INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CIENCIAS MARINAS CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS BIBLIOTECA 1. P. N. DONATIVO

CICIMAR

- A R I A DE EDUCACION PUBLICA

ACTIVIDAD DIAZOTRÓFICA DE CIANOBACTERIAS ASOCIADAS A RAÍCES DE MANGLE NEGRO Avicennia germinans.

T E S I S QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MARINAS PRESENTA EL BIÓLOGO MARINO

GERARDO VICENTE TOLEDO GAMA

La Paz, Baja California Sur, México, Abril 1995

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOSi
ÍNDICE GENERALiii
ÍNDICE DE FIGURASvi
GLOSARIOviii
RESUMENxi
ABSTRACTxiii
INTRODUCCIÓN1
ANTECEDENTES
Fijación de nitrógeno en manglares3
Inoculación de cianobacterias en plantas4
JUSTIFICACIÓN4
Fijación de nitrógeno4
Inoculación de Microcoleus sp. en plántulas de Avicennia germinans5
OBJETIVO6
ÁREA DE ESTUDIO6
MATERIAL Y MÉTODO8
Fijación de nitrógeno in situ8
Elección del sitio de muestreo y colecta de pneumatóforos8
Aislamiento e identificación de cianobacterias8

-

Medición in situ de la actividad diazotrófica (fijaciónde nitrógeno) en la laguna de	
Balandra	.11
Medición de la reducción de acetileno (ARA)	14
Medición de las condiciones ambientales durante la incubación de los pneumatóforos?	15
Microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM) de pneumatóforos	15
Diseño experimental de las mediciones in situ	16
Fijación de nitrógeno in vitro en plántulas inoculadas con Microcoleus sp.	16
Material biológico y condiciones de cultivo	16
Cultivos de cianobacterias	19
Fijación de nitrógeno en plántulas inoculadas	[9
Diseño experimental y análisis estadístico2	1
RESULTADOS	2
Fijación de nitrógeno <u>in situ</u>	22
Aislamiento e identificación de cianobacterias2	22
Colonización de cianobacterias sobre pneumatóforos de mangle negro2	2
Fijación de nitrógeno <u>in situ</u> en pneumatóforos3	3
Interacciones entre mangle negro y <u>Microcoleus</u> sp. <u>in vitro</u>	9
Fijación de nitrógeno en plántulas inoculadas3	9
Colonización de raíces de mangle negro3	9
ANÁLISIS4	8
Fijación de nitrógeno <u>in situ</u> 4	8
Interacciones entre mangle negro y Microcoleus sp. in vitro.	Ş.

BIBLIOTECA I.P.N. DONATIVO

CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	.56
SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	59
LITERATURA CITADA	60
ANEXOS	68
Publicaciones realizadas en el presente trabajo	68
Presentaciones en conferencias internacionales	69
Distinciones recibidas	70

• ••

in in a second

LPP-B: Cianobacterias filamentosas sin beterocistos, con tricomas rectos, con células cilíndricas, similares a los géneros <u>Lvnrbva</u>, <u>Plectonema o Phormidium</u> (Rippka <u>et al</u> 1979). Manglar: Ecosistema localizado en el ecotono entre el ambiente marino y el ambiente terrestre. La parte mas conspicua del manglar es el desarrollo de los arboles de mangle. Mangle: Nombre genérico que reciben plantas superiores arboriformes que crecen en las zonas intermareales y estuarios. En Baja California Sur existen 3 especies; <u>Rhizophora mangle</u>, <u>Laruncularia racemosa</u>, y <u>Avicennia germinans</u>.

Microscopía electrónica de **barrido**: Técnica utilizada para observar con un gran poder de resolución detalles de la forma celular y de las superficies observadas. Se utiliza como fuente de energía un haz de electrones que pasa sobre **la** superficie de la muestra.

Morfotipos de cianobacterias: Grupos en los cuales se pueden íocluir diferentes géneros de cianobacterias de acuerdo a la estructura celular, forma y tamaño (Rippka <u>et al</u> 1979).

Pneumatóforo: Raíz aérea característica del mangle negro.

Propágulos: Estructura reproductiva de propagación de los mangles. Cada especie difiere en la forma y tamaño de sus propágulos.

Raíz secudaria: Raíz producida por el mangle negro, creciendo de manera perpendicular a la raíz principal o raíz radial.

Reducción **de acetileno** (ARA): Técnica utilizada para evaluar la fijación de nitrógeno. Se basa en la afinidad de la nitrogenasa de reducir acetileno ademas del nitrógeno en una proporción de 3:1. Esta afinidad se debe principalmente a la similitud en la estructura química de los enlaces con triple Ligadura.

ix

Sputter coater o 'recubridor de oro por chorro": Aparato utilizado para recubrir las muestras no conductoras de electricidad (tales como raíces de mangle) con una capa de oro, para el posterior análisis de microscopía electrónica de barrido. Consta de un magneto en forma de anillo y una lámina de oro la cual al aplicar un vacío e inyectar argón se ioniza la placa de oro produciendo una "nube" lo cual recubre la muestra.

Vacuum evaporator o 'evaporador de vacio': Aparato utilizado para recubrir las muestras con una capa de oro-paladio, y su funcionamiento es mediante el mismo principio del Sputter coater, pero en este caso el recubrimiento se lleva a cabo por el movimiento de translación y rotación de las muestras en una placa giratoria. La "nube" de oro-paladio es producida por una resistencia sobre la cual se coloca un trozo de metal a manera de un alambre y se aplica alto vacío.

Vainas: Estructuras mucilaginosas que recubren a muchas cianobacterias. Para el caso de cianobacterias filamentosas puede estar recubiertas cada filamento por una vaina, y además pueden compartir varios filamentos una vaina común.

Zonación en el pneumatóforo: Patrón de distribución de las cianobacterias a lo largo de las raíces aéreas de mangle negro.

RESUMEN

En la laguna de **Balandra** se evaluó la fijación de nitrógeno sobre raíces aéreas (pneumatóforos) de mangle negro Avicennia germinans durante 18 meses consecutivos. **Durante** este periodo, se determinaron los patrones anuales de colonización de cianobacterias en los pneumatóforos. La parte basal próxima al sedimento estuvo colonizada principalmente **por** cianobacterias filamentosas sin beterocistos como <u>Lvnebva</u> sp. y <u>Oscillatoria</u> sp. La zona central fue colonizada por filamentos semejantes a <u>Microcoleus</u> sp. y la parte superior por cianobacterias cocoidales del género <u>Aphanothece</u> sp. y algunas cianobacterias filamentosas. Todas las cianobacterias produjeron vainas mucilaginosas durdnte el periodo estudiado. Los sedimentos circundantes fueron dominados estacionalmente por la cianobacteria filamentosa con heterocistos <u>Anabaena</u> sp. En contraste, superficies de vidrio y madera colocadas en las proximidades de tos pneumatóforos no mostraron un patrón específico de distribución, no obstante estuvieron densamente colonizadas.

La fijación de **nitrógeno** in situ mostró variaciones estacionales y diurnas, siendo **baja** durante invierno e incrementandose **a** principios del verano, y alcanzó sus niveles máximos **a** la mitad del **verano**. En los ciclos diurnos, **mostró** dos picos, uno en **la** mañana. durando hasta medio **día**, y el segundo durdnte la tarde. mientras que los niveles **más** bajos se registraron **a** la media noche. La intensidad luminosa y la temperatura del agua son probablemente los factores principales que regulan la fijación de nitrógeno en los pneumatóforos. mientras que la concentración de oxigeno disuelto parece jugar un papel

secundario en esta regulación. En el presente trabajo se propone que las poblaciones de cianobacterias tijadoras de nitrógeno asociadas a los pneumatóforos contribuyen a la incorporación de nitrógeno en este microambiente. Dos cepas de cianobacterias fijador-xx de nitrógeno fueron aisladas de las superficies de pneumatóforos, para evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno in vitro y colonización. Se inoculó la cianobacteria filamentosa Microcoleus sp. en plántulas jóvenes de Avicennia germinans. La fijación de nitrógeno (reducción de acetileno) se incrementó de manera gradual con el tiempo y alcanzó su pico de máxima actividad 5 días después de la inoculación. Posteriormente, se observó un descenso significativo. La actividad de nitrogenasa fue mayor en plántulas inoculadas, **comparándolas** con una población similar de cianobacterias creciendo en medio de cultivo sin fuente de nitrógeno. Un fenómeno importante en la colonización de cianobacterias fue la formación de vainas mucilaginosas. El desarrollo de la vaina in vitro fue gradual, hasta cubrir completamente la raíz de la plántula. La vaina permitió movimiento de los filamentos de las cianobacterias dentro y fuera de ella hacia zonas no colonizadas.

ABSTRACT

Nitrogen fixation and colonization by associative cyanobacteria in aerial roots (pneumatophores) of black mangrove trees was evaluated in situ at **Balandra** lagoon, Baja California Sur, Mexico for 18 consecutive months. During this period, year round zonation of cyanobacterial colonization was **determined** along the pneumatophores. The bottom **part**, close to the sediment, was colonized mainly by non-heterocystous filamentous cyanobacteria resembling Lyngbya sp. and Oscillatoria sp. The central zone was colonized mainly by filaments resembling Microcoleus sp. and the upper par-t by coccoidal cyanobacteria within defined colonies resembling Aphanothece sp. mixed with filamentous cyanobacteria. All the observed cyanobacteria produced mucilaginous sheaths. Massive sheath production along the pneumatophore was evident throughout the observation period. The surround ing sediment was seasonaly dominated by heterocystous Anabaena sp. Glass and dead-wood surfaces incubated for 18 months in the pneumatophore vicinity showed no zonation in the colonization pattern, although they were heavily colonized too. In situ N2-fixation followed seasonal and diurnal patterns. N,-fixation was low during winter, increased in early summer, and reached its peak in mid summer. Diumal N_2 -fixation in the summer showed two peaks; one in the moming until mid-day and the second in the late afternoon. N_2 fixation was at its lowest levels during the mid-night. Light and water-temperature, together with oxygen as a secondary factor? are probably the main environmental factors governing **N**,-fixation on the pneumatophores. We **propose** that the populations of diazotrophic cyanobacteria colonizing the pneumatophores are associated with N,-fixing activity in this

microenvironment. Two cyanobacterial strains isolated from the pneumatophore were efficient diazotrophs. To measure the nitrogen fixation in vitro, one strain of the filamentous cyanobacterid <u>Microcoleus</u> sp. was isolated from black mangrove pneumatophores and inoculated onto young mangrove plantlets to follow root colonization. N₂-fixation (acetylene reduction) gradually increased with time and reach its peak 5 days after inoculation. Later, it decreased sharply. The level of N₂-fixation in the presence of plantlets was significantly higher than the amount of nitrogen fixed by a similar quantity of cyanobacteria in N-free growth medium. The main feature of the root colonization pattern was a gradual production of sheath in which cyanobacterial filaments were embedded. Visible sheatth production increased with time until it completely covered the entire root system of the plantlet. The sheath also allowed in-and-out movement of tilaments towards the uncolonized portions of the root.

INTRODUCCIÓ N

Una gran parte de las lagunas costeras en los trópicos y subtrópicos presentan densos manglares, los cuales son zonas consideradas entre las **más** productivas en el ambiente marino. Estos manglares sostienen a una gran comunidad de plantas y animales, muchas de las cuales son económica y ecológicamente importantes (Jones, 1992; Bunt, 1992). Ademas, estos bosques exportan considerables cantidades de carbono y nitrógeno a las aguas adyacentes (Boto y Robertson, 1990).

Existen dos tipos de comunidades de manglar; los estuarinos (o de fondos suaves) y los eubalinos-metahalinos (o de fondos duros) (Por, 1984). Los manglares de Baja California Sur, corresponden al tipo metahalino, y presentan arboles tipo arbustivo (de tamaño pequeño) y aguas **transparentes**. La comunidad de manglar en nuestra **área** de estudio está compuesta de tres especies de plantas; el mangle rojo (**Rhizophora** mangle **L.**), el mangle blanco (Laeuncularia racemosa Caertn.) y el mangle negro (Avicennia germinans (L.) Stern) de manera similar a la **distribución** de mangles en Florida, E.U.A. (Zuberer y **Silver, 1978)**. Esta última especie se caracteriza por la presencia de **raíces** aéreas o pneumatóforos.

Los manglares subtropicales en la costa occidental de la península de Baja California y los de Florida en el océano Atlántico se encuentran en la misma latitud y son los manglares con la distribución mas hacia el Norte en el hemisferio. No obstante que ambos lugares presentan las mismas especies de plantas, no comparten las mismas condiciones ambientales. Por **el** contrario, **el** ambiente en el cual los mangles se encuentran creciendo en Baja California Sur, se asemejan más a los manglares de la península del Sinai en Egipto, aún y cuando tengan diferentes especies de mangle (Potts, 1979).

Debido a las condiciones de sequía que prevalecen en La Paz, Baja California Sur, con promedios anuales de 181.5 mm de 1906 a 1988 (Salinas y Leyva, 1988) el aporte continental o por lluvias es casi nulo, lo que origina que la concentración de compuestos nitrogenados sea baja. En Balandra, encontramos que los sedimentos presentan un 0.041 % de contenido de nitrógeno total. El nitrógeno orgánico soluble es de 6.7 y 6.3 μ g N l⁻¹, mientras el amonio es 5 y 3.8 μ g N l⁻¹ en sedimentos y agua de mar respectivamente (Hoiguin <u>et al</u> 1992). Estas concentraciones son similares a las encontradas en los manglares de las zonas tropicales, sin embargo, la zona de manglar de Balandra no muestra señales de deficiencia de nitrógeno, esta densamente poblado por mangles y debe ser autosuficiente en cuanto al aporte de nitrógeno, tal y como se encuentran los manglares de la región del Sinai.

La fijación de nitrógeno por bacterias asociadas a plantas puede ayudar a mantener el balance entre la demanda de nitrógeno por la planta y el aporte del ecosistema, resultando en una interacción mutualista, tal y como ha sido observada para otros sistemas. Estas interacciones entre plantas y bacterias han sido investigadas en detalle y se encuentran en vías de comercialización con el objetivo de mejorar la producción agrícola. (Okon. 1994: Tang, 1994; Paau et al 1991).

En los procesos de colonización, las propiedades de adhesión son muy importantes. Todas las cianobacterias adheridas a diferentes superficies comparten la característica de poseer una superficie celular hidrofóbica y de presentar vainas mucilaginosas (Zuberer,

2

1984). Durante el proceso de colonización, ocurren cambios en la hidrofobicidad de las **membranas**, de **hidrofílica** a **hidrofóbica**, lo que resulta en una mejor adhesión (Shilo, 1989).

ANTECEDENTES

Fijación de nitrógeno en manglares.

La fijación de nitrógeno en manglares fue primeramente descrita por **Zuberer** y Silver, (1974; 1978) y ha sido documentada también para otras localidades (Potts, 1984; Hicks y Silvester, 1985; van der Valk y Attiwill, **1984**), no obstante, en raras ocasiones se refieren dichos estudios a un organismo o grupo de organismos en particular (Holguin <u>et</u> <u>al</u> 1992). Para el caso de las cianobacterias, la única información disponible son los trabajos de Potts (1984) en los manglares del **Sinai**.

Las variaciones diurnas y estacionales en la fijación de nitrógeno dependen de muchos factores bióticos (Potts, 1979) y abióticos (Sheridan, 1991). Dentro de los factores abióticos la intensidad luminosa parece ser un factor de suma importancia en diversos manglares (Alongi et al 1992; Bohlool y Wiehe, 1978; Gotto y Taylor, 1976; Jones. 1992; Potts, 1979; Potts y Whitton. 1980) y marismas (Griffiths et al 1987). Los factores bióticos pueden ser la composición de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno. así como su distribución en el ecosistema. Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno han sido localizadas en hojas. raíces y en sedimentos circundantes (van de Valk y Attiwill. 1984). También existen tapetes microbianos asociados a los sedimentos circundantes a manglares (Gotto y Taylor, 1976; Hussain y Khoja, 1993). Entre las cianobacterias presentes en los

tapetes microbianos existen algunas que se encuentran ampliamente distribuidas, como ejemplo, tenemos a <u>Microcoleus</u> sp., Lyngbya sp., y <u>Oscillatoria</u> sp., mientras que por otro lado existen cianobacterias que son endémicas de ciertos lugares. Algunos sitios **present** an ademas una dominancia de especies con beterocistos (**Potts, 1979**), mientras que otros presentan una dominancid de especies sin heterocistos como en Carolina del Norte, USA. (Ben-Pordth y **Zehr, 1994**) y en El Mar del Norte (Sta1 <u>et al</u> 1984).

Inoculación de cianobaterias en plantas.

Es necesario enfocar el estudio de la fijación de nitrógeno desde la **perspectiva** de interacciones entre plantas y microorganismos. Algunos ejemplos de estas **interacciones** han sido estudiados para desarrollar posibles inoculaciones con agentes de **biocontrol por** especies de <u>Pseudomonas</u> (Kloepper <u>et al 1989), Azospirillum</u> (Bashan y Levanony, 1990), <u>Klebsiella</u> (Haahtela <u>et al 1986)</u>, Azotobacter (Pandey <u>et al</u> 1989) y <u>Bacillus</u> (Berge <u>et al</u> 1990; Holl y Chanway, 1992). En contraste, la inoculación de cianobacterias en plantas ha sido reportada en muy pocas ocasiones (Cantar <u>et al 1991a, 1991b, 1993)</u>.

JUSTIFICACIÓN

Fijación de nitrógeno.

Las raices aéreas (pneumatóforos) del mangle negro (Avicennia germinans) son estructuras encargadas del intercambio de gases para la planta, en el ambiente anaeróbico que prevalece en los sedimentos del manglar (Dawes, 1981). Durante los ciclos de marea

I.P.N. DONATIVO

estas raíces quedan eventualmente inundadas con agua de mar, pudiendo ser colonizadas por organismos marinos (Por, 1984). Sin embargo, existe muy poca información referente a la fijación de nitrógeno y colonización (Potts, 1984). En los pneumatóforos del mangle negro y en raíces aéreas de mangle rojo, la colonización puede seguir una zonación, es decir, se pueden encontrar determinadas especies de cianobacterias a determinadas alturas del pneumatóforo. Las raíces de mangle negro son colonizadas en mayor grado que las de mangle rojo debido a que existe una mayor producción de exudados de raíz (Zuberer y Silver, 1979) y que puede resultar en la formación de crecimientos masivos, apreciables a simple vista (Sberidan, 1991).

Inoculación de Microcoleus sp. en plántulas de Avicennia germinans.

La cianobacteria filamentosa sin heterocistos <u>Microcoleus</u> sp. produce colonias conteniendo varios filamentos en una vaina común, las cuales se pueden adherir a superficies por medio de la vaina. Los pneumatóforos de mangle negro en Balandra son un hábitat natural de la cianobacteria <u>Microcoleus</u> sp. La inoculación en el laboratorio de <u>Microcoleus</u> sp. en plántulas de <u>Avicennia germinans</u> nos permite evaluar la interacción de estas dos especies que cohabitan en el mismo ecosistema y nos permitirá además conocer el flujo de nitrógeno en el manglar.

El presente trabajo plantea la siguiente hipótesis :"<u>las cianobacterias asociadas a las</u> raíces detmangle negro entrada de nitrógeno orgánico al manglar."

OBJETIVO

Evaluar la fijación de nitrógeno de cianobacterias asociadas a raíces de mangle negro.

El objetivo fue abordado planteando los siguientes objetivos particulares:

a) Identificar los grupos de cianobacterias dominantes en los pneumatóforos

b) Evaluar las variaciones diurnas y estacionales de fijación de nitrógen<u>o in situsobre</u> pneumatóforos de mangle negro.

c) Observar el patrón de colonización de cianobacterias en plántulas de mangle negro cultivadas en el laboratorio

d) Evaluar las tasas de fijación de nitrógeno en plántulas inoculadas con la cianobacteria Microcoleus sp.

ÁREA DE ESTUDIO

El bosque de manglar donde se realizaron los experimentos, y de donde se aislaron las cepas de cianobacterias se encuentra localizado en Balandra, Baja California Sur. La ubicación geográfica exacta es 24°20' N. 110°20' 0. Se sitúa a 25 Km de distancia de la ciudad de La Paz, comunicado por una carretera pavimentada. El manglar no recibe aportes continentales de agua y es el menos perturbado en la Bahía de La Paz. Su ubicación geográfica se presenta en la figura 1.



Figura 1. Localización exacta del sitio de muestreo en Balandra, Baja California Sur, México.

MATERIAL Y MÉTODO

FIJACIÓ N DE NITRÓGENO IN SITU

Elección del sitio de muestreo y colecta de pneumatóforos.

La laguna de Balandra presenta una zona de manglar densamente poblada. Se colectaron 10 pneumatóforos de mangle negro en cada sitio de muestreo en noviembre de 1992, mayo y junio de 1993 y febrero de 1994. El tamaño de muestra fue seleccionado de acuerdo al número de observaciones que se realizaron sobre cada pneumatóforo, donde un número no menor de 20 observaciones al microscopio óptico en cada pneumatóforonos permitió observar consistencia en las poblaciones detectadas. Los pneumatóforos se cortaron al nivel de la superficie del sedimento con un bisturí estéril y fueron transferidos al laboratorio en tubos de ensayo estériles con tapón de rosca. La superficie del pneumatóforo fue analizada longitudinalmente el mismo día de la colecta, cortando pequeños pedazos de la corteza de cada parte del pneumatóforo (parte baja, media y alta). Cada muestra fu:: analizada con un microscopio de contraste de fases para observar el patrón de colonización.

Aislamiento e identificación de cianobacterias.

Se colectaron pneumatóforos que midieron entre 10 y 17 cm, y fueron obtenidos de diferentes árboles. Las cianobacterias se aislaron a partir de superficies de 1 cm^2 de la corteza del pneumatóforo en agar sólido (1.2% p/v) en medio ASN-III. La composición del medio es: (gl⁻¹):

NaCl	25,
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,
КСІ	0.5,
NaNO ₃	0.75,
K ₂ HPO ₄	0.02,
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.5,
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5,
Na ₂ CO ₃	0.02,
citrato férrico de amonio	3, (mg l'')
citrato de sodio-2H ₂ O	3, "
Na,-EDTA	0.5,
H ₃ BO ₃	2.86, "
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81, "
ZnSO₄⁺7H₂O	0.222, "
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	039, "
CuSO₄∙5H₂O	0.079, "
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.0494, "
vitamina B ₁₂	0.02. "

(**Rippka**<u>et al</u> 1979) adicionado con 50 μ g ml⁻¹ de cicloheximida (Aldrich. USA) para inhibir el crecimiento de organismos eucarióticos. El medio de cultivo fue esterilizado por autoclave a 1.2 kg cm² durante 15 minutos. y ajustado a un pH final de 7.6.

