

Editores de estilo: Elisa Serviere Zaragoza, Rafael Riosmena Rodríguez, Esteban Fernando Félix Pico, José Luis León de La Luz.

Diseño editorial: Edgar Yuen Sánchez.

Diseño de portada: Gerardo Rafael Hernández García.

Imagen de portada: Fotografía aérea del estero El Chivo, Bahía Magdalena, BCS. Tomada por Charles Chandler.

Los Manglares de la Península de Baja California.

Editado por Esteban Fernando Félix Pico, Elisa Serviere Zaragoza, Rafael Riosmena Rodríguez, José Luis León de La Luz.

Primera edición 2011

D.R. © Publicación de divulgación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita. La Paz, Baja California Sur, México, 23090

ISBN 978-607-7634-06-5

Impreso y hecho en México / Printed in Mexico.

“Las opiniones expresadas por los autores (textos, figuras y fotos) no necesariamente reflejan la postura de las instituciones editoras de la publicación”.

Ninguna parte de esta obra puede ser reproducida o transmitida, mediante ningún sistema o método electrónico o mecánico sin autorización por escrito de los editores.

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Universidad Autónoma de Baja California Sur.



CAPÍTULO 5

MICROBIOLOGÍA DEL MANGLAR

Gina Holguin¹, Patricia Vazquez¹, Jimena Sánchez², Yossef López de Los Santos¹,
Ana L. Flores-Mireles³, Luz Marina Melgarejo², Javier Vanegas², Tania Galindo²,
Alfonso Dávila-Lule¹, Jaime Polanía⁴ y Manuel Ruiz¹

¹ *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita. Apdo. Postal 128, La Paz, BCS, 23090, México. pvazquez04@cibnor.mx*

² *Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Carrera 45 No. 26-85. Edificio Uriel Gutiérrez. Bogotá, Colombia.*

³ *Department of Microbiology. Cornell University (CU). 410 Thurston Avenue Ithaca, N.Y. 14850-2432 USA.*

⁴ *Instituto de Estudios Ambientales. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Calle 59A No.63-20. Medellín, Colombia.*

RESUMEN

Los manglares son ecosistemas de alta productividad primaria, ricos en materia orgánica, pero deficientes en nitrógeno y fósforo. Esta productividad ha sido parcialmente explicada por la presencia de un eficiente sistema de reciclaje de nutrientes efectuado a través de la actividad microbiana. A su vez los exudados radicales de las plantas sirven como fuente de alimento para los microorganismos, estableciéndose así una relación mutuamente benéfica. En el presente capítulo se reportan investigaciones sobre la comunidad microbiana de manglar en Bahía Balandra como bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN), desnitrificantes, solubilizadoras de fosfatos (BSF), sulfato reductoras, productoras de moléculas señal, de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal y antibióticos. Estas investigaciones apoyan la hipótesis que la existencia de estos grupos es de vital importancia para el funcionamiento del ecosistema. Así mismo, se destacan aspectos como la mayor actividad para ciertos grupos funcionales (BFN y BSF) cuando se cultivan juntos y la mediación de moléculas señal tipo acil homoserinas lactonas (AHLs). El conocimiento de la estrecha relación microorganismo-nutriente-planta ofrece perspectivas para su potencial utilización en planes de conservación y restauración de estos ambientes marinos.

Palabras clave: manglar, microorganismos, actividad biológica, moléculas señal, antibióticos.

MICROBIOLOGY OF MANGROVE

ABSTRACT

Mangroves are highly productive ecosystems and rich in organic matter, but they are nutrient-deficient in nitrogen and phosphorus. This productivity has been partially explained by an efficient cycling system of nutrients through microbial activity. In turn, plant-root exudates serve as food source for microorganisms, which establish a mutual and beneficial relationship. This chapter reports studies about the mangrove microbial community at Bahía Balandra, such as nitrogen fixing-bacteria (NFB), denitrifying-bacteria, phosphate-solubilizing bacteria (PSB), sulfate-reducing bacteria, signal molecules produced by bacteria, and substances that regulate plant growth and antibiotics. Researches support the hypothesis that these microbial groups play an essential role in the functioning of the ecosystem. Likewise, we emphasize aspects such as major activity for some functional groups (NFB and PSB) when both are grown together and the mediation of signal molecules such as acyl-homoserine lactones (AHLs). Knowledge of the close relationship of microorganism-nutrient-plant interaction offers important perspectives for the potential use of these marine coastal environments in conservation and restoration plans.

Key words: mangrove, microorganisms, biological activity, signal molecules, antibiotics.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Holguin *et al.* (2007) es imposible comprender los mecanismos de desarrollo y sostenimiento del ecosistema de manglar sin abordar el estudio de su microbiología, ya que ésta resulta fundamental para su mantenimiento y constituye un verdadero universo de diversidad filogenética y metabolismo funcional. Alongi *et al.* (1988) mencionan que dentro de esta amplia diversidad microbiana encontrada en los manglares, aproximadamente el 91% de la biomasa microbiana corresponde a organismos de tipo procariótico (dominios Bacteria y Archaea) y a hongos, en tanto que algas y protozoarios están representados un 7 y 2% respectivamente (dominio Eukaria).

Aún cuando se ha reconocido que las comunidades microbianas en los ecosistemas de manglar juegan un papel preponderante en el reciclaje de nutrientes, los estudios hasta ahora realizados explican parcialmente las interacciones entre nutrientes-manglares-microorganismos.

En este sentido, algunos aportes de gran relevancia para los manglares de La Paz, Baja California Sur (México) se han generado desde 1991 en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) cuando el Dr. Yoav Bashan, Gina Holguin y colaboradores, deciden aceptar el reto y emprender lo que 18 años después se ha convertido en una línea de investigación dedicada a generar conocimiento sobre la microbiología, conservación y reforestación del manglar.

Los estudios se han enfocado al aislamiento de grupos bacterianos y evaluación de su importancia en procesos como la fijación de nitrógeno atmosférico, desnitrificación y solubilización de fosfato inorgánico. Actualmente, se han emprendido investigaciones sobre síntesis de antibióticos en la rizósfera de los mangles y la presencia de moléculas señal tipo acil homoserina lactonas o AHLs producidas por bacterias, así como su posible relación con los procesos fisiológicos que promuevan el crecimiento vegetal (Dávila-Lule 2007).

Los trabajos que serán descritos a continuación en este capítulo fueron realizados a partir de muestras obtenidas del manglar de Balandra ubicado en La Paz, B. C. S (Fig. 1). Balandra se localiza en una región semidesértica, en donde la precipitación media anual de la estación mas cercana es de 176.2 mm (CNA 2009) y en donde se han detectado bajos niveles de nitrógeno y fósforo en el agua (Holguin y Bashan 1996, Vazquez 1996, Vazquez 2000). Los mangles de la laguna de Balandra poseen un aspecto saludable sin aparentes deficiencias nutricionales de nitrógeno o fósforo, paradoja que puede ser explicada gracias al efectivo reciclaje que ocurre dentro del ecosistema y que permite mantener los escasos nutrientes en el manglar, proceso que es llevado a cabo por diversos microorganismos (Holguin *et al.* 1999).

Holguin y colaboradores (2007) enumeran tres mecanismos por los que las comunidades bacterianas ayudan al sostenimiento de las especies de mangles: (1) la mineralización de la materia orgánica bajo condiciones principalmente anaerobias y microaerofilicas, relacionada con la intervención de bacterias sulfato reductoras (de gran importancia en las capas anaerobias de los sedimentos de manglar), (2) las tasas de fijación biológica de nitrógeno que contribuyen con un 40 a 60% de los requerimientos de nitrógeno del ecosistema, (3) la presencia de bacterias de la rizósfera o rizosféricas que brindan al mangle y a otras plantas halófitas asociadas, nutrientes y otras sustancias como reguladores de crecimiento.

