

ECOSISTEMAS MARINOS - COSTEROS

Proyecto: APROVECHAMIENTO DE LOS ECOSISTEMAS MARINOS COSTEROS COMO UNA ALTERNATIVA PARA AUMENTAR TOLERANCIA A LA SEQUÍA Y A LA SALINIDAD DEL SUELO EN LAS PLANTAS DE INTERÉS AGRÍCOLA Y DE LOS BOSQUES DE MANGLAR EN LOS DEPARTAMENTOS DE ATLÁNTICO, CESAR, MAGDALENA. **BPIN:** 2022000100074

Informe Técnico

AGOSTO 2023

Actividad 1.1.1 Obtener microorganismos endófitos de manglar con capacidad de promoción de crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino e hídrico.

Entidad ejecutora:



Financia:



Entidades aliadas:



1. IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO

- **Nombre del proyecto:** APROVECHAMIENTO DE LOS ECOSISTEMAS MARINOS COSTEROS COMO UNA ALTERNATIVA PARA AUMENTAR TOLERANCIA A LA SEQUÍA Y A LA SALINIDAD DEL SUELO EN LAS PLANTAS DE INTERÉS AGRÍCOLA Y DE LOS BOSQUES DE MANGLAR EN LOS DEPARTAMENTOS DE ATLÁNTICO, CESAR, MAGDALENA.

Código BPIN: 2022000100074

- **Nombre de la entidad proponente y demás entidades**
 - **Nombre entidad proponente:** Universidad Simón Bolívar
 - **Nombre de la entidad aliada No. 1:** Universidad del Magdalena
 - **Nombre de la entidad aliada No. 2:** Universidad Popular del Cesar
 - **Nombre de la entidad aliada No. 3:** Servialimentos del Noroccidente
 - **Nombre de la entidad aliada No. 4:** Bananera El Rubí S.A.S
 - **Nombre de la entidad aliada No. 5:** Cooperativa de productores y comercializadores de productos agrícolas del Sur del Atlántico.
 - **Nombre de la entidad aliada No. 6:** Establecimiento Público Ambiental Barranquilla Verde

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Aumentar el aprovechamiento de los ecosistemas marino-costeros, orientado al mejoramiento de la tolerancia a la sequía y a la salinidad del suelo de las plantas de interés agrícola y de los bosques de manglar.

Objetivos Específicos

- Ampliar aplicación de conocimiento científico- tecnológico en el desarrollo de tecnologías basadas en microorganismos endófitos de manglar.
- Fortalecer la capacidad instalada científico-tecnológica orientada al capital natural de la región Caribe.
- Desarrollar procesos de empaquetamiento, transferencia y comercialización de la tecnología diseñada.

3. ACTIVIDADES

Objetivo específico	Producto	Actividad	Mes	
			Inicio	Final
OE1: Ampliar aplicación de conocimiento científico-tecnológico en el desarrollo de tecnologías basadas en microorganismos endófitos de manglar.	Artículos de investigación	1.1.1 Obtener microorganismos endófitos de manglar con capacidad de promoción de crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino e hídrico	1	4
		1.1.2 Participar en entrenamiento especializado en bioprospección Marina	3	6
	Servicio de apoyo para la generación de prototipos de materiales, productos o dispositivos derivados del desarrollo experimental	1.2.1 Demostrar la factibilidad técnica de las bacterias encapsuladas en hidrogeles superabsorbentes.	5	8
		1.2.2 Desarrollar prototipo de la tecnología basada en bacterias endófitas de manglar e hidrogeles superabsorbentes a nivel de laboratorio y en un entorno controlado.	9	11
		1.2.3 Validar la tecnología basada en bacterias endófitas de manglar e hidrogeles superabsorbentes en un entorno real.	12	21
		1.2.4 Realizar la administración del proyecto	1	24
		1.2.5 Realizar seguimiento y supervisión del proyecto	1	24
OB2: Fortalecer la capacidad instalada científico-tecnológica	Infraestructura para la investigación	2.1.1 Dotar con equipos científico-tecnológicos laboratorios de investigación orientados a los ecosistemas	3	6

orientada al capital natural de la región Caribe.	dotada	marino-costeros y a los sistemas agrícolas.		
		2.1.2 Monitorear las características fisicoquímicas de suelos agrícolas y bosques de manglar.	6	24
		2.1.3 Desarrollar modelos predictivos sobre los efectos adversos del cambio climático en los ecosistemas marino - costeros y en los sistemas agrícolas.	6	24
		2.1.4 Realizar la administración del proyecto.	1	24
		2.1.5 Realizar seguimiento y supervisión del proyecto	1	24
3. Desarrollar procesos de empaquetamiento, transferencia y comercialización de la tecnología diseñada.	Documentos de lineamientos técnicos.	3.1.1 Desarrollar acciones para la apropiación de la tecnología por parte de los usuarios en instituciones del sector agrícola.	12	24
		3.1.2 Realizar un estudio de exploración del mercado y del desarrollo comercial de tecnologías.	10	24
		3.1.3 Desarrollar estrategias de escalabilidad, aplicabilidad y replicabilidad de las tecnologías desarrolladas.	17	24
		3.1.4 Realizar la administración del proyecto	1	24
		3.1.5 Realizar seguimiento y supervisión del proyecto.	1	24

4. DESARROLLO

4.1 ACTIVIDAD 1.1.1

Actividad 1.1.1 Obtener microorganismos endófitos de manglar con capacidad de promoción de crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino e hídrico.