El desarrollo de tapetes microbianos en Baja California Sur está asociado también al desarrollo de bacterias heterótrofas (Bebout et al 1993; López-Cortes, 1990). Para aislan filamentos de cianobacterias se siguió el método descrito por Stal y Krumbein, (1985) como sigue: se colocó una superficie de 1 cm^2 de corteza de pneumatóforo en una caja de petri conteniendo medio sólido ASN-III y se incubó durante siete días. Los filamentos desarrollados en los bordes de la caja de petri se separaron bajo el microscopio estereoscópico mediante una pipeta pasteur estéril con la punta en forma de **cap**ilar. Les filamentos fueron colocados en una caja de petri con medio fresco e incubados **nueva**mente durante 10 días más. Las condiciones de cultivo fueron: 22 $\pm 1^{\circ}$ C, 50 μ mol m⁻² s⁻¹ en iluminación continua. A través de este método de aislamiento se pueden obtener cepas puras, ya que el deslizamiento de los filamentos de las cianobacterias en el medio de cultivo es mas rápido que la colonización de bacterias, lo que resulta en que las células de las cianobacterias hacia donde se dirige el movimiento se encuentren con una cantidad menor de bacterias heterótrofas. Los filamentos fueron transferidos de 5 a 10 veces y las cepas aisladas fueron mantenidas en ASN-III en agar inclinado durante tres meses. Para evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno las cepas fueron resembradas en medio ASN-III sin fuente de nitrógeno (NaNO₁) durante dos días y posteriormente se realizó la prueba de reducción de acetileno. Las cianobacterias fueron identificadas de acuerdo a la descripción y clasificación de morfotipos (Rippka et al 1979). utilizando como criterios el tamaño y forma celular observadas en microscopio de contraste de fases. Las cianobacterias filamentosas fueron asignadas a un grupo de cada morfotipo. El grupo LPP corresponde a filamentos sin heterocistos que se asemejan a Lvnebva, Plectonema, o Phormidium. Se

clasifican posteriormente en tipo A o tipo B de acuerdo a la forma celular, ya sea discoidal o cilíndrica respectivamente.

Medicion in situ de la actividad diazotrófica (fijación de nitrógeno) en la laguna de Balandra.

La fijación de nitrógeno fue evaluada de manera indirecta mediante la técnica de reducción de acetileno, utilizando dispositivos diseñados modificando los descritos por Li v colaboradores (1992) para evaluar la fijación de nitrógeno en raíces de abetos. Un esquema de los dispositivos se muestra en la figura 2. Para su elaboración se cortó el fondo de tubos de ensave con tapón de rosca de 30 ml. La parte superior se selló herméticamente con un septo de huie debajo de la tapa de rosca original. Las tapas de rosca se perforaron en el centro para tomar las muestras con una jeringa de 1 ml. Los tubos de ensaye fueron colocados sobre los pneumatóforos y sellados mediante 2 capas de latex a la superficie de la raíz. Posteriormente, el látex se cubrió con varias capas de parafilm, y finalmente con una capa de cinta adhesiva resistente al agua. Se colocaron 2 guías de alambrón a cada lado del dispositivo, y fue sellado nuevamente para mantenerlos completamente erectos y evitar se flexionaran por acción de las olas o mareas. Los sistemas fueron revisados por medio de dispositivos que fueron cortados con el pneumatóforo colocado, y sumergidos en una tina con agua. Se inyectaron 30 ml de aire para incrementar la presión interna y verificar posibles fugas.



Figura 2. Representación esquemática de un dispositivo utilizado para medir la fijación de nitrógeno en pneumatóforos intactos en el campo. Para mayor claridad las partes del dispositivo no se encuentran a la misma escala.

La fijación de nitrógeno fue evaluada en el campo al reemplazar **I ml** de aire por acetileno. A continuación se colectaron muestras de aire cada 2 ó 4 horas (según se muestra en las gráficas) durante las siguientes 24 horas. Las muestras de gas fueron almacenadas en viales de 10 ml herméticamente sellados con tapones de hule, y mantenidos en una hielera en el campo hasta su análisis en el cromatógrafo de gases.

De manera paralela se evaluó la fijación de nitrógeno en pneumatóforos cortados e incubados en tubos de ensaye con el mismo sistema de sellado en la boca, pero con el fondo intacto. Los controles negativos (sin actividad de nitrogenasa) fueron obtenidos al colocar los pneumatóforos en una solución al 5% de ácido tricloroacético (**TCA**) durante **5** minutos, con el cual se desinfectó la superficie. Para los pneumatóforos intactos (colocados en los dispositivos) se adicionaron **5 ml** de la solución de TCA. Además se incluyeron controles **tales** como: incubación en la oscuridad (cubriendo los tubos con papel aluminio), adición de glucosa (0.1 **gl**¹), dispositivos conteniendo etileno o acetileno, aire, y pneumatóforos incubados únicamente con aire.

La producción de etileno (actividad de nitrogenasa) en pneumatóforos intactos o cortados fue comparada por medio de un **análisis** de **variancia** de una vía (ANOVA) para eliminar la posibilidad de medir etileno producido por la escisión de los pneumatóforos y por lo tanto alterar la lectura de la actividad de nitrogenasa. Los resultados **del ANOVA** mostraron que no existió una diferencia significativa entre ambos tratamientos ($P \le 0.349$) por lo que se procedió a incrementar el número de replicas utilizando pneumatóforos cortados' por la facilidad de manejo y operación. La incubación siempre se realizó en el sitio de colecta. independientemente del tipo de dispositivo.

Los resultados se expresan como el promedio de 10 réplicas para cada tratamiento.

Medición de la reducción de acetileno (ARA).

La actividad diazotrófica de cultivos puros de cianobacterias se midió en botellas de suero de 70 ml, herméticamente selladas con septos de hule y conteniendo 20 ml de ASN-III sin fuente de nitrógeno. La reducción de acetileno se evaluó reemplazando 1 ml de aire con acetileno puro, mediante la producción de etileno, a través de cromatografía de gases usando un cromatógrafo Varian 6000 (Varian Instrument Group, E.U.A) equipado con un detector de ionización de flama (FID) (Stewart et al 1967). Las condiciones en las cuales se operó el instrumento fueron: utilizando una columna de acero inóxidable de 150 x 0,2 cna empacada con Porapak N, 800/100. La temperatura de la columna fue de 50°C, y del detector 200°C. El gas acarreador utilizado fue una mezcla de nitrógeno e hidrógeno a un flujo de 25 ml min⁻¹ y un flujo de aire de 300 ml min-1. La cantidad de etileno (nmoles) se relacionó con los μ g de clorofila a por ml de cultivo (o por pneumatóforo en su caso) por hora. La clorofila a se consideró un estimador del crecimento cianobacterial, debido a que es virtualmente imposible hacer una evaluación cuantitativa de la población de cianobacterias habitando sobre la superficie del pneumatóforo. También se consideró la concentración de clorofila a debido a que en espectros de absorbancia de extractos metanólicos (90%) de la superficie de los pneumatóforos encontramos clorofila a como pigmento dominante sobre otros tipos de clorofilas.

La concentración se calculó de acuerdo a las ecuaciones propuestas por Tandeu de Marsac y Houmard (1988). El tamaño de los pneumatóforos fue muy variable, por lo que se consideró el volumen en los cálculos de la atmósfera en los dispositivos.

14

Medición de las condiciones ambientales durante la incubación de los pneumatóforos.

La intensidad luminosa en el sitio de muestreo fue medida de manera simultánea a los muestreos de gases. Se utilizó un radiómetro-fotómetro Li-Cor 188B Quantum (Li-Cor E.U.A.). La temperatura del agua se evaluó con un termómetro digital Corning PS-6 con un sensor "L". El oxígeno disuelto se midió en pequeñas pozas en las proximidades de los pneumatóforos mediante un oxímetro YSI modelo 57 (Yellow Spring, Ohio, E.U.A.), y el pH fue medido del mismo sitio con un potenciómetro portátil Beckman modelo 21 (Beckman, E.U.A.).

Microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM) de pneumatóforos.

Para observar el crecimiento y colonización de las comunidades microbianas epifiticas, 20 pipetas de cristal, y 10 trozos de madera (de forma y tamaño semejante a los pneumatóforos) fueron colocados en el sedimento y permanecieron ahí por un periodo de 18 meses. Periódicamente se tomaron muestras cada 3 meses de las superficies de vidrio y madera. De igual manera se colectaron pneumatóforos para analizarlos posteriormente al microscopio electrónico de barrido. Se fijaron superficies de 2 cm², las cuales fueron observadas primero en el microscopio óptico, y posteriormente fueron fijadas con el fijador de Karnovsky que consiste en una mezcla de glutaraldehído (2.5%) y paraformaldehído (2%) en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio (0.2 M) a un pH de 7.2. Las muestras se almacenaron a 4 °C en el fijador, hasta que fueron deshidratadas al ir incrementando la concentración de acetona en las muestras. Finalmente fueron secadas a punto crítico en un CPD (Critical Point Drier, CPD modelo 020, Balzers Union. Liechtenstein). Las muestras se adhirieron a bases (stubs) con pegamento líquido para plástico y una vez secas se cubrieron con una capa de oro o de una mezcla de oro-paladio para darle conductividad. Esta cubierta se realizó en un evaporador de vacío (Vacuum Evaporator VE-10 Varian, E.U.A.) o en un Sputter Coater (Edwards S150B, Inglaterra). Para realizar las observaciones se utilizó un microscopio AmRay modelo 1000-A (E.U.A.) a un voltaje de 10 Kv. Las imagenes se obtuvieron al imprimir en película polaroid. p/n.

Diseño experimental de las mediciones in situ.

Todos los experimentos <u>in situ</u> se realizaron con 10 réplicas de cada tratamiento. Una réplica consistió de un dispositivo y una medición separada de las condiciones ambientales. Los análisis de microscopía electrónica de barrido se realizaron con 5 réplicas, cada una consistió de una base (stub). Los análisis estadísticos se realizaron por medio de un Análisis de Variancia de una Vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $P \le 0.05$. Los parámetros ambientales se ajustaron a modelos por medio de regresiones con polinomios de tercer orden por medio del paquete estadístico Sigmaplot.

FIJACIÓN DE NITRÓGENO IN VITRO EN PLANTULAS INOCULADAS CON Microcoleus sp.

Material biólogico y condiciones de cultivo.

Se colectaron propágulos de mangle negro <u>Avicennia germinans</u> (L.) Stern. de la misma localidad donde se realizaron las mediciones <u>in situ</u>, descritas en las sección anterior y en la medida de lo posible de los mismos árboles. La producción estacional de propágulos

comenzó en la laguna de Balandra en agosto de 1993 y duró aproximadamente 40 dias. Se seleccionaron propágulos que midieron 4 cm y fueron colectados de los árboles, transferidos al laboratorio y examinados. Los propágulos que presentaban pequeños orificios producidos por insectos fueron desechados. El proceso de desinfección se realizó por medio de lavados con Tween 20 (Polioxietilen sorbitan monolaurato, Sigma, E.U.A.) (2%) durante 5 minutos, y despues se enjuagó con agua corriente estéril. Posteriormente, los propágulos fueron desinfectados con NaOCl al 1% durante 5 minutos y la cáscara se retiró por medio de un bisturí estéril. Los propágulos "desnudos" se desinfectaron nuevamente con 0.1% de NaOCl y finalmente enjuagados nuevamente con agua corriente estéril seis veces. Todos estos tratamientos fueron realizados en condiciones de esterilidad en una cámpana de flujo laminar. La eficiencia del proceso de desinfección fue verificada por medio de microscopía óptica y electrónica de barrido.

Se utilizó arena fina como soporte para el desarrollo de los propágulos <u>in vitro</u>, la cual fue colectada de la playa de Balandra y se lavó de 10 a 12 veces con agua corriente presurizada, hasta que el sobrenadante se obtuvo completamente claro. La arena húmeda se incubó a temperatura ambiente (28-33°C) durante 24 horas para permitir que las esporas de microorganismos habitando la arena, germinaran. A continuación se esterilizó en un horno a 250 °C durante 17 horas. Las muestras de arena estéril (260 g) fueron colocadas en frascos cilíndricos de vidrio transparente, con un volumen de 900 ml (17 x 7.5 ml). En cada frasco se adicionó solución mineral del medio descrito por Murashige y Skoog (1962) consistente en : (g l^{-1}):

NH₄NO₃ 1.65,

KNO ₃	1.9,
KH ₂ PO ₄	0.17,
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.37,
CaCl ₂ 2H ₂ 0	0.44,
FeSO ₄ ·7H ₂ 0	0.0278,
Na-EDTA	0.0373,
H ₃ BO ₃	1.55, (mg l ⁻¹)
MnSO ₄ ·H ₂ O	4.22, "
ZnSO ₄ ·7H ₂ 0	2.15, "
KI 2, NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.0735, "
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.125, "
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.125, "
Glicina	0.02, "
Mio-inositol	1, "
ácido nicotínico	0.005, "
Piridoxina monoclorada	0.005, "
hidrocloruro de tiamina	0.001, "
cloruro de sodio	25 g t ¹ .

El volumen de la solución en los frascos se ajustó para permitir que se formara una película de 3 mm aproximadamente sobre la superficie de la arena. Los frascos con la arena y el medio de cultivo fueron cubiertos por una capa gruesa de papel aluminio y esterilizados posteriormente en un autoclave a 1.2 kg cm² durante 20 minutos. Una vez estériles se colocaron ligas de hule para sellar herméticamente las cubiertas de papel aluminio. En cada frasco se colocaron 3 propágulos desinfectados y se plantaron en la arena con la ayuda de unas pinzas de disección estériles. Las plántulas crecieron a 22 \pm 1°C bajo 50 µmol m⁻² s⁻¹ en iluminación continua durante 1 mes. Se agregó solución mineral sólo en los casos en que se requirió para mantener el volumen mencionado.

Cultivos de cianobacterias.

La cepa inoculada <u>Microcoleus</u> sp. B1 se aisló de los pneumatóforos y creció en medio libre de nitrógeno ASN-III, como se describió con anterioridad. El cultivo de cianobacterias que resultó en una masa amorfa compuesta de muchos filamentos, similar a un tapete microbiano o biofilm, fue lavado en medio ASN-III sin nitrógeno, y en un homogeneizador de tejidos (LFE, modelo 5VB, E.U.A.) se obtuvo una suspensión uniforme, la cual se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos para separar los filamentos que fueron rotos durante el proceso. El paquete celular se resuspendió en el mismo medio y se ajustó a una densidad óptica de 0.27 a 540 nm, el cual fue utilizado como inóculo. Esta concentración fue equivalente a 1.48 mg ml⁻¹ de clorofila <u>a</u> y alrededor de 1.16 x 10⁴ filamentos por ml de cultivo (contados en un hematocitómetro bajo el microscopio óptico).

Fijación de nitrógeno de plántulas inoculadas.

Las plántulas seleccionadas de un mes de edad fueron tomadas siempre del mismo lote, teniendo aproximadamente la misma altura (100 mm) y con similar número de hojas. Previo a la inoculación, las raíces se lavaron cuidadosamente en 40 ml de medio ASN-III

sin nitrógeno, para eliminar partículas de arena. A continuación se transfirieron a matraces kitazato de 250 ml con un tapón de algodón en la boca y con un septo de hule sellando herméticamente la salida del pivote del matraz. Se adicionaron 25 ml de suspensión celular de cianobacterias. Las plántulas se incubaron durante 24 horas para permitir colonización de las cianobacterias. Las plántulas no inoculadas fueron simultáneamente incubadas en 25 ml de medio sin cianobacterias. Después del periodo de incubación se agregaron 25 ml de medio ASN-III sin nitrógeno con agar al 1.6% (p/v) a una temperatura de 38°C. lo cual resultó en una mezcla semisólida ál 0.8% después de la solidificación parcial del agar. A continuación los tapones de algodón fueron reemplazados por tapones de goma para sellar herméticamente los matraces. Un volumen de 10 ml de aire fue reemplazado por acetileno a través del septo de hule. Inmediatamente después de la invección de acetileno fueron colectadas muestras de 1 ml con una jeringa y cada 24 horas durante los 5 días subsecuentes. Las muestras de aire se colectaron en botellas de suero de 10 ml herméticamente selladas con septos de hule. Los análisis de reducción de acetileno se realizaron de la misma manera que fue descrita para las mediciones in situ. Los resultados se expresaron como la cantidad de etileno producido (nmoles) por plántula por día. De manera simultánea a la fijación de nitrógeno se incluyeron réplicas (sin acetileno) para analizar el proceso de colonización por microscopía de contraste de fases y por microscopía electrónica de barrido.

Las raíces fueron cortadas en varios pedazos pequeños, y agitados en un vortex durante 1 minuto a máxima velocidad para desprender células no adheridas. Después fueron lavadas con medio ASN-III. La preparación de las muestras para microscopía

20

electrónica de barrido fue de la misma manera que se describió para las observaciones <u>in</u> <u>situ</u>.

Al finalizar el experimento, se realizó una extracción de **colorofila <u>a</u>** en acetona **al 90%**, con el propósito de cuantificar de manera indirecta la biomasa de las cianobacterias que se desarrollaron en la superficie de la raíz. Los extractos se midieron **espectrofotométricamente** a 665 nm. La concentración de clorofila <u>a</u> fue **evaluada** de acuerdo a las ecuaciones propuestas por Tandeu de **Marsac** y **Houmard**, (1988).

Diseño experimental y análisis estadístico.

Los experimentos se repitieron 5 veces, cada vez con 8 réplicas. Cada réplica consistió de un matraz con una plántula. Los controles consistieron en plántulas no inoculadas, matraces con la misma concentración de cianobacterias en el mismo medio de cultivo, y matraces conteniendo la mezcla de gases únicamente. Los resultados fueron expresados como la media de todos los experimentos, y se analizaron a través de un Análisis de Variancia de una Vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $P \le 0.05$.

Las observaciones al microscopio electrónico fueron realizadas en 5 réplicas, usando una base (stub) como réplica.

RESULTADOS

FIJACIÓN DE NITRÓGENO IN SITU.

Aislamiento e identificación de cianobacterias.

La comunidad de cianobacterias en los pneumatóforos estuvo dominada a través del año por filamentos sin beterocistos pertenecientes a los morfotipos LPP-A, similares a los géneros <u>Lyngbva</u> sp. y <u>Oscillatoria</u> sp. y por los morfotipos LPP-B similar a <u>Microcolaus</u> sp.

Se aislaron 2 cepas de cianobacterias filamentosas. La primera correspondióa filamentos únicamente con células vegetativas, tricomas rectos, móviles y envueltos por una vaina común. Los filamentos mostraron células cilíndricas, y las células apicales enforma de "punta de flecha" midiendo de 7 a 8 µm por 5 µm. Este morfotipo es similar a <u>Microcoleus</u> sp. cepa ATCC 29128 (Rippka <u>et al</u> 1979). La segunda cepa, presentó células diferenciadas en heterocistos y parcialmente identificada como <u>Anabaena</u> sp. Los filamentos mostraron la presencia de células intercalares diferenciadas y de esféricas a ovales, midiendo 5 µm por 3 µm. Los tricomas fueron inmóviles y su apariencia fue similar a <u>Anabaena cvlindrica</u> cepa ATCC 27899 (Rippka <u>et al</u> 1979). Ambas cepas fueron fijadoras de nitrógeno mostrdndo una actividad diazotrófica similar en cultivo (109 nmoles de etíleno por µg de clorofila a por mI de cultivo por día).

Colonización de cianobacterias sobre pneumatóforos de mangle negro.

Los pneumatóforos de mangle negro mostraron una densa colonización cubriendo toda la superficie. Entre los organismos colonizadores se **encontraron principalmente** cianobacterias, diatomeas, algas verdes, y en menor grado bacterias. En el microscopio óptico y con bajo aumento encontramos también pequeños organismos marinos como nemátodos. Las cianobacterias mostraron una preferencia en los sitios que colonizaron en el pneumatóforo. Los filamentos de Lyngbya sp. y Oscillatoria sp. se observaron siempre en la parte baja de los pneumatóforos, y hasta una altura de 3 cm a partir del sedimento (Figura 3 y Figura 4 A,B). En la zona comprendida entre los 3 y los 10 cm (parte media) el organismo dominante fue Microcoleus sp. (Figura 3 y Figura 4 C,D). En la parte superior (7 cm) encontramos colonias de cianobacterias cocoidales similares a Aphanothece sp. durante todo el año. Sin embargo, en febrero de 1993 estas colonias cocoidales se tornaron más abundantes (Figura 3). Las colonias varían en tamaño desde 16 μ m (Figura 5 C) hasta 135 μ m (Figura 5 D), y se mezclaron con cíanobacterias filamentosas en una vaina mucilaginosa común (Figura 5D,F). La mayoría de los organismos en esta área presentan una vaina bien desarrollada (Figura 5 E). Los límites de las áreas de zonación fluctúan ligeramente con las estaciones del año. pero la estructura de la zonación permaneció constante durante los 18 meses de muestreo.

La colonización de las pipetas de vidrio sumergidas en las proximidades de los pneumatóforos no mostraron el patrón de colonización estratificada como en los pneumatóforos. La colonización fue aleatoria y estuvo dominada principalmente por diatomeas. algas verdes y bacterias **heterótrofas**, todos mezclados en una matriz

23

mucilaginosa (Figura 6 B,C la confirmación de la presencia de los cloroplastos en las algas verdes se realizó por medio de microscopia óptica). Filamentos tipo LPP-A y LPP-B se presentaron en muy baja frecuencia (Figura 6 A). Algunas áreas no mostraron colonización después de 18 meses de incubación (Figura 6 B flecha), en contraste con Ea densa colonización sobre los pneumatóforos, los cuales estuvieron completamente cubiertos com microorganismos (comparar Figura 6 B con Figuras 4 y 5). Las comunidades en las superficies de vidrio fueron también muy diversas. Las superficies de madera fueron colonizadas del sedimento hasta la parte más alta por cianobacterias cocoidales y filamentosas del grupo LPP-B. Al igual que las superficies de vidrio, éstas no mostraron un patrón específico de colonización, sin embargo, los organismos que colonizaron ambas superficies fueron diferentes. En las proximidades de los pneumatóforos se desarrollaron biofilms que cambiaron su composición específica con la época del año. Así en noviembre de 1992 el sedimento fue dominado por la cianobacteria Anabaena sp. mientras que en el verano de 1993 no se localizaron cíanobacterias con heterocistos en el mismo sitio.

Los espectros de absorción de los pigmentos extraídos de las superficies de los pneumatóforos mostraron los picos distintivos de la clorofila <u>a</u> en 665 nm y 430 nm. Sin embargo. se presentaron también los picos característicos de la clorofila <u>b</u> a 460 y 640 mm. aunque las concentraciones fueron menores respecto a la clorofila <u>a</u>. Estos pigmentos deben provenir de las diatomeas que fueron observadas en el microscopio óptico y electrónico de barrido. No obstante, parece existir una dominancia en la colonización por cianobacterias (Figura 8).



Figura 3. **Representación** esquemática de los patrones de colonización de cianobacterias en pneumatóforos de **mangle** negro. Los filamentos de <u>Microcoleus</u> sp. (*sf*) se encuentran envueltos por una vaina común (s). Filamentos de <u>Lvngbva</u> sp. envueltos por una gruesa vaina (s).



