

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas**

Informe Escrito Final

Caracterización de bacterias endófitas cultivables aisladas de *Rhizophora mangle* y su potencial como promotores del crecimiento en *Oryza sativa*

**Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Licenciatura en
Biotecnología**

Laura Dayana Miranda Chacón

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2023**

**Este trabajo de graduación fue_____ por el Tribunal Examinador de la
Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional como requisito parcial para
optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología**

**Dra. Carolina Marín Vindas
Representante del Decanato**

**Dra. Silvia Mau Incháustegui
Representante de la Escuela de Ciencias Biológicas**

**M.Sc. Luis Vega Corrales
Tutor**

**Dr. Junior Pérez Molina
Asesor 1**

**M.Sc. Carolina Sancho Blanco
Asesora 2**

**Ph.D. Martha Orozco Aceves
Invitada especial**

Resumen

Se caracterizó el potencial biotecnológico de bacterias endófitas cultivables aisladas de hojas y de raíces aéreas de *Rhizophora mangle* del Manglar de Puntarenas, Costa Rica, y su efecto como promotores de crecimiento vegetal en *Oryza sativa*. Se determinó la actividad enzimática: amilolítica, proteolítica y lipolítica, la actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos patógenos y la promoción del crecimiento vegetal *in vitro*: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de ácido indol-3-acético (AIA). Además, se evaluó el efecto de dos aislamientos en el crecimiento del tallo y de la raíz en plántulas de *O. sativa*. Se aislaron 15 cepas de bacterias endófitas de *R. mangle*: 3 de hojas y 12 de raíces aéreas. Trece cepas presentaron actividad en al menos una de las enzimas evaluadas, 3 cepas inhibieron el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 9533™) y otras 3 cepas inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* (ATCC® 90028™). Catorce cepas fijaron nitrógeno, 3 solubilizaron fosfato y 3 produjeron AIA moderada o fuerte. Los aislamientos seleccionados, identificados como *Staphylococcus warneri* y *Pantoea dispersa*, no generaron diferencias significativas respecto al control en los parámetros de crecimiento medidos en *O. sativa*. Este estudio representa el primer reporte de bacterias endófitas cultivables aisladas de *R. mangle* en Costa Rica. Se demuestra el potencial biotecnológico de las bacterias endófitas aisladas de ecosistemas de manglar y se recomienda promover la bioprospección de microorganismos de ambientes marinos con potencial biotecnológico para la I+D+i (investigación, desarrollo e innovación) y el Desarrollo Sostenible de las zonas marino-costeras del país.

Palabras clave: Bioprospección, Actividad enzimática, Actividad antimicrobiana, Promoción de crecimiento vegetal, Costa Rica.

Agradecimiento

En primer lugar a Dios, quién siempre ha guiado mis pasos y me ha brindado la fortaleza necesaria para cumplir esta meta.

A mis padres, por el apoyo incondicional y ser los pilares de mi vida.

A mi familia y a mi novio por su comprensión y colaboración en todo momento.

A mi tutor y asesores, por acompañarme en esta etapa.

Y a todas las personas que de una u otra manera me apoyaron en la realización de este proyecto.

Dedicatoria

A Dios, quien es mi Guía y mi Luz.

A mis padres, quienes con su ejemplo y dedicación me permitieron llegar a cumplir este sueño.

Y a todas las personas importantes que formaron parte de esta etapa.

Índice

Miembros del tribunal.....	I
Resumen.....	II
Agradecimientos.....	III
Dedicatoria.....	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Abreviaturas.....	IX
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	4
1.3 Planteamiento del problema a investigar.....	5
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo General.....	5
1.4.2 Objetivos Específicos.....	5
2. Marco Teórico.....	6
3. Marco Metodológico.....	17
4. Resultados.....	25
5. Discusión.....	31
6. Conclusiones.....	38
7. Recomendaciones.....	39
8. Fuentes de Financiamiento.....	40
9. Conflicto de intereses.....	40
10. Referencias.....	41

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Rhizophora mangle</i>	8
Cuadro 2. Identificación molecular de los aislamientos de bacterias endófitas seleccionadas de <i>Rhizophora mangle</i> del manglar de Puntarenas, Costa Rica, mediante secuenciación del 16S ARN.....	30

Índice de figuras

Figura 1. Vía de biosíntesis de ácido indol-3-acético en bacterias.....	13
Figura 2. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de <i>Rhizophora mangle</i> , del Manglar de Puntarenas, Costa Rica, para el aislamiento de bacterias endófitas.....	17
Figura 3. Plántulas de <i>Oryza sativa</i> A. Listas para ser inoculadas con las bacterias endófitas y B. Siembra para el ensayo de promoción del crecimiento vegetal.....	23
Figura 4. Morfología de las bacterias endófitas aisladas de raíces aéreas (REB) y hojas (LEB) de <i>Rhizophora mangle</i> del manglar de Puntarenas, Costa Rica.....	25
Figura 5. Índice Enzimático (IE) de la actividad amilolítica, lipolítica y proteolítica de bacterias endófitas aisladas de raíces y hojas de <i>Rhizophora mangle</i> del manglar de Puntarenas, Costa Rica. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey, se representan con letras distintas.....	26
Figura 6. Actividad antifúngica de bacterias endófitas aisladas de raíces y hojas de <i>Rhizophora mangle</i> del manglar de Puntarenas, Costa Rica. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey, se representan con letras distintas.....	27
Figura 7. Actividad de promoción de crecimiento vegetal: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de ácido indol-3-acético (AIA) de bacterias endófitas aisladas de raíces y hojas de <i>Rhizophora mangle</i> del manglar de Puntarenas, Costa Rica. Las diferencias estadísticamente no significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey, se representan con letras iguales.....	28
Figura 8. Longitud (cm) y peso seco (g) de raíces y parte aérea de plántulas de <i>Oryza sativa</i> con 8 meses de cultivo, inoculadas con las bacterias endófitas REB.4 (<i>Staphylococcus warneri</i>) y REB.5 (<i>Pantoea dispersa</i>) aisladas de <i>Rhizophora mangle</i> del Manglar de Puntarenas, Costa Rica. CN corresponde al tratamiento control. La letra a representa que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) de los tratamientos respecto al control, según la prueba de Tukey.....	29

Figura 9. Plántulas de *Oryza sativa*, con 8 meses de cultivo, inoculadas con las cepas de bacterias endófitas REB.4 (*Staphylococcus warneri*) y REB.5 (*Pantoea dispersa*) aisladas de *Rhizophora mangle* del Manglar de Puntarenas, Costa Rica. A. Control, B. Tratamiento con REB.4 y C. Tratamiento con REB.5..... 29

Abreviaturas o acrónimos

AIA	Ácido indol-3-acético
Fe	Hierro
IE	Índice Enzimático
MINAE	Ministerio de Ambiente y Energía de Costa Rica
N	Nitrógeno
P	Fósforo
PGP	Propiedades promotoras de crecimiento en plantas
RSI	Resistencia sistémica inducida

1. Introducción

Los ecosistemas de manglar poseen gran variedad de microorganismos endófitos que abren nuevas áreas de exploración biotecnológica (Sebastianes et al., 2017). Las bacterias endófitas se caracterizan por producir antibióticos, enzimas, hormonas de crecimiento vegetal y muchos otros compuestos de interés que pueden ser aplicados en la industria farmacéutica, alimenticia, textil, papelera y agrícola (Castro et al., 2014; Khan et al., 2017; Afzal et al., 2019). Debido a la importancia de estos microorganismos es fundamental aislar y caracterizar bacterias endófitas asociadas a *Rhizophora mangle* en Costa Rica para determinar su potencial biotecnológico.

1.1 Antecedentes

Las investigaciones sobre microorganismos endófitos de manglar han aumentado en los últimos años. Recientemente, se ha considerado el potencial agrícola y biotecnológico de las bacterias endofíticas como una herramienta importante en las distintas industrias y en la promoción del crecimiento de las plantas, al mejorar la nutrición de éstas y al controlar las plagas que las atacan (Sebastianes et al., 2017).

Bibi et al. (2017) aislaron bacterias endófitas de manglares ubicados en la costa de Thuwal, Arabia Saudita y determinaron su capacidad de producir amilasas, proteasas, celulasas y lipasas. Además, evaluaron la actividad antagonica de estas bacterias sobre distintos hongos patógenos como *Phytophthora capsici*, *Altenaria malli*, *Fusarium moniliforme* y *Pythium ultimum* y obtuvieron que el 56.5 % de las cepas bacterianas presentaron actividad antifúngica contra *P.capsici* mientras que 60.8 % de los aislamientos fueron activos contra *P.ultimum*.

