

Nota Científica

Identificación de especies bacterianas en el sistema radicular de *Rhizophora mangle*, en el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes, 2011-2012

Identification of bacterial species in the root system of *Rhizophora mangle* in National Sanctuary Los Manglares de Tumbes, 2011-2012

Tessy Peralta Ortiz¹

Resumen

En la zona de amortiguamiento y en la zona de reservadel Santuario Nacional los Manglares de Tumbes, durante julio de 2011 a marzo de 2012, se identificaron y caracterizaron especies bacterianas. Se sembró una muestra del raspado del sistema radicular de *Rhizophora mangle* en medios de cultivo TCBS, TSA, Cetrimide, Mac Conkey y EndoLES, observando las características morfológicas de las unidades formadoras de colonias. Las muestras fueron purificadas y aisladas, luego se seleccionó UFC y extrajo el ADN utilizando la PCR, la migración del ADN (de los productos de amplificación), y posteriormente fue enviado el amplicon para su secuenciamiento mediante el programa MEGA. Se identificaron las especies bacterianas: *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Bacillus sp.*, *B. aryabhatai*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Exiguobacterium sp.*, y *Staphylococcus epidermidis*, la bacteria no cultivable Firmicutes y otras no cultivables.

Palabras claves: Bacterias, Sistema Radicular *Rhizophora mangle*, Santuario Nacional los Manglares de Tumbes

Abstract

In the buffer zone and in the reserve zone of the National Sanctuary Los Manglares de Tumbes, during July 2011 to March 2012, they were identified and characterized bacterial species. Scraping a sample of the root system of *Rhizophora mangle* in culture media TCBS, TSA, Cetrimide, Mac Conkey and seeded EndoLES observing morphological characteristics of the colony forming units. The samples were purified and isolated, then UFC was selected and extracted DNA using PCR, DNA migration (amplification products), and was subsequently sent to the amplicon sequencing by MEGA program. The bacterial species were identified: *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Bacillus sp.*, *B. aryabhatai*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Exiguobacterium sp.*, and *Staphylococcus epidermidis*, no cultivable bacteria Firmicutes and other non-cultivable

Keywords: Bacteria, scraping *Rhizophora mangler* oot system, National Sanctuary Los Manglares de Tumbes, PCR.

¹ Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar - Universidad Nacional de Tumbes.
e-mail: tesymar765@gmail.com

Introducción

Los manglares son ecosistemas complejos y dinámicos que varían en salinidad, nivel de agua y la disponibilidad de nutrientes; también contienen diversas y distintas comunidades microbianas (Gomes et al. 2011). En Perú se ubican en la zona norte, de manera particular en el Santuario Nacional los Manglares de Tumbes (SNLMT) localizado en la provincia de Zarumilla del departamento de Tumbes, y recibe diariamente efluentes de langostineras de cultivos semi-intensivos e intensivos, que según Hidalgo y Sandoval (2011) tienen una alta carga de nitrógeno total (289,5 ppm) y también una alta demanda bioquímica de oxígeno (9,33 ppm).

En la zona de amortiguamiento y la zona de reserva del SNLMT habita *Rhizophora mangle* en cuyo sistema radicular se ha observado especies bacterianas aún no identificadas, que podrían estar relacionadas con los efluentes vertidos por las empresas langostineras. Estos microorganismos, son células procariotas, con un tamaño de 1 a 2 μm ; se encuentran en todo el sistema acuático, estando involucradas en la descomposición de la materia orgánica y en la utilización y transformación de nu-

trientes como amonio y nitrito a formas menos dañinas (Lodich et al. 2005).

El estudio es importante, pues las bacterias pueden ser utilizadas en los cultivos de *Litopenaeus vannamei* como probióticos y como bacterias benéficas promotoras del crecimiento de plántulas de mangle, y además intervendrían en la reforestación de zonas dañadas o crear manglares artificiales.

Material y Métodos

Área de estudio

La investigación se realizó en la zona de reserva y en la zona de amortiguamiento del SNLMT, provincia de Zarumilla, entre las coordenadas 3° 24' 00" a 3° 26' 57" de latitud sur y 80° 13' 26" a 80° 18' 56" de longitud oeste (Figura 1); comprende una superficie de 2972 ha con 6 zonas: Zona de amortiguamiento, Zona de recuperación, Zona de uso especial, Zona de protección estricta, Zona silvestre y Zona de uso turístico (Inrena Pronaturaleza 2001). El estudio se realizó de julio de 2011 a marzo de 2012.



Figura 1. Área de estudio (color amarillo) en el sistema radicular de *R. mangle*, de las zonas de reserva y de amortiguamiento del Santuario Nacional los Manglares de Tumbes.