Figura 4. (A) Microscopia electrónica de barrido (SEM) de la parte baja del pneumatóforo la cianobacteria mostrando filamentosa del grupo LPP-B. (B) Detalle de la figura 4 A a magnificación, mayor mostrando agregados de filamentos, vainas, bacterias beterotróficas y cianobacterias con beterocistos. (C) Representa la parte central del pneumatóforo mostrando filamentos LPP-B semejantes a Microcoleus sp. La barra representa $10 \mu m$. Abreviaciones: a-Anabaena; bbacteria; m-Microcoleus; 0+ Oscillatoria; s-vainas.


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de la parte alta del pneumatóforo. (A) Colonias cocoidales pequeñas (D) Colonias cocoidales grandes. (B) Detalle de la figura 5 A a mayor magnificación mostrando las colonias embebidas en material de vainas y fundas vacías de cianobacterias. (E) Liberación de células cocoidales envueltas en la vaina de una

posible sitio de **liberación.** Las barras representan 10 μ m (A,B,C,E) y 100 μ m (D). Abreviaciones: **cc-colonia** de cianobacterias cocoidales; c-cianobacterias cocoidales; **f**cianobacterias **filamentosas; s-** vainas; se-fundas de cianobacterias filamentosas.



Figura 6 (A,B) Microscopia electrónica de barrido (SEM) de la colonización sobre superficies de vidrio, donde se observan diatomeas, cidnobacterias filamentosas, algas verdes y bacterias. Las flechas en la figura 6 B muestran **áreas** no colonizadas, después de 18 meses de colonización en la vecindad del pneumatóforo. (D) Detalle de la figura 6 C a mayor magnificación mostrando la localización y magnitud de la colonización por cianobacterias. Las barrds representan 10 µm. Abreviaciones: b-bacterias; cc-colonias de cidnobacterias cocoidales;d-diatomeas; ga-algas verdes;f-cianobacterias filamentosas; s-vainas; LPP-A y LPP-B corresponden a cianobacterias de dichos grupos.



Figura 7. Colonización en los sedimentos próximos a los pneumatóforos. (A) Microscopía óptica de una muestra colectada noviembre de 1992, en mostrando exclusivamente filamentos de Anabaena sp. (B) Amplificación de una pequeña parte de la figura 7 A mostrando detalle celular de Anabaena sp. (C) Microscopía electrónica de barrido (SEM) de la misma área en mayo de 1993 mostrando colonización por diatomeas y unos pocos filamentos LPP-B,

todos embebidos en una vaina masiva. Es importante remarcar la ausencia de <u>Anabaena</u> sp. Las barras representan (A) 100 μm_l(B,C) 10 μm_l Abreviaciones; a-<u>Anabaena</u>; d-l diatomea; s-vainas.



Figura 8. Espectro de absorción de extractos metanólicos (90%) de superficies de pneumatóforos. Las flechas muestran los picos característicos de la clorofila <u>a</u>. Los picos menores a 460 y 640 nm aproximadamente corresponden a la clorofila <u>b</u>.

Fijación de nitrógeno in situ en pneumatóforos.

En los pneumatóforos se detectaron variaciones diurnas y estacionales en la fijación de nitrógeno. En invierno y otoño (noviembre de 1993 y febrero de 1994) se registraron niveles menores que para primavera (mayo 1993) y alcanzó sus máximos valores en verano (junio 1993). Al comparar las cantidades acumuladas de etileno estacionalmente, se encontró que si existen diferencias significativas (Figura 9). Los cambios diurnos en la fijación de nitrógeno durante invierno fueron insignificantes debido a la baja actividad de nitrogenasa y relativamente a la gran variabilidad en cada hora muestreada (Figura 10 A,B). Sin embargo, durante las mediciones de verano cuando se registraron los valores mas altos de actividad, la variación diurna fue evidente. Se registraron dos picos de máxima actividad, el primero en las primeras hords de la mañana hasta mediodía, y el segundo en las últimas horas de la tarde. Durante la noche la actividad de nitrogenasa descendió significativamente alcanzando los valores mínimos alrededor de la medianoche (Figura 10 C,D).

Los parámetros ambientales registrados en las proximidades de los pneumatóforos (intensidad luminosa. temperatura, oxígeno disuelto y pH) en verano mostraron que la fijación de nitrógeno estuvo posiblemente asociada con la intensidad luminosa y con altas temperaturas. Las máximas actividades se registraron cuando los dos parámetros coincidieron (Figura 11 C y 12 C). Al igual que la intensidad luminosa parece tener un marcado efecto en la actividad de las cianobacterias. la temperatura parece ser también un factor limitante. encontrándose que a temperaturas de 25°C o menores la fijación de nitrógeno disminuyo (Figura 11A,B,C,D), aún en presencia de suficiente luz. De manera similar el oxígeno disuelto estuvo asociado al comportamiento de la intensidad luminosa y

la temperatura, pero en menor grado. En cuanto al efecto del oxígeno disuelto, se observó que la fijación de nitrógeno en los pneumatóforos fue ligeramente mayor cuando la concentración de oxígeno disuelto registrddo en el agua circundante fue menor. No obstante, las bajas concentraciones de oxígeno disuelto observadas durante los muestreos de invierno no hubo un incremento en la fijación de nitrógeno dentro de los dispositivos (Figuera 12 A,B,C,D). El pH en el agua no mostró efecto alguno en la fijación de nitrógeno durante todos los muestreos, registrándose variaciones estacionales, en tanto que las variaciones diurnas fueron casi nulas (Figura 12 A,C,D) sin embargo una variación considerable registrada en febrero mostró un incremento aproxitnddamente a las 20:00 horas en los valores de pH. Esta variación es dificil de explicar en términos de las condiciones fisicoquímicas del agua o de actividad microbiana y puede mas bien ser originada por algún factor exógeno no considerado en el experimento (falta de calibración del aparato); sím embargo parece carecer de efecto en el comportamiento de la nitrogenasa.

Un aspecto de remarcable importancia es que para las horas de oscuridad de los muestreos de verano se registraron valores de actividad de nitrogenasa mayores que para los meses de invierno durante el periodo de iluminación (Figura 10 A,B).



Figura 9. Producción acumulada de etileno (actividad de nitrogenasa) en pneumatóforos durante periodos de 24 horas. Cada periodo compuesto de 8 mediciones separadas (total 320 mediciones) a través del año. Las columnas con diferentes letras muestran diferencias estadisticamente significativas a un nivel de significancia de $P \le 0.05$ en Análisis de Variancia de una Vía (ANOVA).



Figura 10. Fijación de nitrógeno en ciclos diurnos a lo largo del año, Cl-fijación de nitrógeno; ■-controle negativos; v-incubación en presencia de glucosa; v-adición de glucosa a controles negativos.



Fig. II. Intensidad luminosa y temperatura registradas simultáneamente a las mediciones de fijación de nitrógeno. Las lineas continuas representan regresiones de tercer orden cuyos coeficientes de correlación son: A=(○)0.9163 (●)0.9192, B=(○)0.9212 (●)0.9188, C=(○)0.9782 (●)0.9518, D=(○)0.9462(●)0.9800.



Fig. 12. Concentración de oxígeno disuelto y pH del agua en las proximidades de los pneumatóforos, registrado simultáneamente a las mediciones de fijación de nitrógeno. Las lineas continuas representan regresiones de terce orden cuyos coeficientes de correlación son:A=(△)0.7497 (▲)0.9654, B=(△)0.8912 (▲)0.1250, C=(△)0.981 (▲)0.9364, D=(△)0.9097 (▲)0.3853.

INTERACCIONES ENTRE MANGLE NEGRO Y Microcoleus IN VITRO

Fijación de nitrógeno en plántulas inoculadas.

La fijación de nitrógeno se incrementó de manera **gradual** cuando las **plántulas** fueron inoculadas con cianobacterias durante los primeros 5 **días** del experimento. A continuación se registró un descenso de la actividad de **nitrogenasa**, el cual fue estadísticamente **significativo** ($P \le 0.05$) en todos los experimentos. El crecimiento de las cianobacterias fue visiblemente mayor en las **plántulas** inoculadas en **comparación** con las cianobacterias creciendo sólo en el medio de cultivo. Sin embargo, la cantidad de clorofila **a** para evaluar el crecimiento de la cianobacterias en los matraces presentó muchas variaciones, las cuales al ser analizadas estadísticamente (ANOVA) no mostraron diferencias significativas (Figura 13 columnas).

Colonización de raíces de mangle negro.

Uno de los **rasgos más** importantes en la colonización de las *raíces* de mangle negro por cianobacterias filamentosas es la **producción** de vainas mucilaginosas. cuya **composición** no hemos determinado aun. El proceso de **colonización** puede comenzar en cualquier parte de la raíz. aunque existieron sitios preferidos por las cianobacterias **para** establecer colonias. **tales** como la zona de **elongación** de la raíz. en lugares donde emergen **raíces** secundarias **o** en la punta de la **raíz** principal.

Durante las primeras 24 horas los filamentos de las cianobacterias establecieron **pequeñas** colonias en forma de "bolsa" (Figura 14 A,B) en muchas **raíces** secundarias. Una parte importante de este proceso de **colonización** es la vaina en la cual muchos filamentos

se encuentran embedidos (Figura 14 C.D.E). Al segundo día después de la inoculación las colonias se volvieron más densas y los agregados de cianobacterias cubrieron unagramparte de la superficie de la raíz (Figura 15 A.B). El tercer **día** se observó una tendeucía de producción de densas vainas, las cuales formaron capas gruesas envolviendo completamente la raíz al unir colonias que originalmente se encontraban separadas (Figura 15 C.D). Observaciones en el microscopio óptico de especimenes vivos revelaron el movimiento de filamentos hacía adentro y hacia afuera de la vaina, gracias a la posibilidad de deslizamiento de las cianobacterias. La vaina no es posible observarla claramente en el microscopio óptico, pero muestras observadas en el microscopio electrónico de barrido permitieron corroborar ese deslizamiento hacia dentro y fuera de la vaina (Figura 15 CD). Este movimiento permitió a las cíanobacterias establecer nuevas colonias. Después de 4 días de inoculadas las plántulas, los filamentos produjeron una vaina compuesta de varias capas la cual cubrió en su totalidad a las raíces mas **pequeñas** (Figura 16 A,B). En el día 5 después de la inoculación la colonización fue evidente, aún a simple vista, Estos macroagregados se localizaron principalmente en sitios donde las raíces secundarias emergieron (Figura 16 D flecha). o cubrieron varias raíces secundarias en la misma vaina (Figura 16 C). En el último día del experimento, la raíz quedo completamente cubierta con una gruesa vaina (Figura 17 B.C), y es evidente la diferencia al compararla con raices no inoculadas (Figura 17 A). No se observaron efectos negativos en el crecimiento de las plántulas como resultado de esta colonización masiva.



Figura 13. Fijación de nitrógeno en **plántulas** de <u>Avicennia **germinans** i</u>noculadas con <u>Microcoleus</u> sp. Las columnas representan la cantidad de clorofila **a** y las barras representan la desviación **típica.** Los puntos correspondientes a cada día marcados con diferentes letras difieren estadísticamente a un nivel de signifícancia de $P \le 0.05$ a través de un Análisis de **Variancia** de una Vía.



Figura 14. (A) Proceso de colonización en la superficie de la raíz de plántulas de <u>Avicennia</u> <u>germinans</u> un día después de la inoculación. Imagen de microscopia óptica, y (B) Microscopía electrónica de barrido (SEM) de colonias similares (flechas).

(C-E) Detalle de La formación de vainas comúnes de cianobacterias en la superficie de la raíz. (D, E) Amplificaciones de una pequeña parte de la figura 14 C mostrando la colonia original. Las barras representan 10 μ m (A, B, D, E) y 100 μ m (C). Abreviaciones: m-Microcoleus; r-raîz sin colonizar; s-vainas mucilaginosas.



Figura 15. (A) En el segundo día de colonización las pequeñas colonias formaron otras más grandes. (B) Amplificación de una pequeña parte de la figura 15 A mostrando numerosos filamentos en la superficie de la raíz. (C) Tres días después de inoculados, los filamentos de <u>Microcoleus</u> sp. forman una vaina muclaginosa mucho mayor. (D) Amplificación de una pequeña parte de la figura 15 C mostrando filamentos desplazandose hacia adentro y hacia afuera de la vaina. Las barras representan 100 μm (A) y 100 μm (B-D). Abreviaciones: SH vainas mucilaginosas.



Figura 16. (A) Microscopia electrónica de barrido (SEM) de una raíz 4 días después de la inoculación. Las cianobacterias cubiertas por una vaina común cubren completamente la superficie de la raíz. (B) Vainas mucilaginosas estratificadas (flechas) conteniendo varios tilamentos. (C) Densa producción de vainas en los sitios de emergencia de raices secundarias, (D) y "pegando" dos raices secundarias (flechas). (E) Micrografía de campo claro de una colonia en forma de bolsa similar a la figura 16 D, mostrando las cianobacterias embebidas en la vaina y desplazándose fuera de ella. Las barras representan 100 μ m (A,B) y 10 μ m (B,C,E). Abreviaciones: r-raíz; s-vaina mucilaginosa conteniendo filamentos de Microcoleus sp.



Figura 17. (A) Microscopía electrónica de barrido (SEM) de una raíz no inoculada. (B) El sistema radicular completamente cubierto con material mucilaginoso. (C) Amplificación de la zona marcada con la flecha en la figura 17 B mostrando copioso desarrollo de la vaina sobre la raíz. Las barras representan 10 µm (A), 1 mm (B), y 100 µm (C). Abreviaciones: s-vainas mucilaginosas.

ANÁLISIS

FIJACIÓN DE NITRÓGENO IN SITU.

En la laguna de Balandra, donde no existe **un** aporte continental de nutrientes y el aporte marino es muy bajo se desarrolla un bosque de manglares. **En** comunidades similares se ha estimado que el nitrógeno disuelto en las lagunas y el nitrógeno **en** los sedimentos no es **suficiente para** satisfacer la alta demanda de! manglar (Alongi y Sasekumar, 1992; Zuberer y Silver, 1978). De ahí que la fijación de nitrógeno deba jugar **un papel importante en el sostenimiento de estos bosques.**

En varias comunidades de manglar se encuentran asociados también tapetes microbianos Iaminados, en donde se ha registrado actividad de nitrogenasa (Alongi <u>et al</u> 1992; Dor, 1984; Hussain y Khoja, 1993; Potts, 1979; Potts, 198-t; Potts y Whitton, 1980; Sheridan, 1991). En la laguna de Balandra existen también tapetes microbianos, ademas de la colonización extensiva en las raíces aéreas de mangle negro. La colonización de manglares por cianobacterias y otras bacterias fijadoras de nitrógeno ha sido observada en hojas. tallos. o en materia! de defoliación (Gotto y Taylor, 1976; van der Valk y Attiwill, 1984; Zuberer y Silver, 1978; 1979).

El proceso de colonización se estudio durante casi 2 años. fue permanente y los crecimientos microbianos cubrieron casi cada parte de los pneumatóforos. La informacitin obtenida de la colonización aleatoria por diatomeas, algas. cianobacterias filamentosas y cocoidales en las superficies de vidrio y en madera sumergida en las proximidades de los pneumatóforos proporcionan una evidencia de la preferencia de cianobacterias a colonizar

pneumatóforos bajo un patrón de distribución específica que no se presenta en superficies inhertes. Esta preferencia puede ser originada por la atracción quimiotáctica de la planta debido a la liberación de compuestos orgánicos por la raíz, y la capacidad de desplazamiento de las cianobacterias hacia los sitios preferidos de colonización. La producción de exudados de **raíz** es utilizada por la comunidad epifítica (Zuberer, **1984**), 10 que favorece el flujo energético entre el mangle y los organismos colonizadores, y para las cianobacterias puede representar una fuente de compuestos orgánicos para un metabolismo fotoheterótrofo y como agentes reductores para la **fijación** de nitrógeno (Stewart, 1973) resultando en una interacción mutualista entre **mangle** negro y cianobacterias colonizadoras de los pneumatóforos.

El patrón observado en la colonización de pneumatóforos es una respuesta a diferentes condiciones microambientales. La distribución resultante puede ser endémica en ciertas localidades (y variar en función de la estación del año), pero, en general, la estructura de la comunidad en Balandra puede ser comparada con otras localidades, donde diferentes géneros de cianobacterias presentan un patrón de colonización similar al observado en nuestro estudio (Dor, 1984: Potts. 1979). En los manglares del Sinaí existe una zonación vertical en los pneumatóforos, pero las especies que se encuentran ahí son principalmente filamentosas con heterocistos (Potts 1979; 1980). En Balandra se observaron especies sin heterocistos en los pneumatóforos. La cianobacteria <u>Anabaena</u> se encontró formando un biofilm alrededor de ellos en el sedimento circundante, pero no directamente sobre los pneumatóforos. La permanencia de este biofilm fue corta y desapareció después

de 6 meses, mientras que la colonización de cianobacterias sin heterocistos sobre fos pneumatóforos fue permanente.

El análisis de las poblaciones de cianobacterias mostró que algunos de los géneros se han encontrado en diferentes manglares del mundo. <u>Microcoleus</u> parece ser un genero colonizador ampliamente distribuido en todas las comunidades con cianobacterias, ya sea en manglares o en tapetes microbianos (Hussain y Khoja, 1993; Potts, 1980; Stal <u>et al</u> 1984) tal y como ocurrió en Balandra Otros géneros de cianobacterias como <u>Lyngbya y Oscillatoria</u> son colonizadores ampliamente distribuídos, pero su dominancia más bien parece ser particular para cada sitio (Jones, 1992; Stal <u>et al</u> 1984). Las condiciones ambientales en la laguna de Balandra modifican las tasas de fijación de nitrógeno en los pneumatóforos de mangle negro, donde aparentemente el proceso es foto y termodependiente, no así en los manglares de Australia, donde parece no existir un efecto de la intensidad luminosa en la actividad de nitrogenasa (Roto y Robertson, 1990).

En los pneumatóforos del mangle negro en la laguna de Balandra la actividad de nitrogenasa en verano fue similar en magnitud y en comportamiento a la de tapetes microbianos compuestos por cianobacterias filamentosas sin heterocistos en el Mar del Norte (Villbrandt et al 1991; Stal <u>et al</u> 1984), en contraste con la actividad registrada en Carolina del Norte E.U.A. donde el pico máximo fue registrado en la noche (Bebout <u>et al</u> 1993). Para Balandra se detecto un pico de máxima actividad en la mañana y hasta mediodía. mientras que el segundo pico de actividad se registró en la tarde. Este comportamiento es similar al observado en los tapetes microbianos laminados en la Isla de Mellum en el Mar del Norte (Stal <u>et al</u> 1984). El carácter de fotodependiente se puede observar en la disminución considerable de la actividad en incubaciones baio condiciones de oscuridad en medios anaeróbicos (Stal et al 1984). En Balandra durante los meses de noviembre y febrero existe una disminución de la actividad de nitrogenasa en los tratamientos incubados en la oscuridad. Los valores son muy cercanos a los controles negativos, lo que indica la relevancia de la iluminación en la fijación de **nitrógeno** en la superficie del pneumatóforo. Los picos de actividad no pueden ser explicados únicamente bajo el efecto de la intensidad luminosa, debido a que existe un incremento gradual de la fijación de nitrógeno varias horas antes del amanecer. El descenso en la actividad debe estar asociado a un efecto de inhibición por excesiva producción de oxígeno resultado de la fotosíntesis. Las mediciones de oxígeno disuelto y de pH se realizaron en el agua circundante a los pneumatóforos, de **manera** que deben ser considerados como estimadores indirectos de los valores reales que debieron ocurrir dentro de los sistemas de evaluación de la fijación de nitrógeno. El efecto de la temperatura está asociado de manera directa a la **luz**, sin embargo, en los **periodos** de oscuridad, se activa la **fijación** de nitrógeno horas antes del amanecer. Esta respuesta puede ser explicada por varios mecanismos, sin que unos excluyan la posibilidad de que ocurran otros de manera simultanea:

a) puede existir una **preadaptación** de las poblaciones de los organismos fototróficos al **régimen** de iluminación a manera de ciclo circadiano. preparándose **para** la **fijación** de **nitrógeno** horas antes del periodo de iluminación utilizando otros agentes reductores diferentes a la ferredoxina (agente reductor durante la fijación de nitrógeno en condiciones de iluminación), **tales** como el piruvato, **glucosa-6-fosfato** y malato (Stewart. 1973).

b) Un activo metabolismo heterotrótico de cianobacterias utilizando glucosa. fructosa y sacarosa como fuentes de carbono, y generando NADPH para reducir la nitrogenasa (Stewart, 1973).

c) La actividad de diversas poblaciones microbianas **diazotróficas** heterótrofas reprimidas durante los **periodos** de iluminación por el daño originado por el oxígeno sobre la nitrogenasa.

d) Incremento-en la humedad en la superficie del pneumatóforo debido al rocío matutino que puede activar la *fijación* de nitrógeno en 1) bacterias heterótrofas 2) poblaciones existentes de cianobacterias utilizando productos de reserva de días anteriores (Bebout<u>et</u> al 1993; Jones, 1992).

En relación a los procesos heterotróficos, la interacción con el **mangle** es de **sum**a importancia, ya que es común la producción de exudados de raíz, lo que puede ser un **factor** importante en la interacción **mangle-cianobacteria**, donde es posible exista un **intercambio** de exudados de raíz (**sustrato** para la reducción de nitrógeno) por productos de excreción de cianobacterias (amonio) y de esta manera quedar disponible para la planta en forma de nitrógeno **orgánico**.

La alta concentración de oxígeno disuelto <u>per se</u> tiene un efecto negativo en la actividad de nitrogenasa (Fay, 1992), sin embargo, en la superficie del pneumatóforo se registro la fijación de nitrógeno bajo condiciones aeróbicas, lo que evidencia que deben existir mecanismos de protección de las cianobacterias a los efectos deletereos del oxigeno sobre la actividad diazotrofica, y una posible dependencia de un metabolismo heterotrúfico. Las variaciones diurnas y estacionales en la fijación de nitrógeno y en los parámetros ambientales registrados indican que la regulación de la actividad de nitrogenasa debe ser

un fenómeno **multiparamétrico** mas que un proceso **monofactorial**. AI menos 2 factores; **la** intensidad **luminosa** y **la temperatura** son **los parámetros principales**, mientras que **la** concentración de oxigeno disuelto debe ser un factor secundario.

Durante **las** horas de bajamar **los** productos de la **fijación** de nitrógeno no son lavados de **la** superficie del pneumatóforo y pueden ser absorbidos por **la** planta debido a **la** organización celular **del** pneumatóforo (**raíz** modificada). Sin embargo esta hipótesis debe ser **confirmada** mediante experimentos con nitrógeno marcado ¹⁵N₂, aunque es importante señalar que dichos experimentos son sumamente complicados de diseñar bajo las condiciones cambiantes en *este* **microambiente**.