En la región costera de Kenia, Ntabo et al. (2018) aislaron 42 bacterias endófitas de hojas y raíces de 6 plantas de mangle y determinaron su actividad enzimática. El estudio mostró que el 69 % de los aislamientos presentaron actividad pectinasa, 95 % actividad proteasa, 88 % actividad amilasa y 92 % actividad celulasa. Los endófitos aislados de las hojas mostraron un mayor índice enzimático para la actividad celulasa, mientras que los endófitos aislados de raíces mostraron mayor actividad amilasa y proteasa.

En la India, se han aislado endófitos bacterianos de distintas plantas de manglar tales como *Avicennia marina*, *Bruguiera cylindrica*, *Rhizophora mucronata*, *Salicornia brachiata*, *Suaeda monoica*, *Rhizophora apiculata*, *Excoecaria agallocha*, *Casearia decantra* y *Aegiceras corniculatum*. Los aislamientos se han obtenido de muestras de diferentes tejidos como raíces, tallos y hojas y se ha reportado gran diversidad de endófitos de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Micrococcus* y *Sporosarcina* (Sebastianes et al., 2017).

La actividad antibacteriana de muchas de estas bacterias ha sido evaluada sobre patógenos humanos y microorganismos fitopatógenos, como *Serratia* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pyogenes*, *Fusarium* sp., *Vibrio* sp. y *Klebsiella* sp., obteniendo en algunos casos aislamientos que exhiben zonas máximas de inhibición (Sebastianes et al., 2017). También se han realizado en ese país estudios que confirman la capacidad de estas cepas endófitas para producir enzimas extracelulares de importancia económica. Anu et al. (2014) aislaron 26 cepas de hojas, tallos y raíces de la especie *Rhizophora mucronata* del manglar ubicado en Thrissur y obtuvieron que todos los aislamientos presentaron actividad celulasa.

En Brasil, también se han realizado estudios sobre el potencial biotecnológico de los microorganismos endófitos. Bacterias endófitas pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Enterobacter* y *Bacillus* se aislaron de *Rhizophora mangle* y *Avicennia* spp., de los manglares ubicados en Bertioga y Cananéia. *Bacillus* fue el género que se aisló con mayor frecuencia, con un 42 % de las especies aisladas de Cananéia y 28 % de las especies aisladas de Bertioga (Castro et al., 2014). Estos aislamientos mostraron actividad enzimática, un 75 % presentó actividad proteasa y 62 % actividad endoglucanasa (Saravanakumar et al., 2016).

Jiang et al. (2018) estudiaron la actividad antimicrobiana de actinobacterias endófitas aisladas de 5 plantas de mangle distintas: *Avicennia marina*, *Aegiceras corniculatum*, *Kandelia obovata*, *Bruguiera gymnorrhiza* y *Thespesia populnea*, recolectadas del Beilun Estuary Nature Reserve, China. Un total de 31 cepas exhibieron resultados positivos en al menos un ensayo antibacteriano.

Por otra parte, en los últimos años varios estudios han utilizado el potencial de las bacterias endófitas de manglar con propiedades promotoras de crecimiento en plantas (PGP) para

estimular el crecimiento de especies vegetales distintas a su huésped natural. En Vietnam, Tam et al. (2018) aislaron 86 endófitos bacterianos de 12 muestras de plantas obtenidas de dos manglares de la Península de Cà Mau. Todos los aislamientos lograron sintetizar amonio, solubilizar fosfato y biosintetizar ácido indol-3-acético (AIA) y por sus propiedades PGP, la cepa *Enterobacter cloacae* NDNC1e resultó ser un candidato prometedor para utilizarse como inoculante en muchos tipos de cultivos en suelos pobres y salinos.

Castro et al. (2018) evaluaron la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y producir AIA de 115 bacterias endófitas aisladas de *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* y *Avicennia nítida*. Dos cepas con alta producción de AIA (*Pseudomonas fluorescens* MCRI.10 y *Enterobacter* sp. MCR1.48) fueron elegidas como inoculantes de *Acacia polyphylla*, un árbol utilizado en la reforestación de zonas degradadas. El tratamiento de plántulas de *A. polyphylla* con la bacteria *Enterobacter* sp. provocó un incremento del peso seco en las mismas, lo que demostró que ésta es una cepa promisoriosa en el crecimiento de este tipo de plantas.

Específicamente en arroz, Deivanai et al. (2014) examinaron la capacidad de las bacterias endófitas de mangle para estimular el crecimiento de plántulas de *Oryza sativa* (arroz). Las bacterias se aislaron de ramas y pecíolos de *Rhizophora apiculata* en Kedah, Malasia y se inocularon en semillas de arroz, esto generó una aceleración en el crecimiento de las raíces y brotes e incrementó el contenido de clorofila de las mismas. Además, Soldan et al. (2019) aislaron bacterias de propágulos de *Avicennia marina*, en el Mar Rojo en la costa de Arabia Saudí y estudiaron el potencial PGP de estas cepas en cebada y arroz. Los 12 aislamientos prometedores fueron probados en cebada en condiciones no axénicas y estrés salino, mientras que solamente 3 cepas se inocularon en semillas de arroz bajo condiciones de estrés salino. La investigación concluyó que la cepa *Gordonia terrae* fue la más efectiva en ambos ensayos.

Por último, en Costa Rica no existen artículos científicos publicados hasta la fecha relacionados con bacterias endófitas de manglar. En el país los estudios en manglares se han dirigido a la descripción de las especies y al estudio de la complejidad estructural de la vegetación (Samper y Silva, 2015; Sánchez et al., 2022) y no a la exploración del potencial biotecnológico de los microorganismos asociados a estos ecosistemas.

1.2 Justificación

En los últimos años el interés por comprender la diversidad y el rol de los microorganismos endófitos en la ecología microbiana y de plantas, biología evolutiva e investigación aplicada, se ha incrementado. Sin embargo, las comunidades endófitas de varias especies de plantas, como las de mangle, siguen siendo poco exploradas y estudiadas pese al gran potencial biotecnológico que poseen. Las bacterias endófitas pueden promover el crecimiento vegetal y producir compuestos de importancia médica, farmacéutica y agrícola, por lo cual son focos de interés para los científicos a nivel mundial (Ek et al., 2019).

Los manglares son ecosistemas con gran potencial biotecnológico al ser una fuente importante de enzimas, antibióticos y hormonas (Bibi et al., 2017). Las enzimas producidas por microorganismos aislados de estos sitios poseen un enorme valor económico en la industria de papel, la medicina y el tratamiento de aguas (Saravanakumar et al., 2016), mientras que los antibióticos y las hormonas son principalmente importantes en la industria agrícola, donde juegan un rol fundamental para el control de fitopatógenos y en la promoción del crecimiento en plantas, respectivamente.

Además, dada la importancia que poseen las bacterias endófitas en la promoción del crecimiento en plantas y debido a su capacidad para colonizar especies distintas a su huésped natural (Afzal et al., 2019), es preciso identificar cepas que estimulen el crecimiento de cultivos de importancia económica, como lo es el arroz (*Oryza sativa*). En Costa Rica, el arroz es un alimento prioritario en la dieta básica de la población (Picado y Solano, 2018) y los manglares parecen ser una fuente prometedora para examinar endófitos que promuevan el crecimiento de este cultivo, ya que de acuerdo con Deivanai et al. (2014), estos ecosistemas y las zonas arroceras poseen similitudes de salinidad, temperatura y humedad.

En vista de la importancia de estos ecosistemas, a la poca caracterización de bacterias endófitas en plantas de mangle y a la falta de información acerca de endófitos bacterianos de los manglares costarricenses, es preciso la bioprospección de bacterias endófitas asociadas a *Rhizophora mangle* para determinar su potencial biotecnológico.