Población y muestra:

La población de *R. mangle* estuvo compuesta por las plantas que se encontraron expuestas al nivel de la línea de alta marea

de la zona de amortiguamiento y la zona reservada del SNLMT. La muestra la conformaron 10 ejemplares de *R. mangle* tomadas al azar de estas zonas.

Los puntos de muestreo para la zona de amortiguamiento fueron a 500 m del canal de marea El Algarrobo, y de la Zona reservada a 500 m del estero Zarumilla. Se tomó una muestra cada 50 m y el muestreo se realizó cubriendo las estaciones del año.

Obtención de la muestra

Se tomó aproximadamente una muestra de 1 cm² del sistema radicular de *R. mangle*, a través de una lámina porta objeto, ubicada cada 10 m, luego la muestra se homogeneizó y se colocó en un microtubo de 1,5 ml de capacidad, siendo transportadas al laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Tumbes, en una caja térmica a temperatura de 5 °C. Estas muestras fueron rotuladas con códigos. Posteriormente se pesó 0,1 g de muestra y se diluyó en 1 ml de solución fisiológica al 0,85 %, para ser sembradas en medios de cultivo.

Medios de cultivo. Para el aislamiento bacteriano se utilizó agar tripticasa soya (TSA), tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), ceftrimide, Mac Conkey y Endo LES. Se realizó las observaciones de las unidades formadoras de colonias (UFC) que crecieron en estos medios; posteriormente estas placas

fueron llevadas a refrigeración a 15 °C, hasta la realización de la purificación.

Purificación. Las colonias se purificaron en medio de cultivo TSA y luego fueron transferidas a caldo de tripticasa soya (TSB); además, esto permitió observar las características desarrolladas.

Identificación de especies bacterianas Extracción de ADN.

Se utilizó el método de Doyle and Doyle (1987) basado en el Bromuro de hexadecil trimetilamonio (CTAB); pues esta técnica permite identificar molecularmente bacterias a partir del ADN. La UFC se homogeneizó y centrifugó a 15490 g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y luego se le agregó 1 ml de etanol al 95 %, finalizando con la centrifugación a 9150 g durante 2 minutos, y se descartó el sobrenadante. Se obtuvo como producto final un pellet ADN el que se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 50 µl de tris y EDTA (TE) 1X y se almacenó a -20°C.

PCR. Para cada muestra se adicionaron los reactivos fermentas en un microtubo de 0,25 ml, como se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos marca fermentas y volumen usados para la reacción de la PCR

Reactivos	Vol/1Rxn
Agua ultra pura	37,0 µl
Buffers	5,0 µl
MgCl ₂ (2,5 mM)	2,5 µl
BSA	1,0 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
Primer forward 16 SRNA-27F (20pM/ µl)	1,0 µl
Primer Reverse 16SRNA-1492R (20 pM/ µl)	1,0 µl
5 Utaq Polimerasa/ µL	0,5 µl
DNA	1,0 µl

El gen utilizado fue el gen 16S rARN que es la subunidad pequeña que se encuentra en el ribosoma de todas las células procariotas.

La amplificación se realizó en un termociclador programado como se indica en la tabla 2. El perfil de la PCR se realizó en un termociclador marca TECHNE que consta de un ciclo de 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C

por 45 segundos y 72 °C por 60 segundos, y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Migración de ADN. Los amplicones fueron migrados en gel de agarosa al 1,75 % conteniendo 1,2 µl de bromuro de etidio (concentración), además se utilizó como tampón de migración 80 ml de TAE 1X, 2 µl de azul de bromofenol (tampón de carga 6X) y 10 µl de cada amplicon procedentes de la PCR. La migración se realizó a 100 V du

rante 20 minutos conjuntamente se hizo migrar un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb. Los geles fueron visualiza

dos utilizando un transiluminador, y fotografiados con cámara digital.

Tabla 2. Programación del termociclador para la amplificación del fragmento del gen 16S rARN

Programación del termociclador	Temperatura(°C)	Tiempo(segundos)	Numerode ciclos
Inicio	94	180	
Desnaturalización	94	30	35 ciclos
Hibridación	55	45	35 ciclos
Polimerización	72	60	35 ciclos
Polimerización final	72	300	

Secuenciación. Se seleccionaron los amplicones de la zonas de estudio y se colocaron en tubos eppendorf de 0,5 ml, se suspendió 10 µl de los productos obtenidos por amplificación de la PCR, en 5 µl de agua ultrapura (AUP) para cada uno de los *primer* correspondientes, en otro microtubo de 0,5 ml se añadió 3 µl de *primer* 16 S rRNA 518 F y 16 S rRNA 800 R para cada amplicon. Los productos de amplificación fueron secuenciados en la empresa Macrogen (Maryland, USA).