INTERACCIONES ENTRE MANGLE NEGRO Y Microcoleus IN VITRO

En la evaluación de cualquier interacción entre microorganismos y plantas existen varias interrogantes que resolver i) ¿Puede el microorganismo colonizar la raíz? Este es un requisito indispensable en muchas interacciones entre bacterias y plantas terrestres (Parke, 1991). ii) ¿El microorganismo secreta alguna substancia que incremente la incorporación de minerales a la planta durante la asociación? (Bashan et al 1990; Li et al 1992; Mazzola et al 1992; Neilands y Leong, 1986; Paula et al 1984; Alexander y Zuberer, 1993). iii) ¿Los microorganismos colonizadores sobreviven suficiente tiempo y en cantidades apropiadas para convertirse en posibles inoculantes? (Bashan y Levanony, 1990; Lynch, 1990).

Los **mangles** están siempre asociados con cianobacterias de diversas especies. pero **la naturaleza** de esta asociación (benéfica o no) es desconocida, sin embargo es claramente visible que **la** interacción no es patógena para **las** plantas. Se desconoce también si las cianobacterias participan en **el** ciclo de vida del **mangle**, aunque se observe con frecuencia

una densa colonización de las raíces de mangle (Dor y Levy, 1984; Potts, 1979; Sheridan, 1991). La interacción <u>in vitro</u> refleja una asociación mutualista, donde planta y cianobacteria obtienen beneficios por el intercambio mediado a través de productas de læ fijación de nitrógeno por exudados de raíz, tal y como se ha mencionado para las interacciones <u>in situ</u>.

El conspicuo desarrollo de la vaina observado a lo largo de las raíces puede per mili a las cianobacterias construir colonias donde se mantiene un microambiente apropiada pare crecer, de manera similar a otras asociaciones entre cidnobacterias y plantas acuáticas (Zuberer, 1984). Las vainas son también estructuras absorbentes (Dor, 1984). Las partes sumergidas de manglar y de sedimentos circundantes están sujetos diariamente a desecación por los períodos de mareas. Esta desecación puede ocasionar una inhibición en la activida de nitrogenasa (Jones, 1992; Potts, 1979; 1980; Potts y Whitton, 1980). Debido a la producción de la vaina, las cianobacterias incrementan la duración de los periodos de humedad, los cuales a su vez pueden prolongar los períodos de fijación de nitrógeno. Al mismo tiempo, la gruesa vaina puede retardar la dispersión de los productos de la fijación de nitrógeno en el agua hacia la laguna. Estas interacciones justifican el desarrollo dela comunidad del manglar en un ambiente pobre en nitrógeno. pero sin embargo exportador de materia orgánica. Así pues las cianobacterias pueden incorporar nitrógeno orgánico al manglar a través de las interacciones con el mangle negro y de esta manera coadyuvar al sostenimiento energético de este ecosistema. De esta manera se puede explicar parcialmente el desarrollo de comunidades de manglar densamente pobladas en los límites entre dos ambientes (el mar y la tierra) pobres en nitrógeno.

CONCLUSIONES

1. Existe una zonación permanente en la distribución de cianobacterias en la superficie de los pneumatóforos.

2. La actividad de nitrogenasa en la superficie de los pneumatóforos presenta variaciones en las respuestas diurnas y estacionales, registrándose los valores más altos en las horas de iluminación en verdno.

3. La colonización i<u>n vitro</u> de <u>Microcoleus</u> sp. produce un incremento en la fijación de nitrógeno.

4. Durante el proceso de colonización la formación de vainas mucilaginosas por cianobacterias y mangle negro juega un papel fundamental.

5. Los productos de fijación de nitrógeno podrían ser absorbidos por la planta durante los períodos de desecación, y de esta manera ser incorporado de manera orgánica en el ecosistema de manglar.

De todas las evidencias experimentales podemos concluir que las cianobacterias asociadas a las raíces de mangle negro participan de manera fundamental en la incorporación de nitrógeno al ecosistema de manglar en Balandra, Baja California Sur.

RECOMENDACIONES

Existen algunos aspectos metodológicos que pudieran ser mejorados. Uno de ellos es el uso de microelectrodos para evaluar con mayor precisión las condiciones ambientales dentro de los dispositivos de evaluación de la fijación de nitrógeno. Se han desarrollado microelectrodos para evaluar la intensidad luminosa (Jorgensen, 1989) y tasas de fotosíntesis a través de oxígeno en distancias de 2 a 10 µm (Revsbecb <u>et al</u>, 1989). Mediante el registro de las condiciones ambientales de manera simultánea a la fijación de nitrógeno com microelectrodos se podrían correlacionar de manera mas certera ambos proceras. Sin embargo su construcción es sumamente complicada.

Un análisis global del ciclo del nitrógeno en el manglar nos daría información del porcentaje que representa la fijación de nitrógeno de cianobacterias en los pneumatóforos, sin embargo se ha demostrado previamente en otras localidades que es relevante (Hicks y Silvester, 1985).

La detección y evaluación de las poblaciones de organismos fijadores de nitrógeno en el manglar requiere la aplicación de otras técnicas que involucran el uso de sondas de DNA o RNA para cuantificar las poblaciones <u>in situ</u>. El proceso de expresión genética de la nitrogenasa está regulado por algunos parámetros ambientales como el oxigeno y compuestos nitrogenados. El estudio de la transcripción y translació<u>n in sit</u>u de la nitrogenasa bajo los efectos mencionados nos daría un nuevo enfoque al proceso complejo de la fijación de nitrógeno. Así pues, el uso de técnicas de biología molecular e ingeniería genética en estudios ecológicos parece ser necesaria para conocer en otra escala de dimensión el ecosistema.

El destino final del nitrógeno atmosférico fijado por las cidnobacterias suponemos que es la planta. Sin embargo, debe ser probado experimentalmente por medio de estudios con ¹⁵N, in <u>situ</u> e in vitro. Dichos experimentos están siendo actualmente realizados en el **CIBNor**, y con el registro de la incorporación del ${}^{15}N_2$ y la comparación con las abundancias naturales de este isótopo estable en diferentes tejidos de la planta se podrá conocer el destino final del nitrógeno en el ecosistema. La evaluación de las concentraciones se realizará por espectrometría de masas, dada la naturaleza estable del gas ¹⁵N₂ (no radioactivo). Resultados preeliminares han mostrado que existe un incremento en el porcentaje de nitrógeno total de tallos y hojas de plantas inoculadas respecto a controles no inoculados. Este dato parece ser alentador en la futura investigación de las interacciones entre cianobacterias filamentosas y mangle negro, sobre todo bajo la perspectiva biotecnológica de bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR o Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Una de las aplicaciones inmediatas, es el mejoramiento en el crecimiento de **plántulas** con fines de repoblación de zonas dañadas por causas antropogénicas.

Los manglares son **comúnes** en las costas de México; el riesgo de una repercusión en las pesquerías es evidente al desequilibrar el balance en el ecosistema costero. Actividades como desarrollos urbanos, y acuaculturales en zonas de manglar pueden amenazar el balance que mencionamos. La alternativa es reforestar zonas apropiadas para ello mediante el uso de algunas **técnicas** detalladas en este estudio, a fin de amortiguar el deterioro producido en manglares por las actividades arriba mencionadas.

Finalmente, se ha establecido un programa de repoblación de los manglares en Baja California Sur, siendo Balandra la primer comunidad repoblada. El inicio de este programa consta de la replantación de 500 plántulas de mangle negro crecidas en condiciones semicontroladas en el CIBNor; la tecnología aquí generada servirá para restaurar zonas de manglar dañadas en las proximidades de La Paz, esencialmente por propósitos meramente artesanales (ahumado de pescado), invasión de manglares por desarrollos turísticos y por ignorancia de la población en general. Este programa servirá para observar el desarrollo de dichas plántulas en un mediano plazo. Después de 3 meses se ha observado un 80% de sobreviven&; resultado alentador en esta dirección.

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Es necesario para la continuación del presente trabajo analizar dos aspectos. El primero es de **carácter** científico, y a través del cual se permitir- diseñar nuevos experimentos que-proporcionen evidencias de las interacciones entre el mangle negro y las cianobacterias. El segundo aspecto es la aplicaciún de las metodologías aquí desarrolladas para la reforestación de zonas dañadas, para lo cual se **deberán** establecer programas de colaboración con dependencias gubernamentales **competentes,tales** como la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca y Centros de Investigación como el **CICIMAR** y **CIBNor**.

LITERATURA CITADA

1. Alexander, DB, y Zuberer, D.A. 1993. Responses by iron-efficient and inefficient out cultivars to inoculation with siderophore-producing bacteria in a calcareus soil. <u>Soil Biol.</u> <u>Fertil</u>. 16:118-124.

2. Alongi, D.M., Boto, K.G., y Robertson, A.I. 1992. Nitrogen and phosphorus cycles. Er <u>Tropical mangrove ecosystems.</u> Editado por A.I. Robertson y D.M. Alongi. American Geophysical Union. Washington DC, USA. pp. 251-292.

3. Alongi, D.M., y Sasekumar, A. 1992. Benthic communities. En <u>Tropical mangrove</u> <u>ecosystems</u>. Editado por A.I. Robertson y M. Alongi. American Geophysical Union Washington DC, USA. pp. 137-171.

4. Bashan, Y., Harrison, S.K., y Whitmoyer, B.E. 1990. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with <u>Azosnirillum brasilense</u> is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. <u>Appl. Environ. Microbiol.</u> 56: 769-775.

5. Bashan, Y., y Levanony, H. 1990. Current status of <u>Azosnirillum</u> inoculation technology: <u>Azosnirillum</u> as a challenge for agriculture. Can. J. Microbio;. **36**: 591-608.

6. Bebout, B.M., Fitzpatrick, M.W., y Paerl, H.W. 1993. Identification of the sources of energy for nitrogenfixation and physiological characterization of nitrogen-fixing members of a marine microbial mat community. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1495-1503.

7. **Ben-Porath**, J., y **Zehr**, J. 1994. Detection and characterization of cyanobacterial <u>nifH</u> genes. Appl. Environ. Microbiol. 60: 880-887.

8. Berge, O., Fages, J., Mulard, D., Y Balandreau, J. 1990. Effects of inoculation with <u>Bacillus circulans</u> and <u>Azospirillum lipoferum</u> on crop-yield in field grown maize. <u>Symbiosis</u>
9: 259-266.

9. Bohlool, B.B., y Wiebe, WJ. 1978. Nitrogen-fixing communities in an intertidal ecosystem. <u>Can. J. Microbiol.</u> 24: 932-938.

10. Boto, K.G., y Robertson, A.I. 1990. The relationship between nitrogen fixation and tidal exports of nitrogen in a tropical mangrove system. Estuar. Coast. Shelf Sci. 31: 531-540.

Bunt, J.S. 1992. Introduction. En <u>Tropical mangrove ecosystems</u>. Editado por A.I.
 Robertson y M.Alongi. American Geophysical Union. Washington DC, USA. pp. 1-6.
 12. Dawes, C. 1981. Marine Botany. John Wiley and Sons. USA.

13. Dor, L 1984. Epiphytic blue-green algae (cyanobacteria) of the Siani mangal: coosiderations on vertical zonation and morphological adaptations. En <u>Hvdrobioloev of the mangal</u>. Editado por F. D. Por e I. Dor. Dr W. Junk Publishers, The Netherlands. pp. 35-53.
 14. Dor, L, y Levy, L 1984. Primary productivity of the benthic algae in the hard-bottom mangal of Sinai. En <u>Hvdrobiology of the mangal</u>. Editado por F.D. Por e I. Dor. Dr W.Junk
 Publishers, The Hage. pp. 179-191.

Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen tixation in cyanobacteria. <u>Microbiol. Rev</u>. 56:
 340-373.

16. Gantar, M., Kerby, N.W., **Rowell, P.,** y **Obreht,** 2.1991. Colonization of wheat (<u>Tricum</u> <u>vulgare</u> L.) by N₂-fixing cyanobacteria: 1. A survey of soil cyanobacterial isolates forming associations with roots. <u>New Phytol.</u> 118: 477-483.

17. Gantar, M., Kerby, N.W., y Rowell, P. 1991. Colonization of wheat (<u>Tricum vulgare L.</u>) by N₂-fixing cyanobacteria: II. An ultrastructural study. <u>New Pbvtol</u>. 118: 485–492.

18. Gantar, M., Kerby, N.W., y Rowell, P. 1993. Colonization of wheat (<u>Tricum vulgare L.</u>) by N₂-fixing cyanobacteria: III. The role of a bormogouia-promoting factor. <u>New Phytol</u>.
124: 505-513.

19. Griffiths, M.S.H., Gallon, J.R., y Chaplin, A.E. 1987. The diurnal pattern of dinitrogen fixation by cyanobacteria in situ. New Phytol. 107: 649-657.

20. Gotto, J.W., y Taylor, B.F. 1976. N₂-fixation associated with decaying leaves of the red mangrove (Rhizophora mangle). Appl. Environ. Microbiol. 31: 781-783.

21. Haahtela, K., Laakso, T., y Korbonen, T.K. 1986. Associative nitrogen fixation by <u>Klebsiella</u> spp.: Adbesion sites and inoculation effects on grass roots. <u>Appl. Environ.</u> <u>Microbiol.</u> 52: 1074-1079.

22. Hicks, B.J., y Silvester, W.B. 1985. Nitrogen fixation associated with the New Zealand mangrove (Avicennia marina (Forsk.) Vierb. var. <u>resinifera</u> (Forst.f.) Bakb.). <u>Appl. Environ.</u> <u>Microbiol.</u> **49**: 955959.

23. Holguin, G., Guzman, MA, y Bashan, Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere Staphylococcus sp. FEMS Microbiol. Ecol. 101: 207-216.

24. Holl, F.B., y Chanway, C.P. 1992. Rbizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by <u>Bacillus polymyxa. Can. J. Microbio]</u>. 38: 303-308.

25. Hussain, M.I., y Khoja, T.M. 1993. Intertidal and subtidal blue-green algal mats of open and mangrove areas in the Farasan Archipielago (Saudi Arabia), Red Sea. Bot. Mar. 36: 377-388.
26. Jones, **K.** 1992. Diurna; **nitrogen** fixation **in** tropical marine cyanobacteria: a comparison between adjacent communities of non-beterocystous <u>Lyngbya</u> sp. and heterocystous <u>Calothrix</u> sp. <u>Br. Phycol. J.</u> 27: 107-118.

27. Jorgensen, B.B. 1989. Light penetration, absorption, and action spectra in cyanobacterial mats. En <u>Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities</u>. Editado por Y. Cohen y E. Rosenberg. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp. 123-137.

28. Kloepper, J.W., Lifshitz, R., y Zablotowicz, R.M. 1989. Free-living bacteria1 inocula for enhancing **crop** productivity. <u>Trends Biotech</u>. **7:** 3944.

29. Li, **C.Y., Massicote,** HB., y **Moore, L.V.H.** 1992. Nitrogen-fixing <u>Bacillus</u> sp. associated with Douglas-k tuberculate ectomycorrhizae. <u>Plant Soil.</u> 140: **35-40.**

30. López-Cortés, A. 1990. Microbial mats **in tidal channels** at San Carlos, Baja California Sur, México. <u>Geomicrobiol. J.</u> **8:** 71-87.

 Lynch, J.M. 1990. Longevity of bacteria: Considerations in environmental release. <u>Curr.</u> Microbiol, 20: 387-389.

32. Mazzola, M., Cook, R.J., Thomashow, LS., Weller, D.M., y Pierson, L.S. III 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorecent pseudomonads in soil habitats. <u>Appl. Environ. Microbiol.</u> 58: 26162624.

33. **Murashige, T., y Skoog, F.** 1962. A revised medium for rdpid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. <u>Physiol. Plant.</u> 15: 473-497.

34. Neilands, J.B., y Leong, S.A. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 187-208.

63

35. **Okon, J.,** y **Labandera-González,** C. 1994. Agronomic aplications of Azospirillum. En <u>Improving plant productivity with rhizosohere bacteria.</u> Editado por M.H. Ryder, P.M. Stephens, y G.D. Bowen. CSIRO, Australia. pp. 274-278.

36. Paau, A.S., Graham, L.L., y Benett, M. 1991. Progress in formulation research for PGPR and biocontrol inoculants. En <u>Plant rrowth promoting rhizobacteria-progress and</u> <u>prospects</u>. Editado por C. Keel, B. Koller, y F. Défago.10BC/WPRS Bulletin, Zürich, Switzerlaud.

37. Pandey, A., Shende, S.T., y Apte, RG. 1989. Effect of <u>Azotobacter chroococcum</u> seed iuoculation on its establishment in rhizosphere, on growth and yield and yield attributing parameters of cotton (Gossypium hirsutum). Zentralbl. Mikrobiol. 144: 595-604.

38. Parke, J.L. 1991. Root colouization by indigenous and introduced microorganisms. En <u>The rhizosphere and plant rrowth.</u> Editado por D.L. Keister y P.B. Cregan. Kluwer Academic pub. The Netherlands, pp. 33-42.

39. Paula, M.A., Urquiaga, S., Siqueira, J.O., y Döbereiner, J. 1992. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (Ipomoea batatas). Biol. Fertil. Soils 14: 61-66.

40. Por, F.D. 1984. The state of the art. En <u>Hydrobiology of the mangal</u>. Editado por F.D. Por e 1. Dor. Dr W. Junk Publishers, The Hage. pp. I-14.

41. Potts, M. 1979. Nitrogen fixation (acetyiene reduction) associated with communities of heterocystous and non-heterocystous blue-green algae in mangrove forests of Sinai. <u>Oecologia</u> 39: 359-373.

42. Potts, M. 1980. Blue-green algae (Cyanophyta) in marine coastal environments of the

Sinai Peninsula; distribution, zonation, stratification and taxonomic diversity. <u>Phycoloria</u> 19:60-73.

43, **Potts, M.** 1984. Nitrogen fixation in mangrove forests. En <u>Hydrobiology of the mangal</u>. Editado por F.D. Por e 1. Dor. Dr. W. Junk Publishers, The Hage. pp. 155-162.

44. Potts, M., y Whitton, B.A. 1980. Vegetation of the intertidal zone of the lagoon of Aldabra, with particular reference to the photosynthetic prokaryotic communities. <u>Proc. R</u> <u>Soc. Lond. B</u> 208:13-55.

45. Revsbech, N.P., Christensen, P.B., y Nielsen, L.P. 1989. Microelectrode analysis of pbotosyntbetic and respiratory processes in microbial mats. En <u>Microbial mats</u>: <u>physiological ecology of benthic microbial communíties</u>. Editado por Y. Cohen y E. Rosenberg. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp. 153-162.

46. **Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., y Stanier,** RY. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of **pure cultures** of cyanobacteria. <u>J. Gen.</u> <u>Microbiol</u>. **111**: 1-61.

47. Salinas, C.A., y Leyva, A.C. 1988. Base de datos pluviométricos, totales mensuales en Baja California Sur. <u>Informe Técnico. CIB</u>. pp 211.

48. Sheridan, R.P. 1991. Epicaulous, nitrogen-fixing microepiphytes in a tropical mangal community, Guadeloupe. French West Indies. <u>Biotronica</u> 23: 530-541.

49. Shilo, M. 1989. The unique characteristics of benthic cyanobacteria. En <u>Microbial mats:</u> <u>physiological ecology of benthic microbial communities</u>. Editado por Y. Cohen y E. Rosenberg. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp. 207-213.

SO. Stal, L.J., Grossberger, S., y Krumbein, W.E. 1984. Nitrogen fixation associated with the

65

cyanobacterial mat of a marine laminated microbial ecosystem. Mar. Biol. 82: 217-224.

51. Stal, LJ., y **Krumbein,** W.E. 1985. Isolation and characterization of cyanobacteria from a marine microbial mat. <u>Bot. Mar.</u> 18:111-125.

52. Stewart, W.D.P., Fitzgerald, C.P., y Burris, R.H. 1967. In situ studies on N_2 fixation using the acetylene reduction technique. Poc. Nat. Acad. Sci. USA 58: 2071-2078.

53. Stewart, W.D.P. 1973. Nitrogen fixation. En <u>The biology of blue-green algae</u>. Editado por N.G. Carr'y B.A. Whitton. University of California Press. pp. 260-278.

54. Tandeu de Marsac, N., y Houmard, J. 1988. Complementary chromatic adaptation. Physiological conditions and action spectra. <u>Methods in Enzimology</u> 167: 318-328. Academic Press. San Diego.

55. Tang, W.H. 1994. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of fide. En <u>Improving plant oroductivity with rhizosphere bacteria</u>. Editado por M.H. Ryder, F.M. Stephens y G.D. Bowen. Division of soils CSIRO, Australia.pp. 267-273.

56. van der Valk, A.G., y Attiwill, P.M. 1984 Acetylene reduction in an<u>Avicennia marina</u> community in Southem Australia. <u>Aust. J. Bot.</u> 32: 157-164.

57. Villbrandt, M., Krumbein, W.E., y Stal, LJ. 1991. Diumal and seasonal variations of nitrogen fixation and photosynthesis in cyanobacterial mats. <u>Plant Soil</u>. 137: 13-16.

58. Zuberer, D.A., y Siher, W.S. 1974. Mangrove-associated nitrogen fixation. En <u>Proceedings of International Symposium on Biology and hlanaeement of Mangroves</u>. Editado por G. Walsh, S. Snedaker y H. Teas. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. pp. 643-652.

59. Zuberer, D.A., y Silver, W.S. 1978. Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction)

associated with Florida mangroves. Appl. Environ. Microbiol. 35: 567-575.

60. Zuberer, D.A., y Silver, W.S. 1979. N₂ fixation (acetylene reduction) and the microbial colonization of mangrove roots. <u>New Phytol</u>. 82: 467-471.

61. Zuberer, D.A. 1984. Microbial colonization of some duckweeds (lemuaceae): examination

by scanning and transmission electron and light microscopy. Aauat. Bot. 18: 275-285.

ANEXOS

Publicaciones realizadas en el presente trabajo.

Toledo, G., y Basban, Y. 1994. Nitrogen fixation in black mangroves by associative cyanobacteria. En <u>Improving plant productivity with rhizosphere bacteria</u>. Editado por M.H. Ryder, P.M. Stephens y G.D. Bowen. Division of Soils CSIRO, Australia. pp. 59-60.

Toledo, G., Basban, Y., Holguin, G., Vazquez-Correa, P., y López-Cortés A. 1994. Nitrogew fixing and phosphate solubilizing bacteria in mangrove communities. En <u>Transactions of</u> <u>The 15th World Congress of Soil Science</u>. Editado por J.D. Etchevers. International Society of Soil Science, 4b: 219-220.

Toledo, G., Basban, Y., y Soeldner, A. 1994. Interaction between cyanobacteria and black mangroves in Northewestem Mexico I: Colonization, diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. Sometida a publicación a <u>Can. J. Microhiol</u>.

Toledo, G., Basban, Y., y Soeidner, A. 1994. Interaction hetween cyanobacteria and hlack mangroves._II: Increased nitrogen fixation and coionization of plantlets inoculated with filamentous cyanobacteria. Sometida a publicación a <u>Can. J. Microbio</u>;.

Presentaciones en conferencias internacionales.

Durante el desarrollo de la presente tesis se presentaron avances en diversas reuniones científicas.