1.3 Planteamiento del problema a investigar

Debido al potencial biotecnológico de las bacterias endófitas asociadas a *Rhizophora mangle* y a la falta de estudios en Costa Rica sobre microorganismos de ecosistemas marino costeros, se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuál es el potencial biotecnológico de las bacterias endófitas cultivables aisladas de *Rhizophora mangle* en Costa Rica y su posible efecto como promotores de crecimiento en *Oryza sativa*?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Caracterizar bacterias endófitas cultivables aisladas de *Rhizophora mangle* y su efecto en la promoción del crecimiento en *Oryza sativa* mediante ensayos *in vitro* y de invernadero para la determinación de su potencial biotecnológico.

1.4.2 Objetivos Específicos

- i) Determinar la actividad enzimática, antimicrobiana y promotora del crecimiento vegetal de bacterias endófitas cultivables aisladas de *Rhizophora mangle*.
- ii) Determinar el potencial de las bacterias endófitas seleccionadas aisladas de *Rhizophora mangle* para la promoción del crecimiento en *Oryza sativa*.
- iii) Identificar molecularmente las bacterias endófitas seleccionadas aisladas de *Rhizophora mangle*.

2. Marco Teórico

La presencia de bacterias endófitas se documentó por primera vez en el siglo XIX. Desde entonces, a pesar de que una variedad de definiciones han sido aplicadas al término de bacterias endófitas, todas concuerdan en que éstas son un grupo especializado de bacterias que han adquirido la capacidad de invadir a su planta huésped y vivir dentro de sus tejidos vegetales sin causar efectos nocivos (Hardoim et al., 2015; Afzal et al., 2019).

Muchas de las investigaciones sobre organismos endófitos se han enfocado en plantas terrestres. Sin embargo, existe un creciente interés en el estudio de bacterias endófitas de sitios inexplorados, como los ecosistemas de manglar, debido a que éstos ofrecen una gran oportunidad para descubrir nuevos compuestos con alto potencial biotecnológico (Sebastianes et al., 2017).

Manglares

Los manglares son ecosistemas ubicados en las zonas intermareales de las regiones tropicales y subtropicales (Castro et al., 2018; Liu et al., 2018) y se caracterizan por la gran abundancia de materia orgánica, nitrógeno y azufre (Ntabo et al., 2018) así como alta salinidad y condiciones anóxicas (Finlayson, 2018). Según Saravanakumar et al. (2016) los manglares son bosques húmedos que crecen en la zona de transición entre la tierra y el mar y que se caracterizan por la alta complejidad en su naturaleza microbiana y fisicoquímica.

Bajo condiciones óptimas, los manglares forman bosques grandes y productivos que alcanzan los 30 m de altura, mientras que en condiciones menos favorables predominan los arbustos dispersos y enanos. Se estima que estos ecosistemas están compuestos por 70-84 especies de plantas, las cuales poseen características estructurales y funcionales que les permiten prosperar en las zonas intermareales. Entre estas características se encuentran la presencia de raíces aéreas, las rápidas tasas de producción de dosel, los mecanismos de retención de nutrientes altamente eficientes y la dispersión de propágulos por las mareas (Finlayson, 2018).

Además, las condiciones distintivas de los manglares permiten la existencia de una gran variedad de microorganismos, presentes en forma libre en los sedimentos o como comunidades

endófitas (Castro et al., 2014). Los microorganismos de los sedimentos son importantes para la productividad y conservación de los ecosistemas de manglar, al encargarse de transformar continuamente la vegetación muerta en fuentes de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes que pueden ser utilizados por los árboles del lugar (Chen et al., 2016; Wu et al., 2016). Las comunidades endófitas en cambio se encargan de promover el crecimiento de sus plantas huésped y contribuir a tolerar el estrés biótico y abiótico que pueden desafiar su desarrollo (Afzal et al., 2019).

Estos ecosistemas son reconocidos por su riqueza natural, relevancia ecológica y económica y los servicios ambientales que prestan (Benavides et al., 2016). A nivel ecológico sirven de hábitat para múltiples especies marinas, actúan como sitios de filtración de sedimentos y además protegen la zona costera de la erosión (Samper y Silva, 2015). Por otra parte, a nivel económico son fundamentales debido a que actúan como base para la alimentación y reproducción de organismos marinos, como peces, crustáceos y mariscos (Finlayson, 2018), lo que hace que estos ecosistemas sean de gran importancia para el sector pesquero (Manikkam et al., 2019). Además, los manglares ofrecen otros productos de importancia industrial como resinas, tintes, medicamentos y alcohol (Finlayson, 2018).

Aproximadamente el 75 % de la zona costera tropical y subtropical del mundo está cubierta por manglares (Azman et al., 2015), siendo Indonesia, Australia y Brasil los países con mayor abundancia de estos ecosistemas (Carvajal et al., 2019). Un estudio realizado por Giri et al. (2011) estimó un total de 137760 km² cubiertos de manglar. Un 42 % de esta área se ubica en Asia, 20 % en África, 15 % en América del Norte y Central, 12 % en Oceanía y 11 % en América del Sur (Finlayson, 2018).

Costa Rica posee importantes áreas de manglar en las costas caribeñas y pacíficas (Benavides et al., 2016). El Ministerio de Ambiente y Energía de Costa Rica (MINAE) informó que en el 2013 el porcentaje de cobertura de los bosques de mangle en el país correspondía a un 0.7 % de todos los tipos de bosques presentes. El 99 % de los manglares se ubican en la costa del Pacífico con una cobertura total estimada de 41 000 hectáreas y divididos en tres zonas específicas: Norte, Central y Sur, las cuales presentan diferencias en la estructura del bosque y composición de las especies (Samper y Silva, 2015).

Rhizophora mangle

Rhizophora mangle es una planta de manglar usualmente conocida como mangle rojo, la cual domina en el Pacífico Norte de Costa Rica (Zamora y Cortés, 2009). Se caracteriza por tener raíces aéreas que se extienden desde el tronco hasta el suelo, una corteza de tallo suave y clara, una altura de hasta 19 m con un diámetro promedio del tronco de unos 30 cm y un mejor crecimiento en salinidad baja e intermedia (Cavalcanti et al., 2016). Según Regalado et al. (2016), *Rhizophora mangle* presenta la siguiente clasificación taxonómica (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Rhizophora mangle*

Clasificación	Nombre
Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Phylum	Tracheophyta
Familia	Rhizophoraceae
Género	<i>Rhizophora</i>
Especie	<i>Rhizophora mangle</i>

Microorganismos endófitos

El botánico alemán Heinrich Friedrich Link fue el primero en describir los endófitos en el año 1809, como un grupo de hongos parcialmente parásitos que viven en plantas (Hardoim et al., 2015). Durante mucho tiempo el término endófito se dirigió principalmente a los organismos patógenos, en especial hongos, y no fue hasta años después que se informó sobre bacterias en el interior de las plantas (Hardoim et al., 2015). Galippe (1887) comunicó la presencia de bacterias y hongos en el interior de plantas vegetales y postuló que estos microorganismos provienen del suelo y migran hasta la parte superior de las plantas, donde desempeñan un papel beneficioso en las mismas. Otros estudios a fines del siglo XIX y principios del siglo XX confirmaron la aparición de microorganismos beneficiosos dentro de las plantas. En 1991, Orlando Petrini

definió los endófitos como los organismos que pueden colonizar los tejidos internos de la planta sin causar daño aparente a su huésped (Hardoim et al., 2015).

El término endófito proviene de las palabras griegas “endon” que significa dentro y “fiton” planta (Shah et al., 2017). Más recientemente, Kandel et al. (2017) definen a los endófitos como aquellos microorganismos (bacterias y hongos) que viven en los tejidos de las plantas en todo o parte de su ciclo de vida sin causar síntomas de enfermedad. Strobel (2018) utiliza un concepto similar, al definir a los endófitos como los microorganismos asociados a tejidos vegetales vivos y que no causan daño a la planta huésped, mientras que Manikkam et al. (2019) describen a los endófitos como microorganismos que viven dentro de los tejidos vegetales sanos y que son capaces de producir nuevos metabolitos bioactivos con aplicaciones clínicas, ambientales y agrícolas. Hoy día se sabe que los microorganismos endófitos están compuestos también por eucariotas unicelulares como amebas y algas (Hardoim et al., 2015; Kandel et al., 2017).

Los microorganismos endófitos son de gran importancia agrícola ya que ayudan a mejorar los rendimientos de los cultivos al estimular el crecimiento en las plantas y su respuesta inmune (Ek et al., 2019). Pero además, los endófitos poseen también un enorme valor en el área biotecnológica, al ser una fuente de compuestos con funciones antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas, inmunosupresivos, antifúngicos, antibacterianos, insecticidas, nematocidas y antivirales (Hardoim et al., 2015).