Análisis de secuencias de los productos amplificados para 16 S r RNA e Identificación de Bacterias presentes en el sistema radicular *R. mangle*. Las secuencias

nucleotídicas del fragmento 16 S rARN correspondientes a las muestras tuvieron un tamaño aproximado de 1500 pb que fueron editadas con el software Mega v.5. Luego estas secuencias de tamaño aproximado de 1500 pb se exportaron al programa Basic Local Alignment SearchTool (BLAST) para realizar su alineamiento frente a las secuencias que se encuentran en la base de datos científica a fin de obtener la especie con la cual tiene una mayor similitud.

Con los resultados de la secuenciación y usando los datos de la página National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante el programa BLAST, se identificaron los géneros de bacterias.

Resultados

1. Observación de unidades formadoras de colonias bacterianas.

En el medio de cultivo TCBS se observaron colonias amarillas (pequeñas, medianas y grandes) y colonias verdes (pequeñas, medianas y grandes); en el medio de cultivo TSA colonias cremas (pequeñas y medianas); en el medio de cultivo cetrimide colonias cremas (pequeñas) y en el medio MacConkey colonias rosadas (pequeñas).

2. Identificación de secuencias obtenidas

Las especies bacterianas identificadas fueron: *Bacillus pumilus* (ingrediente activo en fungicidas agrícolas), *B. thuringiensis* (propiedades insecticidas), *B. aryabhatai* (puede producir glucosa y fructosa degradando bagazo) *B. megaterium* (produce amilasas y proteasas que tienen usos industriales), *Bacillus cereus*, *Exiguobacterium sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, bacterias no cultivables Firmicutes y otras bacterias no cultivables, como se muestran en las tablas del NCBI

Discusión:

La mayoría de especies de bacterias del género *Vibrio* son de origen marino, se les ha aislado de agua de mar, sedimentos y alimentos marinos especialmente bivalvos y crustáceos. Muchas especies son patóge

nos para vertebrados e invertebrados marinos (Internacional 1994). A partir de la muestra extraída del sistema radicular de *R. mangle* hubo crecimiento en el medio de cultivo TCBS que es un medio específico

para bacterias del genero *Vibrio sp.*, tanto en la zona de amortiguamiento como en la zona de reserva durante todos los meses de muestreo, estos hallazgos son semejantes con lo reportado por Lightner (1996) quien menciona que las bacterias gram negativas son predominantes en los ambientes marinos y usualmente constituyen la

parte de la flora bacteriana de crustáceos cultivados y silvestres. Las especies de bacterias del género *Bacillus* fueron: *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Bacillus sp.*, *B. aryabhatai*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*; además de *Exiguobacterium sp.*, bacterias no cultivables *Firmicutes*, *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 3. Algunas secuencias obtenidas de NCBI con máxima identidad correspondientes a las secuencias investigadas, de bacterias del sistema radicular de *R. mangle*.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
EU221329.1	Bacillus pumilus strain NM1C3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2758	2758	99%	99%
JN315777.1	Bacillus pumilus strain AUCAB16 16S ribosomal RNA gene, partial sec	2756	2756	99%	99%
AM913918.1	Bacillus sp. LD125 partial 16S rRNA gene, isolate LD125	2756	2756	99%	99%
FJ615523.1	Bacillus sp. 41KBZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2754	2754	99%	99%
FJ615522.1	Bacillus sp. 41KAZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2754	2754	99%	99%
EU880532.1	Bacillus pumilus strain PRE14 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2754	2754	99%	99%

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
EU661799.1	Bacillus sp. A-29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	789	789	100%	99%
JX438703.1	Bacillus altitudinis strain CF13 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	784	784	100%	98%
JX438702.1	Bacillus altitudinis strain CF15 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	784	784	100%	98%
JX438701.1	Bacillus altitudinis strain CF14 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	784	784	100%	98%
JX438700.1	Bacillus altitudinis strain CF9 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	784	784	100%	98%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
GQ381280.1	Bacillus cereus strain TA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2767	2767	99%	99%
GU566345.1	Bacillus sp. R5(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2767	2767	99%	99%
GQ149481.1	Bacillus cereus strain DS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2767	2767	99%	99%
JQ518346.1	Bacillus cereus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2763	2763	99%	99%
JQ407791.1	Bacillus cereus strain BVC11 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	2763	2763	99%	99%

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
JN082288.1	Uncultured Bacillus sp. clone 20 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2765	2765	99%	99%
JN082330.1	Uncultured Bacillus sp. clone 95 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2765	2765	99%	99%
JN082277.1	Uncultured Bacillus sp. clone 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2765	2765	99%	99%
JN082333.1	Uncultured Bacillus sp. clone 100 16S ribosomal RNA gene, partial se	2765	2765	99%	99%
JN082286.1	Uncultured Bacillus sp. clone 18 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2765	2765	99%	99%
JN082293.1	Uncultured Bacillus sp. clone 33 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2765	2765	99%	99%

