lo anterior, se ha atribuido a que, bajo estas condiciones, el N necesario para las funciones celulares críticas se obtiene de la degradación de clorofila, organelos fotosintéticos y proteínas (Ikarán *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). Por otro lado, la mayor disponibilidad de N favorece la producción de pigmentos en monocultivos de microalgas, lo que a su vez incide tanto en la capacidad fotosintética como en la tasa de crecimiento y, por lo tanto, en la producción de biomasa (Zarrinmehr *et al.*, 2020). Por ejemplo, en *Chlorella vulgaris*, la producción de pigmentos aumentó hasta 80% al aumentar la concentración de NaNO_3 de 1.5 g/L a 3 g/L (Ramírez *et al.*, 2021). En contraste, la limitación de N favorece la acumulación de lípidos en microalgas (Berthold *et al.*, 2019), lo que se utiliza como estrategia para incrementar el rendimiento en la producción de lípidos (Hu *et al.*, 2008) y en la acumulación de triacilglicerol (TAG), usados para la producción de biodiesel (Ikarán 2015). A este respecto, se ha demostrado que *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris oleoabundans* y *Scenedesmus obliquus* incrementan la producción de TAG cuando se cultivan en medios con deficiencia de N, pasando de una producción de alrededor de 10% (p/p) a niveles de 20 a 40% (p/p), dependiendo de la especie (Breuer, 2012).

Los cocultivos alga-bacteria también puede usarse para estimular la producción de pigmentos y lípidos; por ejemplo, el cocultivo de *Phaeodactylum tricorutum* con la bacteria *Stappia* sp. en un medio con 2 g N/L, favoreció (15%) la producción de clorofilas con respecto al monocultivo de la microalga (Vuong *et al.*, 2019); *Chlorella vulgaris* mejoró la producción de lípidos y pigmentos cuando se cocultiva con *Flavobacterium*, *Hyphomonas*, *Rhizobium* o *Sphingomonas* (Cho *et al.*, 2015), al igual que *Characium* sp. cuando se cocultiva con diferentes cepas bacterianas (Berthold, 2019). De hecho, el uso

de consorcios microbianos en biopelículas se ha propuesto para la construcción de biorrefinerías económicamente viables (Wicker *et al.* 2023).

En este trabajo se mostró que el cocultivo de *C. simplex* con la bacteria PMV *M. oryzae* tiene un impacto positivo en la salud, el crecimiento y la producción de lípidos de la microalga, lo que podría ser explicado a través de diversos mecanismos actuando en conjunto. Se ha demostrado que bacterias PCV influyen en la producción de biomasa y en el contenido de lípidos de las microalgas a través del intercambio de gases y compuestos orgánicos volátiles (Amavizca *et al.*, 2017; Berthold *et al.*, 2019). Asimismo, varias especies del género *Methylobacterium* producen compuestos que promueven el crecimiento vegetal, como el ácido indolacético, (Nysanth *et al.*, 2023), que mejoran la resistencia sistémica en las microalgas y aumentan el contenido de clorofila.

Estudios recientes demostraron que las acil-homoserina lactonas (AHL, moléculas involucradas en el proceso de *quorum sensing* en varias especies de *Methylobacterium*), incrementan (hasta 28%) la producción de biomasa, pigmentos y lípidos en *Chlorella sorokiniana* a través del incremento en la expresión de genes involucrados en la síntesis de clorofila, los complejos de captación de luz y otras proteínas clave de la fotosíntesis, así como de genes involucrados en la fijación de C. La mejora en la capacidad fotosintética del alga, junto con el aumento en la expresión de la fosfoglicerato quinasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, favorecen la síntesis de glicerol trifosfato, que puede ser dirigido a la biosíntesis de lípidos (Zhenzhen *et al.*, 2024).