La información de la dinámica espacial y temporal de las poblaciones bacterianas es limitada. González-Acosta y colaboradores (2006) evaluaron los factores físico-químicos y nutricionales que determinaban las fluctuaciones espaciales y estacionales de bacterias heterotróficas cultivables y de *Vibrio* sp. del manglar de Balandra. Para ello se realizaron muestreos mensuales de sedimento de manglar durante un año en tres estaciones. Se hicieron conteos bacterianos y mediciones de temperatura del agua, salinidad y concentración del oxígeno disuelto. También se midieron las concentraciones de amonio, nitratos, nitritos, fosfato, materia orgánica, pH y textura para uno de los muestreos. El análisis de varianza determinó que la temperatura del agua era el principal parámetro que influía en la distribución estacional de bacterias heterotróficas cultivables y *Vibrio* sp. en los sedimentos de manglar. A mayor temperatura las poblaciones cultivables de heterótrofos y *Vibrio* sp. disminuían. La temperatura del agua presentó un rango de 31°C en agosto y 21°C en enero. Se observó una gran variación espacial de las poblaciones bacterianas a cortas distancias (~ 1m) la cual fue correlacionada con la cantidad de arcilla, amonio y pH.

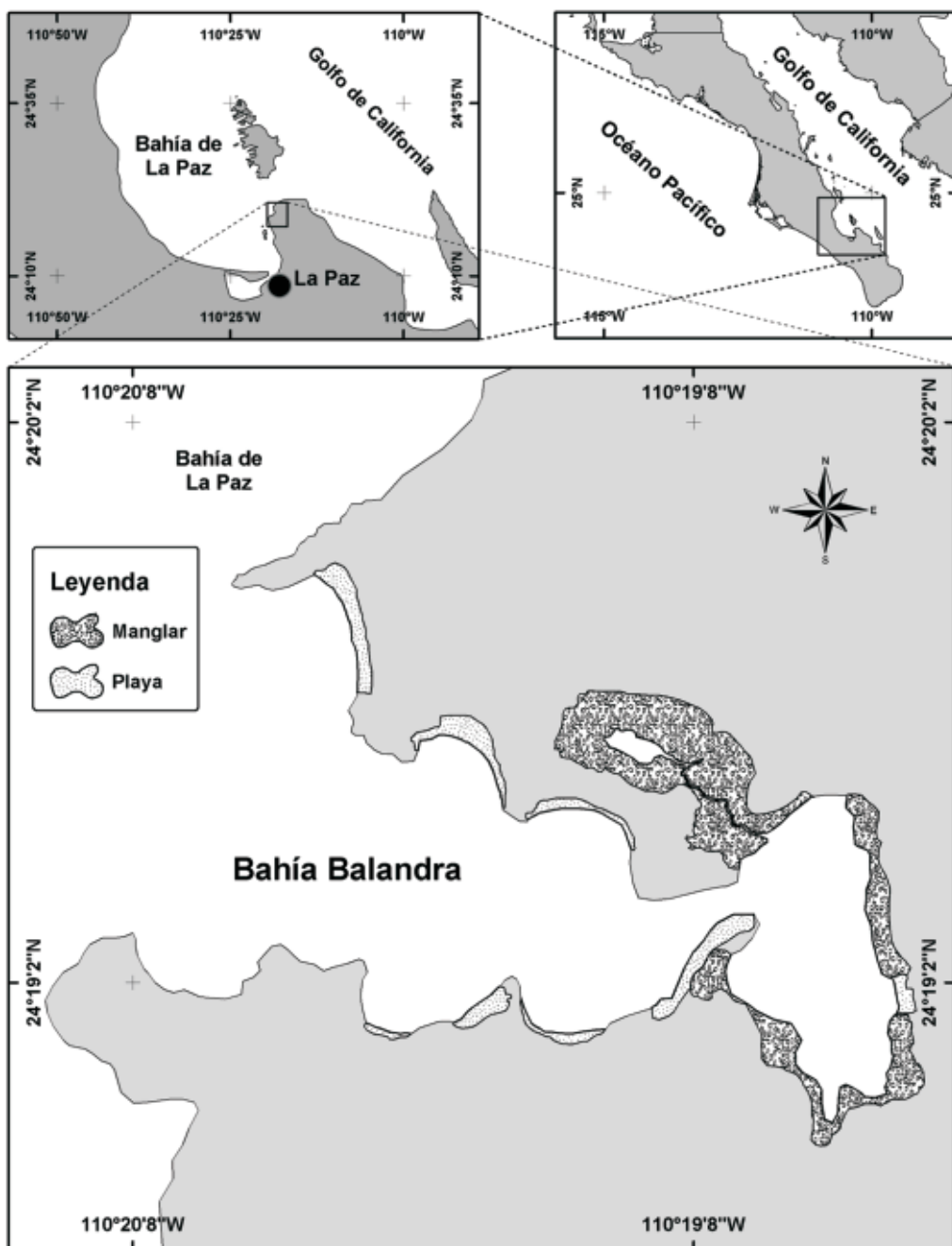


Figura 1.- Localización del área de estudio. Manglar de Balandra.

BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) no se distribuye uniformemente en ecosistemas de manglar, por ejemplo, en sedimentos está probablemente limitada debido a recursos energéticos insuficientes, contrariamente en la rizósfera se presentan altas tasas de fijación de nitrógeno (Zuberer y Silver 1978, Sengupta y Chaudhuri 1991). Esta condición puede ser explicada debido a que las raíces exudan compuestos que sirven como fuente de carbono y energía, sosteniendo así la proliferación de comunidades diazotróficas; adicionalmente las bajas concentraciones de nitrógeno y las condiciones microaerofílicas que se generan en el sedimento promueven la expresión y regulación de genes que codifican para la enzima nitrogenasa (Glick *et al.* 1999a). Dicha enzima cataliza la reducción del nitrógeno molecular a amonio y está compuesta por dos proteínas altamente conservadas: la enzima con hierro (Fe) (codificada por el gen *nifH*) y la enzima con molibdeno y hierro (MoFe) (codificada por los genes *nifDK*) (Young *et al.* 1992). Cabe señalar que el gen *nifH* presenta una secuencia de aminoácidos evolutivamente conservada, por lo que ha sido explotado en el diseño de *primers* para PCR con el fin de investigar el potencial genético de la fijación de nitrógeno en ambientes marinos (Zehr *et al.* 2003).

La fijación de nitrógeno es una función metabólica ampliamente distribuida entre diferentes géneros bacterianos. En ecosistemas de manglar se han identificado miembros de los géneros: *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Paracoccus*, *Phyllobacterium*, *Oceanomonas* y *Vibrio* (Sengupta y Chaudhuri 1991, Holguín *et al.* 1992, Kathiresan y Selvan 2006, Flores-Mireles *et al.* 2007). En el manglar de Balandra, se han desarrollado estudios con el fin de entender los procesos y componentes que regulan la fijación de nitrógeno, así como a los microorganismos involucrados. Holguín y colaboradores (1992) aislaron e identificaron dos diazótrofos (*Listonella anguillarum* y *Vibrio campbellii*) en la rizósfera de mangle y a los cuales estaba asociada una cepa de *Staphylococcus* sp. (no fijadora de nitrógeno); encontraron que al purificar las cepas y separar el *Staphylococcus* sp. de los otros dos diazótrofos, la fijación de nitrógeno disminuyó. Experimentos *in vitro* revelaron que la bacteria no fijadora incrementó la capacidad de *L. anguillarum* un 17% en comparación con el cultivo puro, así como la capacidad para fijar nitrógeno por célula incrementó un 22%. Contrariamente, *Staphylococcus* sp. redujo la capacidad de *V. campbellii* para fijar nitrógeno en un 15%. Esto sugiere que la interacción de los diazótrofos con otros microorganismos en la rizósfera del mangle de alguna manera promueve la fijación de nitrógeno; sin embargo, el mecanismo por el que esto se genera no fue explicado. Adicionalmente, este fenómeno se observó cuando el diazótrofo terrestre *Azospirillum brasilense* Cd (utilizado para promover el crecimiento de plantas de importancia agrícola) fue co-cultivado con la cepa de *Staphylococcus* sp. (aislada de la rizósfera de mangle), en este caso, el incremento en la fijación de nitrógeno

fue atribuido al ácido aspártico producido por *Staphylococcus* sp., que estimula la actividad de la enzima nitrogenasa de *A. brasilense* (Holguin *et al.* 1996). Se concluyó que dicho sinergismo es importante para aumentar la eficiencia de los procesos metabólicos que se generan en las raíces del manglar.