Bacterias endófitas

Las bacterias endófitas se pueden definir como aquellas bacterias que colonizan el tejido interno de la planta sin mostrar signos externos de infección (Zhang et al., 2019). Muchos estudios científicos se han centrado en aislar las bacterias endofíticas de una variedad de especies de plantas y evaluar sus beneficios en la industria agrícola (Puri et al., 2018). Como se mencionó anteriormente, estas comunidades otorgan numerosos beneficios a las plantas al aumentar el crecimiento y desarrollo de las mismas, maximizar la protección contra los fitopatógenos y mejorar la resistencia al estrés (Da Silva et al., 2018).

Las comunidades bacterianas endofíticas se originan a partir del ambiente exterior y entran a la planta a través de estomas, lenticelas y heridas (Walia et al., 2017), una vez dentro pueden

diseminarse sistemáticamente para colonizar los tejidos superiores y establecer en el tallo y hojas densidades de población entre 10^3 y 10^4 UFC/gfw en condiciones naturales (Da Silva et al., 2018; Afzal et al., 2019). Estas bacterias viven dentro de las paredes celulares y las regiones intercelulares de los vasos del xilema y pueden colonizar, semillas, flores y frutos (Ek et al., 2019).

La razón por la cual el estudio de bacterias endófitas ha tomado gran auge en los últimos años es su potencial prometedor en el despliegue de procesos biotecnológicos. Las bacterias endófitas producen una amplia gama de enzimas comercialmente importantes, fitohormonas como auxinas, giberelinas y ácidos giberélicos que promueven el crecimiento de las plantas, así como compuestos bioactivos de interés (Bind y Nema, 2019).

Producción de enzimas por bacterias endófitas

Los microorganismos son importantes en los procesos de producción de enzimas debido a su alta capacidad de producción y bajo costo (Castro et al., 2014; Bibi et al., 2017). Las comunidades bacterianas endofíticas se consideran una fuente importante de enzimas extracelulares de alto valor biotecnológico, las cuales son de gran utilidad en la industria textil, alimentaria y de detergentes, así como en la investigación agrícola y farmacéutica (Lata et al., 2019). Se han aislado e identificado cepas de varias especies de plantas con estas características, específicamente en plantas de mangle se ha reportado que bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Curtobacterium* y *Enterobacter* presentan distintas actividades enzimáticas (Sebastianes et al., 2017).

Las bacterias endófitas son una fuente potencial de enzimas tales como las enzimas desaminasas del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), pectinasas, esterases, asparaginasas, fitasas, quitinasas, deshidrogenasas, β -glucanasas, fosfatasas, celulasas, lipasas, amilasas y proteasas (Khan et al., 2017; Lata et al., 2019), siendo estas últimas tres de alto interés industrial. Las lipasas tienen varias aplicaciones, especialmente en la digestión de grasas, por lo cual son muy utilizadas en la industria papelera, cosmética y alimentaria. Las amilasas son enzimas que degradan los azúcares complejos en azúcares más simples y se han reportado especies de *Bacillus* aisladas de hojas de manglar que exhiben máxima actividad de esta enzima

(Saravanakumar et al., 2016). Las proteasas pertenecen a un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas y se han utilizado ampliamente en la industria de detergentes, alimentos y productos farmacéuticos (Flores et al., 2019).

Promoción del crecimiento en plantas por bacterias endófitas

Algunas bacterias endófitas forman parte de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGP) y al igual que las bacterias rizosféricas presentan mecanismos directos e indirectos, o una mezcla de estos, que benefician a las plantas en su crecimiento y desarrollo (Velasco et al., 2019). Los mecanismos directos aumentan la disponibilidad de nutrientes, mejorando con ello su nutrición, mientras que los indirectos promueven el crecimiento de las plantas al protegerlas contra el ataque de organismos fitopatógenos (dos Santos et al., 2018; Velasco et al., 2019).

Mecanismos directos

En bacterias endófitas se puede mencionar la síntesis de hormonas estimuladoras de crecimiento vegetal tales como el ácido indol-3-acético (AIA), la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno, la actividad de la enzima ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa y la producción de sideróforos para la adquisición de hierro (Fe) (Afzal et al., 2019; Velasco et al., 2019). Estas propiedades hacen que las bacterias endófitas sean estudiadas por la gran importancia agrícola que poseen.

Producción de AIA: El AIA es una importante auxina que desempeña un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, al participar en numerosos procesos fisiológicos tales como señalización célula-célula, alargamiento celular, división celular, diferenciación celular y regulación de la síntesis de otras hormonas vegetales como el etileno (Latif et al., 2016; Afzal et al., 2019). La producción de AIA por las bacterias endófitas puede mejorar la biomasa y el área superficial de las raíces, así como aumentar la producción de raíces laterales en las plantas huésped (Afzal et al., 2019).

Los endófitos bacterianos pueden sintetizar esta auxina mediante tres rutas diferentes, a través de (i) ácido indol-3-pivurato, (ii) indol-3-acetamida e (iii) indol-3-acetonitrilo (Latif et al., 2016). Las vías de síntesis de AIA más importantes y ampliamente distribuidas son la vía

indol-3-piruvato (IPA) y la vía indol-3-acetamida (IAM), las cuales son dependientes de triptófano (Figura 1). La vía IPA ha sido reportada principalmente en bacterias promotoras de crecimiento vegetal, mientras que la vía IAM ha sido descrita en bacterias fitopatógenas (Vega et al., 2016).

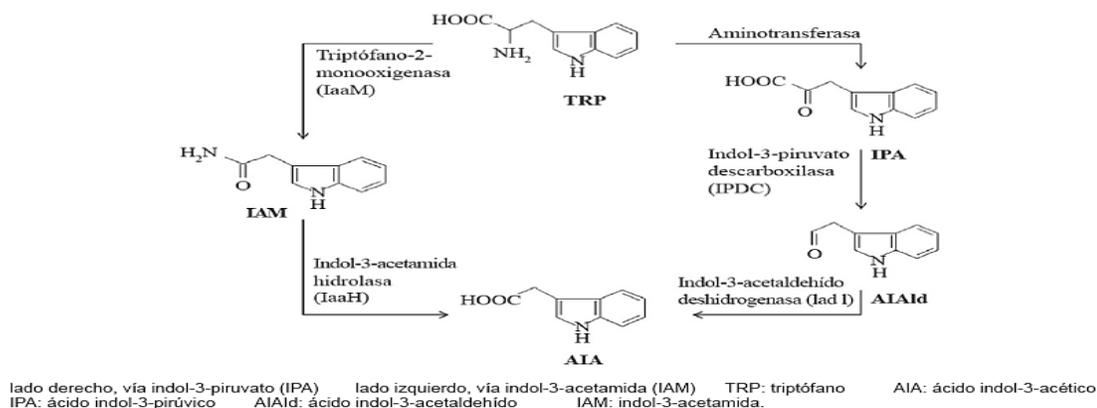


Figura 1. Vía de biosíntesis de ácido indol-3-acético en bacterias (Recuperado de Vega et al., 2016)

Solubilización de fosfatos: El fósforo es el segundo nutriente esencial requerido por las plantas y este juega un rol importante en procesos metabólicos, tales como fotosíntesis, respiración, transducción de señales y transferencia de energía (Matos et al., 2017). Sin embargo, este nutriente es usualmente encontrado en el suelo como sales minerales o compuestos orgánicos que son insolubles (Afzal et al., 2019).

Las bacterias endófitas pueden solubilizar el fosfato mediante la secreción de ácidos orgánicos que convierten los fosfatos insolubles en iones monobásicos y dibásicos solubles, los cuales quedan disponibles para las plantas, o a través de mecanismos como la acidificación y quelación (dos Santos et al., 2018; Afzal et al., 2019). Bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* son capaces de solubilizar fosfato y la utilización de éstos, así como de otros organismos con estas propiedades como inoculantes, provoca un incremento en los rendimientos de las plantas, convirtiéndolos en una alternativa ecológica para reducir la utilización de productos químicos en el sector agrícola (Matos et al., 2017; Walia et al., 2017).