4.1.1 Detalle del cumplimiento de la actividad

ACTIVIDAD	PRODUCTO	MEDIO DE VERIFICACIÓN	FECHA	% DE AVANCE
Obtener microorganismos endófitos de manglar con capacidad de promoción de crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino e hídrico.	Artículos de investigación Medido a través de: Número de artículos Cantidad: 1	Documento de artículo postulado	2/05/2023 a 31/08/2023	1,46%

Fuente: elaboración propia

4.1.1 Detalles del cumplimiento de las tareas

TAREA	ENTREGABLE	MEDIO DE VERIFICACIÓN	FECHA	% DE AVANCE
Aislamiento de bacterias endófitas de Avicennia germinans	Informe de recolección, procesamiento y tratamiento de muestras en ecosistemas de manglar.	Informe de Laboratorio con los resultados del proceso de aislamiento de bacterias endófitas de Avicennia germinans	2/05/2023 a 30/06/2023	0,50%
Evaluación de actividad de promoción de crecimiento vegetal y tolerancia a salinidad	Documento del proceso de evaluación de actividad de promoción de crecimiento vegetal y	Informe de Laboratorio con los resultados de la evaluación de promoción de actividad de crecimiento	1/06/2023 a 31/07/2023	0,40%

	tolerancia a salinidad	vegetal y a salinidad		
Ensayo de antagonismo y producción de AIA de las cepas aisladas	Informe de resultados de ensayo de antagonismo y proceso de producción de AIA de las cepas aisladas	Informe de Laboratorio con los resultados del ensayo de antagonismo y proceso de producción de AIA de las cepas aisladas.	1/07/2023 a 31/08/2023	0,56%

Fuente: elaboración propia

4.2 METODOLOGÍA

Las acciones desarrolladas en esta actividad corresponden a las 3 tareas de la actividad 1.1.1 y la metodología empleada se describe a continuación:

4.2.1 Aislamiento de bacterias endófitas de *Avicennia germinans*

Procedimiento

Se tomarán muestras de diferentes tejidos (hojas, flores, raíces, tallos, neumatóforos, propágulos) de plantas adultas de *Avicennia germinans*, sin signos de enfermedad. Dichos tejidos serán trasladados, en condiciones de refrigeración, al laboratorio de microbiología donde serán procesados. Los segmentos de los tejidos muestreados serán limpiados superficialmente mediante un lavado a fondo con agua de grifo para eliminar el suelo adherido y otras partículas no deseadas. Posteriormente se lavarán con etanol al 80% por 2 minutos para el caso de hojas y flores, 3 minutos en tallos y propágulos, y 4 minutos para raíces profundas y neumatóforos, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio al 4% por 4 minutos, finalizando con 8 lavados sucesivos con agua estéril. Las alícuotas del agua del lavado se cultivarán en el medio de cultivo OGYE y PDA e incubadas por 72 h a 25°C para el caso de las bacterias y PDA para el caso de los hongos por 5 días a 25°C, con el fin de confirmar el proceso de esterilización. Posteriormente con una hoja de bisturí estéril se eliminará la corteza del tallo, raíces, propágulos y neumatóforos y los segmentos de tejido interno serán macerados en un mortero estéril que contenía 3 mL de solución salina 0.9% estéril. En el caso de las hojas y flores estas serán maceradas directamente bajo las mismas condiciones. El líquido obtenido del macerado será cultivado en agar OGYE y PDA e incubados por 72 h y 5 días a 25°C, respectivamente.

Acciones Desarrolladas

Selección de puntos de muestreo

De acuerdo con la selección de las zonas y puntos de muestreo se realizó la revisión de las condiciones que permitan adelantar adecuadamente la toma de las muestras y realizar la escogencia

de estas las plantas de manglar. Dichos sitios fueron identificados utilizando Google earth Pro teniendo en cuenta la presencia de manglares de la especie *A. germinans* y estrés salino por falta de aportes de agua dulce. Para la definición de los puntos de muestreo, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: (a) Salinidad en el nivel freático superior a 60 ppm, (b) Presencia de plantas de *Avicennia germinans* en buen estado que presentes flores, propágulos y neumatóforos, (c) La superficie del suelo no debe presentar inundación durante el periodo seco. Los sitios seleccionados fueron: La Nueva Barra de La Ciénaga de Mallorquín, Puerto Caimán y Galerazamba que cumplen con los criterios establecidos. En ese contexto, los criterios de los ecosistemas de manglar donde se dan las condiciones ambientales para encontrar microorganismos endófitos extremófilos estarían ubicados básicamente en los siguientes sitios: a) las flechas litorales, b) las lagunas costeras con áreas hipersalinas y c) las planicies donde se forman salares por evapotranspiración. En el departamento del Magdalena se identificaron zonas que cumplieran con las características comentadas anteriormente los cuales fueron los siguientes: Sierra Laguna, Cabo Tortuga, Pueblo Viejo, Km19 vía a Barranquilla y la Ciénaga del Chino.