Otro estudio confirmó el sinergismo existente entre cepas de *Phyllobacterium* sp. (diazótrofo) y *Bacillus licheniformis* (solubilizador de fosfatos) obtenidas de la rizósfera de mangle, las cuales incrementaron los niveles de fijación de nitrógeno (200%) y de solubilización de fosfatos (152%) al ser co-cultivadas. Experimentos con ^{15}N en los que se inocularon plántulas de mangle negro con *Phyllobacterium* sp. demostraron que era mejor la inoculación mixta. El ^{15}N fue incorporado a las hojas, aunque el nivel de nitrógeno total disminuyó (Rojas *et al.* 2001).

Adicionalmente, en estos ecosistemas se ha descrito la presencia de otro componente importante de la microbiota como lo son las cianobacterias consideradas uno de los principales portadores de nitrógeno al sistema (Palaniselvam *et al.* 1998). En este sentido, en el manglar de Balandra se han realizado estudios que demuestran la relevancia de dichos microorganismos.

Inicialmente, se evaluó la comunidad de cianobacterias asociadas a las raíces aéreas (pneumatóforos) de mangle negro, localizando los sitios de colonización preferidos por diferentes grupos bacterianos. Se observó que las cianobacterias filamentosas como *Lyngbya* sp. y *Oscillatoria* sp. colonizaron la parte inferior del pneumatóforo; en la parte media dominó la cianobacteria filamentosa *Microcoleus* sp. y en la superior se encontró *Aphanoteche* sp. La capacidad para fijar nitrógeno *in vitro* de *Microcoleus* sp. fue de 10^{-6} nmol etileno célula $^{-1}$ 24 h $^{-1}$ (Toledo *et al.* 1995a). Complementariamente, se determinó *in situ* la fijación de nitrógeno producida por las cianobacterias presentes en las raíces aéreas del mangle, detectando mayores niveles en verano (603.69 nmol etileno μg clorofila a $^{-1}$ pneumatóforo $^{-1}$ 24h $^{-1}$) y menores de otoño a invierno (76.18 nmol etileno μg clorofila a $^{-1}$ pneumatóforo $^{-1}$ 24h $^{-1}$) (Toledo *et al.* 1995a). Asimismo, al inocular la cianobacteria *Microcoleus* sp. en plántulas de mangle germinadas en condiciones de laboratorio, se observó que después de seis días de incubación las raíces de las plantas estaban totalmente colonizadas por esta cianobacteria. La fijación de nitrógeno incrementó gradualmente hasta el cuarto día. En las plantas inoculadas se registraron valores máximos de 9 nmol etileno planta $^{-1}$ día $^{-1}$ (Toledo *et al.* 1995b).

Estudios posteriores con ^{15}N corroboraron que la inoculación con *Microcoleus chthonoplastes* en plántulas de mangle negro incrementaba significativamente el contenido de nitrógeno total en las hojas en un rango de 5-114% (Bashan *et al.* 1998).

Puente y colaboradores en 1999 experimentaron inoculando plántulas de *Avicennia germinans* con las bacterias *Azospirillum brasilense* Cd y *Azospirillum halopraeferans* (halotolerante), observando mediante microscopía electrónica de barrido que los mecanismos de colonización en las raíces fueron diferentes para ambas cepas. Las dos bacterias sobrevivieron en agua de mar por más de 30 días a una concentración de 10^4

log UFC ml⁻¹. Este trabajo fue el primero en evaluar la posibilidad de utilizar bacterias terrestres promotoras de crecimiento vegetal para inocular plantas marinas.

Dado que la información acerca de la importancia de las comunidades diazotróficas en manglares es limitada, se efectuó análisis de la diversidad molecular de la comunidad de fijadores de nitrógeno asociados a las raíces de los mangles de Balandra, demostrando que dicha comunidad presenta una mayor diversidad cuando los niveles de oxígeno son bajos y la concentración de materia orgánica es elevada. En dicho estudio se utilizó la técnica de T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism), que permitió la detección de la heterogeneidad espacial de la composición de las comunidades diazotróficas a través del análisis del gen *nifH* (fijación de nitrógeno) obtenido de ADN de la comunidad microbiana. Simultáneamente, las secuencias de ADN obtenidas fueron comparadas en un análisis filogenético, encontrando que estaban principalmente relacionadas con secuencias que provienen de ambientes marinos (Flores-Mireles *et al.* 2007).

En investigaciones efectuadas por Bashan y colaboradores (2000) se utilizaron inoculantes bacterianos para promover el crecimiento de plantas halotolerantes; para lo cual se inocularon semillas de *Salicornia bigelovii* con bacterias de la rizósfera de mangle (*Vibrio aestuarianus* – diazótrofa - con *V. proteolyticus* - bacteria solubilizadora de fosfatos- y *Phylobacterium myrsinacearum* – diazótrofa - con la bacteria solubilizadora de fosfatos - *Bacillus licheniformis*), obteniendo un aumento significativo en su crecimiento (de 44% a 102% en peso seco, 500% en el contenido de nitrógeno y proteínas y 94% en el de ácidos grasos).

BACTERIAS DESNITRIFICANTES

La desnitrificación es uno de los principales procesos del ciclo del nitrógeno global y es efectuada exclusivamente por bacterias que controlan el balance entre las formas de nitrógeno (Zumft 1992), señalando que en este proceso respiratorio, el nitrato es reducido a nitrito, óxido de nitrógeno (NO y N₂O) y nitrógeno molecular (N₂), que es liberado a la atmósfera (Ghiglione *et al.* 2000).

La reducción de nitrito a óxido nitroso a través de la nitrito reductasa es el primer paso que distingue a los microorganismos desnitrificantes netos (Priemé *et al.* 2002). La enzima nitrito reductasa es fundamental en el proceso de desnitrificación y es codificada por los genes *nirK* y *nirS* con cobre y citocromo cd₁ respectivamente, que son utilizados como marcadores funcionales (Zumft 1992, Priemé *et al.* 2002, Castro-González *et al.* 2005). Este proceso permite la mineralización de la materia orgánica (Song y Ward 2003) y el reciclaje de nutrientes en ambientes anaerobios o microaerófilos como sedimentos marinos, ecosistemas de manglar y marismas (Rivera-Monroy y Twilley 1996, Priemé *et al.* 2002), en donde el oxígeno no está disponible

como aceptor final de electrones (Wolsing y Priemé 2004).

La información sobre la pérdida de nitrógeno en sedimentos de manglares a través de desnitrificación y los factores que la rigen es muy limitada. Rivera-Monroy y Twilley (1996) reportaron que en ecosistemas de manglar contaminados, las tasas de desnitrificación eran mayores que las observadas en manglares no perturbados.

Adicionalmente, en otro estudio se demostró que la pérdida de nitrógeno por desnitrificación en sedimento de manglar fue del 55% debido a la gran disponibilidad de glucosa encontrada en ese ambiente, fomentando el crecimiento de microorganismos desnitrificantes (Chiu *et al.* 2004). Algo similar fue reportado en un estudio realizado en manglares de la India con altas concentraciones de materia orgánica en donde se analizó la composición química del agua intersticial y de sedimento, encontrando niveles significantes de mineralización de materia orgánica a través de la desnitrificación bajo condiciones anóxicas (Seralathan *et al.* 2006). Patrones similares se han observado en comunidades de pastos marinos como *Halodule uninervis* y *Thalassia hemprichii*, en donde sus raíces producen una considerable cantidad de exudados que permiten el desarrollo de microorganismos desnitrificantes (Shieh y Yang 1997). Los resultados de dichas investigaciones se encuentran sustentados en un factor común en donde se plantea que para la proliferación de comunidades desnitrificantes es necesario que exista un exceso de nutrientes y condiciones anaerobias, ya que la presencia de oxígeno inhibe a las enzimas involucradas en este proceso metabólico (Zumft 1992, Shieh y Yang 1997).

