

Bacterias halotolerantes/alcalofilas productoras de ácido indolacético (AIA) asociadas a *Arthrospira platensis* (Cyanophyceae)

Halotolerant alkalophilic and indolacetic acid producing bacteria associated with *Arthrospira platensis* (Cyanophyceae)

Liliana Cecilia Gómez Gómez*, Nelson Valero Valero**, Ever Morales Avendaño***

Resumen

Este trabajo tuvo como propósito contribuir al conocimiento de la interacción entre la cianobacteria alcalófila *Arthrospira platensis* y las bacterias que crecen asociadas a su mucilago. Se desarrolló un medio de cultivo heterotrófico en el cual se aislaron cinco cepas bacterianas asociadas a un monocultivo de *A. platensis*. Se determinó la capacidad de estas cinco cepas para producir ácido 3- indol acético (AIA). La tipificación molecular de los aislamientos bacterianos permitió identificarlos como *Exiguobacterium aurantiacum* str. DSM 20416, *Xanthomonas* sp. ML-122, *Halomonas* sp. Ap-5, *Bacillus okhensis* str. Kh10-101, *Indibacter alkaliphilus*, type str. LW1T; todas las cepas bacterianas obtenidas son halotolerantes, alcalófilas y productoras de AIA. Los resultados aportan evidencia para sugerir una interacción benéfica entre *A. platensis* y sus bacterias asociadas, quizá como estrategia evolutiva de cooperación para desarrollarse en un ambiente hipersalino.

Palabras clave: *Bacillus okhensis*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Halomonas* sp., *Indibacter alkaliphilus*. *Xanthomonas* sp.

Abstract

The aim of this study was contribute to knowledge over alkalophilic cyanobacterium *Arthrospira platensis* and their interaction with some associated bacteria growing in their mucilage. Heterotrophic culture medium was designed, in this medium were isolated five bacterial strains associated to single culture of *A. platensis*. It was measured the 3-indol acetic acid (IAA) production by these bacterial strains. Molecular typing allowed identify these bacterial strains like *Exiguobacterium aurantiacum* str. DSM 20416, *Xanthomonas* sp. ML-122, *Halomonas* sp. Ap-5, *Bacillus okhensis* str. Kh10-101, *Indibacter alkaliphilus*, type str. LW1T; all these bacteria are halotolerant, alkalophilic and IAA producer. The findings allow suggest a beneficial interaction between *A. platensis* and their associated bacteria, maybe as evolutionary strategy of cooperation to grow and develop in hypersaline environments.

Key words: *Bacillus okhensis*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Halomonas* sp., *Indibacter alkaliphilus*. *Xanthomonas* sp.

Recibido: julio 3 de 2012

Aprobado: noviembre 21 de 2012

* Docente Universidad Popular del Cesar, Departamento de Licenciatura en Ciencias Naturales, Grupo de Investigación en Microbiología Agrícola y Ambiental, Cesar-Colombia. lilianagomez@unicesar.edu.co

** Docente Universidad Popular del Cesar, Departamento de Microbiología, Grupo de Investigación en Microbiología Agrícola y Ambiental, Cesar-Colombia. nelsonvalero@unicesar.edu.co

*** Docente Universidad del Zulia, Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos, Maracaibo-Venezuela.

Introducción

El estudio de las microalgas y cianobacterias ha tomado gran interés en la actualidad no solamente para conocer su distribución y su importante papel ecológico, sino por ser una fuente de información aplicable a nivel biotecnológico, pues los procesos y metabolitos resultantes de su metabolismo son utilizados ampliamente en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, en la agricultura y a nivel ambiental (Comas, 1996; Bicudo *et al.*, 2006). *Arthrospira platensis* es una cianobacteria filamentosa, habitante de lagos alcalinos, conocida por su potencial biotecnológico (Vonsak, 1997). Sus usos incluyen aspectos como la producción de aminoácidos esenciales, vitaminas, pigmentos naturales y ácidos grasos esenciales que son precursores de prostaglandinas (Carvalho *et al.*, 2004; Radman *et al.*, 2007). Por su potencial como recurso alimenticio, esta cianobacteria se ha propuesto como alternativa en tratamientos frente a la malnutrición. También se ha relacionado con una aparente protección contra el cáncer y la estimulación de la secreción de leche materna (Ogbona *et al.*, 2006); se ha descrito su efecto en la regulación y optimización de diferentes actividades metabólicas, funciones inmuno-moduladoras y bio-moduladoras (Ramírez, 2006; Colla *et al.*, 2007); por lo anterior se ha considerado su producción para varias aplicaciones farmacéuticas (Raoff *et al.*, 2006).