Desarrollo de salidas de campo

Atlántico

Se visitó La Nueva Barra de Mallorquín, Puerto Caimán y Galerazamba ubicados en el departamento del Atlántico, vía al mar. Se tomaron muestras de tejido vegetal de *Avicennia germinans* con la ayuda de tijeras de jardinería, bolsas con cierre hermético, guantes de nitrilo y alcohol. Asimismo, se midió el tamaño de la planta a través de una cinta métrica y con la ayuda de una pala se realizó un agujero cerca de la planta de mangle con el objetivo de determinar el nivel freático que se presentaba y se midió la salinidad del agua freática. Una vez obtenidas las muestras, estas fueron rotuladas con un marcador permanente punta fina y se almacenaron en una cava de poliestireno expandido que contaba con geles refrigerantes previamente congelados. Cabe mencionar que se determinó la ubicación exacta de la planta a través de un GPS. Se realizó un muestreo de propágulos en Puerto Caimán y Galerazamba, las plantas adultas de *Avicennia germinans* ubicadas en estas 2 zonas fueron monitoreadas para establecer la presencia de propágulos. Los propágulos encontrados fueron almacenados en bolsas ziploc y transportados al laboratorio para el aislamiento de los microorganismos endófitos.

Magdalena

Una vez establecido el punto de muestreo que fue playa cabo tortuga y sierra Laguna, se realizó la georreferenciación del lugar y fue seleccionado el ejemplar vegetal a estudiar y muestrear, en este caso, el manglar cuyo nombre científico corresponde a *Avicennia germinans*, posteriormente se inició con el procedimiento de toma de muestra. Posteriormente se realizó un estudio utilizando sistemas de información geográfica y se establecieron nuevos sitios de muestreo en el departamento del Magdalena. Se realizó el muestreo en el kilómetro 19 vía Barranquilla y en Pueblo Viejo, iniciando con una georreferenciación del lugar y seleccionando el ejemplar de *Avicennia germinans* en cada sitio de muestreo y se tomaron muestras de las siguientes estructuras del espécimen: neumatóforos, propágulos, hojas, tallos, raíces, plántulas y flores. Además, se midieron parámetros tales como tamaño de la planta, nivel freático, salinidad de agua freática, pH, humedad y conductividad eléctrica del suelo. Posteriormente las muestras de las plantas fueron conservadas en una cava con geles de

refrigeración y posteriormente enviadas a la Universidad Popular del Cesar para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos. Posteriormente se tomaron muestras en la Ciénaga del Chino iniciando con una georreferenciación del lugar y seleccionando el ejemplares de *Avicennia germinans* en cada sitio de muestreo y se tomaron muestras de las siguientes estructuras del espécimen: neumatóforos, propágulos, hojas, tallos, raíces, plántulas y flores. Además, se midieron parámetros tales como tamaño de la planta, nivel freático, salinidad de agua freática, pH, humedad y conductividad eléctrica del suelo. Posteriormente las muestras de las plantas fueron conservadas en una cava con geles de refrigeración y posteriormente enviadas a la Universidad Popular del Cesar y la Universidad Simón Bolívar.

Ensayos en laboratorio

Atlántico

Se inició con el lavado superficial exhaustivo con agua de grifo en todas las muestras tomadas para eliminar cualquier residuo adherido en el material vegetal; para posteriormente dejar secar en una bandeja con papel absorbente.

Continuamente se procedió a realizar el proceso de desinfección, iniciando con etanol al 80% por un minuto en hojas y flores, dos minutos para tallos y propágulos y tres minutos en raíces profundas y neumatóforos. Luego se utilizó el hipoclorito de sodio al 4% en un lapso de 4 minutos para todas las muestras; a continuación, se realizó de 8 a 10 lavados con agua destilada esteril, tomando el último lavado como control negativo, al ubicarla en cajas de Petri previamente rotuladas con el código específico para cada muestra y el medio que será vertido posterior a la inoculación, siendo este PDA y OGYE. Una vez obtenido el control, se dejan secar las muestras dentro del mortero esteril ubicada en la cabina de flujo laminar, luego con la ayuda de un bisturí esteril se elimina la corteza del tallo, raíz, propágulos y neumatóforos, mientras que en flores y hojas solo se fracturan en pedazos más pequeños. Se realizó proceso de macerado en el mortero tras añadir 3 ml de solución salina al 0.9% esteril.

Posteriormente, se tomó 1 ml del líquido obtenido tras el proceso anterior, y se inocularon en cajas de Petri rotuladas y luego se añadió el medio de cultivo específico, ya que se realizó una siembra a profundidad. Tanto las cajas control como las que contaban con la muestra fueron incubadas a 37°C por 72 horas. Al pasar el tiempo, se revisaron las cajas incubadas para evidenciar la presencia o ausencia de colonias.

Las muestras de las Ciénaga del Chino analizadas en la Universidad Simón Bolívar fueron de hojas y propágulos de *A. germinans*, se realizó en mismo procedimiento anteriormente explicado.