En particular, en los mangles de Balandra, se efectuó caracterización molecular de la comunidad de microorganismos desnitrificantes y a su vez ésta fue comparada con la comunidad de fijadores de nitrógeno, encontrando que la comunidad de desnitrificantes está escasamente representada en estos ambientes. Lo anterior obedece a que estos ecosistemas son pobres en nitrógeno por lo cual, la desnitrificación no es promovida debido a la falta de nitratos y nitritos que son aceptores de electrones y dirigen el proceso de desnitrificación; de tal forma que es comprensible que exista mayor abundancia de fijadores de nitrógeno que provean nitrógeno orgánico (Flores-Mireles *et al.* 2007).

Asimismo, en dicho estudio se realizaron los primeros aislamientos de cepas desnitrificantes provenientes de este ecosistema, pertenecientes a los géneros: *Vibrio*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Oceanomonas*, *Paracoccus* y *Aeromonas*. Adicionalmente, se generó una librería de clones y sus secuencias fueron filogenéticamente analizadas, encontrando que estaban relacionados con muchas secuencias de clones de pastos marinos y de marismas (Flores-Mireles *et al.* 2007).

En conclusión, el proceso de desnitrificación puede presentar argumentos a favor y en contra que dependen de los ambientes en los que se lleve a cabo. Así, un exceso de bacterias desnitrificantes en los suelos destinados para agricultura sería indeseable porque eliminaría el nitrato que es una fuente de alimento necesaria para las plantas, contrariamente, este proceso podría ser esencial para ambientes altamente eutróficos.

No obstante, en términos de calidad, se esperaría que los suelos con gran riqueza y diversidad microbiana contengan un balance entre bacterias desnitrificantes y bacterias fijadoras de nitrógeno, de tal forma que estas últimas devuelvan al sistema el nitrógeno liberado por el proceso de desnitrificación (Zumft 1992).

Es importante realizar estudios más profundos para una mejor comprensión del ciclo de nitrógeno. En particular para los manglares de Baja California Sur, la información recopilada hasta el momento revela que las comunidades diazotróficas son esenciales para su mantenimiento. Futuras investigaciones de los microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno y sus interacciones con aquéllos de actividades metabólicas diferentes, permitirían generar inoculantes mixtos que nos ayuden a mantener o restaurar zonas de manglar deterioradas.

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO INORGÁNICO

El fósforo es un componente funcional y estructural esencial para todo ser viviente (Ehrlich 1990) y después del nitrógeno, es el segundo nutriente más requerido por plantas y microorganismos; cuya función principal radica en su participación en procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Alexander 1980).

El fósforo en suelos es inmovilizado o menos soluble principalmente por procesos de adsorción, precipitación química o ambos; en estas condiciones, el papel de los microorganismos solubilizadores de fosfatos es de suma importancia ya que disuelven formas de fosfato que se encuentran inmovilizadas por cationes de calcio, hierro y aluminio, liberándolas en solución y permitiendo su asimilación por parte de las plantas (Vazquez *et al.* 2000).

En ambientes marinos, la presencia de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) ha sido reportada, por ejemplo, en la rizósfera de *Zostera marina* (pasto marino), se demostró que los exudados radicales (aminoácidos y glucosa) sirven como fuentes de carbono y energía para estas bacterias (Craven y Hayasaka 1982).

Un estudio pionero en la investigación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en manglares y relevante para posteriores trabajos, fue realizado por Vazquez y colaboradores (2000) a partir de muestras rizosféricas de plántulas de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* del manglar de Balandra. Las raíces de las plántulas fueron colocadas en un medio de enriquecimiento modificado y suplementado con fosfato de calcio tribásico, permitiendo el aislamiento de *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atropheus*, *Paenibacillus macerans*, *Enterobacter taylorae*, *E. aerogenes*, *E. asburiae*, *Kluyvera cryocrescens*, *Chryseomonas luteola*, *Xantobacter agilis*, *Pseudomonas stutzeri* y *Vibrio proteolyticus*. La capacidad de solubilización y el crecimiento de algunas de las cepas se evaluaron en experimentos *in vitro* utilizando

un medio específico modificado para bacterias marinas, al cual se le adicionó fosfato de calcio. Los resultados mostraron que la mayor solubilización de fosfato ocurrió entre las 18 y 24 h correspondiendo aproximadamente a la fase logarítmica del crecimiento de las bacterias. La mayor concentración de fósforo solubilizado fue detectada en una cepa de *V. proteolyticus* (475 mg L^{-1}), concentración que teóricamente sería suficiente para proporcionar los requerimientos diarios de una plántula de mangle. Nuestro grupo de investigación también se enfocó en determinar el posible mecanismo utilizado (por las bacterias aisladas) para solubilizar el fosfato inorgánico. Para tal efecto, se realizó un análisis de los sobrenadantes (de los cultivos bacterianos) y por cromatografía de gases se detectó que todas las especies bacterianas produjeron ácidos orgánicos (láctico, succínico, isobutírico, isovalérico, acético) y otros compuestos no identificados.

Por lo anteriormente expuesto, se concluyó que la solubilización mediada por las bacterias en la rizósfera de los mangles de Balandra es significativa y se propuso como mecanismo principal para la solubilización de fosfato inorgánico la producción de ácidos orgánicos. Un análisis microbiano hecho por Holguín y colaboradores (2006) sugiere que la relación BSF y bacterias totales aerobias (cultivables) serviría como un indicador de la salud del manglar.

Otros microorganismos involucrados en el proceso de solubilización de fosfatos inorgánicos, son los hongos. No obstante, su investigación en relación con manglares se ha orientado principalmente al conocimiento de su diversidad, distribución, ecología, participación en procesos de fitopatogenicidad y de solubilización – translocación de fosfatos o en la producción de sustancias antimicrobianas (Sosa *et al.* 2007). Vazquez y colaboradores (2000) aislaron e identificaron a partir de muestras rizosféricas de mangle negro, una cepa solubilizadora del hongo filamentoso *Aspergillus niger*, que produjo exclusivamente ácido succínico. A excepción de este estudio y hasta donde tenemos conocimiento, no existen reportes de otros hongos aislados en los mangles de Baja California Sur.

BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

Las bacterias sulfato reductoras son de gran importancia como grupo metabólico funcional. Degradadores primarios de hasta un 50% de la materia orgánica bajo condiciones de anaerobiosis o microaerofilia en los sedimentos marinos de manglar (Jørgensen 1982, Kristensen *et al.* 1991), son capaces de reducir formas oxidadas de azufre y por esto son denominadas de manera genérica como bacterias “sulfato reductoras”. Este grupo bacteriano está directamente relacionado con los perfiles de concentración de azufre y oxígeno; su participación en el reciclaje de nutrientes tiene un papel fundamental en el ciclo biogeoquímico del azufre (Postgate 1979).

De acuerdo a lo revisado en la literatura y a pesar de su importancia, escasos reportes de bacterias sulfato reductoras se han realizado en los ecosistemas de manglar. Una bacteria sulfato reductora no identificada fue aislada de la rizósfera de *Avicennia germinans* en el manglar de Bahía Balandra (G. Holguín, dato no publicado). Un trabajo realizado por López de los Santos (resultados no publicados) describe que mediante el empleo de nucleadores cilíndricos de PVC (2.5 cm de diámetro por 5 cm de longitud) se obtuvieron muestras de sedimento rizosférico de *Avicennia germinans*. Para el aislamiento de bacterias sulfato reductoras, utilizó los medios de Widdel y Back modificado, usando etanol como fuente de carbono (Battersby 1988) y un medio específico para el cultivo de *Desulfovibrio* sp. empleado por la DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares).

Con técnicas de microbiología básica, agar-shake o agar roll tube (Battersby 1988) y de Hungate (Miller y Wolin 1974) para el cultivo de anaerobios estrictos, aisló bacilos Gram negativos. Los resultados mostraron que alrededor de un 60% de los tubos utilizados, exhibieron un crecimiento de bacterias sulfato reductoras con la técnica de agar shake.