La producción de biocombustibles a partir de microalgas requiere de alta productividad de biomasa y de lípidos para que el proceso sea rentable, lo que constituye un desafío, ya que ambas variables dependen de condiciones de cultivo opuestas (Soru *et al.*, 2019). Sin embargo, debe destacarse que, en este trabajo, el contenido de lípidos en *C. simplex* se analizó al final del periodo de cultivo (22 días). Generalmente, la acumulación de lípidos aumenta con el tiempo de cultivo hasta alcanzar un máximo, y después disminuye. Berthold *et al.* (2019) estudiaron la acumulación de lípidos en 22 cepas de microalgas verdes, y observaron que, el mayor contenido de lípidos (~16%) se alcanzó entre los 5 y los 15 días de cultivo, disminuyendo posteriormente; por lo que es importante llevar a cabo un estudio cinético de para determinar el tiempo óptimo de acumulación de lípidos.

El cocultivo de microalgas y bacterias PCV se considera una estrategia prometedora para el tratamiento de aguas residuales y la producción eficiente de biomasa (Anand *et al.*, 2023); sin embargo, su uso para aplicaciones agrícolas permanece inexplorada en gran medida (Kang *et al.*, 2021). Comúnmente, se propone el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal como biofertilizantes o bionoculantes, debido a su capacidad para fijar nitrógeno, movilizar fósforo y potasio, así como producir fitohormonas o regular sus niveles en plantas (Sparks *et al.*, 2020). También se ha propuesto el uso de extractos de la biomasa de microalgas como bioestimulantes vegetales, para lo cual se elimina la pared celular, liberando compuestos bioactivos como fitohormonas, aminoácidos, carotenoides y ficobilinas, que contribuyen a mejorar la productividad de los cultivos (Chiaiese *et al.*, 2018, González-Pérez *et al.*, 2021). Además, tanto las microalgas como las bacterias PCV pueden prevenir enfermedades mediante la estimulación de los sistemas de defensa de las plantas y la secreción de antibióticos y enzimas antifúngicas. Debido a que los mecanismos por los que las bacterias PCV y las algas estimulan el crecimiento o

rendimiento de los cultivos es distinto, el uso de cocultivos microalga-bacteria PCV se ha propuesto como una alternativa para promover el crecimiento vegetal en comparación con los monocultivos (Kang *et al.*, 2021).

Este estudio demostró que el filtrado libre de células del cocultivo *C. simplex* - *M. oryzae* resulta más eficiente que el obtenido a partir de los monocultivos para estimular la elongación de germinados de rábano. Aunque la aplicación de microalgas o de consorcios microalga-bacteria como bioestimulantes y biofertilizantes suele hacerse adicionando la biomasa de ambos microorganismos (crecidos en cocultivo o cultivados por separado) a las raíces de las plantas u obteniendo un extracto de los microorganismos para ser aplicado (González-Pérez *et al.*, 2021), algunos compuestos promotores del crecimiento vegetal pueden secretarse al medio de cultivo, lo que podría aprovecharse como bioestimulante, dejando la biomasa disponible para otros propósitos. En el caso del monocultivo de *M. oryzae*, el efecto bioestimulante del FLC obtenido con 0.42 g N/L puede atribuirse a la capacidad de este género para producir compuestos PCV, incluyendo ácido indolacético, ácido abscísico y citoquininas (Palberg *et al.*, 2022). Debe resaltarse que, en el caso de los cocultivos, el efecto bioestimulante se observó aún en ausencia de una fuente externa de N, lo cual puede deberse a la capacidad de *M. oryzae* para fijar el N atmosférico. Asimismo, no se puede descartar que el cocultivo promueva la producción de metabolitos por la microalga, los cuales podrían tener efecto sobre el crecimiento vegetal (González-González y De-Bashan 2021), aspecto que deberá analizarse en estudios futuros. Considerando que ambos microorganismos fueron aislados de la misma planta, con la cual interaccionaban como endófitos, es probable que el mayor efecto del FLC del cocultivo sobre la elongación de la planta sea un efecto sinérgico de los mecanismos individuales de estimulación del crecimiento vegetal.