Las interacciones entre bacterias y microalgas han sido motivo de estudio debido a los efectos de inhibición o estimulación del crecimiento, estos efectos pueden ser de la bacteria hacia la microalga o de la microalga a la bacteria; al parecer suelen ser muy específicas; entre los efectos negativos se ha descrito la producción de alguicidas por bacterias y de bactericidas o bacteriostáticos por las microalgas, efectos que pueden ser de utilidad en el control de las floraciones fitoplanctónicas excesivas resultantes de procesos de eutrofización (Fukami, 1997; Riquelme y Avendaño, 2003). Entre los efectos positivos se destaca la estimulación del crecimiento celular de manera recíproca entre microalgas y bacterias a través del aporte de vitaminas, factores de crecimiento o productos extracelulares benéficos. La comprensión de estas interacciones constituye la base para el desarrollo de estrategias tecnológicas para el cultivo y aprovechamiento de microalgas y cianobacterias.

Se ha demostrado que bacterias promotoras del crecimiento en plantas de cultivo también pueden establecer asociaciones con microalgas (De-Bashan *et al.*, 2002a). Los mecanismos de estimulación del crecimiento están relacionados con la producción de ácido 3-indolacético (AIA) por parte de la bacteria (Dobbelaere, *et al.*, 1999). Esta sustancia induce el alargamiento y proliferación de las células vegetales; este efecto

se ha descrito en la asociación entre *Azospirillum brasilense* cd (bacteria promotora del crecimiento en plantas) y la microalga *Chlorella vulgaris* (González, *et al.*, 2000); como resultado se incrementa la concentración de clorofila a y b, luteína y violoxantina y lípidos; igualmente la interacción conlleva al aumento en la población de la microalga (González *et al.*, 2000). También se ha observado que la inoculación de *Azospirillum* sp. o *Azotobacter* sp. en lagunas de acuicultura aumenta significativamente la población de fitoplancton (De Bashan *et al.*, 2003). Algunas bacterias como *Acinetobacter* sp, *Pantoea* sp, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia marcescens* y *Stenotrophomonas maltophilia*, se han encontrado en asociación con cianobacterias formadoras de líquenes; estas bacterias se encuentran fijando nitrógeno y produciendo aminoácidos y fitohormonas, características fisiológicas que en el curso de la evolución pudieron permitir el establecimiento de la interacción positiva con los líquenes (Liba, *et al.*, 2006).

El cultivo de *A. platensis* en laboratorio (monocultivo) no es un cultivo axénico, por el contrario, se han observado diferentes microorganismos que cohabitan con la cianobacteria (Sena, *et al.*, 2010), entre ellos se ha descrito la presencia de "Glacial ice bacterium", *Aeromicrobium alkaliterrae*, *Halomonas desiderata*, *Halomonas nitritophilus*, *Staphylococcus saprophyticus* (Gang-Guk, *et al.*, 2007). Con base en las observaciones anteriores se propone que pueden existir asociaciones funcionales entre cianobacterias como *A. Platensis* y bacterias que se establecen en el mucilago, de la misma manera como se han observado asociaciones entre bacterias y microalgas, y de una forma análoga al establecimiento de bacterias benéficas en la rizósfera de las plantas gracias a los exudados radiculares. Así, el objetivo de esta investigación fue aislar las bacterias asociadas a un monocultivo de *A. platensis*, para determinar la producción de (AIA) como una característica propia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Con este trabajo se buscó contribuir al conocimiento de estas asociaciones microbianas con el fin de establecer un patrón aplicable para otras especies de microalgas y cianobacterias de diverso interés, que conduzcan a desarrollos biotecnológicos para mejorar sus sistemas de cultivo y aprovechamiento.