Fijación de nitrógeno: El nitrógeno es un componente esencial de todas las proteínas, los ácidos nucleicos que forman el ADN y la clorofila que permite el proceso de fotosíntesis en las plantas. Este elemento es muy común en la naturaleza, sin embargo, gran parte de este nitrógeno está en forma de dinitrógeno (N₂), que es inerte y no puede ser utilizado por las plantas. Para que las plantas usen este dinitrógeno, debe fijarse en formas como nitrato (NO₃⁻) y amonio (NH₄⁺) (Puri et al., 2018).

En la fijación biológica de nitrógeno, ciertos microorganismos como algunas bacterias endófitas biodisponibilizan el nitrógeno al romper el triple enlace del dinitrógeno y lo convierten en amoníaco, utilizando un complejo enzimático altamente especializado y conservado llamado enzima nitrogenasa (Puri et al., 2018; Afzal et al., 2019).

Según Olanrewaju et al. (2017) la ecuación para la fijación de nitrógeno es:



Las bacterias endófitas constituyen una alternativa para maximizar la fijación biológica de nitrógeno (dos Santos et al., 2018) y representan un sustituto promisorio de los fertilizantes químicos (Puri et al., 2018). En los últimos años varios estudios han reportado que la inoculación de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en diversas plantas produce un aumento en el rendimiento de las mismas (Lata et al., 2019). Bacterias endófitas como *Sporosarcina aquimarina*, *Pseudomonas fluorescens* y *Enterobacter* sp. aisladas de diferentes órganos de plantas de mangle son capaces de fijar nitrógeno (Sebastianes et al., 2017).

Producción de ACC: La ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa es una enzima que promueve el crecimiento de las plantas al disminuir los niveles de etileno (Latif et al., 2016). Si bien el etileno es un metabolito esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, una alta concentración del mismo puede ocasionar afectaciones en el desarrollo de raíces y brotes de éstas (Olanrewaju et al., 2017; Lata et al., 2019). El incremento de la hormona en las plantas se debe a condiciones de estrés tales como la presencia de metales, temperaturas extremas, productos químicos en exceso, escasez de agua, luz ultravioleta o por la presencia de patógenos fúngicos o bacterianos (Olanrewaju et al., 2017).

La ACC desaminasa cataliza la conversión de ACC, el precursor inmediato de la síntesis de etileno, en amoniaco y α -cetobutirato (Latif et al., 2016). Por lo tanto, los endófitos que expresan la ACC desaminasa logran disminuir los niveles de ACC en las plantas y posteriormente los niveles de etileno, reduciendo a su vez los efectos ocasionados por las condiciones de estrés (Olanrewaju et al., 2017).

Mecanismos indirectos

El control biológico es un mecanismo que promueve indirectamente el crecimiento de las plantas al protegerlas contra el ataque de fitopatógenos (dos Santos et al., 2018; Afzal et al., 2019). Se define como el uso de microorganismos beneficiosos, sus genes o productos para reducir los efectos negativos de los patógenos de plantas y promover respuestas positivas en las mismas (Da Silva et al., 2019).

Las bacterias endófitas pueden reducir las poblaciones microbianas que dañan las plantas actuando como agentes de control biológico, ya sea a través de la competencia por el mismo nicho ecológico, mediante la resistencia sistémica inducida o por medio de la producción de agentes químicos como los metabolitos secundarios (Yadav y Yadav, 2017). Además, las bacterias endófitas pueden secretar enzimas que protegen a las plantas de las invasiones de patógenos (Banik et al., 2016). Las bacterias que pertenecen a los géneros *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* son las más comúnmente reportadas por sus actividades antimicrobianas contra los fitopatógenos (Afzal et al., 2019).

Competencia y Resistencia Sistémica Inducida (RSI): Bacterias endófitas con características de promoción de crecimiento vegetal pueden eliminar los fitopatógenos mediante la competencia directa por espacio y nutrientes o a través de un mecanismo llamado Resistencia Sistémica Inducida (RSI), el cual les permite proteger sus plantas huésped del ataque de patógenos fúngicos, bacterianos o virales (Afzal et al., 2019). La RSI es una estrategia que ayuda a la planta a reaccionar más rápido y fuertemente a un posterior ataque de patógenos, induciendo mecanismos de defensa (Afzal et al., 2019).

Mediante la RSI se pueden restringir los patógenos a la corteza de las raíces de las plantas al aumentar la densidad de la pared celular del huésped (Yadav y Yadav, 2017). Este proceso es

activado mediante la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (quitinasa y β -1,3 glucanasa), proteínas relacionadas con la defensa (peroxidasa y polifenol oxidasa) y compuestos fenólicos (Yadav y Yadav, 2017). Se ha demostrado que bacterias endofíticas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* son capaces de utilizar este mecanismo (Afzal et al., 2019).

Metabolitos secundarios: Dentro de los metabolitos secundarios que pueden producir los endófitos bacterianos se encuentran los sideróforos, antimicrobianos naturales y cianuro de hidrógeno (Olanrewaju et al., 2017). Los sideróforos son agentes quelantes de hierro producidos por algunos microorganismos bajo la deficiencia del mismo (Yadav y Yadav, 2019). Si bien la producción de sideróforos por organismos endófitos promueve el crecimiento de las plantas al secuestrar el hierro y aumentar con ello la concentración de este elemento en los tejidos internos de las mismas, estas bacterias también dan competencia nutricional a los patógenos, limitando la disponibilidad de hierro para éstos e inhibiendo su crecimiento (Maheshwari et al., 2019). El complejo sideróforo proporciona Fe a las plantas y priva al patógeno de este micronutriente (Yadav y Yadav, 2019).

El hierro es el principal elemento requerido por los microorganismos para procesos celulares tales como la respiración y transpiración y es a su vez cofactor para muchas enzimas (Afzal et al., 2019; Lata et al., 2019). Existe predominantemente en su estado férrico Fe^{3+} y reacciona formando hidróxidos altamente insolubles que en gran medida no están disponibles para los microorganismos y las plantas (Lata et al., 2019). Para adquirir suficiente cantidad de este elemento, los sideróforos producidos por las bacterias pueden unir Fe^{3+} con una alta afinidad que logre la solubilización del metal para su absorción eficiente (Lata et al., 2019).

Por otra parte, los antimicrobianos naturales son productos de bajo peso molecular fabricados por microorganismos, los cuales inhiben el crecimiento o causan la muerte de fitopatógenos, así como de bacterias, hongos, virus y protozoarios que causan enfermedades en humanos y animales (Ek et al., 2019). La producción de antibióticos se considera un mecanismo muy eficiente para el control de los patógenos de las plantas y recientemente se ha encontrado que bacterias endófitas de diferentes especies de plantas son importantes productores de estos metabolitos (dos Santos et al., 2018; Ek et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, los metabolitos producidos por bacterias endófitas actúan también como agentes antimicrobianos contra bacterias patógenas de humanos y animales (Ek et al., 2019). Sin embargo, la acción efectiva de un antibiótico contra una cepa patógena puede no tener la misma eficiencia en otra cepa de la misma especie debido a la presencia de mecanismos de resistencia genética o a la pérdida de eficiencia debido a la variación de las condiciones ambientales (dos Santos et al., 2018). Se ha identificado una variedad de antibióticos tales como la anfisina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), oomicina A, fenazina, pioluteorina, pirrolnitrina, tensina y tropolona, producidos por especies de *Pseudomonas* y oligomicina A, kanosamina y xantobaccina producidas por los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, los cuales forman parte de comunidades endófitas (Gull, 2016).

Además de la producción de antibióticos, las bacterias también son capaces de producir compuestos volátiles como cianuro de hidrógeno (HCN) el cual es un inhibidor activo de enzimas metálicas, particularmente de la enzima citocromo c oxidasa (Swarnalakshmi et al., 2019). Muchos géneros bacterianos como *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Aeromonas* son productores de HCN, el cual se considera un compuesto antagónico efectivo particularmente contra los hongos (Olanrewaju et al., 2017).

Enzimas extracelulares: Numerosas plantas responden a la infección de hongos fitopatógenos activando la síntesis de una serie de enzimas degradantes de la pared celular (Olanrewaju et al., 2017). Las celulasas, proteasas, quitinasas, β -glucanasas, lipasas y fosfatasas son enzimas que juegan un rol importante en el control biológico ya que exhiben propiedades anti parasíticas (Lata et al., 2019). La quitinasa se caracteriza por degradar la quitina la cual es una parte integral de la pared celular de muchos hongos fitopatógenos, mientras que las β -1,3 glucanasas, proteasas y lipasas rompen los carbohidratos, proteínas y lípidos, respectivamente, asociados a esta estructura celular (Olanrewaju et al., 2017). Todas estas enzimas tienen la capacidad de lisar las células fúngicas y causar la destrucción del micelio (Olanrewaju et al., 2017).