Sixth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legums, en Egipto del 6 al 10 de Septiembre de 1993. En la mencionada conferencia se presentó un poster y se anexa el resumen publicado en las memorias de la reunión, titulado "Diazotrophic activity of cyanobacteria associated with the black mangrove (Avicennia germinans).

V Congerso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Celebrado del 27 de Septiembre al 1 de Octubre de 1993. En esta reunión en la ciudad de La Paz, México, se presento de manera oral el trabajo 'Actividad diazotrófica de cianobacterias asociadas a raíces de mangle negro Avicennia germinans¹, ademas de mi participación como moderador en la sesión "Ecología y manejo de lagunas costeras" en el mismo evento.

Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. En Adelaide, South Australia. del 7 al 11 de mano de 1994. Se elaboro un poster referente a la actividad promotora de crecimiento de cianobacterias en plántulas de mangle negro bajo el título :"Nitrogen fixation in black mangroves (Avicennia germinans) by associutive cyanobacteria".

15th Worfd Congress of Soil Science, celebrado en Acapulco, México, del 10 al 16 de julio del presente ano. Se presentó el trabajo **"Nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in mangrove communities"** a manera de cartel.

Distinciones recibidas

Nominación por el CICIMAR como candidato a la Presea Lázaro Cárdenas-IPN por haber obtenido el mejor promedio de calificaciones (9.67 nueve punto sesenta y siete) durante mi estancia en el Centro.

El poster presentado en el 15th World Congress of Soil Science, recibió una mención entre los mejores 6 posters del evento. La distinción fue otorgada por el Dr. James M. Tiedje, Profesor Distinguido de la Universidad de Michigan, y Director del Centrode Ecología Microbiana.

IMPROVING-PLANT-PRODUCTIVITY WITH RHIZOSPHERE BACTERIA

Editors M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen.

IMPROVINGPLANTPRODUCTMTY WITH RHIZOSPHEREBACTERIA

.

Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

.

Adelaide, South Australia, March 7-11 1994

Edited by M. H. Ryder, P. M. Stephens and G. D. Bowen



Nitrogen fixation in black mangroves (Avicennia germinans) by associative cyanobacteria

G. Toledo ^{1,2} and <u>Y. Bashan¹</u>

¹Department of Microbiology. The Centre for Biological Research (CIB) P.O Box. 128. La Paz, B.C.S. Mexico 23000 ²Department of Experimental Biology. Interdisciplinary Centre for Marine Sciences (CICIMAR), P.O. Box 592. La Paz, B.C.S. Mexico 23000.

Summary. The interaction between Plant Growth-Promoting Cyanobacteria (PGPC) and mangroves was studied in a coastal lagoon of Baja California Sur. Mexico. Wkn inoculated on mangrove seedlings, cyanobacteria isolated from rk surface of aerial roots (pneumatophores) significantly increased nitrogen fixation and visibly promoted plant growth. In situ measurements of mitrogen fixation on the intact pneumatophores in the lagoon revealed that diazotrophic activity is possibly related to sunlight and oxygen concentration, being lowest at midnight and highest at morning and late afternoon. Different species of cyanobacteria have different attachment preferences to surfaces in the mangrove ecosystem, preferring living aerial roots and sediment to glass or deadwood. This is the first repon of PGPC in tk mangrove ecosystem.

Introduction

The coastal lagoon, some of which support dense mangrove forests, is one of the most productive arnas in the marine environment because it supports a complex plant and animal community, many of which are economically and ecologically important.

The terrestrial nutrient contribution to the lagoon is nil, and soluble nitrogenous compounds in the lagoon are low because of low rainfall on the Baja California peninsula. Nevertheless, the mangrove forest is very healthy and shows no signs of nitrogen deficiency, indicating the possible activity of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in general, and diazotrophic activity in particular. Indications for the latter were previously documented (Holguin *et al.*, 1992).

The aim of this study was to identify and clarify the role of diazotrophic cyanobacteria closely associated with black mangrove trees.

Materials and Methods

The distribution pattern of cyanobacteria on the surface of pneumatophores was done by phase contrast and epifluorescence microscopy over a five month period.

In situ nitrogen fixation activity in black mangroves growing at Balandra lagoon was measured by modifying of the method Of Li et al. (1992) over intact and excised pneumatophores. The intact pneumatophon was inserted into a tube hermetically sealed at the bottom with a layer of latex and with a rubber stopper tightly closed with a hollowed plastic screw cap at the top. Excised pneumatophores were incubated in screw-cap test tubes with a rubber stopper. Nitrogenase activity was assayed by acetylene reduction by collecting subsamples of 1 mL with a syringe every 4 h. and relating activity to the chlorophyll a content on the pneumatophore surface, which represents the amount of cyanobacteria. Negative controls were obtained by incubating exased pneumatophores under the same conditions but injected with 1 mL of 5% TCA for nitrogenase deactivation. Simultaneously, temperature, light intensity. pH. and O_2 concentration in the adjacent water were measured.

Results are expressed as an average of ten replicates in an experiment conducted in June of 1993 (Fig. 1).

Results

Phototrophic diazorophs (cyanobacteria and purple sulfur bacteria) grew epipbytically over partially submerged surfaces of the red, white and black mangroves. On the pneumatophores of the black mangrove, three cm above the sediment, we consistently observed communities of the cyanobacteria Lyng bya sp. and Oscillatoria sp. Between three and seven cm above the sediment, we found Microcoleus sp. and above that, Aphanothece sp. A biofilm composed of 99% cyanobacteria Anabaena sp. grew on the surrounding sediment. In situ experiments with glass and wood surfaces simulating pneumatophores showed no attachment of cyanobacteria as to the aerial roots (data not shown). One strain of Anabaena formed a biofilm on the surrounding soil surface. We also found one Microcoleus strain and five hetcrotrophic bacteria belonging to the genera Aeromonas, Pseudomonas, and Agrobacterium associated with the pncumatophore surface.

Nitrogen fixation on mangrove pneumatophores proved to be light dependent. The lowest nitrogen fixation was measured at midnight, and the highest was measured during relatively low light intensity in the momings and afternoons. The low activity was accompanied by low oxygen concentration, low temperature and lower pH values (Fig. 1).

Conclusions

1) Diazotrophic PGPC increased the nitrogen fixation of inoculated seedlings. 2) There appears to be attachment of diazotrophic cyanobacterial populations to the pneumatophores of the black mangroves but not to glass or dead wood. 3) Nitrogen fixation on the pneumatophore surface is influenced by light intensity and appears to be activated by low oxygm concentrations at midnight. 4) Since Avicennia plants grow in the high tide zone of the mangrove community where



Figure 1. In situ nitrogenase activity (ARA) during 24 hoor cycles performed in June 1993, and the corresponding environmental conditions.

pneumatophores are unsubmerged for long periods, niaogen fixed by the cyanobacteria may be assimilated by the trees and not washed away by the tides. 5) This is the first report of PGPC in the mangrove ecosystem.

Acknowledgments

We thank Mr Dariel Tovar Mr Ariel Cruz and Miss Dalia Gómez for excellent technical assistance, and Mr Roy Bowers for careful English corrections. Yoav Bashan participated in this study in the memory of the late Mr Avner Bashan from ISRAEL. Gerardo Toledo was supported by grant 839 16 from CONACyT and 93018 from CICIMAR-PIFI.

References

Holguin, G., Guzmán, M. A. and Bashan, Y. (1992). Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiolog Ecology* 101.207-216.

Li, C. Y., Massicote, H. B. and Moore, L. V. H. (1992). Nitrogenfixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-k tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil* 140, 35-40.



VOLUME 4b: COMMISSION III: POSTERSESSIONS

Transactions

15th World Congress of Soil Science 15 Bodenkundlicher Weltkongress 15^{ème} Congrès Mondial de la Science du Sol 15° Congreso Mundial de la Ciencia del Suelo 6

Symposium ID-25. Biological Nitrogen Fixation (BNF) for Sustainable Agriculture.

A study of genetic background of rice bacteria-associated N ₂ fixation using ¹⁵ N dilution method. P. Wv. and J.K. Ladha. (Philippines)	181
The interaction of herbicider and heterotrophic N ₂ fixation in the rhizosphere of field grown rice. D.N. Nayak, and P.K. Mahana. (India)	183
Potentials of associative nitrogen fixation for sustainable rice cultivation. V. Rajaramamohan. T.K. Adhya, C.K. Paınaik, and P.K. Kanungo. (India).	185
Nitrogen fixation associated with non-legumes in vegetable growing agriculture. V.T. Emisev. (Russia).	187
Effect of management protices on biological N_2 fixation: an attempt to quantify root contribution inalley farming. N. Sanginga. S.K.A. Danso. and F. Zapata. (Nigeria/Austria).	189
Biological nitrogen fixation and phosphorus requirements of Azollanative of Venezuela. R. Gutterrez. and Y. Espinoza. (Venezuela)	190
Azolla biofertilizer technology for sustainable rice farming. S. Kannaiyan. (India)	192
Flood tolerant legume green manure for sustainable rice production in Sri Lanka. S.A. Kulasooriva, G. Seneviraine, I.M. Samarakoon. and W.L. Wcerakoon. (Sri Lanka).	194
Production of Rhizobium inoculants for Phaseolusvulgaris in Cuba. G. Hernandez, A. Gonzalcz, V. Toscano, M. Sánchez, and H. Vázquez, (Cuba),	196
Nitrogen fixation of common bean (Phaseolus vulgaris L.). cultivars at different levels of available phosphorus. D.P. Beck. and V.D.P. Vadez. (Colombia)	198
Biomass production and BNF responses to low phosphorus conditions by leguminous crops. K. Fujita, J.J. Adu-Gyamfi, D. Yoshizawa, and I. Chaudhary, IIapan).	200
Influence of some herbicides on the symbiotic nitrogen-fixation in soybean. R. Donkova. and D. Chanova. (Bulgaria).	202
Effect of inocularion with Sinorhizobium/redii and fertilization with different forms of mineral nitrogen upon N- fixation and production. S. Redzepovie, S. Tucakovic, B. Varga. and S. Sikora, (Croatia).	204
Diazotrophs, Rhizobium promotegrowth of Triticum spp. S.K. Kavimandan, A. Singh. S.K. Shivankar R. Sing, and S. Sengal. (India).	206
The use of 15 N to assess the effect of phosphorus on N ₂ fixation and transfer in medic/wheat crop rotation and mixture. <i>M.Ismaili. and KICE abbad. (Morocco)</i>	208

Nitrogen Fixing and Pbosphate Solubilizing Bacteria in Mangrove Communities

Introduction. Coastal laqoons colonized by mangrove trees are one of the most important ecosystems in the marine environment. The nangrove trees provide organic matter to the ecosystem and to adjacent waters in the form of detritus uhich is used as food for many marine animals of commercial interest like oysters, shriaps and fish. Thus nangroves, by providing detritus to the system, support an extensive food chain. They also serve as a breeding refuge for many valuable marine and terrestrial species.

The arid climate of the Baja California peninsula, (Mexico) does not produce enough run-off to bring terrestrial nutrients to the lagoons, thus concentrations of soluble nitrogenous compounds are low. Nevertheless, the nangrove forests look "jungle-like" and show no signs of nitrogen deficiency, indicating the possibility of diatotrophic activity in this environment. Two species of *new* diazotrophic bacteria known as fish pathogens, were identified in the roots of mangrove seedlings (Holguin et al. 1992). Additionally, three unidentified nitrogen fixing bacteria were isolated from the rhizosphere of severa). nangrove species.

Phosphate rock deposits are **common in** southern Baja California, but **the** phosphate **must first be solubilized before it is** available to the manqrove plants. After a bacterial enrichment **process, twelve** phosphate **solubilizing** bacteria and **two** phosphate solubilizing fungi **were** isolated and purified from the rhirosphere of black mangrove seedlings after bacteria?. enrichment. Several isolates solubilitedthe rock through the production of acids, while the others **operated via an** unidentified mechanism(s).

Materials and Methods. Nitrogen fixing and phosphate solutiliring bacteria wereisolated from Balandra bay, 25 Km north of La Paz, Baja Cal ifornia Soz.

Results and Discussion. The rhizosphere of mangrove plants is composed of a large variety of bacteria. Several morphotypes of these bacteria were isolated and purified. One of these isolates, <u>Stachylococcus</u> sp, (apparently a new species) enhanced the nitrogen fixing capacity of several species of nitrogen-fixing bacteria from either mangrove rhizosphere (Holguin et al. 1902) or from terrestrial origin like <u>Azospirillum</u> (Holguin et at. 1993).

Cyanobacteria were observed growing epiphytically over exposed surfaces of the red, -hite and black mangroves. Phototrophic diazotrophs (purple and green sulfur bacteria) were observed to be growing on submerged sections of aerial roots (pneumatcphores) and in the sedinents. On the aerial roots of the black mangrove, three cm

the fate and use efficiency of N as Sesbania rostrata green manure and urea in lowland rice soil. T.K. Biswas, S.K. De Datta, and D.K. Das. (India).	210
Construction and characterisation of NIF and GLN a linked mutations of the N ₂ -fixing cyanobacterium Nostoc muscorum. A. Dixir. R. Srivastava. and D.V. Amla. (India)	212
Recombinant D NA approaches to optimize the nitrogen biofertilizer potential of cyanobacteria in stress situation. S.K. Apte. (India).	214
Enhancement of BFN (biological nitrogen fixation) in tropical soils by VAM fungi. M.H. Ahmad, K. Daniels-Hylton, T.R. Thiagarajan, and 1. Lemonius. (Jamaica)	216
In vitro selection of plant genotypes and bacterial strains to use in the field for improving biological nitrogen fixation in rice. M. Rahman, M. Kabir, T. Heulin, J. Balandreau. (Bangladesh).	217
Nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in mangrove communitiu. G. Toledo.Y. Bashan.G. Holguin. and P. Vázquez-Correa. (Mexico)	219

above the sediment, we consistently observed communities of the cyanobacteria <u>Lvngbva sp</u>. and <u>Oscillatoria sp</u>. Between three and seven cm above the sediment, we found <u>Microcoleus sp</u>. and above that, <u>Aphanothece sp</u>. This distribution pattern was consistent, as confirmed by phase contrast and epifluorescence nicroscopy over a five month period. A biofilm cocposed of 99% cyanobacteria <u>Anabaena</u> sp. grew on the surrounding sediment. <u>In situ</u> experiments on cyanobacterial attachment to glass, wood and root surfaces showed preference to aerial roots.

In field measurements, we detemined overall nitrogen fixing activity of the nangrove cyanobacterial populations on intact and excised pneumatophores. Our results showed that nitrogen-fixation on the pneumatophores, either intact or excised, occurs mainly during daytime with two activity peaks: one in the morning and the other in the afternoon when light intensity in the swamp is relatively low (400 μ E m⁻² Sec⁻¹). At nidday, with light intensities reaching as high as 1800 μ E m⁻² Sec⁻¹, the nitrogen fixation activity decreased. The lowest values were monitored at midnight; however, an increase in nitrogen fixation began during the pre-dawn hours, which suggests cyanobacterial anticipation of the light energy.

Black mangrove pneumatophores are exposed nany hours a day to dry conditions since the plants are in the outer zone of the mangrove community and only occasionally subnerged. Nevertheless, this does not affect the nitrogen-fixing activity of the cyanobacteria, which occurred regardless of the tide cycle, water tenperature, salinity or Ph. Thus, as the bacteria are attached to the pneumatophores, nitrogenous compounds can essentially diffuse from the bacteria to the plant and not be diluted or washed away by the tides. These results indicate that cyanobacteria associated with the black mangrove pneumatophores may contribute nitrogen to the nangrove plants.

To evaluate diazotrophic activity in pure and sixed culture, we isolated one strain of <u>Microcoleus</u>sp., five heterotrophic bacteria associated to the pneumatophores of the black nangrove, and a strain of <u>Anabaena</u>sp. froa the biofilm on the surrounding sedinent. Nitrogen fixing activity of these strains is currently being compared to field experimental data to evaluate their total nitrogen contribution to the mangrove ecosystem.

We propose that nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing microorganisms may contribute macro-nutrients to the nancjrove community and in so doing, contribute to the well being of this ecosystem.

Literature cited

- Holguin, G., M.A. Guzman, and Y. Bashan. 1992. Two new nitrogenfixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere <u>Staphylococcus</u> sp. FEMS Microbiol. Ecol. 101: 207-215.
- Holguin, G., and Y. Bashan. 1993. Increasing the nitrogen-fixing activity Of <u>Azospirillum</u> by mixed culturing with <u>Staphylococcus</u> sp. In: New Horizons in Nitrogen fixation. (eds). R. Palacios, J. Mora, W.E. Newton. Kluwer Academic Pub. The Netherlands. p. 725.

1 Interaction between cyanobacteria and black mangroves in Northwestern 2 Mexico. I: Colonization, diurna; and seasonal nitrogen fixation on aerial roots.

3 GERARDO TOLEDO'.', YOAV BASHAN^{1*}, AND AL SOELDNER³

4¹Department of Microbiology. The Center for Biological Research (CIB). P.O. Box 128. La 5 Paz. B.C.S.. Mexico 33000

6² Experimental Biology Laboratory Interdisciplinary Center for Marine Sciences (CICIMAR).
7 P.O. Box 592. La Paz. B.C.S., Mexico 23000

8³ Electron Microscopy Facility Department of Botany and Plant Patholow. Oregon State 9 University. Corvallis, Oregon. 9733 1-2902, USA

- 10 ...Author to whom correspondence should be addressed.
- 11 FAX: 52112-547-10; E-mail: bashan@cibnor.conacyt.mx
- 12 Number of figures: 9

Toledo, G., Bashan, Y., and Soeldner. A. 1994. Interaction between cyanobacteria and black
 mangroves in Northwestem Mexico 1: Colonization, diurnal and seasonal nitrogen fixation on
 aerial roots. Can. J. Microbiol. 000-000.

Nitrogen fixation and colonization by associative cyanobacteria in aerial roots 4 5 (pneumatophores) of black mangrove trees was evaluated in situ at Balandra lagoon, Baja California Sur, Mexico for 18 consecutive months. Year round zonation of cyanobacterial 6 7 colonization was determined along the pneumatophores. The bottom part, close to the sediment, was colonized mainly by non-heterocystous filamentous cyanobacteria resembling Lyngbya sp. 8 9 and Oscillatoria sp. The central zone was colonized mainly by filaments resembling Microcoleus 10 sp. and the upper part by coccoidal cyanobacteria within defined colonies resembling 11 Aohanothece sp. mixed with filamentous cyanobacteria. Two cyanobacteria strains isolated from 12 the pneumatophore were efficient diazotrophs. Massive sheath production along the 13 pneumatophore was evident throughout the observation period. The surrounding sediment was 14 seasonaly dominated by heterocystous Anabaena sp. Glass and dead-wood surfaces incubated 15 for 18 months in the pneumatophore vicinity showed no zonation in the colonization pattern, 16 although they were heavily colonized too.

17 In situ N_2 -fixation followed seasonal and diurnal pattems. N_2 -fixation was low during 18 winter, increased in early summer, and reached its peak in mid summer. Diumal N.-fixation in the 19 summer showed two peaks; one in the moming until mid-day and the second in the late 20 afternoon. N_2 -fixation was at its lowest levels during mid-night. Light and water-temperature, 21 together with oxygen as a secondary factor, are probably the main environmental factors 22 governing N.-fixation on the pneumatophores.

- We propose that the populations of diazotrophic cyanobacteria colonizing the
 pneumatophores are associated with N₂-fixing activity in this microenvironment.
- 3
- 4 Key words: <u>Avicennia germinans</u>, black-mangrove, diazotrophic cyanobacteria, nitrogen
 5 fixation, pneumatophore.
- 6

- 1 We propose that the populations of diazotrophic cyanobacteria colonizing the 2 pneumatophores are associated with N_2 -fixing activity in this microenvironment.
- 3
- 4 Key words: <u>Avicennia germinans</u>, black-mangrove, diazotrophic cyanobacteria, nitrogen
 5 fixation, pneumatophore.
- 6

k

1 Introduction

2 Many coastal lagoons in the tropics and subtropics support dense mangrove forests. These 3 forests are the dominant features of the lagoons and one of the most productive areas in the 4 marine environment, supporting large plant and animal communities, many of which are 5 economically and ecologically important (Jones 1992; Bunt 1992). Additionally, mangrove 6 forests export considerable amounts of carbon and nitrogen to the coastal waters (Boto and 7 Robertson 1990).

8 There are two types of mangrove communities (mangals); estuarine soft bottom and 9 euhaline-methaline hard bottom (Por 1984). Those of Baja California Sur are methaline and have 10 shrub-like trees and transparent water. The mangrove community in our study area at Balandra 11 lagoon is composed of three plant species, the red mangrove (<u>Rhizoohora mangle L.</u>), the white 12 mangrove (<u>Laguncularia racemosa Gaertn.</u>) and the black mangrove (<u>Avicennia eerminans</u> (L.) 13 Stem), similar to Florida's mangroves (Zuberer and Silver 1978). Only the later species has 14 dense aerial roots (pneumatophores).

15 The sub-tropical mangrove forests on the Mexican Pacific Ocean side, together with 16 Florida's forests at approximately the same latitude on the Atlantic Ocean side, represent the 17 most northem distribution of mangroves in the hemisphere. Although both locations contain the 18 same plant species, they do not share the same environmental conditions. The climate and 19 mangrove growth conditions in Baja California strongly resembles that of the Sinai peninsula in 20 Egypt. yet the mangroves there have different plant species (Potts 1979). Due to the dry desert 21 conditions prevailing in Baja California peninsula (approximately 100 mm annual rainfall), the 22 terrestrial nutrient contribution to the lagoons from runoff is nil, and the level of nitrogenous

4

compounds is low. For example, total nitrogen content in the sediment of subtropic Balandra
 lagoon, is 0.041%. The soluble organic nitrogen in mangrove sea-water is 6.3 g N l⁻¹. The
 ammonia level is 3.3 g 1" in mangrove sea-water and 5 g l⁻¹ in the sediment (Holguin et al. 1992).
 These conditions are similar to those in tropical mangrove sediments (Alongi and Sasekumar
 1993). Paradoxically, the mangrove forest in Balandra lagoon shows no visible signs of nitrogen
 deficiency, is extremely dense, and apparently, is as self-sustaining in nitrogen as the Sinai
 mangroves (Potts 1984).

8 Nitrogen fixation in mangroves, first described by Zuberer and Silver (1978; 1974), is well 9 documented in several different mangrove communities (Potts 1984; Hicks and Silvester 1985; 10 van der Valk and Attiwill 1984), but rareiy with any particular reference to certain 11 microorganisms (Holguin et al. 1992). In relation to cyanobacteria, the only information 12 available is from the Sinai mangroves (Potts 1984).

Diurnal and seasonal diazotrophic activities vary in different mangals pending on many biotical factors (Potts 1979) and abiotical vehicles (Sheridan 199 1). Light seems to be a prime factor in several mangals (Alongi et al. 1992; Bohlool and Wiebe 1978; Gotto and Taylor 1976; Jones 1992; Potts 1979; Potts and Whitton 1980) and salt marshes (Griffiths et al. 1987).