5. CONCLUSIÓN

Se estableció un cocultivo estable *entre C. simplex* y *M. oryzae*, en el que ambos microorganismos crecieron de forma equitativa, permitiendo el crecimiento aún en ausencia de una fuente de carbono y de nitrógeno; este es el primer reporte del establecimiento de un cocultivo estable entre un alga y una bacteria PCV, ambos endófitos de la misma planta. La producción de biomasa, lípidos, pigmentos fotosintéticos y compuestos que promueven el crecimiento vegetal depende de manera significativa de la disponibilidad de nutrientes en el medio. Aunque el cocultivo de *C. simplex* con *M. oryzae* mejoró la producción de lípidos, aún es necesario optimizar las condiciones nutrimentales que permitan altas productividades de lípidos con el uso de este cocultivo. Se demostró que, en germinados de rábano, el cocultivo tiene un efecto bioestimulante significativamente mayor que el encontrado en los monocultivos, por lo que el cocultivo de estos dos microorganismos endófitos, es una alternativa con gran potencial para su aplicación con fines agrícolas. Esto representa una opción sustentable para incrementar el rendimiento de cultivos al mismo tiempo que se disminuye el uso de fertilizantes químicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), México (número de proyecto 358005). M. Velázquez también agradece al CONAHCYT por su beca de doctorado (número de beca 933661).

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

M.G. Velázquez Rodríguez realizó el trabajo experimental, el análisis de datos y la redacción del manuscrito. T.L. Volke Sepúlveda dirigió la investigación, realizó el análisis de datos y la redacción de manuscrito, F.J. Figueroa Martínez supervisó la investigación, realizó el análisis de datos y la redacción de manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron la versión final del manuscrito.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Aharonovich, D., Sher, D., 2016. Transcriptional response of *Prochlorococcus* to co-culture with a marine *Alteromonas*: differences between strains and the involvement of putative infochemicals. ISME J. 10(12), 2892–906. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.70>
- Alcántara, M.N., Figueroa, M.F., Rivera, C.F., Gutiérrez, S.G., Volke, S.T., 2018. An endophytic strain of *Methylobacterium* sp. increases arsenate tolerance in *Acacia farnesiana* (L.) Willd: A proteomic approach. Sci Total Environ. 625, 762–774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.314>
- Alcántara, M.N., Figueroa, M.F., Rivera, C.F., Volke, S.T., 2022. An unexpected guest: a green microalga associated with the arsenic-tolerant shrub *Acacia farnesiana*. FEMS Microbiol Ecol. 98(4), fiac041. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac041>
- Anand, U., Dey, S., Parial, D., Federici, S., Ducoli, S., Bolan, N. S., Bontempi, E., 2023. Algae and bacteria consortia for wastewater decontamination and transformation into biodiesel, bioethanol, biohydrogen, biofertilizers and animal feed: a review. Environ Chem Lett. 21(3), 1585-1609. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01562-w>
- Bermejo, E., Ruiz, M.C., Cuaresma, M., Vaquero, I., Ramos, M.A., Vega, J. M., Vílchez, C., Garbayo, I., 2018. Production of lutein, and polyunsaturated fatty acids by the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis* under abiotic stress by salt or ultraviolet light. J Biosci Bioeng. 125(6), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.025>
- Berthold, D.E., Shetty, K.G., Jayachandran, K., Laughinghouse, H.D., Gantar, M., 2019. Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture. Biomass Bioenergy. 122, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.033>
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., & Magnani, M., 2011. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. J Microbiol Methods. 87(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.018>

Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour Technol.* 124, 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>

Chen, C., Wang, Z., Zhao, M., Yuan, B., Yao, J., Chen, J., Hrynshpan, D., Savitskaya, T., 2021. A fungus–bacterium co-culture synergistically promoted nitrogen removal by enhancing enzyme activity and electron transfer. *Sci Total Environ.* 754, 142109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142109>

Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M.C., Roupshael, Y., 2018. Renewable sources of plant biostimulation: microalgae as a sustainable means to improve crop performance. *Front Plant Sci.* 9, 1782. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01782>

Cho, 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. *Bioresour Technol.* 175, 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.159>