Cesar

Para el aislamiento, inicialmente en cada muestra se realizó un lavado superficial exhaustivo con agua de grifo para eliminar el suelo adherido y otras partículas no deseadas. posteriormente, se llevó a cabo la desinfección de la superficie utilizando alcohol al 80% por un lapso de tiempo de 1 min para hojas y flores, 2 min para tallos y propágulos, y 3 min para raíces profundas y neumatóforos; luego, se

continuó el lavado con hipoclorito de sodio al 4% por goteo durante 4 min. Seguido se procedió a realizar 8 lavados sucesivos con agua destilada estéril para retirar el hipoclorito de sodio residual, en cada muestra las alícuotas del agua del último paso de lavado se utilizó como control negativo y se cultivó en agar OGY y PDA para cada muestra. Después, se secaron las muestras al aire dentro de la cabina de flujo laminar, una vez sacadas, con ayuda de la hoja de bisturí estéril se eliminó la corteza del tallo, la raíz y propágulos y posteriormente se maceró, los segmentos de tejido interno de cada muestra de manera independiente con ayuda de un mortero estéril con 3 ml de solución salina al 0,9% estéril. Las hojas se maceraron bajo las mismas condiciones. Por último, se tomó 1 ml del líquido macerado de cada muestra y se sembró masivamente en agar OGY y agar PDA y se llevó a incubar 30°C durante 5 días. Pasado el tiempo de incubación, se realizó observación macroscópica y una descripción de cada colonia obtenida en los medios de cultivo y sus respectivos controles.

4.2.2 Evaluación de promoción de crecimiento vegetal y tolerancia a salinidad

Procedimiento

a) *Curva de tolerancia al cloruro de sodio: las bacterias aisladas serán cultivadas en medio Luria Bertani (LB) con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0%, 2%, 4%, 8%, 10%, 12%, 14%, 18%, 20%) con el objetivo de seleccionar las bacterias que más toleran dicha sal.*

b) Identificación de las bacterias tolerantes a cloruro de sodio: las bacterias que toleren altas concentraciones de cloruro de sodio serán caracterizadas macro (tipo de colonia) y microscópicamente (tinción de Gram). Para la identificación taxonómica de las bacterias se amplificará una región del gen que codifica para la subunidad pequeña (16S) del ARNr y será secuenciada para determinar género y especie.

c) Actividad proteolítica: la actividad proteolítica será determinada mediante el cultivo de las cepas bacterianas en medio suplementado con leche desnatada. El medio de cultivo tendrá la siguiente composición (g/L): triptona 5, extracto de levadura 2.5, glucosa 1, NaCl 2.5, agar 18, pH 7.0. Posterior a la esterilización se adicionará 100 mL de leche desnatada. La presencia de halos transparentes alrededor de las colonias después de 72 h de incubación a 25°C serán considerados como positivos.

Las bacterias aisladas serán cultivadas en medio BHI con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0%, 3.5%, 5%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%) con el objetivo de seleccionar las bacterias que más toleran dicha sal.

Acciones Desarrolladas

La tolerancia a NaCl se realizó teniendo en cuenta el protocolo para la curva de tolerancia al NaCl. Se preparó el caldo infusión cerebro corazón (BHI) y agar papa dextrosa (PDA) y se ajustaron las concentraciones de NaCl: 0%, 3.5%, 5.0%, 7.5%, 8.0 %, 8.5%, 9.0%, 9.5%, 10%, 12% y 15% posteriormente los medios de cultivo fueron esterilizados. Los medios de cultivos con las diferentes concentraciones de NaCl con las diferentes concentraciones de NaCl fueron inoculados con el aislado bacteriano (BHI) y fúngico (PDA). Los medios de cultivo fueron incubados durante 72 horas y 7 días a

temperatura ambiente para bacterias y hongos, respectivamente. La presencia de turbidez y el porcentaje de crecimiento micelial en cada una de las concentraciones de NaCl fue tomada en cuenta para establecer la tolerancia del microorganismo evaluado a dicha sal.

La conservación de las cepas bacterianas y fúngicas que presentaron tolerancia al NaCl se realizó para el caso de las bacterias cultivando a estas en caldo Luria Bertani durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron 700 microlitros del medio de cultivo y se adicionaron a un tubo eppendorf que contenía 300 microlitros de glicerol, el tubo eppendorf se llevó al vortex y se almacenó a -80 °C. En el caso de los hongos, taquitos con crecimiento micelial de 7 días de incubación fueron depositados en tubos eppendorf que contenían agua destilada estéril y fueron almacenados a 4 °C.

4.2.3 Ensayo de antagonismo y producción de AIA de las cepas aisladas

Procedimiento

Con cada una de las cepas aisladas se evaluará su capacidad de antagonismo con el fin de seleccionar las que no poseen esta actividad. La bacteria será cultivada en agar tripticasa de soya e incubada a 25°C/48 h, posterior a este periodo de incubación se inoculará de manera perpendicular otra de las cepas bacterianas y se incubará por 48h para observar si hay o no actividad antagónica entre las cepas.

La producción de AIA por las cepas bacterianas aisladas serán medidas utilizando el reactivo (12 g of FeCl₃ por litro en 7.9 M H₂SO₄). Las cepas serán cultivadas en el medio King B y se incubarán a 25°C por 48 h en agitación a 180 rpm. Posteriormente, a las 48 h, el medio será centrifugado a 6.000 rpm, durante 5 min, y 1 mL del sobrenadante será mezclado con 1 mL del reactivo e incubado por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y finalmente la absorbancia será medida a 530 nm en espectrómetro. Con el fin de hallar la concentración de ácido indolacético de las muestras a partir de su absorbancia, se construirá una recta patrón, utilizando ácido indolacético 98% (ALDRICH, Chemistry). Para ello, se tomarán concentraciones conocidas de ácido indolacético (0-150 µg.mL⁻¹), se mezclarán con el reactivo y se medirán sus absorbancias. Con estos datos será construida una recta de calibrado mediante la cual se calcularon las concentraciones de las muestras.