3. Marco Metodológico

3.1 Área de estudio y recolección de muestras

Se caracterizó el potencial biotecnológico de bacterias endófitas cultivables asociadas a la especie *Rhizophora mangle* en Costa Rica y su posible efecto como promotores de crecimiento en *Oryza sativa*. Las bacterias endófitas se aislaron a partir de muestras de hojas y de raíces aéreas de plantas de *R. mangle* recolectadas al azar en 3 sitios del Manglar de Puntarenas, Costa Rica (N 09°59'40.308''/ O 84°48.22.143''; N 09°59'32.776''/ O 84°48.18.339''; N 09°59'29.176''/ O 84°48.15.647'') (Figura 2). Los aislamientos se realizaron respaldados en permisos otorgados por la Comisión Nacional para Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO) bajo la Resolución R-027-2021-OT-CONAGEBIO y el resto de objetivos de la investigación bajo la R-027-2021-OT-CONAGEBIO y R-030-2023-OT-CONAGEBIO.

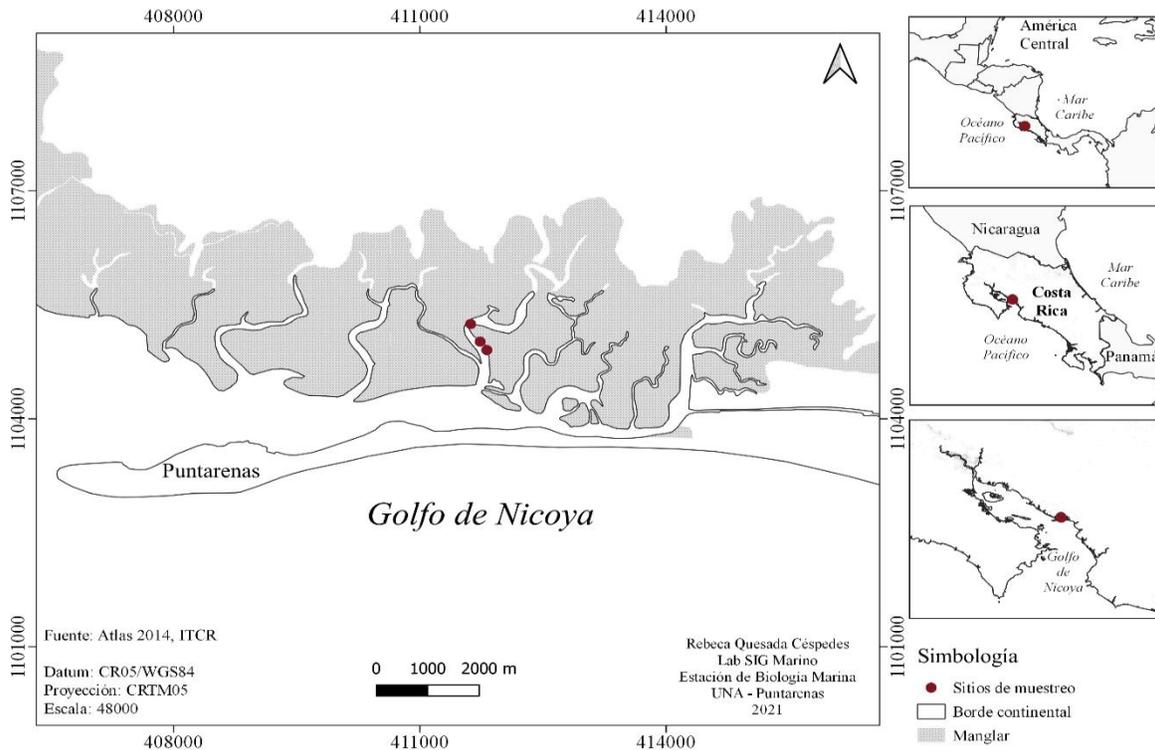


Figura 2. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de *Rhizophora mangle*, del Manglar de Puntarenas, Costa Rica, para el aislamiento de bacterias endófitas

Se recolectaron 10 hojas y 5 segmentos de la parte final de las raíces aéreas por sitio de muestreo. Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas estériles y se transportaron en condiciones asépticas al laboratorio. El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Marina (LaMMar) en colaboración con el Laboratorio de Ecología Funcional y Ecosistemas Tropicales (LEFET) y el Laboratorio de Análisis Genómico (LAGEN) de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Costa Rica.

3.2 Aislamiento de bacterias endófitas

El aislamiento de las bacterias endófitas se realizó con base en Gayathri et al. (2010), Castro et al. (2014) y Deivanai et al. (2014), con algunas modificaciones. Se realizó una mezcla compuesta de las hojas y otra mezcla de las raíces de los 3 sitios de muestreo y se seleccionó aproximadamente 2 g de raíces y 2 g de hojas y se aplicaron dos protocolos de desinfección al material vegetal.

En el primer protocolo, 1 g de raíces y 1 g de hojas se desinfectaron superficialmente con etanol al 70 % por 30 s. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se aplicó otra desinfección con NaClO al 3 % por 3 min, seguida de otros tres lavados con agua destilada estéril y secado a temperatura ambiente.

Respecto al segundo protocolo, 1 g de raíces y 1 g de hojas se lavaron con agua del grifo por unos segundos. Seguidamente, se realizó una desinfección con etanol al 70 % por 2 min, tres lavados con agua destilada estéril, una segunda desinfección con NaClO al 2 % por 1 min y otros tres lavados con agua destilada estéril y secado a temperatura ambiente. Para ambos protocolos, alícuotas de 0.1 mL del agua correspondiente al último lavado se inocularon por esparcido en medio nutritivo para evaluar la efectividad del proceso de desinfección.

Las muestras desinfectadas se maceraron asépticamente con 5 mL de agua destilada estéril utilizando mortero y pistilo. A partir del macerado se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . De cada dilución se inoculó por esparcido 0.1 mL en agar nutritivo. Los cultivos se incubaron a 30 °C por 5 días. Luego del periodo de incubación, se seleccionaron colonias bacterianas distintas morfológicamente para las pruebas posteriores. Los cultivos puros de los aislamientos se criopreservaron con glicerol al 20 % a -80°C.

3.3 Actividad enzimática

Se determinó la actividad amilolítica, proteolítica y lipolítica de las bacterias endófitas aisladas, utilizando, respectivamente, agar nutritivo con: 0.2 % de almidón soluble (Castro et al., 2014), 10 % de leche descremada (Alnahdi, 2012) o Tween 20 (al 1 % v/v) (Gould et al., 2009; Lanka y Latha, 2015).

Los cultivos se incubaron a 28 °C por 72 h y la observación de un halo claro alrededor del crecimiento bacteriano indicó la presencia de la enzima (Gayathri et al., 2010; Deivanai et al., 2014). La prueba de actividad amilolítica requirió la adición de 5 mL de solución de lugol para observar el halo. El índice enzimático (IE) se registró como la distancia en mm entre el diámetro del halo de actividad enzimática y el borde de la colonia bacteriana (Castro et al., 2014). Cada prueba se realizó por triplicado. Se utilizó agua destilada estéril como control negativo y *Bacillus* sp. como control positivo para la actividad amilasa y proteasa.

3.4 Actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana de las bacterias endófitas aisladas se determinó mediante el método de estría perpendicular, contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 6538TM), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 27853TM), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC[®] 13883TM), *Acinetobacter baumannii* (ATCC[®] 19606TM), *Enterobacter hormaechei* (ATCC[®] 700323TM) y *Enterococcus faecium* (ATCC[®] 6056TM).

Los endófitos se inocularon por estría en el centro de una placa con agar Müller Hinton y luego se inoculó perpendicularmente una asada de cada patógeno (formando una línea de 2 cm de longitud y a 0.5 cm de la línea central del endófito), tal como lo describe Ashitha et al. (2019) y Boontanom y Chantarasiri (2020).