Estos datos coincidieron con el género *Bacillus* sp. reportado por Vázquez et al. (2000) quien logro aislar, de rizosfera de dos especies de manglares, trece cepas bacterianas: *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus*, *macerans Paenibacillus*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacteragilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aylorae*, *Enterobacter asburiae*, *Kluyvercryocrescens*, *Pseudomonas stutzeri*, y *Chryseomonas luteola*; así

como lo reportado por Deivanai et al (2014) quienes identificaron ocho bacterias endófitas aisladas de tejidos de las ramas y pecíolos de los manglares en base a sus 16S r RNA de secuencias de genes de homología, siendo las especies predominantes, *B. amyloliquefaciens* y *Pantoea ananatis*.

Se identificaron las especie *Bacillus* sp. y

Staphylococcus epidermidis en la zona de reserva y en la zona de amortiguamiento en el sistema radicular de *R.mangle* similares a los reportados en suelo de manglar de suva e islas Fiji (Kumar, HATHAL and Chisti 2007) quienes determinaron la diversidad y la carga de bacterias heterotróficas sien

do predominantes las bacterias "Gram positivas" del género *Bacillus* y *Staphylococcus*, así mismo Namvar et al. (2014) mencionan que *Staphylococcus epidermidis* tiene la capacidad potencial de formar biopelículas y colonizar diferentes superficies.

Conclusiones

1. Se identificaron las bacterias *B.pumilus*, *B. megaterium*, *Bacillus sp.*, *B .aryabhattai*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Exiguobacterium sp.*, y *Staphylococcus epidermidis*, la bacteria no cultivable Firmicutes y otras no cultivables del sistema radicular de *R. mangle* en el Santuario Nacional los Manglares de Tumbes, mediante el empleo de secuenciación PCR.
2. Las bacterias identificadas empleando el gen 16 S rRNA fueron bacterias gram positivas y crecieron en medio de cultivo TSA.

Referencias Bibliográficas

- Deivanai S., A. Santhanam, G. Prabhakarn and S. Janardhan. 2014. "Culturable bacterial endophytes isolated from Mangrove tree (*Rhizophora apiculata* Blume) enhance seedling growth in rice." *J Nat Sci Biol Med.* 5(2): 437-444. Accedido abril 18 de 2015 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4121931/>
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue." *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Gomes N., D. Cleary, R. Calado y R. Costa. 2011. "Mangrove bacterial richness". *Commun Integr Biol.* 4(4):419-23. Accedido febrero 10 de 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mangrove+bacterial+richness.+Gomes+NC1%2C+Cleary+DF%2C+Calado+R%2C+Costa+R>
- Hidalgo A. y J. Sandoval 2011. "Impacto ambiental de la actividad langostinera sobre el ecosistema de manglar en el litoral de la región Tumbes." *Revista Manglar Universidad Nacional de Tumbes* 6:(1-2)
- Inrena Pronaturaleza. 2001. *Estrategia de conservación del ecosistema de los manglares de Tumbes*. Perú.
- Internacional Cia. Ltda. 1994. *Nueva Tecnología para diagnóstico y control de enfermedades*. Guayaquil – Ecuador.p.118.
- Kumar, S., A. HATHAL and K. Chisti. 2007. "Diversity and effectiveness of tropical mangrove soil microflora on the degradation of poly theme carry bags". *Revista de biología Tropical* 55. Accedido febrero 10 de 2013. <http://www.vinc.ucr.ac.cr/latindex/rbt55-3-4-2007/04-Kumar-Diversity.pdf>
- Lightner, D. 1996. *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society.
- Lodich, H., A. Berck, P. Matsudaira, C. Kaiser, M. Krieger, M. Scott, S. Lawrence y Darnell. 2005. *Biología Celular y molecular*. Madrid España: Editorial medica panamericana. p. 4.
- Namvar, A., S. Bastarahang, N. Abbasi, G. Ghehi, S. Farhadbakhtarian, P. Arezi, M. Hosseini, S. Baravati, Z. Jokar and S. Chermahin. 2014. "Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review". *GMS Hyg Infect Control.* 30: 9(3). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25285267>.
- Vázquez P., G. Holguin, M.E. Puente, A. Lopez-Cortes and Y. Bashan. 2000. "Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon". *Biol Fertil Soils* 30:460-468. Accedido junio 27 de 2012. <http://bashanis.org/gmaweb/pdfs/vazquez1.pdf>.