Materiales y métodos

Aislamiento de bacterias asociadas a *A. platensis*

La cepa de *A. platensis* fue suministrada por el cepario del laboratorio de microorganismos fotosintéticos de la Universidad del Zulia (Venezuela), y mantenida

en monocultivo semicontinuo en medio Zarrouk (Zarrouk, 1966), en el laboratorio de microbiología agrícol y ambiental de la Universidad Popular del Cesar (Colombia), a una temperatura de $33\pm 3^{\circ}\text{C}$., bajo un fotoperiodo de 12 horas con luz artificial mediante lámparas de luz blanca con una iluminación de $100\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

Para el aislamiento de las bacterias asociadas a *A. platensis* se modificó el medio Zarrouk (Zarrouk, 1966), el cual es utilizado tradicionalmente para el cultivo de cianobacterias del género *Arthrospira*, la modificación consistió en la adición de agar nutritivo, sacarosa y extracto de levadura, con el fin de aportar condiciones heterotróficas para favorecer el crecimiento de las bacterias asociadas a *A. platensis*, el medio fue denominado agar ZANSEL (Zarrouk-Agar Nutritivo-Sacarosa-Extracto de Levadura) y presenta la siguiente composición: (NaHCO_3 88 g; K_2HPO_4 2.75 g; NaNO_3 13.75 g; NaCl 5.5 g; K_2SO_4 5.5 g; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g; CaCl_2 0.22 g; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.55 g; EDTA 0.44 g /1000 mL de agua) agar nutritivo (23 g/l), extracto de levadura (0,005%) y sacarosa (0,5%), pH 9.0.

Las bacterias se aislaron mediante la siembra de 1ml de monocultivo de *A. platensis*, para ello, la biomasa de la cianobacteria fue lavado cuatro veces con agua destilada estéril antes de la siembra en el medio ZANSEL, la siembra se realizó por estría con asa metálica, el medio ZANSEL inoculado se mantuvo a $33\pm 3^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 12 horas, hasta la aparición de las diferentes colonias bacterianas; las bacterias que crecieron fueron purificadas y conservadas en el mismo medio a 4°C .

Identificación por biología molecular

Para la identificación molecular de las cepas bacterianas obtenidas se amplificó por PCR una región de 1465 pb del gen ribosomal 16s, para esto se utilizaron los iniciadores 27F, 1492R, 518F y 800R, los productos de la reacción fueron secuenciados y ensamblados en una secuencia consenso problema, cuya comparación con bases de datos de referencia del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI), generó la clasificación taxonómica mediante la elaboración de un árbol filogenético del grupo de secuencias con mayor similitud a la secuencia consenso.

Producción de AIA

Las bacterias se cultivaron en caldo L-triptófano (Merck), en este medio enriquecido el triptófano actúa como precursor del AIA, a las 48 horas de crecimiento se tomaron 10 ml de cada cultivo y realizó la

determinación de AIA presente en el medio, mediante el método colorimétrico de Salkowsky (Glickmann y Dessaux, 1995); para cuantificar la concentración de AIA en los cultivos bacterianos se construyó una curva de interpolación, utilizando soluciones patrón de AIA (Sigma) con concentración conocida (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50 y 70 ppm) y se registró la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Génesis 20. Para este ensayo se utilizó una cepa de *Azospirillum brasilense* cd. como referencia para comparar la producción de AIA debido a que esta es una bacteria ampliamente conocida como modelo de estudio en la producción de AIA, fijación de nitrógeno y promoción del crecimiento en plantas y microalgas (Baldani *et al.*, 1983, Bashan *et al.*, 1997, De- Bashan, *et al.*, 2002a, Valero, 2006).

Resultados

Empleando el medio orgánico ZANSEL se logro aislar cinco cepas diferentes de bacterias asociadas a *A. platensis* (BAAP), las cuales son descritas fenotípicamente a continuación:

BAAP1: Bacilos Gram positivos pequeños y cortos, **móviles**, catalasa positiva, oxidasa negativa, no se observó formación de esporas; desarrollan colonias de 2-2,5 mm de diámetro, de color amarillo claro, cremosas, bordes irregulares, convexas; los cultivos de ocho días se tornan de coloración amarillo intenso.