La actividad antifúngica de los endófitos contra los hongos patógenos *Candida albicans* (ATCC[®] 90028TM) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC[®] 9533TM) se determinó según la metodología descrita por Ngo et al. (2020), con ciertas modificaciones. Un disco de agar con micelio (aproximadamente 0.9 cm de diámetro) de cada una de las cepas patógenas cultivadas durante 7 días se inoculó individualmente en el centro de una placa con agar Müller Hinton.

Luego, a los 2 cm del disco (en 3 direcciones distintas) se inoculó por estría (2 cm) cada bacteria endófitas en estudio.

Las placas con los ensayos de actividad antibacteriana se incubaron a 28° C por 24 h, mientras que las placas con los ensayos de actividad antifúngica se incubaron a 28° C por 120 h. Luego del periodo de incubación, se registró el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio para determinar la actividad antifúngica de los aislamientos. Este porcentaje está dado por la fórmula: (%) = [(D1 – D2)/D1] × 100, donde D1 = diámetro del micelio del hongo crecido en el disco control (cm) y D2= diámetro del micelio del hongo crecido en el disco tratado con las bacterias endófitas (cm). Cada prueba se realizó por triplicado. Se utilizaron discos de antibióticos Oxoid™ de ampicilina (10 ug), fosfomicina (50 ug), chloranphenicol (30 ug), amoxicilina (30 ug) como controles positivos para el ensayo de actividad antibacteriana y agua destilada estéril como control negativo para ambas pruebas.

3.5 Actividad de promoción del crecimiento vegetal

La actividad de promoción del crecimiento vegetal de los aislamientos se evaluó determinando la capacidad de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de ácido indol-3-acético (AIA). La capacidad de fijación biológica de nitrógeno de los aislamientos se determinó evaluando el crecimiento bacteriano en un medio de cultivo sin nitrógeno (10 g/L de glucosa, 0.41 g/L KH₂PO₄, 0.52 g/L de K₂HPO₄, 0.05 g/L de Na₂SO₄, 0.2 CaCl₂, 0.1 MgSO₄·7H₂O, 0.005 FeSO₄·7H₂O, 0.0025 g/L Na₂MoO₄·2H₂O, 15 g/L de agar). Las cepas endófitas se inocularon por rayado a partir de una suspensión bacteriana equivalente al estándar McFarland 0.5 (1.5x10⁸ células mL⁻¹) y se incubaron 7 días a 28 °C (Andrade et al., 1997). Posterior al período de incubación, los aislamientos se inocularon 2 veces consecutivas en el mismo medio de cultivo carente de nitrógeno y se consideró que cada cepa era fijadora de nitrógeno si mantenía su crecimiento durante todo el ensayo. De acuerdo al nivel de crecimiento, se clasificaron las cepas según su actividad (nula, débil, moderada, fuerte y muy fuerte) (Ríos, 2021).

La capacidad de solubilización de fosfato se determinó en el medio de cultivo Pikovskaya (1948) con algunas modificaciones: 10 g/L de glucosa, 5 g/L de CaHPO₄, 0.5 g/L de (NH₄)₂SO₄,

0.2 g/L de NaCl, 0.1 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0.2 g/L de KCl, 0.5 g/L de extracto de levadura, 0.002 g/L de MnSO₄·H₂O, 0.002 g/L de FeSO₄·7H₂O y 15 g/L de agar (Zhang et al., 2018). Los aislamientos se inocularon en punto y se incubaron durante 7 días a 28 °C. La presencia de un halo translúcido alrededor de la colonia bacteriana fue un indicador de solubilización positiva de fosfato mineral (Chowdhury et al., 2017; Castro et al., 2018). El índice de solubilización se registró como la distancia en mm entre el diámetro del halo y el borde de la colonia, según Etesami et al. (2014).

Para la producción de AIA, los cultivos bacterianos se inocularon en erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de medio nutritivo suplementado con triptófano (100 µg/mL) y se incubaron a 30°C por 48 h a 200 rpm (Etesami et al., 2014; Passari et al., 2016). Luego del periodo de incubación, las células se sedimentaron por centrifugación a 5000 rpm por 15 min y 1 mL del sobrenadante se mezcló con 2 mL del reactivo de Salkowsky (1 mL de FeCl₃ a 0.5 M en 50 mL de ácido perclórico al 35 %) y se incubó en oscuridad por 30 min. La aparición de un color rosa fue un indicador positivo de producción de AIA y de acuerdo a la intensidad de la coloración, las cepas se clasificaron según su actividad (nula, débil, moderada, fuerte y muy fuerte) (Etesami et al., 2014; Passari et al., 2016; Moronta et al., 2017).

Las pruebas se realizaron por triplicado para cada uno de los aislamientos. Se utilizó agua destilada estéril como control negativo y *Rhizobium trifolii*, *Enterobacter* sp. y *Bacillus* sp. como controles positivos en los ensayos de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de AIA, respectivamente. Además, se utilizó una solución comercial de ácido indol-3-acético como control positivo para el ensayo de producción de AIA (Castro et al., 2018).

3.6 Actividad de promoción del crecimiento en *Oryza sativa*

Preparación de las suspensiones bacterianas

Se seleccionaron 2 de los aislamientos que mostraron resultados positivos para las pruebas de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de AIA. Las cepas seleccionadas se cultivaron en agar nutritivo durante 48 h y posteriormente, se preparó una suspensión

bacteriana en agua destilada estéril equivalente al estándar McFarland 0.5 (1.5×10^8 células mL^{-1}) (Raweekul et al., 2016; Khan et al., 2017; Banik et al., 2019).

Evaluación de los inóculos

Las semillas de arroz *Oryza sativa* se desinfectaron superficialmente con etanol al 70 % durante 30 s y NaClO al 2 % por 5 min, seguido de 2 lavados con agua destilada estéril (Elbeltagy et al., 2000). Posteriormente, alrededor de 1000 semillas desinfectadas se colocaron en papel toalla humedecido y se incubaron a temperatura ambiente hasta alcanzar la fase de plántula (Pradhan y Mishra, 2015).

Las plántulas de arroz sanas de aproximadamente 25 días de edad (Figura 3.A) se lavaron con agua destilada estéril, se sumergieron por separado en las suspensiones bacterianas durante 6 h a 150 rpm y se trasplantaron en recipientes de siembra. Los recipientes se llenaron con aproximadamente 500 g de tierra estéril (Singh et al., 2011; Banik et al., 2019). En cada recipiente se sembraron 10 plántulas y nueve de ellos se asignaron a cada tratamiento (Figura 3.B) (Gholamalizadeh et al., 2018). Los tratamientos fueron los siguientes: i), plántulas de *O. sativa* no inoculadas (control); ii) plántulas inoculadas con la cepa 1 y iii), plántulas inoculadas con la cepa 2.

Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero (temperatura entre 20-30 °C) y se regaron regularmente con agua estéril durante 8 meses. Para evaluar el efecto de las cepas como promotores de crecimiento se determinó para cada tratamiento el crecimiento vegetal.

Medición del crecimiento vegetal

Al final del experimento, se seleccionaron aleatoriamente 30 plantas de cada tratamiento y se midieron parámetros morfológicos como la longitud del tallo (cm) y longitud de la raíz (cm) (Banik et al., 2019; dos Santos et al., 2019). Además, se separaron las raíces y parte aérea de cada planta y se secaron por 48 h a 60°C para obtener el peso seco de cada componente (Du et al., 2019).



Figura 3. Plántulas de *Oryza sativa* **A.** Listas para ser inoculadas con las bacterias endófitas y **B.** Siembra para el ensayo de promoción del crecimiento vegetal

3.7 Identificación molecular

Los dos aislamientos seleccionados para la prueba de promoción de crecimiento en *O. sativa* se identificaron molecularmente mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. Se realizó una extracción de ADN utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue Kits (QIAGEN®). Posteriormente se evaluó la integridad del ADN obtenido mediante una electroforesis en gel de agarosa, así como la concentración (ng/uL) y pureza (A260/280 y A260/230) de éste utilizando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®).