Choix, F. J., López-Cisneros, C. G., Méndez-Acosta, H. O., 2018. *Azospirillum brasilense* Increases CO₂ Fixation on Microalgae *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, and *Chlamydomonas reinhardtii* Cultured on High CO₂ Concentrations. *Microb Ecol.* 76(2), 430–442. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1139-z>

Concas, A., Malavasi, V., Costelli, C., Fadda, P., Pisu, M., Cao, G., 2016. Autotrophic growth and lipid production of *Chlorella sorokiniana* in lab batch and BIOCOIL photobioreactors: Experiments and modeling. *Bioresour Technol.* 211, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.089>

Dawood, M. F. A., Sofy, M. R., Mohamed, H. I., Sofy, A. R., Abdel-Kader, H. A. A., 2022. N- or/and P-deprived *Coccomyxa chodatii* SAG 216–2 extracts instigated mercury tolerance of germinated wheat seedlings. *Plant Soil.* 483(1), 225-253. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05732-7>

Dourado, M.N., Camargo, A.A., Santos, D.S., Araújo, W.L., 2015. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. *Biomed Res Int.* 2015(1), 909016. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/909016>

Ferreira, V. S., Pinto, R. F., Sant’Anna, C., 2016. Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *J Appl Microbiol.* 120(3), 661-670. <https://doi.org/10.1111/jam.13007>

Fuentes, J.L., Huss, V.A.R., Montero, Z., 2016. Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga *Coccomyxa onubensis* sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J Appl Phycol.* 28, 3269–3279. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0887-3>

Gao, C.H., Cao, H., Cai, P., Sørensen, S.J., 2021. The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity, *ISME J.* 15(1), 29–40. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00751-7>

Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canad. J. Microbiol.* 41, 109–117. <http://doi:10.1139/m95-015>

González, B. K., Rivas, A. M., Valdez, A., Gayosso, M. A., 2022. Microalgae as biostimulants: A new approach in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 38(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03192-2>

González, G.L., de-Bashan, L.E., 2021. Toward the enhancement of microalgal metabolite production through microalgae–bacteria consortia. *Biology.* 10(282). <https://doi.org/10.3390/biology10040282>

Guo, Z. y Tong, Y. W., 2013. The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. *J Appl Phycol.* 26(3), 1483–1492. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0186-1>

Higgins, B. T., VanderGheynst, J. S., 2014. Effects of *Escherichia coli* on Mixotrophic Growth of *Chlorella minutissima* and Production of Biofuel Precursors. *Plos One.* 9(5), e96807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096807>

Hoang, A. T., Sirohi, R., Pandey, A., Nižetić, S., Lam, S. S., Chen, W.-H., Luque, R., Thomas, S., Arıcı, M., Pham, V., 2022. Biofuel production from microalgae: challenges and chances. *Phytochem Rev.* 22(4), 1089-1126. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09819-y>

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal.* 54(4), 621-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03492.x>

Ikarán, Z., Suárez, S., Urreta, I., Castañón, S. 2015. The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Research,* 10, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.023>

Kang, Y., Kim, M., Shim, C., Bae, S., Jang, S., 2021. Potential of Algae–Bacteria Synergistic Effects on Vegetable Production. *Front Plant Sci.* 12, 65662. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.656662>

Khan, M. I., Shin, J. H. y Kim, J. D., 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact.* 17(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>

Klein, I., von Rad, U., Durner, J., 2009. Homoserine lactones: do plants really listen to bacterial talk?. *Plant Signaling Behav.* 4(1), 50-51. <https://doi.org/10.4161/psb.4.1.7300>

Krug, L., Morauf, C., Donat, C., Müller, H., Cernava, T., Berg G., 2020. Plant Growth-Promoting Methylobacteria Selectively Increase the Biomass of Biotechnologically Relevant Microalgae. *Front. Microbiol.* 11:427. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00427>