BAAP2: Bacilos Gram negativos pequeños y agrupados, **móviles**, colonias transparentes de 0,5- 1mm de diámetro, pequeñas, redondeadas, bordes definidos, convexas.

BAAP3: Bacilos Gram negativos cortos y delgados, **móviles**, colonias beige entre 2 - 2.5 mm de diámetro, cremosas, medianas, bordes irregulares, convexas. Los cultivos viejos desarrollan coloración café en el centro de la colonia.

BAAP4: Bacilos Gram positivos ligeramente curvados, **móviles**, colonias blancas entre 0.5 - 1 mm de diámetro, pequeñas, bordes de color blanco más intenso, irregulares y planas.

BAAP5: Bacilos Gram negativos cortos, **móviles**, colonias de color naranja, pequeñas (0,5-1mm de diámetro), bordes regulares, convexas. Los cultivos viejos se tornan de coloración roja, su coloración se mantiene mientras se incuba en fotoperíodo, en ausencia de luz pierden la coloración.

Tipificación molecular de las BAAP: Según el análisis realizado, los resultados indican que la Secuencia Con-

senso Problema (SCP) tiene como mejor “hit” en las bases de datos del NCBI y Green Genes a las secuencias identificadas con los números identificadores del banco de genes (Gene bank identifier) que corresponden a las especies presentadas en la tabla 1.

Para verificar este resultado se tomaron las 25 secuencias que tuvieron mayor similitud a la secuencia problema. Se construyó un alineamiento múltiple y se computó un dendrograma por el método de Neighbor-Joining. Para darle robustez al resultado, el alineamiento/dendrograma se recomputó 100 veces y se calculó un dendrograma consenso a partir de los 100 resultados individuales. El resultado de este cálculo para cada una de las bacterias tipificadas indica que la SCP forma un clado junto a otras secuencias pertenecientes a cada una de las especies presentadas en la tabla 1. El nodo que agrupa a estas secuencias tiene una robustez muy cercana al 100%. Esta evidencia in-

dica que la SCP pertenece a la especie relacionada con una confianza de más del 99%.

Producción de AIA: Las cepas de *Halomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. presentaron una producción de AIA de 64 y 37,7 ppm respectivamente, valores superiores a la cepa de referencia *A. brasilense* Cd que produjo 31,5 ppm, las tres BAAP restantes producen la fitohormona pero en menor cantidad; *B. okhensis* 21 ppm, *E. aurantiacum* 26 ppm y *I. alkaliphilus* 23ppm (figura 1).

Discusión

Exiguobacterium aurantiacum str. DSM 20416 es una bacteria halotolerante y alcalófila (Ordoñez, et al., 2009); la coloración naranja de las colonias en cultivos viejos ha sido reportada previamente (Collins et al., 1983; Rodríguez et al., 2006). *Xanthomonas* sp. ML-122, también es un organismo halotolerante y alcalófilo (Zhang, et al., 2005). El género *Xanthomonas* se

Tabla 1. Similitud de las SCP de las BAAP con cepas reportadas en el banco de genes.

Cepa	Nombre	Identidad (%)	Gene bank identificador(gi)	Número de acceso
BAAP1	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> str. DSM 20416	99,03	151042	DQ019166.1
BAAP2	<i>Xanthomonas</i> sp. ML-122	98.00	4959909	AF139997.1
BAAP3	<i>Halomonas</i> sp. Ap-5	99.00	109156710	DQ6644497.1
BAAP4	<i>Bacillus okhensis</i> str. Kh10-101	99.00	16238498	DQ026060.1
BAAP5	<i>Indibacter alkaliphilus</i> , type str. LW1T	95.00	218059669	FM883672.1