Diazotrophs have been found on mangrove leaf and root litter. live roots and on the surrounding sediments (van der Valk and Attiwil 1984). Cyanobacterial mats cover the sediment surrounding mangrove trees (Gotto and Taylor 1976; Hussain and Khoja 1993). Many cyanobacterial species like <u>Microcoieus sp.. Lyngbya sp..</u> and <u>Oscillatoria sp. are common place</u> in different mangrove forests. while others are location specific. Dominance of heterocystous forms over non-heterocystous forms was observed for several mangals (Potts 1979). However, the non-heterocystous forms were the dominant diazotrophs in microbial mats from North
 Carolina (Ben-Porath and Zehr 1994) and from the North Sea (Stal et al. 1984).

The aerial roots (pneumatophores) of black mangroves are essential plant structures which 3 exchange gases for the plant in an otherwise anaerobic sediment (Dawes 198 1). During the tidal 4 5 cycles, these roots are submerged part-time, and there by subjected to colonization by marine micro-and macro organisms (Por 1984). Information on nitrogen fixation and colonization of 6 pneumatophores is scarce (Potts 1984). There is species zonation along the pneumatophores of 7 8 the black mangrove and on prop roots of the red mangrove in Sinai and Aldabra island in the tropics (although sharing the same common name, they are different plant species from those in 9 10 Balandra lagoon) where they form dense crusts (Potts 1979; 1980; Potts and Whitton 1980). But cyanobacterial colonization might be more important in black than in red or white mangrove 11 because of the high production of sloughing cells and mucigel (Zuberer and Silver 1979) which 12 may support formation of dense epicalous crusts (Sheridan 1991). 13

The aims of this study were: (i) to **locate** cyanobacteria dominant groups along the black mangrove pneumatophores. and (ii) to **measure** the diumal and **seasonal changes** in <u>in situ</u> **nitrogen** fixation activity **occurring on** these pneumatophores. Short accounts were presented elsewhere (Toledo and Bashan 1994, Toledo et al. 1994).

l Material and Methods

2 Sampling site and oneumatoohore collection

3 The Balandra coastal lagoon lies 25 Km north of La Paz, Baja California Sur, Mexico, 4 and has an intensive, intact mangrove forest. Its exact geographical location and our sampling 5 sites were previously described in detail (Holguin et al. 1992). Ten black mangrove (<u>Avicennia</u> 6 <u>germinans(L.)</u> Stem) pneumatophores (aerial roots) were collected at each sampling date in 7 November 1992, in May and June, 1993 and in April, 1994, by cutting them with a scalpel from 8 their emerging sites in the sediment, 3 cm below soil surface. They were immediately transferred 9 to the lab in sterile screw-capped test tubes. The pneumatophore surface was analyzed (from top 10 to bottom) on the same collection day by cutting several small samples of the bark surface from 11 each part of the pneumatophore. Then each sample was observed by phase contrast microscopy 12 to determine microorganism colonization.

13 Isolation and identification of cvanobacteria

We studied pneumatophores ranging from 10 to 17 cm long and which were obtained 15 from different trees. The filamentous cyanobactetia was isolated from a l cm' piece of 16 pneumatophore bark in solid (1.2% agar w/v) ASN-III medium. The medium composition was (g 17 l⁻¹): NaCl25, MgCl₂·6H₂O 2. KCI 0.5. NaNO₃ 0.75, K₂HPO₄ \leq \leq 3H20. 0.02, MgSO₄·7H₂O 3.5. 18 CaCl₂·2H₂O 0.5, Na₂CO₃ 0.02. and (mg l⁻¹) of Ferric arnmonium citrate 3, Na₂-citrate·2H₂O 3, 19 Na₂-EDTA 0.5, Vitamin B 12 0.02, and (µg l⁻¹) H₃BO₃ 2.86, MnCl₂·4H₂O1.81, ZnSO₄·7H₂O 20 0.222, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39, CuSO₄·5H₂O 0.079, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.0494, (Rippka et al. 1979) 1 supplemented with 50 μ g ml⁻¹ of cycloheximide (Aldrich, USA) to inhibit growth of eukaryotic 2 organisms. The medium was sterilized by autoclave, and its final pH was adjusted to 7.6.

In Baja California lagoons, as elsewhere in marine microbial mats, cyanobacterial 3 4 colonization of surfaces is always associated with heterotrophic bacteria (Bebout et al. 1993; 5 López-Cortés 1990). To isolate the single filaments we used the method of Stal and Krumbein 6 (1985) as follows: seven days after placing the piece of bark on the solid medium, we collected 7 single filaments which had developed. This was done under a microscope using a sterile Pasteur 8 pipette to excise this filaments from the edges of the developing colonies. The filaments were 9 placed in the center of a fresh ASN-III agar-plate. Then, they were incubated at $22 \pm 1^{\circ}$ C under a 10 continuous light intensity of 50 μ molm⁻²s⁻¹ for an additional 10 days. This method is based on It the assumption that colony growth of filamentous cyanobacteria on solid medium is faster than 12 the swarming of the heterotrophic bacteria on this medium. By picking filaments from the colony 13 edge after serial transfers (5 to 10 repetitions of the procedure), it is possible to obtain 14 cyanobacterial morphotypes (strains). The isolated strains were further maintained on ASN-III 15 agar slants under the same incubation conditions for 3 months. Next, they were transferred to 16 N-free ASN-III for 2 days before evaluating their nitrogen fixation capacity by acetylene 17 reduction assay (described later). The cyanobacteria residing on the pneumatophores were 18 identitied according to the classification and morphotypes described by Rippka et.al. (1979) 19 under light and phase contrast microscopy. Filamentous cyanobacteria were assigned to each 20 morphotype group according to their cell morphology and size. The LPP group corresponds to 2 1 those filamentous non-heterocystous cyanobacteria which resembled Lyngbya sp., Plectonema

1 sp. or <u>Phormidium</u> sp. They were fürther classified as either type A or B according to their cell 2 shape, either disc-shape or cylindrical shape, respectively.

3 In situ measurements of diazotrophic activity in Balandra lagoon.

Nitrogen fixation in situ was evaluated by the acetylene reduction assay (APA) (described 4 5 later) in assemblies which were a modification of those designed to measure nitrogen fixation in 6 intact roots of Douglas-fir trees (Li et al. 1992). A drawing of this assembly is shown in Figure 1. 7 We cut off bottom of glass, screw cap test tubes (30 ml). Then, the upper part was hermetically 8 sealed by a rubber septum under the original plastic screw cap. The screw caps were 9 pre-punctured in the center to allow air sampling through the rubber septum with a lml syringe. 10 The test tube was then placed over the pneumatophore, and were sealed to its surface by two 1 1 layers of latex balloons, several layers of parafilm, and finally, by a water-resistant adhesive film. 12 Two thick wires were stuck in the mud close to each pneumatophore and were used to keep the 13 assembly up straight and to prevent its bending by tidal waves. Additional test assemblies were 14 checked for possible gas leaks by cutting the pneumatophore base (outside of the test tube), 15 submerging the assembly in a bucket of water, and injecting 30 ml of air with a sytinge to detect 16 any release of bubbles. To evaluate nitrogen fixation activity in the field. Iml of air from each 17 assembly was replaced by acetyiene. Later. 1 mlair samples were taken at 2-4 h intervals during 18 24 h. The air samples were first stored in 10 ml hermetically-sealed serum bottles kept in an ice 19 box in the field After each sampling period of 24 h, the samples were transferred to the 20 laboratory for gas chromatography analysis (described later).

Alternatively, N₂-fixation in excised pneumatophores was evaluated by cutting and incubating them in intact sterile test tubes with the same capping system. Negative controls (no nítrogenase activity) in tests using excised pneumatophores were obtained by rincing the pneumatophores within the tube in 2 ml of a solution of 5% trichloroacetic acid (TCA) (v_1/v) for 5 min. This treatment surface disinfected the pneumatophore. For intact pneumatophores (which were already placed in the assemblies), 5 ml of the same solution were applied. Additional positive and negative controls were assayed and included: dark incubations by covering the assemblies with aluminum foil, addition of glucose (0.1 g l⁻¹), assemblies containing only ethylene, or acetylene, or air, and pneumatophores incubated with air only.

The ethylene production (nitrogenase activity) of intact and excised pneumatophores was 10 compared by One-way Anafysis of Variance (ANOVA) to eliminate the possibility of measuring 11 "wound ethylene" created by the excision. No difference in ethylene production between intact 12 pneumatophore and excised pneumatophores was found, and they were statistically in the range 13 14 of $P \le 0.3499$. By using excised pneumatophores in addition to intact pneumatophores, we were able to increase the number of samplings and the number of replicates per field sampling since 15 16 excised pneumatophores assemblies were easier to handle in the muddy surroundingu of the mangrove swamp. However, regardless of the assembly type used, incubation was always under 17 18 the field conditions of the mangrove forest at Balandra lagoon.

19 Results are expressed as the average of ten replicates for each treatment and for each 20 sampling interval in all field experiments.

10

1 Acetvlene reduction assav (ARA)

Diazotrophic activity for pure cultures of cyanobacteria was measured in 70 ml serum 2 3 bottles. hermetically sealed with a rubber septum and containing 20 ml of N-free ASN-III medium. Acetylene reduction (nitrogenase activity) was assayed by replacing 1 ml of air with 4 pure acetylene. Ethylene production was evaluated by gas chromatography using a Varian 6000 5 gas chromatograph (Varian Instrument Group, USA) equipped with hydrogen flame ionization 6 detector (FID) (Stewart et al. 1967). The instrument operating conditions were as follows: a 7 stainless-steel column 150 x 0.2 cm was packed with Porapak N, 80/100, with a column 8 temperature of 50°C, temperature detector of 200°C, a nitrogen carrier gas and H₂ were used, 9 both at a flow rate of 25 mlmin⁻¹ and air flow rate of 300 mlmin⁻¹. The amount of ethylene was 10 expressed as nmol ethylene per µg chlorophyll a per ml (of culture or per pneumatophore) per 11 12 hour. Since the size of each pneumatophore was different, the volume of each pneumatophore was incorporated into the calculation of the total atmosphere within each assembly at each 13 14 sampling time. Since it is virtually impossible to measure the number of filamentous 15 cyanobacteria colonizing a pneumatophore. chlorophyll a content is commonly used to estimate 16 cyanobacterial mass (Potts 1979; Stal et al. 1984). We assumed the presence of chlorophyll <u>a</u> on the pneumatophore surface because: (i) we always observed by light microscopy the presence of 17 chlorophylla_on the predominant brown-gray pneumatophore surface, and (ii) the presence of a 18 chlorophyll a peak and the absence of other chlorophyll types in the absorption spectra (described 19 later) of pneumatophore extracts. The concentration of chlorophylla was calculated according to 20 21 the equations proposed by Tandeu de Marsac and Houmard (1988).

1 Measurements of environmental conditions during the incubation of pneumatophores.

Light intensity in the sampling site was measured concomitant with the gas sampling using a LI-Cor 188B Quantum radiometer-photometer (Li-Cor, USA). Water-temperature was determined using a digital Corning PS-6 (USA) thermometer with "L" type probe. Dissolved soxygen was measured in pool in the pneumatophore area with an oximeter YSI model 57 (Yellow Spring, Ohio, USA), and pH measurements were taken from the same place with a portable pH meter (Beckman model 2 1, USA).

8 Light and scanning electron microscopy (SEM) analysis of pneumatophores.

9 To observe the growth and the colonization of epiphytic microbial communities, 20 laboratory glass pipettes and 10 similar-sized dead-wood sticks were inserted into the mud close 10 to the pneumatophores and left there for 18 months. Their height above the sediment was similar 11 to those of natural pneumatophores. Periodical samples were taken every 3 months from glass, 12 wood and pneumatophore sur-faces. Excised pneumatophores and 2 cm' samples of these 13 materials were first observed by light microscopy and were further fixed for scanning electron 14 microscopy analysis. Fixation was done with Kamovsky fixative (2.5% glutaraldehyde, 2% 15 paraformaldehyde in sodium cacodilates buffer 0.2 M, pH 7.2). Samples were kept at 4°C in the 16 fixative until they were dehydrated by graded acetone series. Finally, they w-ere dried in a Critical 17 Point Drier (CPD Model CPD 020. Balzers Union, Liechtenstein), then attached to stubs with 18 19 glue. The dry samples were coated with both gold and gold-palladium mix, either in a Vacuum Evaporator (VE- 10 Varian, USA) or in a Sputter Coater (Edwards S 150B, England). We used a 20 21 AmRay model 1000-A (USA) at 10Kv for SEM analysis.

1 Experimental design and statistical analysis.

All in situ experiments were performed in ten replicates. A replicate consisted of a single 3 test-tube assembly or a separate determination of the environmental conditions. SEM analysis 4 was done in five replicates; each consisteti of a single stub. Statistical analysis was done by 5 One-way Analysis of variance (ANOVA) at $P \le 0.05$. Fitting models for the environmental 6 conditions were created by third order regressions with a Sigmaplot© software.

7 Results

8 Isolation and identification of cyanobacteria

9 The cyanobacterial community on the pneumatophore was dominated throughout the year 10 by homocystous filaments belonging to the morphotypes LPP-A resembling <u>Lyngbya</u> and 11 <u>Oscillatoria</u>, and by the morphotype LPP-B resembling <u>Microcoleus</u>.

Two strains were isolated. One strain was a LPP-B morphotype, showing filaments with 13 only vegetative cylindrical cells. The trichomes were straight, motile embedded in a sheath. On 14 pneumatophores. several filaments of these cyanobacteria were covered with a common sheath. 15 The filaments showed the typical arrow-shaped apical cells measuring 7-8 μ m by 5 μ m. This 16 morphotype resembled <u>Microcoleus sp. strain ATCC 29 128</u> (Rippka et al 1979). A second 17 isolate was a heterocystous strain, and was partially identified as <u>Anabaena</u> sp. The filaments 18 showed the presence of both intercalar differentiated cells and spherical to ovoid vegetative cells 19 measuring 5 μ m by 3 μ m. Non-motile trichomes were characteristic of this strain. and it 20 resembled <u>Anabaena cylindrica</u> strain ATCC 27899 (Rippka et al. 1979). Both strains were nitrogen fixers showing similar diazotrophic activity in culture, measuring about 109 nmoles
 2 ethyiene per μg chlorophylla ml⁻¹ per day.

3 Cyanobacterial colonization of black mangrove pneumatophores.

4 The main characteristic of the pneumatophore colonization was that all the surfaces were completely colonized by microorganisms, mainly cyanobacteria, diatoms, green algae and to a 5 lesser extend by bacteria. Not a single free surface on the pneumatophore was found (Fig. 2 6 7 B,C). In low magnification under light microscopy, or even by the naked-eye small marine fauna 8 such as nematodes and barnacles were also observed (data not shown and Fig. 2 D). Different cyanobacterial populations preferred to colonize particular sites along the pneumatophore. 9 Filaments of Lyngbya sp. and Oscillatoria sp. were always observed at the lower part of the 10 pneumatophores from the soil surface line upward to 3 cm (Fig. 2 A and Fig. 3 A,B). Above this 11 zone, <u>Microcoleus</u> sp. was the dominant microorganism, with a wider colonization zone of 12 about 7 cm in the central part of the pneumatophore (Fig. 2 A and Fig. 3 C,D). At the upper 13 portion (top 7 cm) of the pneumatophore, coccoidal cyanobacterial colonies resembling 14 Aphanothece sp. were observed year around (Fig. 2 A). However, in February 1993 they were 1.5 visibly more abundant. These colonies varied in size ranging from 16 µm (Fig. 4 A-C) to 135 µm 16 (Fig. 4 D), and were mixed with filamentous cyanobacteria in common sheaths (Fig. 4 D). They 17 may release single cells (for possibly fürther dispersal) from a cavity at the top of the colony (Fig. 18 4 D,E arrows at colony top). Most of the microorganisms in this area have well developed 19 sheaths as a common feature (Fig. 4). The zonation borders along the pneumatophore varied 20

slightly with the seasons, but the particular zonation (iower. central and high) was constant
 during the 18 months of sampling.

Colonization of glass pipettes submerged in the pneumatophore vicinity did not show the 3 zonation pattem observed on the pneumatophores. The colonization was random and was 4 dominated mainly by diatoms, possibly heterotrophic bacteria and green algae all mixed in a 5 sheath material (Fig. 5A,B, confirmation of chloroplast presence in the algae cells was done by 6 light microscopy). A few cyanobacterial LPP-A and LPP-B filaments were also present (Fig. 5 7 S A). Some areas were not colonized by any organism 18 months after the glass tubes were planted 9 in the mud (Fig. 5 B, arrow). This was in contrast to colonization of pneumatophores which are always completely covered with microorganisms (compare Fig. 5 B with Figs. 3 and 4). The 10 community on the glass was also very diverse. The wooden sticks were randomly colonized 11 12 from top to bottom by a mixture of filamentous cyanobacteria (resembling LPP-B morphotype) and by coccoidal colonies (Fig. 5 C,D). Like the glass, no zonation of colonization was detected 13 on the wooden sticks. Interestingiy, the microorganisms on the wood were different from those 14 observed on the glass surfaces nearby. Microcoleus sp., the common colonizer of 15 pneumatophores, was absent from either the glass or the wood sur-faces. Biofilms on the 16 17 surroundings sediment in the vicinity of the pneumatophores changed microbial composition with 18 the time of year. In November, 1993, the sediment was dominated by heterocystous Anabaena sp. (Fig. 6 A,B), while in the summer of 1993. no heterocystous cyanobacteria were found in the 19 20 same place (Fig. 6 C).

The absorption spectra of pigments extracted from the pneumatophore surfaces showed the distinctive peaks at 665 and 436 nm which are the characteristic of chlorophyll <u>a</u>. No

15

significant amounts of other chlorophylls were detected, indicating cyanobacterial colonization
 (Fig. 7).

3 In situ nitrogen fixing activity in pneumatophores

Diumal and seasonal changes in nitrogen fixation on the pneumatophores revealed the following observations. We found that the level of nitrogen fixation was seasonally determined. During the winter, (November 1993 and February 1994 samplings), the level of nitrogen fixation per 24 h periods was less than in early summer (May 1993 sampling), and it peaked in mid-summer (June 1993 sampling). Significant differences between the seasons were found in the daily-accumulated nitrogen fixation (Fig. 8).

Diurnal changes in N_2 -fixation during the winter were insignificant due to the low level of 11 nitrogen fixation detected and the relatively large variation within each sampling hour (Fig. 9 12C,F). However, during the summer season when significant amounts of nitrogen fixation were 13 detected. diurnal variation was evident. The two peaks of nitrogen fixation occurred from early 14 moming to mid-day and during the late afternoon. During the night. N_2 -fixation decreased 15 significantly, reaching minimal values around midnight (Fig. 9 LL).

From the four environmental parameters evaluated in the pneumatophore surroundings 17 (light intensity, water-temperature, osygen level and water-pH), the summer samplings gave 18 clear indication that N_2 -fixation was possibly associated with high light intensity and high water 19 temperatures. Peak N_2 -fixation activities were measured when the two variables coincided 20 (compare Fig. 9 G.J with I,L). Although it seems that light has a marked effect on the activity of 21 the cyanobacteria, water temperature was possibly a limiting factor. When the water temperature 1 was around 25 °C or lower, nitrogen fixation was reduced (Fig. 9 A,D,G) even in the presence of 2 sufficient light. Similarly, oxygen played an associative role together with light intensity and 3 water-temperature, but to a lesser extend. Nitrogen fixation on the pneumatophore was slightly 4 higher when the oxygen levels in the surrounding water was low. However, low oxygen levels in 5 the water during winter samplings did not increase nitrogen fixation on the pneumatophore (Fig. 6 9 B,E,H,K). The water pH had no effect on nitrogen fixation for all samplings. Although water 7 pH varied between the seasons, it was relatively constant within a a particular sampling date (Fig. 8 9 B,E,H,K).

9 A peculiar appearance of nitrogen fixation activity was during the pre-dawn hours during 10 the summer when the level of nitrogen fixation in these dark hours was even higher than the 11 levels of nitrogen fixation in the daytime winter samplings (Fig 9 I,L).

12 Discussion

Mangrove trees are thriving in Balandra lagoon in Baja California. Mexico, where there is 14 almost no input of nutrients from either the sea or the surrounding desert. In general, the 15 dissolved nitrogen in the lagoon water and the nitrogen in the sediment are not enough to fulfill 16 the requirements of the mangrove trees (Alongi and Sasekumar 1993; Zuberer and Silver 1978). 17 Thus. nitrogen tixation may play a role in the excellent health and density of these mangrove 18 forests.

19 Diazotrophic cyanobacterial mats have been found in several mangrove communities 20 worldwide (Alongi et al. 1992; Dor 1984; Hussain and Khoja 1993; Potts 1979; Potts 1984; 21 Potts and Whitton 1980: Sheridan 1991). Balandra lagoon also has cyanobacterial mats. in significant amounts of other chlorophylls were detected, indicating cyanobacterial colonization
 (Fig. 7)

3 In situ nitrogen fixing activity in pneumatophores

Diurnal and seasonal changes in nitrogen fixation on the pneumatophores revealed the following observations. We found that the level of nitrogen fixation was seasonally determined. During the winter, (November 1993 and February 1994 samplings), the level of nitrogen fixation per 24 h periods was less than in early summer (May 1993 sampling), and it peaked in mid-summer (June 1993 sampling). Significant differences between the seasons were found in the daily-accumulated nitrogen fixation (Fig. 8).

Diurnal changes in N_2 -fixation during the winter were insignificant due to the low level of nitrogen fixation detected and the relatively large variation within each sampling hour (Fig. 9 2 C,F). However, during the summer season when significant amounts of nitrogen fixation were detected. diurnal variation was evident. The two peaks of nitrogen fixation occurred from early moming to mid-day and during the late afternoon. During the night, N_2 -fixation decreased significantly, reaching minimal values around midnight (Fig. 9 LL).

From the four environmental parameters evaluated in the pneumatophore surroundings (light intensity, water-temperature, osygen level and water-pH). the summer samplings gave (lagr indication that N₂-fixation was possibly associated with high light intensity and high water temperatures. Peak N₂-fixation activities were measured when the two variables coincided (compare Fig. 9 G.J with I,L). Although it seems that light has a marked effect on the activity of the cyanobacteria, water temperature was possibly a limiting factor. When the water temperature
1 was around 25°C or lower, nitrogen fixation was reduced (Fig. 9 A.D,G) even in the presence of 2 sufficient light. Similarly, oxygen played an associative role together with light intensity and 3 water-temperature, but to a lesser extend. Nitrogen fixation on the pneumatophore was slightly 4 higher when the oxygen levels in the surrounding water was low. However, low oxygen levels in 5 the water during winter samplings did not increase nitrogen fixation on the pneumatophore (Fig. 6 9 B,E,H,K). The water pH had no effect on nitrogen fixation for all samplings. Although water 7 pH varied between the seasons, it was relatively constant within a a particular sampling date (Fig. 8 9 B,E,H,K).

9 A peculiar appearance of nitrogen fixation activity was during the pre-dawn hours during 10 the summer when the level of nitrogen fixation in these dark hours was even higher than the 11 levels of nitrogen fixation in the daytime winter samplings (Fig 9 I,L).