En este sentido, las cepas de fitopatógenos serán reactivadas cultivándolas en medio agar papa dextrosa e incubándolas a 25 °C por 7 días. Posteriormente las cepas serán conservadas en agua destilada estéril a 4°C.

Acciones Desarrolladas

La reactivación de los hongos fitopatógenos que serán usados en los ensayos de antagonismo se llevó a cabo mediante el cultivo de las cepas de *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. y *Botrytis cinerea* en PDA. Las placas de Petri fueron incubadas a temperatura de 25°C durante 7 días. Las cepas posteriormente fueron conservadas a 4 °C en agua destilada estéril para posteriores ensayos.

5. RESULTADOS

El 24 de mayo se visitó el sitio Puerto Caimán ubicado en el departamento del Atlántico, en el municipio de Tubará entre las 7:00 AM - 12:00 PM, donde de la primera planta ubicada en las coordenadas 10,763 - 75,260 se tomaron muestras de hojas, tallos, raíces, flores, neumatóforos, suelo y agua. La planta tuvo una altura de 33,5 cm y con un nivel freático de 53 cm, además de determinar una salinidad de 85 ppt. La segunda planta se encontraba ubicada en las coordenadas 10,763 - 75,261. Tenía un nivel freático de 48 cm y salinidad de 41,5 ppt, además de mostrar una altura de 41,5 cm. Finalmente, la tercera planta estaba ubicada en las coordenadas 10,763- 75,259, su altura fue de 2.10 metros, el nivel freático de 36 cm y la salinidad de 45 ppt.

El 5 de junio se visitó el sitio Galerazamba ubicado en el municipio de Santa Catalina, entre las 7:00 AM - 12:00 PM donde de la primera planta ubicada en las coordenadas 10°45'47.2"N75°15'33,7"W se tomaron muestras de hojas, tallo, raíz, neumatóforos, suelo y agua. La planta contaba con una altura de 38 cm y con un nivel freático de 37 cm, además de determinar una salinidad de 89 ppt. La segunda planta ubicada en las coordenadas 10°45'44.2"N75°15' 33,0 "W, poseía un nivel freático de 25 cm y salinidad de 98 ppt y una altura de 97 cm. La tercera planta estaba ubicada en las coordenadas 10°45'48.6"N75°15' 37,7 "W, tenía una altura de 64 cm, un nivel freático de 21 cm y una salinidad de 80 ppt.

El 16 de junio se tomaron muestras de propágulos de plantas ubicadas en Puerto Caimán y Galerazamba. En Puerto Caimán se obtuvieron propágulos procedentes de cuatro plantas de manglar ubicadas en las coordenadas 10.763-75.260, 10.763- 75.261, 10.763-75.259 y 10.764-75.265. La primera planta tenía una altura de 2,10 metros y una salinidad del agua freática de 60 ppt, la segunda planta por su parte presentó una altura de 1,75 metros y salinidad de 60 ppt, la tercera tenía una altura de 98 cm y salinidad de 60 ppt y la cuarta planta presentaba una altura de 1,02 metros y salinidad de 60 ppt. Por su parte, en Galerazamba no se observaron propágulos en la zona de muestreo.

Durante aislamiento de microorganismos endófitos de Puerto Caimán se evidenció la ausencia de crecimiento microbiano en las cajas de control, indicando el buen procedimiento del proceso de limpieza y desinfección. Se evidenció que el mayor número de microorganismos aislados procedían de las hojas (9 colonias bacterianas y 7 fúngicas). Sin embargo, solo se observó crecimiento de una sola colonia bacteriana en la muestra de neumatóforos de la planta 3, siendo el tejido de la planta que menos aislados obtuvo. Es importante destacar que la gran mayoría de los aislados de las plantas de Puerto Caimán se encuentran en el grupo de los organismos fúngicos (20 colonias), evidenciando la prevalencia de estos en la microbiota endófito de *Avicennia germinans*, en comparación a las bacterias, de las cuales solo se logró obtener un total de 13 colonias.

Mediante la curva de tolerancia a NaCl de los microorganismos aislados de plantas muestreadas en la nueva barra de Mallorquín, se pudo determinar cómo los aislados procedentes de las hojas de los tres puntos muestreados son aquellos que contaron con mayor tolerancia a condiciones de mayor concentración de NaCl, siendo este un número de 8 colonias distribuidas entre hongos y bacterias; en cambio, en las muestras de flores, tallos (1 aislado), neumatóforos (1 aislado) y raíces presentaron un número mínimo de aislados capaces de tolerar NaCl a concentraciones superiores al 5%. Asimismo, se evidenció como el 50% de las bacterias sometidas a ensayos de tolerancia a NaCl presentaron

crecimiento en concentraciones de 7.5%, sin embargo, la otra mitad de las colonias no superaban el 3.5% y 5%. Por su parte, la curva de tolerancia al NaCl de los aislados obtenidos de las plantas muestreadas en Puerto Caimán estableció que las muestras de hojas de los tres puntos presentaban una mayor tolerancia a condiciones de altas concentraciones de NaCl en comparación con las muestras de flores, tallos, neumatóforos, raíces y propágulos. En total se aislaron 8 colonias microbianas, que consistían en hongos y bacterias, de las muestras de hojas, mientras que los otros tejidos tenían un número mínimo de colonias, entre 1 y 5.