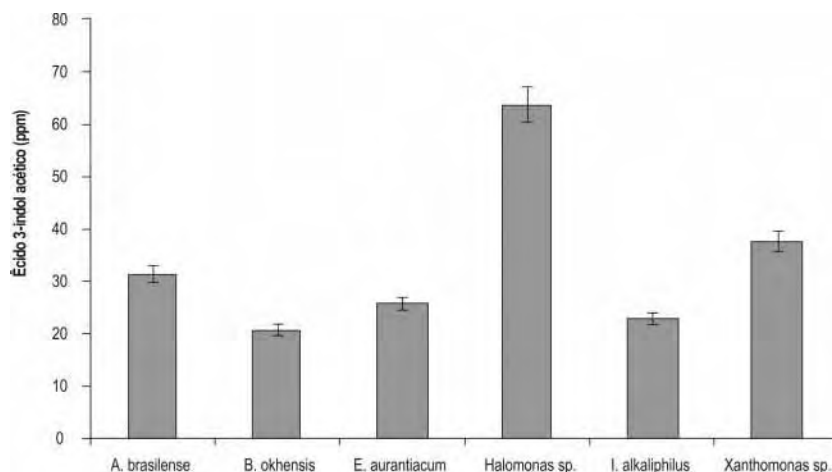


Figura 1. Producción de AIA por BAAP en comparación con la cepa de referencia *A. brasilense* cd.

encuentra generalmente asociado a enfermedades en plantas (Misaghi, *et al.*, 1990; Shen, *et al.*, 2002; Jimenez, *et al.*, 2004; Benítez, *et al.*, 2009), hecho relacionado con aspectos como su capacidad para sobrevivir de forma endófito y la producción de algunas enzimas endógenas que intervienen en el metabolismo de oligosacáridos (Bashan, *et al.*, 1982; Park, *et al.*, 1999), sin embargo, algunas especies de este género son promotoras de crecimiento vegetal (Islam, *et al.*, 2009). *Halomonas* sp. Ap-5 y en general el género, presentan como rasgo distintivo el carácter halotolerante y alcalófilo, es habitual su hallazgo en muestras de agua con estas características (Gang-Guk, *et al.*, 2008; Ordoñez, *et al.*, 2009). Esta misma cepa ha sido registrada previamente como bacteria asociada de *A. platensis* SAG 21.99 (Gang-Guk, *et al.*, 2008). *Bacillus okhensis* strain Kh10-101 es una especie halotolerante y alcalófila reportada recientemente, fue aislada de muestras de agua en un lago hipersalino de la India (Nowlan, *et al.*, 2006). *Indibacter alkaliophilus*, type strain LW1T, también se trata de una bacteria halotolerante y alcalófila; el género y la especie fueron propuestas recientemente, esta bacteria también fue aislada de un lago hipersalino de la India (Anil Kumar, *et al.*, 2010).

El medio de cultivo Zarrouk es adecuado para el crecimiento de *A. platensis*, sin embargo en este medio no se puede conseguir el crecimiento de las bacterias asociadas a *A. platensis* en colonias independientes. Esto se debe a que el medio no presenta fuente de carbono orgánico, por lo tanto las bacterias pueden sobrevivir solamente si se alojan en el mucilago de la cianobacteria (Gang-Guk *et al.*, 2007); al respecto se ha propuesto que en este microambiente se encuentra la fuente de carbono necesaria para la nutrición de las bacterias asociadas, proveniente de la secreción de sustancias orgánicas por parte de la cianobacteria; por su parte, las bacterias podrían favorecer de alguna manera el desarrollo del microorganismo fotosintético (Haines y Guillard, 1974; Fukami, 1997; Parada *et al.*, 1998; De-Bashan *et al.*, 2002^a; Riquelme y Avendaño, 2003). Por lo anterior se explica que el medio orgánico ZANSEL haya permitido el desarrollo de colonias de bacterias con crecimiento independiente, sin observarse el crecimiento de la cianobacteria. Sin embargo, se ha observado el crecimiento de *A. platensis* en medios heterotróficos.