Lee, C., Jeon, M. S., Kim, J. Y., Lee, S. H., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, Y.-E., 2019. Effects of an auxin-producing symbiotic bacterium on cell growth of the microalga *Haematococcus pluvialis*: Elevation of cell density and prolongation of exponential stage. *Algal Res.* 41, 101547. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101547>

Leng, L., Li, W., Chen, J., Leng, S., Chen, J., Wei, L., Peng, H., Li, J., Zhou, W., Huang, H., 2021. Co-culture of fungi-microalgae consortium for wastewater treatment: A review. *Bioresour Technol.* 330, 125008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125008>

Li, D., Liu, R., Cui, X., He, M., Zheng, S., Du, W., Gao, M., Wang, C., 2021. Co-culture of bacteria and microalgae for treatment of high concentration biogas slurry. *J Water Process Eng.* 41, 102014. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102014>

Lian, J., Schimmel, P., Sanchez-Garcia, S., Wijffels, R. H., Smidt, H., Sipkema, D., 2021. Different co-occurring bacteria enhance or decrease the growth of the microalga *Nannochloropsis* sp. CCAP211/78. *Microb Biotechnol.* 14(3), 1159–1170. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13784>

Lichtenthaler, H. K., 1987. Chlorophyll Fluorescence Signatures of Leaves during the Autumnal Chlorophyll Breakdown. *J Plant Physiol.* 131(1-2), 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80271-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80271-7)

- Llamas A., León-Miranda E., Tejada-Jiménez M., 2023. Microalgal and Nitrogen-fixing bacterial consortia: from interaction to biotechnological potential. *Plants*. 12(13), 2476. <https://doi.org/10.3390/plants12132476>
- Makut, B. B., Das, D., Goswami, G., 2019. Production of microbial biomass feedstock via co-cultivation of microalgae-bacteria consortium coupled with effective wastewater treatment: A sustainable approach. *Algal Res.* 37, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.020>
- Mujtaba, G., Lee, K., 2016. Advanced Treatment of Wastewater Using Symbiotic Co-culture of Microalgae and Bacteria. *Appl Chem Eng.* 27(1), 1–9. <https://doi.org/10.14478/ace.2016.1002>
- Nacry, P., Bouguyon, E., Gojon, A., 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil.* 370,1–29. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1645-9>
- Nicodemus, T.J., Behrens, M., Allen, J.W., DiRusso, C.C., Black, P.N. 2022. Co-cultures of *Coccomyxa subellipsoidea* and *Pseudomonas denitrificans* increases lipid accumulation independent of nutrient conditions. *Bioresour Technol Rep.* 19, 101197. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101197>
- Nysanth, N.S., Rajan, S.A., Sivapriya, S.L., Anith, K.N. 2023. Pink Pigmented Facultative Methylophs (PPFMs): Potential Bioinoculants for Sustainable Crop Production. *J Pure Appl Microbiol.* 17, 660-681. <https://doi: 10.22207/JPAM.17.2.17>
- Palacios, O. A., Gomez, A.G., Bashan, Y., de-Bashan, L. E., 2016. Tryptophan, thiamine and indole-3-acetic acid exchange between *Chlorella sorokiniana* and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Ecol.* 92(6), fiw077. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw077>
- Palacios, O. A., López, B. R., de-Bashan, L. E., 2022. Microalga Growth-Promoting Bacteria (MGPB): A formal term proposed for beneficial bacteria involved in microalgal–bacterial interactions. *Algal Res.* 61, 102585. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102585>
- Palberg, D., Kisiała, A., Jorge, G. L., Emery, R. J. N. 2022. A survey of *Methylobacterium* species and strains reveals widespread production and varying profiles of cytokinin phytohormones. *BMC Microbiol.* 22(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02454-9>
- Peng, H., de-Bashan, L. E., Bashan, Y., B. T., 2020. Indole-3-acetic acid from *Azospirillum brasilense* promotes growth in green algae at the expense of energy storage products. *Algal Res.* 47, 101845. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101845>
- Perera, I. A., Abinandan, S., Panneerselvan, L., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., Megharaj, M., 2022. Co-culturing of microalgae and bacteria in real wastewaters alters indigenous bacterial communities enhancing effluent bioremediation. *Algal Res.* 64, 102705. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102705>
- Rachidi, F., Benhima, R., Kasmi, Y., Sbabou, L., Arroussi, H. E., 2021. Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Sci Rep.* 11(1), 930. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78820-2>
- Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Oh, H.M., Kim, H.S., 2016. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications, *Biotechnol Adv.* 34, 14-29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>
- Rivasseau, C., Farhi, E., Compagnon, E., de Gouvion Saint Cyr, D., van Lis, R., Falconet, D., Kuntz, M., Atteia, A., Couté A., 2016. *Coccomyxa actinabiotis* sp. nov.

(Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a new green microalga living in the spent fuel cooling pool of a nuclear reactor. *J Phycol.* 52(5), 689-703. <https://doi.org/10.1111/jpy.12442>

Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., Rashid, N., 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 92, 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>

Rosero, C.G., Rodríguez, R. M., Aguilar, C. N., Buitrón, G., Chairez, I., Ruiz, H. A., 2021. Microbial co-culturing strategies for the production high value compounds, a reliable framework towards sustainable biorefinery implementation – an overview. *Bioresour Technol.* 321, 124458. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124458>

Sciuto, K., Baldan, B., Marcato, S., Moro, I., 2019. *Coccomyxa cimbrica* sp. nov., a green microalga found in association with carnivorous plants of the genus *Drosera* L. *Eur J Phycol.* 54(4), 531–547. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1618920>

Sonowal, S., Palani, N. P., Ahmed, R., Debbarma, J., Chikkaputtaiah, C., Basar, E., Velmurugan, N., 2022. Himalayan bacterial endophytes enhance microalgal cell numbers and chlorophyll content in synthetic co-culture. *J Appl Phycol.* 34(5), 2383-2400. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02798-9>

Soru, S., Malavasi, V., Concas, A., Caboni, P., Cao, G., 2019. A novel investigation of the growth and lipid production of the extremophile microalga *Coccomyxa melkonianii* SCCA 048 under the effect of different cultivation conditions: Experiments and modeling. *Chem Eng J.* 377, 120589. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.049>

Sparks, D. L., Maçik, M., Gryta, A., Frąc, M., 2020. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Adv Agro.* 162, 1-42. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001>

Su, Y., 2021. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Sci Total Environ.* 762, 144590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>

Suastes, J. K., Hernández, A.R., Mena, V. Y., Chairez, I., 2020. Simultaneous Optimization of Biomass and Metabolite Production by a Microalgae-Yeast Co-culture Under Inorganic Micronutrients. *Bioenergy Res.* 13(3), 974–985. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10116-9>

Tagirdzhanova, G., Scharnagl, K., Yan, X., 2018. Genomic analysis of *Coccomyxa viridis*, a common low-abundance alga associated with lichen symbioses. *Sci Rep* 13, 21285. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48637-w>

Tian, Q., Chen, F., Liu, J., Zhang, F., Mi, G., 2008. Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *J Plant Prot Res.* 165(9), 942–951. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.02.011>

Tong, C. Y., Honda, K., Derek, C. J. C., 2023. A review on microalgal-bacterial Co-culture: The multifaceted role of beneficial bacteria towards enhancement of microalgal metabolite production. *Environ Res.* 228, 115872. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115872>

Torres, R., Bernabé, A. J., Carmona, F. J., Martínez, J., Fernández, F., 2024. Application and effectiveness of *Methylobacterium symbioticum* as a biological inoculant in maize and strawberry crops. *Folia microbiol.* 69(1), 121-131. <https://doi.org/10.1007/s12223-023-01078-4>

Trémouillaux, G.J., Huss, V. A. R., 2007. A cryptic intracellular green alga in *Ginkgo biloba*: ribosomal DNA markers reveal worldwide distribution. *Planta.* 226(2), 553–557. [doi: 10.1007/s00425-007-0526-y](https://doi.org/10.1007/s00425-007-0526-y)