Con relación a los hongos, el 50% de las colonias fúngicas sometidas a ensayos de tolerancia al cloruro de sodio mostraron crecimiento en concentraciones del 7.5%. Por su parte, las colonias bacterianas, 7 de ellas fueron capaces de crecer en una concentración del 7.5% de NaCl, lo cual representó el 77.77% de los aislados obtenidos de las muestras de tejido vegetal de *Avicennia germinans*. En cuanto a los hongos fitopatógenos para el ensayo de antagonismo todos crecieron de manera satisfactoria durante su reactivación y fueron conservados en agua destilada estéril a 4°C para ensayos posteriores. De las muestras analizadas procedentes de la Ciénaga del Chino se obtuvo como resultado del proceso de aislamiento la ausencia de crecimiento microbiano en las cajas de control, indicando el buen procedimiento en el proceso de limpieza y desinfección. Hasta la fecha de este informe (27/07/2023) no se ha observado crecimiento de microorganismos en los tejidos vegetales analizados (hojas y propágulos). La ausencia de crecimiento puede ser debida a que la salinidad en esta zona está asociada a la presencia de carbonatos y el posible que los microorganismos necesiten un pH alcalino en el medio de cultivo o la presencia de bicarbonato. Para los siguientes aislamientos de las muestras de esta zona se tendrán en cuenta dichas condiciones.

Según los resultados del ensayo, se observó que las muestras de hojas de las plantas muestreadas en La Nueva Barra de Mallorquin, Puerto Caimán y Galerazamba presentaron una mayor tolerancia al NaCl (13%) comparado a la tolerancia del 10% que solo se presentó en 1 muestra en Puerto Caimán y en 3 muestras en Galerazamba.

Con relación a los tallos, se puede observar que en ninguna de las colonias de bacterias obtenidas en los sitios de muestreo hubo tolerancia a la salinidad del 10% y 13% comparado a la muestra de flores donde se presentó en Galerazamba tolerancia de NaCl de 10% en un aislado y otro al 13%. Además, se obtuvo tolerancia por parte de las bacterias aisladas de los neumatóforos donde se presentó en una colonia de Puerto Caimán con capacidad de crecer al 13% de NaCl comparada a un aislado de Galerazamba que solo tolero hasta el 10%. Y en el caso de las plántulas se puede observar cómo solo se obtuvo crecimiento en Galerazamba presentándose una tolerancia del 13% en mayor medida con dos aislados. Estos resultados indican que los aislamientos microbianos aisladas de las hojas de los puntos muestreados presentaron una mayor tolerancia al NaCl, especialmente en el caso de las bacterias.

Un aumento en la concentración de NaCl llevo a identificar un total de 9 bacterias y 5 hongos con capacidad de tolerar cloruro de sodio al 15%. Estos microorganismos procedían de diferentes tejidos de las plantas tales como hojas, raíz, propágulos, neumatóforos, tallos y una plántula. En cuanto a bacterias se observó mayor cantidad de aislados se obtuvieron de los tallos, neumatóforos y plántulas. Llama la atención que en los propágulos se identificaron tres aislados de hongos que demostraron la capacidad de tolerar NaCl al 15%, mientras que en el caso de las bacterias no se presentaron

aislamientos con esta capacidad a partir de este tejido. En cuanto a la capacidad de promoción de crecimiento vegetal cada uno de los aislados presentaron pruebas positivas. En cuanto a los aislados bacterianos, el identificado como C1HMA02 mostró ser positivo en solubilización de fosfato y actividad proteolítica, el aislado C3HPC02 presentó una capacidad positiva para fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato, junto con actividad proteolítica. Los aislados C1NPC03, C2 plántula G02 y C4 plántula G02 compartieron la capacidad de fijación de nitrógeno y actividad proteolítica, mientras que el aislado C1 NG02 solo presentó capacidad de fijación de nitrógeno. Por su parte los aislados fúngicos, el aislado C2PPC03 demostró resultados negativos en solubilización tanto de fosfato como de potasio, así como en actividad proteolítica. Por otro lado, el aislado C4PPC03 también obtuvo resultados negativos en solubilización de fosfato y potasio, sin embargo, mostró una respuesta positiva en actividad proteolítica. Contrariamente, el aislado C4RPC03 presentó resultados positivos en solubilización tanto de fosfato como de potasio, mientras que careció de actividad proteolítica. En un enfoque más integral, el aislado C2PPC204 demostró un perfil sobresaliente al dar positivo en las tres pruebas: solubilización de fosfato, solubilización de potasio y actividad proteolítica. Por último, el aislado C1HCN01 resultó positivo en la solubilización de fosfato y actividad proteolítica, aunque mostró un resultado negativo en la solubilización de potasio.