Se aislaron cinco cepas (GAG 10"1, GAG 10"2, GAG 6V, GAG 6 y GAG 1) y dentro de la caracterización fisiológica, se valoraron las curvas de crecimiento bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y utilización de distintas fuentes de carbono (etanol, lactato, fumarato, malato y ácido succínico). Observándose que las cepas crecieron mejor en los medios que contenían lactato y etanol, seguidos por aquéllos con malato y fumarato, en tanto que no hubo crecimiento al sustituir el etanol por ácido succínico. Se determinó un rango óptimo de crecimiento a pH 6.5 - 8.0 y temperatura de 24 - 35 °C. Adicionalmente, se cuantificó la capacidad de las cepas para fijar nitrógeno (N₂) mediante el ensayo de reducción de acetileno, registrando una producción máxima de 0.5 nmol de etileno por la cepa GAG 10"1 (López de los Santos 2005 - Resultados no publicados -).

Dado que los anteriores resultados se consideran preliminares, se plantea continuar con la investigación sobre las comunidades de bacterias anaerobias en los ecosistemas de manglar de la península de Baja California Sur.

BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS ANOXIGÉNICAS

Otro grupo bacteriano que ha sido muy poco estudiado es el de las bacterias fotosintéticas anoxigénicas que no producen oxígeno como producto de la fotosíntesis y utilizan el sulfuro de hidrógeno (u otro compuesto de azufre reducido o H₂) en lugar de agua como donador de electrones. Este grupo incluye bacterias púrpuras y verdes del azufre y bacterias púrpuras no azufrosas. Amador y Holguín (resultados no publicados) aislaron dos morfotipos de bacterias púrpuras del azufre de las partes

sumergidas de los pneumatóforos de *Avicennia germinans* en el manglar de Balandra. La caracterización inicial de las dos cepas mostró perfiles típicos de bacterioclorofilas *a* y *b*. Es posible que estas bacterias conjuntamente con otros grupos de microorganismos predominantes en ambientes anaerobios puedan contribuir a la productividad del manglar (Holguin 2001).

ACTINOBACTERIAS O ACTINOMICETOS

Las actinobacterias o actinomicetos son un grupo de bacterias muy estudiado en suelos terrestres. Este grupo tiene capacidad para degradar compuestos orgánicos complejos (Tokala *et al.* 2002) y ser agentes de control biológico de patógenos en raíces de plantas (Yuan y Crawford 1995). La síntesis de antibióticos es común en bacterias asociadas a las raíces de las plantas, permitiéndoles competir efectivamente por espacio y nutrientes con otros microorganismos que colonizan la rizósfera (Raaijmakers *et al.* 2002). Uno de los principales factores que determina la distribución y la actividad metabólica de las actinobacterias es la disponibilidad de nutrientes; que no se encuentran distribuidos uniformemente en el suelo y están localizados principalmente en los restos de plantas, materia orgánica, espermósfera (región adyacente a semillas en germinación) y la rizósfera (Thomashow *et al.* 1997).

El alto contenido de nutrientes de la rizósfera comparado con el del suelo no rizosférico es un parámetro excepcional. Numerosos estudios han demostrado que las plantas estimulan el crecimiento de ciertas poblaciones saprófitas de actinobacterias (productoras de antibióticos), debido a su actividad antagonista sobre organismos patógenos que atacan a las raíces (Weller *et al.* 2002).

En manglares, Jensen y colaboradores (2005) detectaron actinomicetos no cultivables (por medio de la amplificación de los genes 16S y 23S del ARNr) en muestras de sedimento de manglares en la isla de Guam. Por su parte Flores-Míreles (2007) aisló de raíces de mangle negro (del manglar de Balandra) tres cepas de actinomicetos pertenecientes a los géneros *Corynebacterium* y *Arthrobacter*.

Ruiz (2007) reportó la presencia de los antibióticos tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina, en sedimentos del manglar de Balandra. Por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) detectó concentraciones entre 0.06 a 0.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, en suelo de manglar no asociado a raíces de mangles; en tanto que en muestras de la rizósfera de *Avicennia germinans* las concentraciones fueron de 0.1 a 1.4 $\mu\text{g g}^{-1}$. Al estimar la fracción biodisponible de las tetraciclinas mediante el empleo de un biosensor bacteriano, el autor indica que el 17% de las tetraciclinas detectadas eran bioactivas. Lo anterior, sugiere la presencia de una comunidad del género *Streptomyces* metabólicamente activa que sintetiza tetraciclinas en las raíces de *A. germinans*.

En un estudio previo realizado por Holguin y Bacilio (resultados sin publicar) se

detectaron en exudados radicales de *Avicennia germinans*, sustancias como el p-hidroxibenzoato, vanilato, siringato, glicerol y ácidos orgánicos (láctico, succínico, fumárico, málico y adípico). La presencia de glicerol en los exudados de *A. germinans* también sugiere una estimulación en el crecimiento de actinobacterias del tipo asociación planta-bacteria.

Este trabajo es el primer reporte de la síntesis natural de tetraciclinas en la rizósfera del mangle *Avicennia germinans*.

PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS SEÑAL A PARTIR DE BACTERIAS AISLADAS DE MANGLE

Aunque se ha considerado que los microorganismos del suelo se comportan como individuos independientes e incapaces de relacionarse entre ellos; se ha demostrado su habilidad para percibir las condiciones ambientales que los rodean y comunicarse entre sí mediante autoinductores (AIs) como la molécula acil homoserina lactona (AHLs), que se acumula hasta alcanzar una concentración determinada (Dávila-Lule 2007). Al sistema de comunicación célula - célula que emplean los AIs producidos en respuesta a la densidad celular de la población de microorganismos, se le ha denominado *quorum sensing* (Keller y Surette 2006).

Algunos ejemplos de procesos celulares activados por las moléculas señal son: síntesis de antibióticos, esporulación, asimilación de nitrógeno, conjugación, expresión de genes relacionados con virulencia, síntesis de enzimas degradadoras de pared celular, respuesta a inanición, transición a fase estacionaria, producción de metabolitos secundarios, entre otros (Dunny y Winans 1999).

Se ha encontrado que la producción de AHLs en bacterias asociadas a plantas es común (Cha *et al.* 1998), por ejemplo, *Pseudomonas aureofaciens* inhibe el crecimiento del hongo *Gaeumannomyces graminis*, bajo la expresión controlada por una AHLs del antibiótico fenazina (Pierson *et al.* 1999). Sin embargo, la información es limitada en cuanto a la participación de las AHLs en mecanismos bacterianos de promoción del crecimiento vegetal (fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y síntesis de reguladores de crecimiento).

En un estudio se aislaron 20 cepas bacterianas promotoras de crecimiento vegetal, a partir de raíces de los mangles de Balandra. El 50% de estos aislamientos fueron productores de AHLs (Holguín *et al.* 2006), destacando que la síntesis de éstas moléculas estuvo determinada por la composición del medio de cultivo (con extracto de levadura y glucosa) que inhibió la síntesis de AHLs en la mayoría de las cepas (Flores-Mireles 2007). Al extraer y detectar las AHLs del suelo de rizósfera de mangle, se demostró que las condiciones *in situ* son apropiadas para la síntesis de AHLs por parte de las bacterias que habitan este ambiente (Holguín *et al.* - Resultados no publicados -).

Igualmente, se ha reportado que bacterias desnitrificantes (*Vibrio* sp., *Oceanomonas* sp., *Corynebacterium* sp., *Arthrobacter* sp. y *Pseudomonas stutzeri*) procedentes de raíces de mangle; que han crecido en cultivo mixto con bacterias fijadoras de nitrógeno, incrementan hasta cinco veces la producción de moléculas señal tipo acil homoserina lactona (Flores-Mireles 2007), lo cual indica que las bacterias desnitrificantes y fijadoras de nitrógeno interactúan entre sí por medio de la producción de moléculas señal.

Investigaciones realizadas por Villicaña (2007) evaluaron la relación entre la producción de AHLs de bacterias de la rizósfera de mangle y sus propiedades asociadas a la promoción de crecimiento en plantas. Para tal efecto, *Pseudomonas* sp. (LRMR6A) y *Vibrio* sp. (AG1HC) fueron transformadas con el gen *aiiA* que codifica para una lactonasa que degrada AHLs. En este estudio se demostró que la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfato de las bacterias, están influenciados por las AHLs y por lo tanto, es importante evaluar las cepas (en cultivos mixtos para el diseño de inoculantes) para confirmar que las propiedades promotoras de crecimiento se conserven. Dicho trabajo es pionero en el estudio de estos procesos, lo que evidencia que se requiere continuar investigando para explicar los mecanismos de regulación a nivel genético por parte de las AHLs.