No se observó buen crecimiento de *A. platensis* en el medio sólido ZANSEL, a diferencia del medio sólido Zarrouk, en el cual registró un buen crecimiento; pero en este medio el crecimiento de las bacterias asociadas fue menor. Para explicar este comportamiento se puede sugerir que en el medio autotrófico las bacterias asociadas necesitan de la cianobacteria, puesto que

esta suple a las bacterias con algunos de sus nutrientes limitantes, a cambio las bacterias estarían produciendo algunos factores que promueven el crecimiento de la cianobacteria. A la vez este efecto positivo sobre la cianobacteria conducirá a una mayor producción de sustancias orgánicas disponibles para las bacterias. Por el contrario, en el medio heterotrófico las bacterias no estarían obligadas a establecer una relación con *A. platensis*, se sugiere que al alcanzar cierta "independencia", las bacterias disminuyen o cesan el aporte de las sustancias que promueven el crecimiento de la cianobacteria; este supuesto podría explicar la marcada disminución en el crecimiento de la cianobacteria en el medio heterotrófico. Por otra parte, en el medio heterotrófico hay un aumento de la población de bacterias asociadas, por lo tanto de metabolitos resultantes que podrían perjudicar el crecimiento de *A. platensis* por competencia o por inhibición.

Todas las cepas bacterianas encontradas son reportadas como organismos alcalófilos y halotolerantes, frecuentemente aislados de muestras de agua en ambientes hipersalinos (Zhang, *et al.*, 2005; Nowlan, *et al.*, 2006; Gang-Guk, *et al.*, 2008; Ordoñez, *et al.*, 2009; Anil Kumar, *et al.*, 2010). Solamente *Halomonas* sp AP5 ha sido reportada previamente asociada a *A. platensis* (Gang-Guk, *et al.*, 2008); las bacterianas restantes han sido encontradas en muestras de agua de lagos hipersalinos pero no se han relacionado previamente con la cianobacteria. Las cinco BAAP encontradas en este estudio se obtuvieron a partir de un monocultivo madre de *A. platensis* mantenido en laboratorio, en un medio hipersalino y alcalino sin fuente de carbono orgánica (medio Zarrouk); además estas bacterias solamente se pueden cultivar sin la presencia de la cianobacteria cuando se utiliza el medio orgánico enriquecido (ZANSEL). Por lo anterior se puede sugerir una fuerte asociación entre estos organismos, donde las bacterias parecen depender nutricionalmente del organismo fotosintético; quizá esta asociación obedezca a la coevolución de las bacterias y las cianobacterias en un medio extremófilo (hipersalino e hiper-alcalino), generando una interacción positiva; como es bien conocido, las asociaciones benéficas entre organismos tienden a expresarse con mayor magnitud en ambientes altamente limitantes.

La cianobacteria *A. platensis* utilizada en el presente estudio no fue obtenida de un ambiente natural, esta fue tomada de un monocultivo de cepario mantenido por mucho tiempo en laboratorio; sin embargo, como se discutió previamente, todas las bacterias que se encontraron asociadas al monocultivo de *A. platensis* también han sido aisladas en ambientes naturales, principalmente en lagos hipersalinos, los cuales son aptos

para la proliferación de esta cianobacteria. Al respecto surgen los siguientes interrogantes: ¿la asociación descrita entre las bacterias asociadas y *A. platensis* se favoreció por la presión de selección mediante los cultivos sucesivos de la cianobacteria en laboratorio?, y ¿en condiciones naturales los dos organismos pueden vivir separados gracias a su carácter halotolerante y alcalófilo?, o por el contrario, esta asociación ocurre naturalmente y se conserva en los cultivos de laboratorio. Esta última alternativa parece una explicación posible, se puede apoyar en el hecho de que las cinco BAAP encontradas en este estudio hayan expresado la producción de AIA, dado que esta sustancia secretada por las BAAP puede ejercer un efecto estimulador del crecimiento sobre *A. platensis*. Al respecto, De-Bashan *et al.*, (2002), reportaron la promoción del crecimiento de otro microorganismo fotosintético, la microalga *Chlorella vulgaris*, tras la asociación artificial *in vitro* con *A. brasilense* cd., mediante un mecanismo relacionado con la producción de AIA por parte de esta bacteria, la cual es conocida como promotora del crecimiento en plantas y es comúnmente utilizada para la elaboración de biofertilizantes.

En relación a la capacidad de las 5 BAAP para producir AIA, reportes previos indican que *Exiguobacterium*, *Xanthomonas* y *Halomonas* son géneros para los cuales se ha reportado esta capacidad (Spaepen *et al.*, 2007), pero no se han presentado reportes previos sobre la producción de AIA por *B. okhensis* e *I. alkaliphilus*.