Los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. y *Botrytis cinerea* reactivados presentaron características macroscópicas características de cada especie, por lo cual son conservados para ensayos posteriores. En las pruebas de antagonismo las bacterias exhibieron una menor capacidad para restringir el desarrollo de los fitopatógenos utilizados en el experimento, mientras que todos los hongos demostraron una inhibición significativa en términos de porcentaje. Además, se pudo constatar que *Botrytis cinerea* y *Alternaria* sp. fueron los fitopatógenos en los que los aislamientos bacterianos y fúngicos empleados en el estudio lograron un mayor porcentaje de inhibición. Se observó que el aislamiento denominado C2PPC204 exhibió la mayor capacidad de inhibición frente a los tres fitopatógenos, siendo *B. cinerea* el más afectado en su crecimiento, seguido de *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp., con un grado de inhibición del 91.7%, 83% y 80%, respectivamente.

En cuanto a la producción de Ácido Indol Acético se observó que la mayoría de los aislados bacterianos demostraron la capacidad de producir la fitohormona, excepto la C3HPC02 que no exhibió tal habilidad. Además, se observó que la cepa bacteriana llamada C1NPC03 tuvo la producción más alta, seguida por C2PLANTULAG02 y C4PLANTULAG02, con valores de 4,625 µg/mL, 1,928 µg/mL y 1,664 µg/mL, respectivamente.

En el Departamento de Magdalena se realizó una salida de campo el día 14 de Junio a dos sitios identificados como Kilómetro 19 vía Barranquilla (11° 00' 44" N – 74° 36' 46" W) y Pueblo Viejo (11° 59' 18" N – 74° 17' 31" W). La planta muestreada en el Kilómetro 19 vía Barranquilla tenía una altura de 2,5 m, un nivel freático de 20 cm y una conductividad eléctrica en agua freática de 146,4 mS/cm. Por su parte, la planta muestreada en Pueblo Viejo presentó una altura de 3,3 m, un nivel freático de 40 cm y una conductividad eléctrica en agua freática de 85,02 mS/cm. Las muestras fueron enviadas a la Universidad Popular del Cesar para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos. Posteriormente el 17 de julio se realizó una salida de campo a la Ciénaga del Chino. Se tomaron muestras de hojas, tallos, flores, neumatóforos, raíces, agua y suelo procedentes de la planta de manglar *Avicennia germinans* ubicadas en las coordenadas 10° 53' 56,400" N – 74° 15' 14,400" W y

10° 53' 53,196" N – 74° 15' 13,921" W. El nivel freático encontrado en la zona fue de 35 cm y salinidad de 80 ppt y una conductividad eléctrica en suelo de 17.19 mS/cm en promedio.

En el laboratorio de la Universidad Popular del Cesar los resultados de las muestras de cabo Tortuga (Magdalena) al usar inicialmente cloruro de sodio al 3.5% hay una mayor variedad de morfologías aisladas y reduce el crecimiento de estas, que cuando están sin sal que no se logran ver colonias separadas en el primer subcultivo y con más morfologías juntas, en consorcios. También, podemos decir que por ser muestras recolectadas desde el 18 de mayo y al durar 1 semana y media en refrigeración las muestras se quemaron y marchitaron, perdiendo las características de su tejido. Se sugiere procesar las muestras apenas lleguen al laboratorio y usar inicialmente cloruro de sodio al 3.5% para obtener unos resultados fiables y una mayor morfología aislada y restringir su crecimiento. Se observó crecimiento microbiano en todos los tejidos vegetales analizados, con un mayor crecimiento en las flores con 8 aislados, cabe destacar que en hojas solo se obtuvieron 3 aislados. Referente a la curva de tolerancia al NaCl los microorganismos endófitos de plantas de manglar de Cabo Tortuga, para el propágulo, se tienen un total de 3 aislamientos. Todos estos aislamientos presentaron una tolerancia a concentraciones de cloruro de sodio del 12% y uno del 10%. Por su parte, de las muestras tomadas en Sierra Laguna (Magdalena), los resultados muestran que usando agar PDA, se recuperaron cerca de 10 morfologías de un total del cuatro órganos y una plántula de manglar procesados; mientras que, con agar OGYE-base este número se incrementó a casi 30 morfologías diferentes, mostrando que la composición del agar OGYE base favorece la recuperación de microorganismos endófitos de manglar casi 3 veces más que el agar PDA. En cuanto a la curva de tolerancia a NaCl, 7 aislamientos de la raíz presentaron tolerancia a NaCl a concentraciones entre el 10 y 12%, 5 aislados de neumatóforos toleraron entre el 8.5 y 12%, 2 aislados del tallo toleraron 8.5%, 7 aislados de la hoja toleraron del 8.5 al 12% y 5 aislados de las plántulas toleraron del 10 al 12%. En relación con los aislamientos en Cabo Tortuga se obtuvieron 20 aislamientos bacterianos de los cuales 10 presentaron la capacidad de tolerancia al NaCL al 10%, 5 al 12% y 3 al 15%. Los aislados con mayor tolerancia (15%) se obtuvieron de tallos (2) y flores (1). Por su parte, en Pueblo Viejo se obtuvieron 11 aislamientos de los cuales 4 presentaron tolerancia al NaCL al 10%, 6 al 12% y 1 del 15%. El microorganismo que presento mayor tolerancia fue aislado de la flor e identificado como un hongo. Finalmente, de las muestras tomadas en el Km 19 vía Barranquilla se obtuvieron 9 aislamientos bacterianos de los cuales 5 presentaron la capacidad de tolerancia al NaCL al 10%, 3 al 12% y 1 al 15%. El microorganismo que presentó mayor tolerancia fue aislado del tallo. Las muestras enviadas de la Ciénaga del Chino hasta la fecha de este informe (27/07/23) no han sido procesadas debido a la demora en la entrega de los materiales y reactivos de laboratorio indispensables para llevar este procedimiento.