12 Discussion

Mangrove trees are thriving in Balandra lagoon in Baja California Mexico, where there is 14 almost no input of nutrients from either the sea or the surrounding desert. In general, the 15 dissolved nitrogen in the lagoon water and the nitrogen in the sediment are not enough to fulfill 16 the requirements of the mangrove trees (Alongi and Sasekumar 1992; Zuberer and Silver 1978) 17 Thus, nitrogen lixation may play a role in the excellent health and density of these mangrove 18 forests.

19 Diazotrophic cyanobacterial mats have been found in several mangrove communities 20 worldwide (Alongi et al. 1992; Dor 1984; Hussain and Khoja 1993; Potts 1979; Potts 1984; 21 Potts and Whitton 1980; Sheridan 199 1). Balandra lagoon also has cyanobacterial mats. in 1 addition to the extensive cyanobacterial colonization on black mangrove aerial roots. The 2 colonization of mangroves by cyanobacteria and other diazotrophs has been observed on leaves, 3 stems, or in falling plant parts (Gotto and Taylor 1976; van der Valk and Attiwill 1984; Zuberer 4 and Silver 1978; 1979).

5 We studied the cyanobacterial colonization of black mangrove pneumatophores for almost 6 2 years. The colonization was permanent and covered every surface of the pneumatophox The 7 data we obtained from the random colonization by the numerous microbial species on glass tuber 8 and on dead-wood sticks submerged in the pneumatophore vicinity add indirect evidence for the 9 affinity of certain cyanobacteria to colonize pneumatophores.

Zonation in colonization by marine microorganisms is a response to different Il microenvironmental conditions. This zonation can be endemic (composed of particular species 12 for one site and time), but the general community structure might be comparable to other 13 localities where other species colonize in more or less the same manner (Dor 1984; Potts 1979). 14 In the Sinai mangroves there was a vertical zonation along the pneumatophores by mainly 15 heterocystous cyanobacteria (Potts 1979; 1980). However. in Balandra lagoon we observed 16 zonation by non-heterocystous forms. The heterocystous <u>Anabaena</u> sp. formed a biofilm only on 17 the sediment around the pneumatophores but not directly on them. Furthermore, this biofilm was 18 short-lived and disappeared within 6 months while the pneumatophore non-heterocystous 19 colonization was a permanent one.

Analysis of populations of cyanobacteria showed that some species of Balandra lagoon are commonly found in different mangals of the world. <u>Microcoleus</u> sp. seems to be a universal colonizer in all cyanobacterial communities. whether in mangals or in microbial mats (Hussain

and Khoja 1993; Potts 1980; Stal et al. 1984) an also in our study. Other common
 cyanobacterial species like Lyngbva and Oscillatoria are also well distributed colonizers.
 However, their dominance is more site specific (Jones 1992; Stal et al. 1984).

4 The environmental conditions in Balandra lagoon change the rate of nitrogen fixation 5 which seems to be photo-and temperature dependent, although evidence of nildiurnal response 6 to light stimulation has been shown for Australian mangroves (Boto and Robertson 1990). In 7 Balandra lagoon, the summer diazotrophic activity resembled in occurrence and magnitude, that 8 of microbial mats composed mainly of non-heterocystous cyanobacteria in the North Sea 9 (Villbrandt et al. 199 1; Stal et al. 1984), and differed with N₂-fixation of microbial mats near 10 North Carolina where the main activity was detected in late night (Bebout et al. 1993). We 11 detected the first significant N₃-fixation activity from moming until midday and a second peak in 12 the late afternoon. The diurnal peaks we detected can not be explained solely by light because a gradual increase in N₂-fixation starts hours before sunrise. The effect of other parameters such as 13 14 root exudates, lower oxygen tension or wetting of the pneumatophore surface by moming dew 15 may start nitrogen fixation by either 1) other heterotrophic bacteria before dawn or 2) by the 16 existing populations of cyanobacteria utilizing storage products of photosynthesis from the 17 previous day (Bebout et al. 1993; Jones 1992).

High oxygen tension by itself has a deleterious effect on nitrogenase activity (Fay1992). Still. N₂-fixation was found under aerobic conditions on the pneumatophore surface. suggesting that colonizing diazotrophs have their own protecting mechanisms against oxygen inhibition. The seasonal and diurnal changes in N₂-fixation and in the environmental conditions measured in this study imply that the aerial nitrogen fixation occurring on the pneumatophores should be regarded 1 as an environmental multiparametric response rather than a single cause phenomena. At least two 2 factors, light intensity and water-temperature. are major parameters. while oxygen tension is a 3 secondary contributing factor. Black mangrove pneumatophores are submerged only several 4 hours daily depending on the tide, yet N₂-fixation occurs continuously. During the dry hours, the 5 fixed nitrogen is not washed away from the pneumatophore surface and may be absorbed into the 6 plant by the normal absorbing function of the pneumatophore. Naturally, this hypothesis should 7 be confirmed by ¹⁵N₂ tests which are difficult to perform under the constantly changing conditions 8 of this marine environment.

9 In conclusion, we describe the permanent zonation of cyanobacterial colonization on black 10 mangrove aerial roots in one of the northern most distributions of mangroves in the American 11 hemisphere. The diurnal and seasonal nitrogen fixation occun-ing on these pneumatophores. 12 reached its peak in the summer during the daylight hours.

13 Acknowledgments

We thank Mr. Jesús Alejandro Ostos Garcia, Delegado de la Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL. Baja California Sur. Mexico) for granting us a large part of Balandra lagoon as an experimental field. We appreciate the excellent technical assistance of Mr. Dariel Tovar. Mr. Ariel Cruz. Mr. Angel Carrillo and Miss Dalia Gómez. the artwork of Mr. Roberto Lomeli and Oscar Armendariz, the field photography of Mr. Sergio Rosas, the light microscopy advice of Mr. Alejandro López-Cortés, and the electron microscopy advice of Dr. Eugenia Klein, 20 Electron Microscopy Unit, The Weizmann Institute of Science, Israel. We also thank Mr. Roy Bowers for careful English corrections and Dr. C.Y. Li, USDA-Oregon for his advice on in situ
 measurements of N₂-fixation. Yoav Bashan participated in this study in the memory of the late
 Mr. Avner Bashan from Israel. Gerardo Toledo was partially supported by grants #839 16 from
 CONACyT and #930108 from CICIMAR-PIFI (Mexico).

5 **References**

- 6 Alongi, D.M., Boto, KG., and Robertson. A.I. 1992. Nitrogen and phosphorus cycles In
- 7 Tropical mangrove ecosystems. <u>Edited by</u> A.I. Robertson, and D.M. Alongi. American
- 8 Geophysical Union Washington DC, USA. pp. 251-292.
- 9 Alongi, D.M., and Sasekumar, A. 1992. Benthic communities. In Tropical mangrove
- 10 ecosystems. <u>Edited</u> by A.I. Robertson, and M. Alongi. American Geophysical Union.
- 11 Washington DC, USA. pp. 137-171.
- 12 Bebout, B.M. Fitzpatrick, MW. and Paerl, H.W. 1993. Identification of the sources of energy
- 13 for nitrogen fixation and physiological characterization of nitrogen-fixing members of a marine
- 14 microbial mat community. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1495-1503.
- 15 Ben-Porath. J. and Zehr, J. 1994. Detection and characterization of cyanobacterial nifH genes.
- 16 Appl. Environ. Microbiol. 60: 880-887.
- 17 Bohlool, B.B., and Wiebe, W.J. 1978 Nitrogen-fixing communities in an intertidal ecosystem
- 18 Can. J. Microbio₁. **24**:932-938.
- 19 Boto, K.G. and Robenson. A.I. 1990. The relationship between nitrogen fixation and tidal
- 20 exports of nitrogen in a tropical mangrove system. Estuar. Coast. Shelf Sci. 31: 53 I-540.

1 Bunt, J.S. 1992. Introduction. In Tropical mangrove ecosystems. Edited by A.I. Robertson

2 and M.Alongi American Geophysical Union. Washington DC, USA. pp. 1-6.

3 Dawes, C. 198 I. Marine Botany. John Wiley and Sons. USA.

4 Dor, I. 1984. Epiphytic blue-green algae (cyanobacteria) of the Siani mangal: considerations on

5 vertical zonation and morphological adaptations. In Hydrobiology of the mangal. Edited by F

6 D. Por, and 1. Dor. Dr W. Junk Publishers. The Netherlands. pp. 35-53.

7 Fay, P. 1993. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiol. Rev. 656:

8 340-373

9 Griffiths, M.S.H., Gallon, J.R., and Chaplin, A.E. 1987. The diurnal pattern of dinitrogen fixation
by cyanobacteria in situ. New Phytol. 107: 649-657.

11 Gotto, J.W., and Taylor, B.F. 1976. N₂ fixation associated with decaying leaves of the red

12 mangrove (<u>Rhizoohora mangle</u>). Appl. Environ. Microbiol. 31: 781-783.

13 Hicks, B.J., and Silvester. W.B. 1985. Nitrogen fixation associated with the New Zealand

mangrove (<u>Avicennia marina</u> (Forsk.) Vierh.var. <u>resinifera</u> (Forst.f.) Bakh.). Appl. Environ.
Microbiol. 49: 955-959.

16 Holguin. G., Guzman. M.A., and Bashan, Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the

17 rhizosphere of mangrove trees: Their isolation. identification and in vitro interaction with

18 rhizosphere <u>Staphylococcus</u> sp. FEMS Microbiol. Ecol. 101: 207-2 16.

19 Hussain. M.I., and Khoja. T.M. 1993. Intertidal and subtidal blue-green algal mats of open and

20 mangrove areas in the Farasan Archipielago (Saudi Arabia), Red Sea. Bot. Mar. 36: 377-388.

1 Jones, K. 1992. Diurnal nitrogen fixation in tropical marine cyanobacteria: a comparison between

2 adjacent communities of non-heterocystous <u>Lyngbya</u> sp. and heterocystous <u>Calothrix</u> sp. Br.

3 Phycol. J. 27: 107-118.

4 Li. C.Y., Massicote, H.B., and Moore, L.V.H. 1992. Nitrogen-fixing <u>Bacillus</u> sp. associated with
Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. Plant Soil.140:35-40.

6 López-Cortés, A. 1990. Microbial mats in tidal channels at San Carlos. Baja California Sur,

7 Mexico. Geomicrobiol. J. 8: 71-87.

8 Por, F.D. 1984. The state of the art. In Hydrobiology of the mangal. Edited by F.D. Por, and I.

9 Dor. Dr W Junk Publishers, The Hage pp. 1 - 14.

10 Potts, M. 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with communities of

heterocystous and non-heterocystous blue-green algae in mangrove forests of Sinai. Oecologia
39: 359-373.

13 Potts, M. 1980. Blue-green algae (Cyanophyta) in marine coastal environments of the Sinai

14 Peninsula; distribution, zonation, stratification and taxonomic diversity. Phycologia 19: 60-73.

15 Potts. M 1984. Nitrogen tixation in mangrove forests. In Hydrobiology of the mangal Edited by

16 F.D. Por and Dor. Dr W. Junk Publishers. The Hage.pp155-162.

17 Potts. M., and Whitton. B.A. 1980. Vegetation of the intertidal zone of the lagoon of Aldabra,

with particular reference to the photosynthetic prokaryotic communities. Proc. R. Soc. Lond.
B 208: 13-55.

20 Rippka. R., Deruelles. J., Waterbury, J.B., Herdman. M., and Stanier, R.Y. 1979 Generic

assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen.

22 Microbiol. 111: 1-61.

1 Legends to figures

2 Figure 1. Schematic representation of an assembly used for measuring nitrogen fixation on intact3 pneumatophores in the field. Note that for clarity, parts of the assembly are not to the same scale.

4 Figure 3(A). Schematic representation of the cyanobacteria pattern of colonization along a
5 pneumatophore of black mangrove Note that <u>Microcoleus</u> sp. filaments share a common sheath
6 (s), (sf-single filaments). <u>Lyngbya</u> filaments embedded in a thick sheath (s). (B) Typical
7 distribution of pneumatophores around a black mangrove tree. (C) Close up of pneumatophore
8 covered with cyanobacteria. (D) Bamacies colonizing pneumatophores. Pneumatophore size
9 ranged from10-17 cm.

10 Figure 3(A). SEM of the lower part of the pneumatophore showing mainly the filamentous
11 cyanobacteria LPP-B. (B) insert in Fig. 3(A) showing bundles of filarnentous. sheath material,
12 heterotrophic bacteria and a filament of heterocystous cyanobacteria. (C) The central part of the
13 pneumatophore showing filaments of LPP-B cyanobacteria resembling Microcoleus sp. Scale bar
14 represents 10 µm. Xbbreviations: a-Anabaena; b-bacteria; m-Microcoleus; o-Oscillatoria;
15 s-sheath material.

16 Figure 4.SEM of the higher part of the pneumatophore. (A) small, and (D) big coccoidal 17 colonies. (B) insert of Fig. 4A showing the colonies embedded in sheath material. (C) light 18 microscopy of a typical mixture of filaments and coccoidal colonies. (E) release of coccoidal cells

1 Villbrandt. M., Krumbein, W.E., and Stal, L.J. 1991. Diurna1 and seasonal variations of nitrogen
2 fixation and photosynthesis in cyanobacterial mats. Plant Soil. 137: 13-16.

3 Zuberer, D.A., and Silver, W.S. 1974. Mangrove-associated nitrogen fixation. In Proceedings of

4 International Symposium on Biology and Management of Mangroves. Edited by G. Walsh, S

Snedaker, and H. Teas. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. pp
643-652.

7 Zuberer, D.A., and Silver, W.S. 1978. Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction)

8 associated with Florida mangroves. Appl. Environ. Microbiol. 35: 567-575.

9 Zuberer, D.A., and Silver, W.S. 1979. N₂-fixation (acetylene reduction) and the microbial

10 colonization of mangrove roots. New Phytol. 82: 467-47 l.

Figure 7. Xbsorption spectra of 90% methanolic extracts of the pneumatophores Arrows show
 typical chlorophyll <u>a</u> peaks.

3 Figure S. Accumulated ethylene production (nitrogenase activity) in pneumatophores during 24 4 hours periods (each composed of 8 separate samplings, total 320 measurements) throughout the 5 year. Columns followed by a different fetter differ significantly at $P \le 0.05$ in One-way ANOVA.

6 Figure 9. Diurnal nitrogen fixation on black mangrove pneumatophores during the year and the 7 environmental conditions that prevailed during its measurement. In subfigures C,F,I,L 8 \Box -nitrogen fisation measured; •-negative controls; ∇ -incubation in the presence of glucose; V 9 -addition of glucose to negative controls (symbol can hardly seen since it coinside with the \approx 10 symbol). Continues lines (in A,B,D,E,G,H,J,K) represent 3rd order regressions of the 11 environmental conditions. Regression coefficients are; A=(O) 0.9163 (•)0.9192, B=(Δ)0.7497

12 (Δ)0.9654, D= (\odot)0.9212 (•)0.9188, E= (Δ)0.8912 (Δ)0 1250, G=(\odot)0.9782

13 (•)0.9518, H= (Δ)0.9817 (Δ)0.9364, J= (\bigcirc)0.9462 (•)0.9800, K= (Δ)0.9097

14 (Δ)0.3853 Sub-figure "L" is from Toledo and Bashan. 1994 (by permission of the publisher).

I embedded in sheath material from a colony under light microscopy. Arrows in Fig. 3 D (black) 3 and in Fig. 4 E (white) show the possible release exit of coccoidal cells. Scale bars represented 3 10 μ m (A, B, C, E) and 100 μ m (D). Abbreviations: cc-coccoidal colony; c-coccoidal 3 cyanobacteria; f-filamentous cyanobacteria; s-sheath material; se-sheath envelopes.

5 Figure 5. (A,B) SEM of glass surface colonization showing heterogeneous colonization by 6 diatoms, filamentous cyanobacteria, possible green algae and bacteria. Large arrow in Fig.5B 7 indicates uncolonized glass surface 18 month after insertion on the surface in the pneumatophore 8 vicinity. (C) SEM of dead-wood surface colonization by filamentous cyanobacteria and 9 coccoidal colonies 18 months after insertion of the wood in the pneumatophore area.(D)insert 10 in Fig. 5 C showing the location and magnitude of the cyanobacteria coionization. Scale bars 11 represents 10 μm. Abbreviations; b-bacteria; cc-coccoidal colony; d-diatom; ga-green algae; 12 filamentous cyanobacteria; s-sheath material, LPP-A and LPP-B filamentous cyanobacåer ia of 13 these groups.

14 Figure 6. Colonization of the surrounding sediment of the pneumatophore zone. (A) light 15 microscopy preparation (from November, 1992 sampling) showing exclusive coionization by 16 <u>Anabaena</u> sp. (B) magnitication of small portion of Fig. 6 A showing typical <u>Xnabaena</u> sp. 17 filaments. (C) SEM of the same area in May, 1993 showing random colonization by diatoms and 18 a few LPP-B cyanobacterial filaments, all embedded in a massive sheath. Note the absence of 19 <u>Anabaena</u> sp. colonization. Scale bars represent (A) 100 μ m, (B.C) 10 μ m. Abbreviations; 20 a-<u>Anabaena</u>; d-diatom: s-sheath material.























:

1 Interaction between cyanobacteria and black mangroves. II: Increased 2 nitrogen fixation and colonization of plantlets inoculated with filamentous 3 cyanobacteria.

4 GERARDO TOLEDO'.', YOAV **BASHAN**¹, AND **AL SOELDNER**³

⁵ ¹Department of Microbiology, The Center for Biological Research (CIB). P.O. Box 128, La Paz,
6 B.C.S., Mexico 23000

7² Experimental Biology Laboratory Interdisciplinary Center for Marine Sciences (CICIMAR).
8 P.O. Box 592. La Paz. B.C.S., Mexico 23000

9 ³ Electron Microscopy Facility, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State
10 University. Corvallis, Oregon. 9733 1-2902. USA

¹¹ • Author to whom correspondence should be addressed.

12 FAX 52- 112-547 10; E-mail: bashan@cibnor.conacyt.mx

13 Number of figures: 5

1 Toledo, G., Bashan, Y., and Soeldner, A. 1994. Interaction between cyanobacteria and black 2 mangroves. II: increased nitrogen fixation and colonization of plantlets inoculated with 3 filamentous cyanobacteria. Can. J. Microbiol. 000-000.

One strain of the filamentous cyanobacteria <u>Microcoleus</u> sp. was isolated from black mangrove pneumatophores and inoculated onto young mangrove plantlets to evaluate its nitrogen fixation and root colonization capacities. N₂-fixation (acetylene reduction) gradually rincreased with time and reach its peak 5 days after inoculation. Later, it decreased sharply. The S level of N₂-fixation in the presence of plantlets was significantly higher than the amount of nitrogen fixed by a similar quantity of cyanobacteria in N-free growth medium. The main feature of the root colonization pattern was a gradual production of sheath in which cyanobacterial ll filaments were embedded. Visible sheath production increased with time until it completely covered the entire root system of the plantlet. The sheath also allowed in-and-out movement of filaments towards the uncolonized portions of the root. This work presents the first report of 14 artificial inoculation of cyanobacteria on marine mangroves.

15 Key words: <u>Avicennia eerminans</u>, black-mangrove. diazotrophic cyanobacteria, <u>Microcoleus</u> sp.,
16 nitrogen fixation, root colonization.



1 Introduction

2 The inoculation of **crop** and forest plants with associative beneficial bacteria has generated well-documented techniques which have recently reach their experimental peak in route to 3 commercialization (Okon 1994; Tang 1994; Paau et al. 1991). The most common organisms 4 used belong to the bio-control group of pseudomonads (Kloepper et al. 1989), Azospirillum 5 6 (Bashan and Levanony 1990), Klebsiella (Haahtela et al. 1986), Azotobacter (Pandey et al. 1989) 7 and Bacillus (Berge et al. 1990; Holl and Chanway 1992). The inoculation of cyanobacteria onto 8 plants has been virtually neglected except for few recent studies on the inoculation of wheat plants with terrestrial cyanobacteria (Gantar et al. 199 1 a, 199 1 b, 1993). 9

Mangrove forests are an essential prerequisite for a sustainable coastal fisheries. They supply large amounts of carbon and nitrogen to the environment and act as a major refuge for many economically important fish and shellfish. Once a mangrove forest has been cleared the resulting effect on the coastal fishing industry is irreversible decimation (Por 1984).

Diazotrophic activity in mangroves and in other marine plants has been observed worldwide (Holguin et al. 1992; Potts 1984; van der Valk and Attiwiil 1984; Zuberer 1984; Zuberer and Silver 1978), but usually without any reference to the particular species of microorganism, which vary from site to site. Marine cyanobacterial population are an integral and a major component of the micro-biota in every mangrove system (Hussain and Khoja 1993. Potts 1979, 1980;Potts and Whitton 1980). They colonize any submerged surface such as sediment. 20 roots. aerial roots. branches and trunks of mangrove (Hicks and Silvester 1985; Sheridan 1991; 21 Zuberer and Silver 1978). Yet. the exact interaction between cyanobacteria and mangroves or 22 any resulting mutual benefits have yet to be established.

All cyanobacteria adhering to surfaces share two properties: (i) they have a hydrophobic cell surface, and (ii) they form sheaths (Zuberer 1984). During the colonization process, the 2 membrane changes from hydrophilic to hydrophobic which enhances the attachment (Shilo 3 1989). The universally distributed, filamentous, non-heterocystous cyanobacteria Microcoleus 4 5 sp. produces colonies containing many filaments usually embedded in a common sheath (Rippka et al. 1979). These colonies are then attached to a surface by the sheath. Black mangrove 6 pneumatophores (aerial roots) in Balandra lagoon, Baja California Sur, Mexico are also the 7 natural habitat of the nitrogen fixer Microcoleus sp. (Toledo et al. submitted to Can. J. 8 Microbiol.). 9

10 The aims of the present study were to observe the pattern of root colonization in black 11 mangrove plantlets after inoculation with the N_2 -fixing cyanobacteria <u>Microcoleus</u> sp. and to 12 measure the nitrogen fixation occurring on the roots.

13 Material and Methods

14 Plant material and growth conditions

We collected black mangrove propaguls (<u>Avicennia eerminans</u> (L.) Stem) from the same locality of the insitu nitrogen fixation measurements described in our previous paper (Toledo et al. submitted to Can. J. Microbiol.) and from approximately the same trees. The seasonal production of propaguls began at Balandra lagoon in August 1993 and lasted for approximately 40 days. Propaguls measuring 4 cm were directly picked from the trees. transferred to the lab. and examined; those with small insect holes were discarded. The disinfection process was done by serial washings. first with Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Sigma, USA) ((2% v/v) for 5 min, then rinsed with sterile tap water. Later, propaguls containing the skin were treated with NaOCl 1% (Clorox, Mexico) for 5 min. Then, the propaguls were peeled with sterile scalpel and the skin was discarded. The "naked" propaguls were further disinfected with 0.1% NaOCl and finally rinsed with sterile tap water six times. All these steps were carried out under sterile conditions. The efficiency of our disinfection process was checked by light and scanning electro; microscopy (Toledo et al. submitted to Can. J. Microbiol.).