Dávila-Lule (2007) realizó experimentos con la cepa solubilizadora de fosfato *Vibrio* sp. (LR6hc), aislada de raíces de mangle negro. Encontró que la producción de AHLs por parte de la bacteria; está relacionada con un tipo de movilidad conocida como “swarming” o desplazamiento en enjambre, observando que esta sustancia participa como biosurfactante rompiendo la tensión superficial que existe sobre determinados sitios y permitiendo la libre migración de las bacterias.

López de los Santos 2005 (resultados no publicados) detectó en la cepa sulfato reductora GAG 10¹ la producción de posibles AHLs de 6 y 8 carbonos, lo cual es relevante, ya que se tiene conocimiento que estas moléculas son mediadoras de una comunicación bacteriana intra e interespecífica (Lazdunski *et al.* 2004). La detección de las AHLs se realizó utilizando dos cepas genéticamente modificadas (*Agrobacterium tumefaciens* cepa KYC55 y *Chromobacterium violaceum* cepa CV026), que generan como respuesta la producción de color al detectar las moléculas señal.

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA) Y REGULACIÓN TIPO *QUORUM SENSING* EN RIZOBACTERIAS

Como se ha mencionado previamente en este capítulo, para minimizar el deterioro que se ha generado en las zonas de manglar, se ha recurrido al uso de estrategias de reforestación. Así, ensayos para inocular plántulas con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, de las siglas en inglés Plant-Growth Promoting Rhizobacteria) constituyen una alternativa interesante para incrementar la tasa de

supervivencia éstas y transplantarlas en su ecosistema nativo.

La utilización de PGPR en reforestación y restauración de ecosistemas, es una opción en creciente desarrollo, que se ha examinado en varias especies forestales (revisado en Lucy *et al.* 2004); sin embargo, para diseñar inoculantes cuya utilización resulte exitosa en procesos de crecimiento y supervivencia de plántulas, es necesario entender los mecanismos de acción y las interacciones, que puedan conducir a la optimización de estos procesos en el ambiente rizosférico, es decir, en el medio que se encuentra influenciado por las raíces de las plantas en el suelo.

Es muy interesante que las plantas produzcan fitohormonas como el ácido indolacético (AIA), que les permite regular procesos de elongación celular, incrementar su superficie radical y aumentar el número de pelos radicales (Barbieri y Galli 1986, Barbieri *et al.* 1993, Okon y Vanderleyden 1997, Dobbelaere *et al.* 1999). Las bacterias asociadas a raíces también producen reguladores de crecimiento que permiten un mayor desarrollo de las plantas (Glick *et al.* 1999b). Existen rizobacterias en los mangles de Balandra que producen AIA; específicamente dos bacterias (denominados 1hc y 6hc, descritos en Holguín *et al.* 2007) del género *Vibrio* podrían considerarse para ser aplicadas en raíces e investigar sus efectos en el crecimiento de plántulas de mangle. Es importante mencionar, que antes de realizar este trabajo no se había cuantificado la dinámica *in vitro* de este proceso con dichas bacterias (Holguín *et al.* 2007). Específicamente, las concentraciones de AIA en la raíz, ya sea de origen bacteriano o vegetal, deben estar muy controladas porque si sobrepasan concentraciones entre 10^{-9} M y 10^{-12} M sus efectos no son benéficos para el crecimiento de raíces primarias (Glick *et al.* 1999). Debido a esto, el grupo de microbiología del CIBNOR y como parte del convenio de investigación México - Colombia (CONACYT - COLCIENCIAS, Programa Internacionalización de la Ciencia 2004-2006), realizó un estudio encaminado a conocer la dinámica *in vitro* e *in planta* de la producción de AIA de algunos aislamientos bacterianos caracterizados en trabajos previos, cuyo potencial promotor de crecimiento era conocido (Flores-Mireles 2007, Holguín *et al.* 2007). Adicionalmente, el tema se abordó partiendo de su relación con el sistema de regulación de procesos metabólicos en bacterias, conocido como *quorum sensing*, que involucra entre otros, la producción de moléculas señal tipo Acil Homoserina Lactonas (AHLs). Para esto se utilizó el sistema experimental descrito en Villicaña (2007) y Dávila-Lule (2007), el cual utiliza células bacterianas rizosféricas (provenientes del manglar de Balandra) modificadas genéticamente para no producir AHLs. Para conocer si existía alguna relación entre ambos procesos fisiológicos, cepas del género *Vibrio* denominadas 1hc, 6hc y 6a (nativas y modificadas) se utilizaron para establecer la cinética de la producción del AIA y las diferencias causadas por la presencia o ausencia de AHLs.

Los alcances de este estudio se enfocaron en conocer la producción de AIA en rizobacterias de mangles (de Balandra y Colombia), para ser utilizadas como posibles inoculantes con fines de reforestación. Para tal efecto, se determinó si la producción de

AIA en rizobacterias, podría inducir un aumento en el crecimiento de plántulas de mangle y si este proceso sería independiente o estaría relacionado con moléculas señal tipo AHLs. La estrategia metodológica contempló la cuantificación de la acción de AHLs (de origen sintético y bacteriano) en la producción del AIA de las bacterias. Los experimentos *in planta* para determinar la capacidad de las rizobacterias como promotoras del crecimiento vegetal, están aún por realizarse.

Para cuantificar la producción de AIA se utilizaron dos técnicas bioquímicas, una colorimétrica de Salkowsky (Glickmann y Dessaux 1995) y otra cromatográfica (HPLC). Para monitorear el sistema experimental; se utilizaron técnicas de biología molecular como: extracción de DNA, PCR del gen con el que se modificaron las cepas nativas, modificación genética por conjugación y verificación de presencia de plásmidos de conjugación. En tanto que, para detectar AHLs se utilizó el método de biosensores descrito por Villicaña (2007).

Este trabajo es pionero en el área de la microbiología del suelo encaminada a la conservación de especies forestales, ya que no se han hecho investigaciones dirigidas a entender los mecanismos de promoción de crecimiento y su relación con procesos de regulación por AHLs en *quorum sensing*. Adicionalmente, estas investigaciones pueden generar un aumento en el valor agregado del manglar de Balandra, ya que se justifica su conservación y continuación de diversos estudios promisorios, dado que constituyen el origen de los aislamientos utilizados en este estudio.

APLICACIÓN EXÓGENA DE REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL

Otro de los factores más restrictivos en la reforestación de zonas deterioradas de manglar es la hipersalinización de suelos, que limita el crecimiento vegetal (Elster 2000, Álvarez-León 2003). Existen niveles de salinidad con tendencia a ser críticos para el desarrollo de los manglares (Pino-Renjifo 1998). Las especies del género *Avicennia* y en especial *A. germinans* en Colombia (Elster 2000), poseen adaptaciones que les permiten dominar en suelos de elevada concentración salina. Según Cintrón y Schaeffer-Novelli (1983) *A. germinans* se desarrolla bien con salinidades entre 60 - 65 ppm y forma bosques achaparrados en ambientes hipersalinos marginales (hasta 90 ppm); señalando que dichos valores pueden ser registrados durante época de verano en el manglar de Bahía Balandra.

Para diversas especies de mangle, existen reportes de un mayor crecimiento vegetal después de la inoculación con bacterias nativas, procedentes de estos bosques (Bashan *et al.* 2000, Holguin *et al.* 2001, Bashan y Holguin 2002, Ravikumar *et al.* 2004, Galindo *et al.* 2006). Esta respuesta podría estar asociada a la producción de diversos reguladores

de crecimiento vegetal como el ácido indolacético (AIA), cuyo principal precursor es el triptófano.