Un aumento en la concentración de NaCl llevo a identificar un total de 4 bacterias y 1 hongo con capacidad de tolerar cloruro de sodio al 15%. Las bacterias fueron aisladas de tallos y flores; mientras que el hongo fue aislado de flores. Estos microorganismos mostraron algunas respuestas positivas para las pruebas de promoción de crecimiento vegetal tales como actividad proteolítica, solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno. En cuanto a las pruebas de antagonismos, los aislamientos presentaron diferentes capacidades versus a los diferentes hongos fitopatógenos. En este sentido el aislado identificado como C5H-SL01 fue el que presentó el mayor porcentaje de inhibición sobre los fitopatógenos ensayados.

CONCLUSIONES

Se realizaron salidas de campo en los Departamentos del Atlántico y Magdalena, con el objetivo de obtener muestras de plantas de *Avicennia germinans* y analizar su capacidad de promoción de crecimiento vegetal en condiciones de estrés salino e hídrico. En el Atlántico, se tomaron muestras de diversas partes de tres plantas de manglar, registrando información detallada sobre coordenadas geográficas, altura, nivel freático y salinidad. En el Magdalena, se recolectaron muestras de varias partes de dos plantas, junto con muestras de suelo y agua del entorno.

En esta actividad se ha observado que el aislamiento de microorganismos endófitos sigue siendo eficiente según la metodología empleada. Además, se observó que existen microorganismos endófitos de diferentes tejidos de la planta que son capaces de tolerar concentraciones de NaCl hasta 15%. Cabe destacar que en las muestras analizadas en el departamento del Atlántico la mayor cantidad de microorganismos con capacidad de tolerar NaCl son provenientes de las hojas que alcanzaron hasta el 13%. Por su parte en las muestras del departamento del Magdalena se observó al igual que en el Atlántico un mayor número de tolerancia a NaCl en las hojas, pero también se observó un número igual en las raíces. En el caso de los aislamientos realizados en plantas muestreadas en Cabo Tortuga, Pueblo Viejo y Km19 se observó que los microorganismos toleran mayor concentración de NaCl llegando hasta una concentración del 15%. Cabe resaltar que los microorganismos con mayor tolerancia en estos puntos de muestreo fueron aislados a partir de flores y tallos.

El análisis de la curva de tolerancia al 15% de cloruro de sodio (NaCl) en la especie de manglar *Avicennia germinans* revelan patrones contrastantes entre bacterias y hongos en términos de adaptación a la salinidad en diferentes componentes. Las bacterias se destacan como tolerantes en las hojas, tallos, neumatóforos y plántulas, señalando su capacidad para prosperar en ambientes salinos. Sin embargo, los hongos presentan un papel dominante en los propágulos, sugiriendo una ventaja adaptativa en esta parte específica de la planta. Esta variabilidad en las respuestas microbiológicas refuerza la noción de la complejidad de las adaptaciones microbianas y cómo pueden ser influidas por las condiciones específicas de cada ambiente.

A partir del análisis de la inhibición del crecimiento de fitopatógenos, se establece que las bacterias, en comparación con los hongos, presentan una capacidad limitada para restringir el desarrollo de estos agentes perjudiciales. Sin embargo, resalta la importancia de ciertas cepas bacterianas y fúngicas en la inhibición de patógenos específicos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria* sp., sugiriendo su potencial en estrategias de control biológico.

En el contexto de la producción de la fitohormona AIA, se subraya que la mayoría de las bacterias evaluadas tienen la habilidad de sintetizar esta hormona vegetal con importantes implicaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La relación entre las bacterias beneficiosas y la producción de AIA puede desempeñar un papel crucial en la promoción del crecimiento de las raíces, la absorción de nutrientes y la resistencia a factores estresantes bióticos y abióticos como es el caso del estrés salino y la sequía.

Esta información demuestra la capacidad que poseen los microorganismos endófitos halotolerantes aislados de *A. germinans* de promover el crecimiento vegetal tanto de forma indirecta como directa.

Lo anterior reafirma que estos microorganismos pueden ser usados para hacer que plantas de interés agrícolas se adapten a suelos con estrés salino.

6. ANEXOS

- Anexo A1_ Informe de recolección, procesamiento y tratamiento de muestras en Manglar
- Anexo A2_ Documento del proceso de evaluación de promoción de crecimiento vegetal
- Anexo A3_ Informe de ensayo de antagonismo y producción de AIA de las cepas aisladas_

7. EVIDENCIAS

Carpeta en onedrive: [Informes y protocolos Actividad 1.1.1 \(Unisimon, Unimagdalena y Upc\)](#)

Registros multimedia: <https://www.youtube.com/channel/UCm6z7-gMg-pmfYkY7gveeDg>

Elaboró: Hernando Bolívar Anillo

Revisó y aprobó: Maria Auxiliadora Iglesias Navas