8 White sand was collected from a sandy beach in Balandra lagoon and washed 10-12 times with pressurized salty tap water (2560 µmhos cm⁻¹) until the discarding supernatant was 9 completely clear. The wet sand was then incubated at room temperature (28-33 °C) for 24 hours 10 to allow the spores of any microorganisms time to germinate. Then, it was sterilized in an oven at 11 250 °C ovemight. Sand samples (260 g each) were then loosely packed into cylindrical, 900 ml 12 transparent glass beakers (17 x 7.5 cm). Each beaker was supplemented with a mineral solution 13 portion of Murashige and Skoog medium (1962) containing the following: (mg l⁻¹): NH, NO, 14 1650, KNO, 1900, KHLPO, 170, MgSO, & SE 7&0 370, CaCL & SE 2_0 440, FeSO, & SE 7Id_0 27.8, 15 Na-EDTA 37.3. H,BO, 1.55. MnSO, •H,O 4.22, ZnSO, & & X 71-&0 2.15, KI 2, NaMoO, •2H,O 16 17 0.0735, CuSO, SE 5H_O 0.125, CoCl. S SE 6H.O 0.125, Glycine 0.02, Myo-inositol 1, Nicotinic acid 18 0.005. Pyridosine monochloride 0.005, Thiamine hydrochloride 0.001, and 35 g l⁻¹ of sodium 19 chloride. The volume of the solution in the beakers was adjusted to allow for the formation of a water-film approximately 3 mm over the sand surface. The beakers were then vertically 20 autoclaved for 20 min with a loose covering of thick aluminum foil. Afterwards, the foils were 21 22 further fastened and sealed with elastic bands. All these procedures were essential to obtain

1 sterile assemblies in which to grow the plantlets. Three disinfected propaguls were then planted 3 with sterile forceps 1 cm deep in the sand of each beaker. The plantlets were grown at $22 \pm 1^{\circ}$ C 3 under 50 µmol m⁻² s⁻¹ of continuous fluorescent light for 1 month. Fresh mineral medium was 4 added only when required to maintain the level of solution in each beaker. All procedures were 5 routinely carried out under aseptic conditions.

6 Cvanobacterial cultures

The inoculated Microcoleus sp. strain (B1) was isolated from the black mangroves 7 pneumatophores and grown in N-free ASN-III medium (Rippka et al 1979) as described in the 8 previous paper (Toledo et al. submitted to Can. J. Microbio].). The cyanobacterial culture was 9 10 characterized as an undefined mass composed of numerous filaments and resembling a mat. First, it was washed in N-free ASN-III, homogenized in a tissue homogenizer (LFE, model 5VB, 11 USA) to obtain a slurry cell suspension. The slurry was further centrifuged at 3000 g for 10 min 13 to discard disrupted filaments which were suspended in the discarded supematant. The pellet was 13 14 resuspended in the same medium and adjusted to an optical density of 0.27 at 540 nm which was used as an inoculum. This inoculum concentration was equivalent to 1.48 mg ml⁻¹ of chlorophyll 15 16 a and to about 1.16 x 10' filaments per ml (counted in a hemocytometer under light microscopy).

17 Nitroeen fixation on inoculated plantlets

18 One month old plants were selected for each experiment. The plantlets selected were 19 always from the same lot, about the same height (approximately 100 mm) and had a similar 20 number and size of true leaves. Previous to inoculation, the roots were carefully washed in 40 ml

1 of sterile N-free ASN-III medium in a beaker to remove sand particles. Then, they were 2 transferred to 250 ml filtration flasks equipped with a cotton plug at the top, a rubber septumat 3 the side-arm exit, and 25 ml of N-free ASN-III medium containing cyanobacterial inoculum. The 4 plantlets were first incubated for 24 h under the described growth conditions to allow roo: 5 colonization by the cyanobacteria. The non-inoculated plantlets were similarly incubated in 25 ml 6 of bacteria-free, N-free ASN-III. Twenty-four hours after inoculation additional 25 ml of N-free 7 ASN-III medium containing 1.6% agar (Sigma) at temperature of approximately 38 °C was 8 added to each flask. The mixture produced a semisolid medium (0.8% agar) in the filtration flask. 9 upon partial solidification. Then, the cotton plugs were removed and the flasks were hermetically 10 sealed with rubber stoppers. Ten ml of air were replaced by pure acetylene. Air samples were Il drawn with 1 ml sterile syringes immediately after the acetylene injection and every 24h 12 thereafter for five days. The air samples were collected in 5 ml serum bottles hermetically sealed 13 with rubber septums. The analysis of the samples was done in a Varian 6000 gas chromatograph 14 (Varian Instrument Group. USA) as described earlier (Toledo et al. submitted to Can. J. 15 Microbio].). The amount of ethylene produced was expressed as nmol ethylene per day per 16 plantlet.

17 Parallel to the nitrogen fixation determinations. additional replicates (but without 18 acetylene) were selected to examine cyanobacterial root colonization using phase contrast 19 microscopy and scanning electron microscopy (SEM) analyses. The roots were cut, and several 20 small pieces were obtained by a razor blade under dissecting microscope. These root pieces were 21 first shaken in a vortex mixer for 1 minute at maximum speed to remove non-attached cells, then

rinsed with sterile liquid ASN-III medium. Preparation of the samples for SEM was described 2 earlier (Toledo et al. submitted to Can. J. Microbiol.)

At the end of the experiment, chlorophyll <u>a</u> was extracted from the semisolid medium 4 containing the roots by homogenization with acetone 90%. The extract was then measured 5 spectrophotometrically at 665 nm. The amount of chlorophyll <u>a</u> was calculated according to the 6 equation of Tandeu de Marsac and Houmard (1988).

7 Experimental design and statistical analysis

8 The N₂-fixation experiment was repeated five times, each in eight replicates. A replicate 9 consisted of one filtration flask containing one plantlet. Controls consisted of non inoculated 10 plantlets, the same concentration of inoculated cyanobacteria in ASN-III medium without plants, 11 and flasks containing the different gases alone. The results are expressed as the mean values of all 12 experiments. One-way Analysis of Variance (ANOVA) was performed at $P \le 0.05$.

13 SEM observations were carried out in five replicates, using a single stub as a replicate.

14 Results and Discussion

Any evaluation of novel plant-microorganism interactions should test the following 16 questions: (i) Is the potential microorganism capable of colonizing the host plant? This is a basic 17 requirement established for many terrestrial plant-bacteria interactions (Parke 199 1). (ii) Does the 18 microbe excrete any potential beneficial substance for plants or helps the plant scavenging 19 minerals that the plant needs. during the association? (Alexander and Zuberer 1993; Bashan et al. 20 1990; Li et al 1992; Mazzola et al. 1992; Neilands and Leong 1986; Paula et al. 1992) (iii) Does the microbe survive long enough and in sufficient numbers to become a possible agent for further
 inoculation evaluations? (Bashan and Levanony 1990; Lynch 1990).

Mangrove plants are always associated with cyanobacteria of diverse species. The nature of the association (whether beneficial or not) is unknown, although it is visibly clear that the interaction is at least non-pathogenic. It is also unknown whether cyanobacteria participate in the life cycle of mangrove plants, although dense colonization of submerged parts of mangrove trees rees is frequently observed (Dor and Levy 1984; Potts 1979; Sheridan 199 1; Toledo et al. submitted to Can. J. Microbiol.).

9 The goal of the present study was to explore the possibility that black mangrove plants 10 may associated with cyanobacteria from the onset of propagule establishment and to present the 11 first report **on** inoculation of marine plants with potential beneficial cyanobacteria.

Nitrogen fixation activity gradually increased when the plants were inoculated with the cyanobacteria. However, 5 days after inoculation there was a sharp, statistically significant, decrease in this activity for all repetitions (Fig. 1). The cyanobacterial growth was visibly denser in the plant-cyanobacteria beakers compared to cyanobacteria in nutrient solution alone. However, the chlorophyll <u>a</u> determinations to evaluate the quantity of cyanobacteria on the root varied greatly. Therefore, the visible differences were not statistically significant by this analysis (Fig. 1; columns).

19 The main feature of the colonization patterns was the production of sheath, as yet of 20 undefined nature. The cyanobacterial colonization process can start on any part of the root. but 21 was mainly obsetved in the root elongation zone, in places were lateral roots emerge or on the 22 root cap (light microscopy. data is not shown). In the first 24 h. the cyanobacterial filaments

I established small pocket-like colonies (Fig 2 AB) on many secondary roots. The fine texture of 2 colonization is a sheath in which many filaments are embedded (Fig. 2 C,D,E).

On the second day after inoculation, the colonies became denser, and cyanobacterial 3 4 aggregates covered a large portion of the root surface (Fig. 3 A, B). On the third day, the trend 5 of building a massive sheath continued (light microscopy, data not shown). The sheath formed a 6 thick layer, wrapping the entire root by submerging almost all the former separate small colonies 7 (Fig. 3 C,D). SEM observations, and especially light microscopy, of live specimen revealed the 8 movement of filaments in and out of the sheath (Fig. 3 C,D and Fig. 4 E). This may allow the 9 cyanobacteria to establish the new small colonies we observed nearby on the roots (light 10 microscopy, data not shown). Four days after inoculation, the filaments produced extensive Il multilayer sheath material which completely covered small roots (Fig. 4 AB). On the fifth day, 12 colonization was apparent to the naked eye. The macro-aggregates were located mainly in the 13 places were new roots emerged (Fig. 4 C arrow), or they "glued" together several small 14 secondary roots (Fig 4 D arrow). Six days after inoculation, the entire root system was 15 embedded in one thick sheath (Fig 5 B,C), in contrast to non colonized roots (Fig. 5 A). No 16 negative effects on plantlet growth was observed as a result of this massive colonization. On the 17 contrary, the inoculated plantlets were greener and slightly larger than non-inoculated plants 18 (data not shown).

19 The extensive sheath formation observed along the roots may have allowed cyanobacteria 20 to build large macrocolonies thereby maintaining a suitable microenvironment for growth, similar 21 to cyanobacteria on aquatic duckweed plants (Zuberer 1984). Sheaths are also known to absorb 22 water (Dor 1984). The submerged parts of mangrove and surrounding sediment are subject to daily desiccation (Jones 1992; Potts 1979, 1980; Potts and Whitton 1980), known to inhibit
N₂-fixation by cyanobacteria (Potts 1980). Therefore, by producing sheaths, the cyanobacteria
increase the duration of the wet conditions which may provide prolonged periods for N₂-fixation.
At the same time, a thick envelope may slow down the release of cyanobacteria produced
compounds into the lagoon water and the open sea.

6 Cyanobacteria, by virtue of their abundance in the mangrove forests and by their high 7 capacity for N.-fixation (Potts 1979, 1984), are natural candidates for the evaluation of secdlings 8 inoculation for future re-forestation and rehabilitation of destroyed coastal lagoons. At this point 9 of our study, it is unclear whether the nitrogen is directly transferred from the cyanobacteria to 10 the mangrove seedling since ¹⁵N assimilation tests have not yet been done. However, this study 11 pointed out the possibility of using cyanobacteria in general as a future inoculant for mangrove 12 plants.

In sum, this study shows that the cyanobacteria <u>Microcoleus</u> sp. intensely colonizes the roots of black mangrove plantlets and fixes more nitrogen while it is in association with these plants.

16 Acknowiedgments

We thank Mr. Jesus Alejandro Ostos Garcia, Delegado de la Secretaria de Desarrollo
Social (SEDESOL. Baja California Sur. Mexico) for granting us a large part of Balandra lagoon
as an experimental field. We appreciate the excellent technical assistance of Mr. Dariel Tovar.
Mr. Ariel Cruz. and Miss Dalia Gómez, Mr. Oscar Armendariz for artwork, Dr. Eugenia Klein,
Electron Microscopy Unit, The Weizmann Institute of Science, Israel for her advice in electron

microscopy and Mr. Roy Bowers for careful English corrections. Yoav Bashan participated in
 this study in the memory of the late Mr. Avner Bashan from Israel. Gerardo Toiedo was partially
 supported by grants #83916 from CONACyT and #930108 from CICIMAR-PIFI (Mexico).

4 References

- 5 Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. 1993. Responses by iron-efficient and inefficient oat cultivars
 6 to inoculation with siderophore-producing bacteria in a calcareus soil. Soil Biol. Fertil. 16:
 7 118-124.
- 8 Bashan, Y., Harrison, S.K., and Whitmoyer, B.E. 1990. Enhanced growth of wheat and soybean
- 9 plants inoculated with <u>Azosoirillum brasilense</u> is not necessarily due to general enhancement of
 10 mineral uptake. Appl. Environ. Microbiol. 56: 769-775.
- 11 Bashan, Y., and Levanony, H. 1990. Current status of Azosnirillum inoculation technology:
- 12 <u>Azosnirillum</u> as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608.
- 13 Berge. O., Fages, J., Mulard, D., and Balandreau, J. 1990. Effects of inoculation with Bacillus
- 14 <u>circulans</u> and <u>Azospirillum lipoferum</u> on crep-yield in field grown maize. Symbiosis 9:
- 15 259-266.
- 16 Dor, I., and Levy, I. 1984. Primary productivity of the benthic algae in the hard-bottom mangal
- 17 of Sinai. <u>In Hydrobiology of the mangal</u>. <u>Edited by</u> F.D. Por. and I. Dor. Dr W. Junk
- 18 Publishers. The Hage. pp. 179-191
- 19 Gantar. M., Kerby. N.W.. Rowell. P.. and Obreht, Z. 1991. Colonization of wheat (Tricum
- 20 <u>vulgare L.</u>) by N₂-fixing cyanobacteria: I. A survey of soil cyanobacterial isolates forming
- associations with roots. New Phytol. 118: 477-483.

Gantar, M., Kerby, N.W., and Rowell, P. 1991. Colonization of wheat (Tricum vulgare L.) by N.-fixing cyanobacteria: II. An ultrastructural study. New Phytol. 118: 485-492. 2 3 Gantar, M., Kerby, N.W., and Rowell, P. 1993. Colonization of wheat (Tricum vulgare L.) by 4 N.-fixing cyanobacteria: III. The role of a hormogonia-promoting factor. New Phytol. 124: 5 505-S 13. 6 Haahtela, K., Laakso, T., and Korhonen, T.K. 1986. Associative nitrogen fixation by Klebsiella 7 spp.: Adhesion sites and inoculation effects on grass roots. Appl. Environ. Microbiol. SS: 8 1074-1079. 9 Holguin, G., Guzman, M.A., and Bashan, Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the 10 rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere Staphylococcus sp. FEMS Microbiol. Ecol. 101: 207-2 16. 11 12 Holl, F.B., and Chanway, C.P. 1992. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by <u>Bacillus polymyxa</u>. Can. J. Microbiol. 38: 303-308. 13 14 Hicks, B.J., and Silvester, W.B. 1985. Nitrogen fixation associated with the New Zealand 15 mangrove (Avicennia marina (Forsk.) Vierh.. var. resinifera (Forst.f.) Bakh.). Appl. Environ. 16 Microbiol. 49: 955-959. 17 Hussain. M.I., and Khoja, T.M. 1993. Intertidal and subtidal blue-green algal mats of open and mangrove areas in the Farasan Archipelago (Saudi Arabia), Red Sea. Bot. Mar. 36: 377-388. 18 19 Jones. K. 1992. Diurnal nitrogen fixation in tropical marine cyanobacteria: a comparison between 20 adjacent communities of non-heterocystous Lyngbya sp. and heterocystous Calothrix sp. Br. 21 Phycol. J. 27: 107-1 18.

1 Kloepper, J.W., Lifshitz, R., and Zablotowicz, R.M. 1989. Free-living bacteria1 inocula for

2 enhancing **crop** productivity. Trends Biotech. 7: 39-44.

3 Li, C.Y., Massicote, H.B., and Moore, L.V.H. 1992. Nitrogen-fixing Bacillus sp. associated with
4 Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. Plant Soil. 140: 35-40.

5 Lynch, J.M. 1990. Longevity of bacteria: Considerations in environmental release Curr.

6 Microbiol. 20: 387-389.

7 Mazzola, M., Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., and Pierson, L.S. III 1992.

8 Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorecent

9 pseudomonads in soil habitats. Appl. Environ. Microbiol. 58: 26 16- 2624.

10 Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with

11 tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. **15**: 473-497.

12 Neilands, J.B., and Leong, S.A. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease.

13 Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 187-208.

14 Okon, J.. and Labandera-González, C. 1994. Agronomic aplications of Azospirillum. In

15 Improving **plant** productivity with rhizosphere bacteria. <u>Edited **by**</u> M.H. Ryder, P.M.

16 Stephens, and G.D. Bowen. **Divison** of Soils CSIRO, Australia. pp. 274-278.

17 Paau. A.S.. Graham, L.L., and Benett. M. 1991. Progress in formulation research for PGPR and

18 biocontrol inoculants. In Plant growth promoting rhizobacteria-progress and prospects.

19 Edited by C. Keel. B. Koller, and F. Défago. 10BC/WPRS Bulletin, Zürich, Switzerland

20 Pandey, A., Shende. S.T., and Apte. R.G. 1989. Effect of Azotobacter chroococcum seed

21 inoculation on its establishment in rhizosphere, on growth and yield and yield attributing

22 parameters of cotton (Gossvoium hirsutum). Zentralbl. Mikrobiol. 144: 595-604.
1 Parke, J.L. 1991 Root colonization by indigenous and introduced microorganisms In The

2 rhizosphere and plant grow-th. <u>Edited by</u> D.L. Keister. and P.B. Cregan. Kluwer Academic

3 pub. The Netherlands, pp. 33-42.

4 Paula, M.A., Urquiaga, S., Siqueira, J.O., and Döbereiner, J. 1992. Synergistic effects of

5 vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of

6 sweet potato (<u>Ipomoea batatas</u>). Biol. Fertil. Soils **14**: 61-66.

7 Por, F.D. 1984. The state of the art. In Hydrobiology of the mangal. Edited by F.D. Por, and 1.

8 Dor. Dr W. Junk Publishers, The Hage. pp. 1-14.

9 Potts, M. 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with communities of

heterocystous and non-heterocystous blue-green algae in mangrove forests of Sinai. Oecologia
39: 3.59-373.

12 Potts, M. 1980. Blue-green algae (Cyanophyta) in marine coastal environments of the Sinai

13 Peninsula; distribution. zonation. stratification and taxonomic diversity. Phycologia 19:60-73.

14 Potts, M., and Whitton. B.A. 1980. Vegetation of the intertidal zone of the lagoon of Aldabra.

with particular reference to the photosynthetic prokaryotic communities. Proc. R. Soc. Lond.
B 208: 13-55.

17 Potts, M. 1984. Nitrogen fixation in mangrove forests. In Hydrobiology of the mangal. Edited by

18 F.D Por. and I. Dor. Dr W. Junk Publishers. The Hage. pp. 155-162.

19 Rippka R., Deruelles. J.. Waterbury. J.B., Herdman, M.. and Stanier, R.Y. 1979. Generic

20 assignments. strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen.

21 Microbiol. 111: I-61.

1 Sheridan, R.P. 199 1. Epicaulous, nitrogen-fixing microepiphytes in a tropical mangal community,

2 Guadeloupe, French West Indies. Biotropica 23: 530-541.

3 Shilo, M. 1989. The unique characteristics of benthic cyanobacteria. In Microbial mats:

4 physiological ecology of benthic microbial communities. Edited by Y. Cohen, and E

5 Rosenberg. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp. 207-2 13.

6 Tandeu de Marsac, N., and Houmard, J. 1988. Complementary chromatic adaptation:

physiological conditions and action spectra. Meth.Enzimol. 167. Academic Press. San Diego.
pp. 318-328.

9 Tang, W.H. 1994. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. In

10 Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Edited by M.H. Ryder, P.M. Stephens,

and G.D. Bowen. Division of Soils CSIRO, Australia.pp. 267-273.

12 Toledo, G., Bashan, Y., and Soeldner, A. 1994. Interaction between cyanobacteria and black

13 mangroves in Northewestern Mexico I: Colonization, diurnal and seasonal nitrogen fixation

14 on aerial roots. Submitted to Can. J. Microbiol.

15 van der Valk, A.G., and Attiwill, P.M. 1984. Acetylene reduction in an Avicennia marina

16 community in Southern Australia. Aust. J. Bot. 32: 157-164.

17 Zuberer, D.A. 1984. Microbial coionization of some duchweeds (lemnaceae): examination by

18 scanning and transmission electron and light microscopy. Aquat. Bot. 18: 275-285.

19 Zuberer. D.A., and Silver, W.S. 1978. Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction)

20 associated with Florida mangroves. Appl. Environ. Microbiol. 35: 567-575.

21

1 Legends to figures

2 Figure 1.	Nitrogen fixation of inoculated Avicennia germinans plantlets with Microcoleus sp.
3	Columns represent the amount of chlorophyll \underline{a} and bars represent the standard
4	deviation. Points (for each day, separately) followed with a different letter differ
5	significantly at $P \le 0.05$ by One-way ANOVA.
6 Figure 2.	(A) The colonization process along the root surface by Microcoleus sp. one day
7	after inoculation. Light microscopy ofpocket-like colony, and (B) SEM of a
8	similar colony (arrows).
9	(C-E) Detailed formation of cyanobacterial filaments embedded in a common
10	sheath on the root surface. (D and E) Inserts showing higher magnification of the
11	original colony (C).
12	Bars represents 10 μ m(A,B,D,E) and 100 μ m (C).
13	Abbreviations: m-Microcoleus sp.filaments; r-uncolonized root; s-sheath material.
14 Figure 3.	(A) On the second day of colonization. small colonies merged into larger.
15	(B) Insert in Fig. 3 A showing numerous filaments on the root surface
16	(C) Three days after inoculation Microcoleus sp. filaments are embedded in a large
17	sheath.
18	(D) Inset-ts in Fig. 3 C showing filaments moving in and out of the sheaths.
19	Bar represents 100 μ m (A) and 10 μ m (B-D). Abbreviations: s-sheath material.
20	

1 Figure 4.	(A). SEM four days after inoculation, cyanobacteria embedded in thick sheath
3	covered the entire small root.
3	(B) A multilayer of sheath material embedded the filaments (arrows).
4	(C) A heavy sheath production in site of emergence of new roots, and (D)
5	"gluing" two small roots (arrows) five days after inoculation.
6	(E) Light microscopy of sheath pocket-like colony (like Fig. 4 D) showing
7	embedded and releasing of cyanobacteria from the sheath (arrows).
8	Bars represent 100 μ m(A,D) and 10 μ m(B,C,E). Abbreviations: r-root; s-sheath
9	material containing Microcoleus sp. filaments.

10 Figure 5. SEM of root colonization six days after inoculation.

11	(A) Non-inoculated root tip.
12	(B) Representative part of the root system of a plantlet completely covered with
13	sheath material.
14	(C) Enlargement of the arrow site in Fig. 5B showing massive multilayer sheath
15	developed on the root.
16	Bars represent 10 μ m (A), I mm (B). and I OO μ m (C). Abbreviations: s-sheath
17	material.
10	