Dado el interés mundial por el cultivo de diferentes especies de cianobacterias filamentosas del género *Arthrospira*, por sus aplicaciones en la alimentación humana y animal, en la industria farmacéutica, química, entre otros campos, y por otra parte la dificultad para obtener cultivos axénicos, resulta conveniente explicar a fondo las interacción entre estas cianobacterias y sus bacterias asociadas, así como los mecanismos involucrados, con el propósito de desarrollar aplicaciones biotecnológicas que potencialicen su producción y calidad.

Conclusiones

En el cultivo autotrófico de *A. platensis* se encontraron bacterias asociadas que están adaptadas a las condiciones de salinidad y alcalinidad en que crece esta cianobacteria.

La capacidad para producir AIA por las cinco bacterias asociadas al cultivo de *A. platensis* aporta evidencia sobre una posible asociación benéfica entre estos organismos, esta asociación podría promover el crecimiento de la cianobacteria.

El empleo medio de cultivo heterotrófico ZASEL resulta un aporte metodológico conveniente para el aislamiento de las bacterias asociadas a *A. platensis*.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la División de Investigación de la Universidad Popular del Cesar, quien financio esta investigación a través del convenio 008 del 2008, a los Laboratorios de Ingeniería Ambiental, Licenciatura en Ciencias Naturales y Microbiología de la Universidad Popular del Cesar por el préstamo de materiales y equipos, al Grupo Microbiología Agrícola y Ambiental (MAGYA), y a los integrantes del semillero LUZ VERDE por sus aportes intelectuales.

Bibliografía

- Anil-Kumar, P., Srinivas, T. N., Madhu, S., Manorama, R., Shivaji, S. 2010. *Indibacter alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from a haloalkaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 721-726.
- Baldani, V.L., Baldani, J.I., Döbereiner, J. 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 924-929.
- Bashan, Y., Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43:103-121.
- Bashan, Y., Diab, S., Okon, Y. 1982. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant and Soil*. 68: 161-170.
- Béñez H., Solange V., Hoyos C., Lilliana M. 2009. Sintomatología asociada a bacteriosis en zonas productoras de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en Colombia. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*. 3 (2): 275-279.
- Bicudo, C., Menezes, M. 2006. Géneros de algas de aguas continentais do Brasil. 2da Ed. RiMa Editora. São Carlos, Brasil.
- Carvalho, J. C., Francisco, F. R., Almeida, K. A., Sato, S., Chojnacka, K., Noworyta, A. 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 34 :461-465.
- Colla, L. M., Oliveira-Reinehr, C., Reichert, C., Vieira, J. A. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*. 98: 1489-1493.
- Collins, M.D., Lund, B. M., Farrow, J. A., Schleifer, K. H. 1983. Chemotaxonomic Study of an Alkaliphilic Bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *Journal of General Microbiology*. 129: 2037-2042.
- Comas, A. 1996. Las Chlorococcales dulciacuicolas de Cuba. Ed. J. CRAMER. Berlin, Stuttgart.