Las fitohormonas participan activamente ante condiciones extremas, incrementando la tolerancia de la planta. A mayor salinidad, especies de interés comercial elevan sus niveles de ácidos abscísico (ABA), jasmónico (AJ) y etileno; y disminuyen las concentraciones de AIA, giberélico (AG), salicílico (AS) y citoquininas (Wang *et al.* 2001, Kaur *et al.* 2003, Seo *et al.* 2005, Iqbal *et al.* 2006). Otras fitohormonas, como las poliaminas, también han sido relacionadas con procesos de estrés, aunque con menor frecuencia (Azcon-Bieto y Talón 2000).

A pesar del efecto de la salinidad sobre las plantas del manglar (Elster 2000, Suárez y Medina 2005), pocas son las investigaciones que la correlacionan con la producción de reguladores de crecimiento. Vanegas (2007) aplicó triptófano (10^{-5} M) y AIA (10^{-6} M) en plantas de *Avicennia germinans* que crecían en agua de mar (30 g L^{-1} de NaCl) bajo condiciones de invernadero. Encontró que la aplicación de triptófano estimuló la producción de peso seco de las hojas ($840\text{ mg planta}^{-1}$), en comparación a las plantas sin triptófano ($309\text{ mg planta}^{-1}$) y suplementadas con AIA ($318\text{ mg planta}^{-1}$). Con el aumento de la salinidad (680 mol m^{-3} NaCl) se ha registrado reducción en la producción de nuevas hojas de *A. germinans* y de su longevidad (Ye *et al.* 2005), al igual que disminución del área foliar (Suárez y Medina 2005) y la fotosíntesis (Parida *et al.* 2004). Los reguladores de crecimiento pueden tener efectos sobre la respuesta o adaptación de las plantas a diferentes condiciones de estrés (Seo *et al.* 2005) y la alteración de los niveles endógenos de fitohormonas en la planta, pueden estimular su crecimiento a una elevada salinidad.

La respuesta de las plantas a la salinidad encierra todo un complejo fisiológico y bioquímico que incluye una serie de cambios en las concentraciones y proporciones de fitohormonas endógenas. La reducción del estrés por salinidad puede deberse a una alteración en los niveles hormonales de la planta. La aplicación exógena de algunos reguladores de crecimiento constituye una atractiva aproximación para aliviar condiciones de estrés vegetal (Kaur *et al.* 1998); sin embargo, su aplicación está relegada por sus altos costos y actividad a baja escala. La actividad microbiana productora de diversos reguladores de crecimiento está directamente relacionada con las plantas inoculadas (Vessey 2003), lo que ha estimulado las prácticas de bioprospección de microorganismos en ecosistemas poco explorados, como los manglares.

COMENTARIOS FINALES

El uso de poli-inóculos microbianos (con efecto promotor de crecimiento vegetal) para favorecer procesos de restauración en zonas de manglares deteriorados, se perfila

como una alternativa de gran potencial. Como se ha mencionado anteriormente, los estudios realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), han revelado que al crecer bacterias en cultivos mixtos; la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y otros procesos benéficos relacionados, se magnifican en comparación con aquéllos de cultivos puros individuales (Holguin *et al.* 2001, Holguin *et al.* 2007).

Las investigaciones realizadas en el manglar de la laguna de Balandra, han aportado información valiosa acerca de la relación estrecha que existe entre los microorganismos y las especies de mangle que habitan la región. El comprender el funcionamiento de las complejas interacciones entre las comunidades bacterianas y los mangles, es prioritario para desarrollar estrategias de conservación de estos ecosistemas ecológica y económicamente importantes.

AGRADECIMIENTOS

El presente escrito está dedicado a la memoria de la Dra. Gina Holguin Zehfuss quien trabajó con pasión y dedicación en la investigación y preservación de los manglares y a quien siempre llevaremos en nuestro corazón. Agradecemos especialmente a Gina Holguin por haber obtenido apoyo de cooperación bilateral México - Colombia y al financiamiento otorgado por la Universidad Nacional de Colombia, COLCIENCIAS, CONACYT y CIBNOR. Javier Vanegas agradece especialmente al Dr. M. Bacilio por el financiamiento parcial y el aporte logístico en el desarrollo experimental de su estudio. Agradecemos la participación de Ira Fogel y Diana L. Dorantes en la traducción al inglés del resumen.

LITERATURA CITADA

- Alexander M (1980) Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, S A, Mexico.
- Alongi DM (1988) Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microb Ecol* 15:59-79.
- Álvarez-León R (2003) Los manglares de Colombia y la recuperación de sus áreas degradadas: revisión bibliográfica y nuevas experiencias. *Madera y Bosques* 9:3-25.
- Azcon-Bieto J, Talón M (2000) Auxinas. En: Acosta Echeverría M, Sánchez Bravo J, Bañin Arnao M (eds) *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill, Madrid, p 305-323.
- 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.
- Barbieri P, Zanelli T, Galli E, Zanetti G (1986) Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol Lett* 36:87-90.

- Bashan Y, Holguin G (2002) Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Tree* 16:159-166.
- Bashan Y, Moreno M, Troyo E. (2000) Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with the mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. *Biol Fertil Soils* 32:265-272.
- Bashan Y, Puente ME, Myrold D.D, Toledo G (1998) In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. *FEMS Microbiol Ecol* 26:165-170.
- Battersby NS (1988) Sulfate-reducing bacteria. En: Austin B (ed) *Methods in aquatic Bacteriology*. John Wiley y Sons Ltd, New York, p 269-294.
- Castro-González M, Braker G, Farias L, Ulloa O (2005) Communities of nirS-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environ Microbiol* 7(9):1298-1306.
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:1119-1129.
- Chiu ChY, Lee Sch, Chen TH, Tian G (2004) Denitrification associated N loss in mangrove soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 69(3):185-189.
- Cintrón G, Schaeffer-Novelli Y (1983) Introducción a la ecología del manglar. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe - ROSTLAC, Montevideo, Uruguay, p 109.
- Craven PA, Hayasaka SS (1982) Inorganic phosphate solubilization by rhizosphere bacteria in a *Zostera marina* community. *Can J Microbiol* 28:605-610.
- Dávila-Lule A (2007) Participación de moléculas señal acil homoserina lactonas en la movilidad “swarming” producido por *Vibrio* spp. aislada de la rizósfera del mangle negro *Avicennia germinans*. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México.
- 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.
- Dunny GM, Winans SC (1999) Bacterial life: neither lonely nor boring. En: Dunny GM, Winans SC (eds) *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. ASM Press, Washington DC, p 1-5.
- Ehrlich HL (1990) *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, New York.
- Elster C (2000) Reasons for reforestation success and failure with three mangrove species in Colombia. *Forest Ecology and Management* 131:201-214.
- Flores-Mireles AL, Winans SC, Holguin G (2007) Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. *Appl Environ Microbiol* 73(22):7308-7321.
- Galindo T, Polanía J, Sánchez J, Moreno N, Vanegas J, Holguin G (2006) Efecto de inoculantes microbianos sobre la promoción de crecimiento de plántulas de mangle y plantas de *Citrullus vulgaris* San Andrés Isla, Colombia. *Acta Biológica* 11:83-93.
- Ghiglione JF, Gourbiere F, Potier P, Philippot L, Lensi R (2000) Role of respiratory nitrate reductase in ability of *Pseudomonas fluorescens* YT101 to colonize the rhizosphere of maize. *Appl Environ Microbiol* 4012-4016.

- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM (1999a) Nitrogen fixation. En: Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM (eds) Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria Imperial College Press, London UK, p 14-44.
- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM (1999b) Auxin production. En: Glick BR, Patten CL, Holguin G y Penrose DM (eds) Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London UK, p 86-133.
- Glickmann E, Dessaux Y (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *App Environ Microbiol* 61:793-796.
- Gonzalez-Acosta B, Bashan Y, Hernandez-Saavedra NY, Ascencio F, De la Cruz-Agüero G (2005) Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. *FEMS Microbiol Ecol* 55:311-321.
- Holguin G, Bashan Y (1996) Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium *Staphylococcus* sp. *Soil Biol Biochem* 28:1651-1660.
- Holguin G, Bashan Y, Mendoza-Salgado RA, Amador E, Toledo G, Vazquez P, Amador A (1999) La microbiología de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. *Ciencia y Desarrollo* 144:26-35.
- Holguin G, Davila-Lule A, Flores-Mireles AL, Villicaña C, Geraldo N (2006) Acyl homoserine lactone-producing bacteria from mangrove roots with plant-growth promoting properties. *Microbiol* (sometido).
- Holguin G, Flores A, Eberhard A, Winans S, Dávila-Lule A, Villicaña C, Geraldo N, Bacilio M, López de los Santos Y, Ruiz M (2007) Microbiología de manglar y técnicas moleculares para su estudio. En: Sánchez J (ed) Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, p 94-103.
- Holguin G, González-Zamorano P, de-Bashan LE, Mendoza R, Amador E, Bashan Y (2006) Mangrove health in an arid environment encroached by urban development-a case study. *Science of the Total Environment* 363:260-274.
- Holguin G, Guzman MA, Bashan Y (1992) Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees, isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology* 101:207-216.
- Holguin G, Vazquez P, Bashan Y (2001) The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol Fertil Soils* 33:265-278.
- Iqbal M, Ashraf M, Jamil A (2006) Seed enhancement with cytokinins: changes in growth and grain yield in salt stressed wheat plants. *Plant Growth Regulation* 50:29-39.
- Jensen P, Gontang E, Mafnas C, Micer T, Fenical W (2005) Culturable marine actinomycetes diversity from tropical pacific ocean sediments. *Environ Microbiol* 7 (7):1039 -1048.
- Jørgensen BB (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed – the role of sulphate reduction. *Nature* 296:643-645.
- Kaur S, Gupta AK, Kaur N (1998) Gibberellin A3 reverses the effect of salt stress in chickpea (*Cicer arietinum* L) seedlings by enhancing amylase activity and mobilization of starch in cotyledons. *Plant Growth Regulation* 26:85-90.

- Kaur S, Gupta AK, Kaur N (2003) Indole acetic acid mimics the effect of salt stress in relation to enzymes of carbohydrate metabolism in chickpea seedlings. *Plant Growth Regulation* 39:91-98.
- Kathiresan K, Selvam MM (2006) Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil *Botanica Marina* 49:86-88.
- Keller L, Surette MG (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 4:249-258.
- Kristensen E, Holmer M, Bussarawit N (1991) Benthic metabolism and sulfate reduction in a south-east Asian mangrove swamp. *Mar Ecol Prog Ser* 73:93-103.
- Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN (2004) Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. *Nature* 2:581-592.
- Lucy M, Reed E, Glick B (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86:1-25.
- Miller TL, Wolin MJ (1974) A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27:985-987.
- Okon Y, Vanderleyden J (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *A. Soc Microbio News* 63:366-370.
- Palaniselvam V, Kathiresan K (1998) Potential of a marine cyanobacterium, *Phormidium tenue* (Menegh) Gomont as a shrimp feed supplement. *Seaweed Res Utiln* 20(1 y 2):75-78.
- Parida AK, Das AB, Mittra B (2004) Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees* 18:167-174.
- Pierson LS, Wood DW, Beck von Bodman S (1999) Quorum sensing in plant-associated bacteria. En: Dunny GM, Winans SC (eds) *Cell-cell signaling in bacteria*. ASM Press, Washington DC, p 101-115.
- Pino-Renjifo JC (1998) Monitoreo en aguas de los manglares del Caribe continental colombiano. *Proy. PD 171/91 Rev. 2 Fase II (Etapa I) Conservación y Manejo para el Uso Múltiple y el Desarrollo de los Manglares de Colombia, MINAMBIENTE/ ACOFORE/OIMT. Inf. Técnico* 26, Santa Fe de Bogotá DC, Colombia. Colombia, p1-98.
- Postgate JR (1979) *The sulfate-reducing bacteria*. Cambridge University Press. Inglaterra.
- Priemé A, Braker G, Tiedje JM (2002) Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl Environ Microbiol* 68 (4):1893-1900.
- Puente ME, Holguin G, Glick BR, Bashan Y (1999) Root surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferans* and *A. brasilense* in seawater. *FEMS Microbiol Ecol* 29:283-292.
- Ravikumar S, Kathiresan K, Thadedus S, Babu M., Shanthi S (2004) Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. *J Exp Mar Biol Ecol* 312:5-17.
- Rivera-Monroy VH, Twilley RR (1996) The relative role of denitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Terminos Lagoon, Mexico). *Limnol Oceanogr* 41(2):284-296.
- Rojas A, G Holguin, BR Glick, Bashan Y (2001) Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from semiarid mangroves rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol*. 35:181-187.

- Ruiz M (2007) Detección de tetraciclinas en rizósfera de *Avicennia germinans* por medio de extracción de fase sólida y la cepa biosensora *Escherichia coli* sptGFP2. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, BCS, México.
- Sengupta A, Chaudhuri S (1991) Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at Ganges river estuary in India. *Oecologia* 87:560-564.
- Seo HS, Kim SK, Jang SW, Choo YS, Sohn EY, Lee IJ (2005) Effect of jasmonic acid on endogenous gibberellins and abscisic acid in rice under NaCl stress. *Biologia Plantarum* 49: 447-450.
- Seralathan P, Rajkumar MS, Sunilkumar V, Anandaraj N (2006) Interstitial water chemistry of mangrove sediments, Kerala. *Journal of the Geological Society of India* 68(2):251-258.
- Shieh WY, Yang JT (1997) Denitrification in the rhizosphere of the two seagrasses *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers and *Halodule uninervis* (Forsk.) Aschers. *J Exp Mar Biol Ecol* 218:229-241.
- Song B, Ward BB (2003) Nitrite reductase genes in halobenzoate degrading denitrifying bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 349-357.
- Sosa-Rodríguez T, Sánchez-Nieves J, Melgarejo Muñoz LM (2007) Papel funcional de los hongos en ecosistemas de manglar Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras (sometido).
- Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537-547.
- Suárez N, Medina E (2005) Salinity effect on plant growth and leaf demography of the mangrove, *Avicennia germinans* L. *Trees* 19:721-727.
- Tokala R, Strap J, Jung C, Crawford D, Salove M, Deobald L, Bailey J, Morra M (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and pea plant (*Pisum sativum*) *Appl Environ Microbiol* 68(5):2167-2171.
- Toledo G, Bashan Y, Soeldner A (1995a) Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. *Can J Microbiol* 41:999-1011.
- Toledo G, Bashan Y, Soeldner A (1995b) *In vitro* colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. *Can J Microbiol* 41:1012-1020.
- Thomashow L, Bonsall R, Weller D (1997) Antibiotic Production by soil and rhizosphere Microbes *in situ*. En: Hurst C, Knudson G, McInerney M, Setzenbach L, Walter M (eds) *Manual of Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, p 493-499.
- Vanegas J (2007) Mitigación del estrés salino en plántulas de *Avicennia germinans* y *Capsicum annuum* por bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Vessey J (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586.
- Vazquez P (1996) Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos asociadas a la rizosfera de los mangles: *Avicennia germinans* (L.) L y *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, BCS, México.

- Vazquez P, Holguin G, Puente ME, Lopez-Cortes A, Bashan Y (2000) Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of semiarid mangroves. *Biol Fertil Soils* 30:460-468.
- Villicaña C (2007) Efecto de las acilo homoserina lactonas en la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato inorgánico en bacterias aisladas de la rizósfera de los mangles *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México.
- Wang Y, Mopper S, Hasenstein KH (2001) Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *Journal of Chemical Ecology* 27:327-342.
- Weller D, Raaijmakers J, Mc Spadden B, Thomashow L (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 40:309 -348.
- Wolsing M, Priemé A (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. *FEMS Microbiol Ecol* 48(2004) 261-271.
- Ye Y, Tam NF, CY Lu, Wong YS (2005) Effects of salinity on germination, seedling growth and physiology of three salt-secreting mangrove species. *Aquatic Botany* 83(3):193-205.
- Young JPW (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: Stacey G, Evans HJ, Burris RH (eds) *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall, New York, p 43-86.
- Yuan WM, Crawford DL (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl Environ Microbiol* 61(8)3119-3128.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* 5(7):539-554.
- Zuberer D, Silver WS (1978) Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves. *Appl Environ Microbiol* 35:567-575.
- Zumft WT (1992) The denitrifying prokaryotes. En: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer-Verlag, New York, p 554-582.