- Verma, K., Kumar, P. K., Krishna, S. V., Himabindu, V., 2020. Phycoremediation of Sewage-Contaminated Lake Water Using Microalgae–Bacteria Co-Culture. *Water Air Soil Pollut.* 23, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04652-5>
- Vuong, T. T., Kwon, B.-R., Eom, J.-I., Shin, B.-K., Kim, S. M., 2019. Interaction between marine bacterium *Stappia* sp. K01 and diatom *Phaeodactylum tricornutum* through extracellular fatty acids. *J Appl Phycol.* 32(1), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01931-5>
- Wang, H., Hill, R. T., Zheng, T., Hu, X., Wang, B., 2014. Effects of bacterial communities on biofuel-producing microalgae: stimulation, inhibition and harvesting. *Crit Rev Biotechnol.* 36(2), 341–352. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.961402>
- Wang, Y., Yang, Y., Ma, F., Xuan, L., Xu, Y., Huo, H., Zhou, D., Dong, S., 2015. Optimization of *Chlorella vulgaris* and bioflocculant-producing bacteria co-culture: enhancing microalgae harvesting and lipid content. *Lett Appl Microbiol.* 60(5), 497–503. <https://doi.org/10.1111/lam.12403>
- Wei, Z., Wang, H., Li, X., Zhao, Q., Yin, Y., Xi, L., Ge, B., Qin, S., 2019. Enhanced biomass and lipid production by co-cultivation of *Chlorella vulgaris* with *Mesorhizobium sangaai* under nitrogen limitation. *J Appl Phycol.* 32(1), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01924-4>
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., Ambati, R. R., 2021. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10(2), 393. <https://doi.org/10.3390/cells10020393>
- Yanke, J., Yingzhe, Y., Zhaoxu, W., Chongchong, L., Ziyi, Y., Yang, L., Xinhua, D., 2024. Plant biostimulant as an environmentally friendly alternative to modern agriculture. *J Agric Food Chem.* 72 (10), 5107-5121. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c09074>
- Zarrinmehr, M. J., Farhadian, O., Heyrati, F. P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M., Daneshvar, E., 2020. Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Egypt J Aquat Res.* 46(2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>
- Zhang, B., Ogden, K., 2019. Nitrogen balances and impacts on the algae cultivation-extraction-digestion-cultivation process. *Algal Res*, 39, 101434. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101434>
- Zhou, X., Jin, W., Wang, Q., Guo, S., Tu, R., Han, S.-f., Chen, C., Xie, G., Qu, F., Wang, Q., 2020. Enhancement of productivity of *Chlorella pyrenoidosa* lipids for biodiesel using co-culture with ammonia-oxidizing bacteria in municipal wastewater. *Renewable Energy.* 151, 598–603. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.11.063>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. ANOVA que muestra las variables con efecto significativo sobre la producción de biomasa de *C. simplex* para la obtención de un cocultivo estable microalga-bacteria (*). La letra (C) indica el efecto cuadrático de la variable evaluada y (L) el efecto lineal.

Table S1. ANOVA showing the variables with significant effect on the biomass production *C. simplex* for establishing a stable microalgae-bacteria coculture (*). The letter (C) indicates the quadratic effect of the evaluated variable and (L) indicates the linear effect.

Factor	β	Error	P <0.05
Intercepto	-7.5E+05	1.7E+06	0.680
(1) <i>C. simplex</i> (L)*	2.0E+01	5.0E+00	0.001
<i>C. simplex</i> (C)*	-1.7E-05	-4.4E-06	0.002
(2) <i>M. oryzae</i> (L)*	1.6E+01	5.0E+00	0.007
<i>M. oryzae</i> (C)*	-1.6E-05	-4.0E-06	0.005
(3) Nitrógeno (L)	4.4E+06	6.5E+06	0.513
Nitrógeno (C)	-7.4E+06	7.9E+06	0.357
(4) Carbono (L)	7.6E+05	2.5E+06	0.762
Carbono (C)	5.8E+06	1.1E+06	0.617
1y2	6.9E+05	1.4E+04	0.653