- De-Bashan, L.E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V.K.; Bustillos, J. J. 2002a. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. When co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 48: 514-521.
- De-Bashan, L. E., Bashan, Y. 2003. Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales (Microalgae growth-promoting bacteria: a novel approach in wastewater treatment). *Revista Colombiana de Biotecnología.* 5: 85-90.
- 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.
- Döbereiner, J. 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*, En A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag. New York. p.2236-2253.
- Fukami, K., Nishijima, T., Ishida, Y. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia.* 358: 185 - 191.
- Gang-Guk, C., Myong-Sook, B., Chi-Yong, A., Hee-Mock, O. 2007. Induction of axenic culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. *Biotechnol Lett.* 30:87-92.
- González, L. E., Cañizares, R.O., Baena, S. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Biores. Technol.* 60:259-262.
- Glickmann, R. V., Dessaux, J.T. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Soil Biology and Biochemistry.* 45: 631-640.
- Haines, K., Guillard, R.1974. Growth of vitamin B12 requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B12 producing marine bacteria. *Journal of Phycology.* 10: 245-252.
- Islam, M., Rashedul, M., Madhaiyan, H. P., Deka, B., Woojong, Y., Gillseung L. 2009. Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Free-Living Diazotrophic Bacteria and Their Inoculation Effects on Growth and Nitrogen Uptake of Crop Plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(10), 1213-1222.
- Jimenez, O., Contreras, N., Nass, H. 2004. *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la Caña de Azúcar (*Saccharum* sp) en los estados Lara y Yaracuy. *Rev. Fac. Agron.*, 21(3): 233-245.
- Liba, C., Ferrana, F., Mantio, G., Garboggini, F., Albuquerque, R., Pavan, C., Ramos, P., Filho, M., Barbosa H. 2006. Nitrogen-fixing Chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology.* 101: 1076-1086.
- Misaghi, I. J., Donndelinger, C. 1990. Endophytic Bacteria in Symptom-Free Cotton Plants. *Phytopathology.* 80 (9): 809.
- Nowlan, B., Dodia, M.S., Singh, S. P., Patel, B. K. 2006. *Bacillus okhensis* sp. nov., a halotolerant and alkalitolerant bacterium from an Indian saltpan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56: 1073-1077.
- Ogbonda, K.H., Aminigo, R. E., Abu, G. 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology.* 98: 2207-2211.
- Ordoñez, O. F., Flores, M. R., Dib, J. R., Paz, A., Farías, M. E. 2009. Extremophile Culture Collection from Andean Lakes: Extreme Pristine Environments that Host a Wide Diversity of Microorganisms with Tolerance to UV Radiation. *Microb Ecol.* Oct;58(3):461-73. doi: 10.1007/s00248-009-9527-7.
- Parada, J. L., Zulpa De Caire, G., Zaccaro De Mule, M. C., Storni De Cano, M. 1998. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Microbiology.* 45: 225-228.
- Park, J.P., Bae, J.T., You, D.J., Kim, B.W., Yun, J.W. 1999. Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endoinulinase from *Xanthomonas* sp. *Biotechnology Letters.* 21: 1043-1046.
- Radmann, E.M., Reinehr, C.O., Costa, J.A. 2007. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture.* 265: 118-126.
- Ramírez-Moreno, L., Olvera-Ramírez, R. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia.* 31 (9): 657-663.
- Raoff, B., Kaushik, B.D., Prasanna, R. 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy.* 30: 537-542.
- Riquelme, C. E., Avendaño, R. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural.* 76: 725-736.
- Rodríguez, D. F., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M. F., Tiedje, J. M. 2006. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles*, 10:285-294.
- Sena, L., Rojas, D., Montiel, E., González, H., Moret, J., Naranjo, L. 2010. A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. Cyanobacteria. *J Microbiol Biotechnol.* doi: 10.1007/s11274-010-0549-6.
- Shen, Y., Sharma, P., Da Silva, F. G., Ronald, P. 2002. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *raxP* and *raxQ* genes encode an ATP sulphurylase and adenosine-5'-phosphosulphate kinase that are required for AvrXa21 avirulence activity. *Molecular Microbiology.* 44 (1): 37-48.
- Spaepen, S., Vanderleyden, S., Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.* 31 (4):1-24.
- Valero, N. 2007. Determinación del Valor Fertilizante de Microorganismos Solubilizadores de Fosfato en Cultivos de Arroz. En: Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Editado por Jimena Sánchez N. 1ª Ed. Bogotá D.C. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. p169 -183.

Vonshak, A., Tomaselli, L. 2000. *Arthrospira* (Spirulina): Systematics and ecophysiology. En *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. p505-522.

Zarrouk, C. 1966. Contribution a l'étude d'une Cyanophyce'e. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la Refe-

rences croissance et la photosynthe`se de *Spirulina maxima* (Setch et Garner) Geitler. Ph. Dr. The`se, Univ. Paris, France.

Zhang, G., Dong, H., Xu, Z., Zhao, D., Zhang, C. 2005. Microbial Diversity in Ultra-High-Pressure Rocks and Fluids from the Chinese Continental Scientific Drilling Project in China. *Appl. Envir. Microbiol.* 71: 3213 - 3227.