La amplificación del gen 16S ARNr se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') (Chen et al., 2015). Los resultados de la PCR se evaluaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en TBE 1X. La identidad de los amplicones se determinó mediante secuenciación Sanger, bajo una química v3.1 utilizando un analizador genético ABI3500 (Thermo Scientific®) ubicado en el Laboratorio de Análisis Genómico (LaGen), Escuela de Ciencias Biológicas. Se realizó además una edición de las secuencias de los productos de PCR utilizando el programa Sequencher 5.4.6. Por último, la identificación bacteriana se realizó mediante la comparación

de secuencias utilizando la herramienta BLASTn (Altschul et al., 1990) del Centro Nacional de Información Biotecnológica-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.8 Análisis de datos

Se verificó la normalidad y la homocedasticidad de los datos para determinar si cumplían con los supuestos del análisis de varianza (ANOVA). Posteriormente todas las variables en cada una de las fases de los ensayos experimentales (*e.i.* índice enzimático, actividad antimicrobiana, solubilización de fosfato y ensayos de crecimiento de plantas de arroz) se sometieron a ANOVA de una vía seguido de un análisis post hoc. Todos los análisis estadísticos se realizaron con lenguaje de programación R, versión 3.6.3 (R Core Team, 2020) y un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

4. Resultados

4.1 Aislamiento de bacterias endófitas

Se aislaron 15 colonias, morfológicamente distintas, de bacterias endófitas de *R.mangle* del Manglar de Puntarenas, Costa Rica, 12 de raíces aéreas (REB) y 3 de hojas (LEB). Las colonias mostraron diferencias en cuanto a tamaño, forma, elevación y pigmentación (Figura 4).

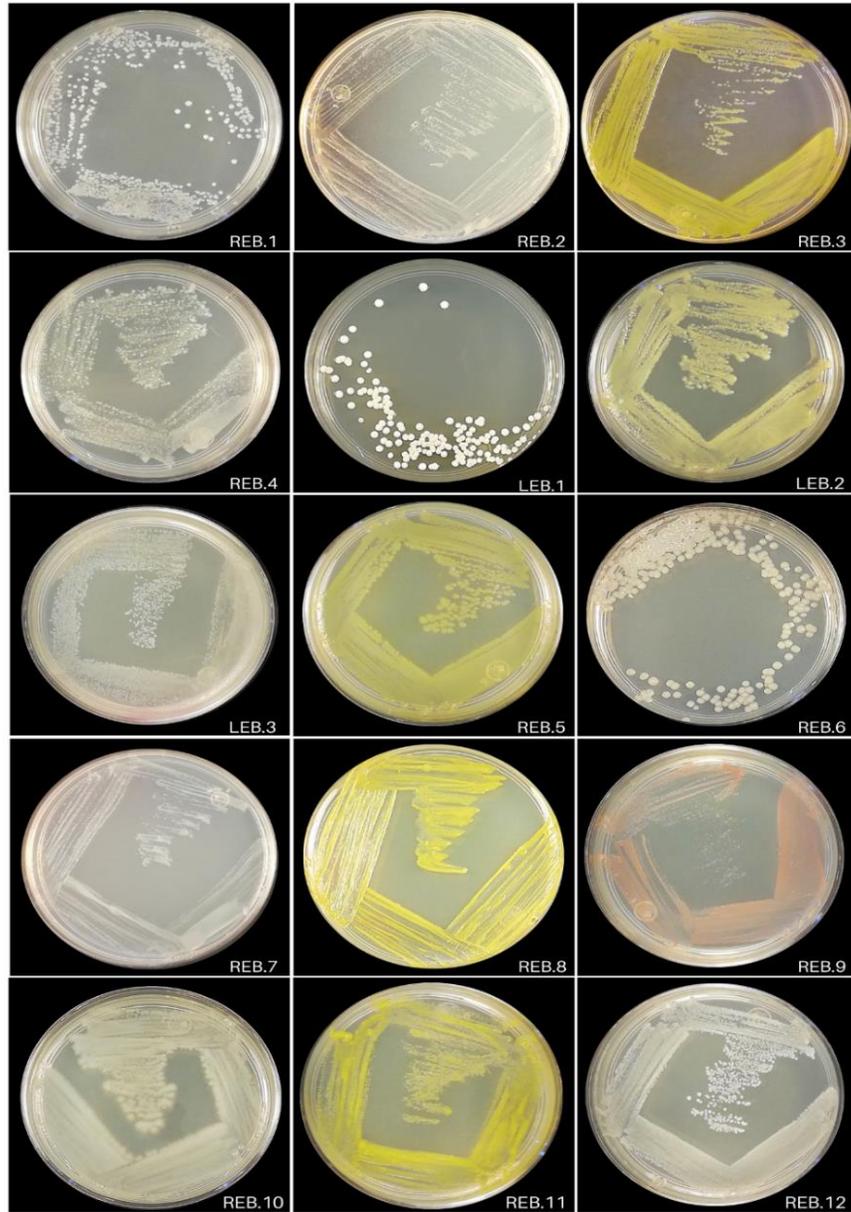


Figura 4. Morfología de las bacterias endófitas aisladas de raíces aéreas (REB) y hojas (LEB) de *Rhizophora mangle* del manglar de Puntarenas, Costa Rica

4.2 Actividad enzimática

Las cepas de bacterias endófitas aisladas de hojas de *R. mangle* presentaron actividad enzimática para amilasa o proteasa. La cepa LEB.1 mostró ambas actividades. Por otra parte, la mitad de las cepas aisladas de raíces aéreas presentaron actividad lipolítica, siendo REB.11 la que mostró el índice enzimático mayor respecto a las demás cepas. REB.3 fue la única cepa que produjo actividad en las 3 enzimas estudiadas: amilasa, lipasa y proteasa (Figura 5).

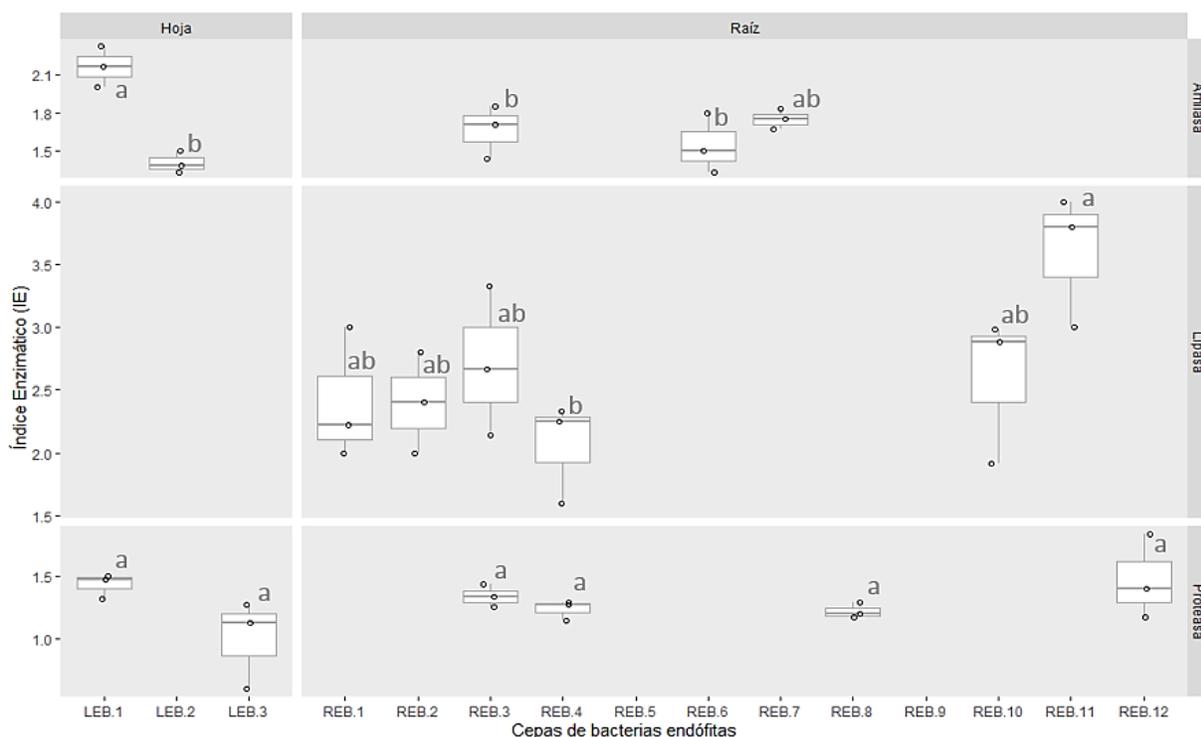


Figura 5. Índice Enzimático (IE) de la actividad amilolítica, lipolítica y proteolítica de bacterias endófitas aisladas de raíces y hojas de *Rhizophora mangle* del manglar de Puntarenas, Costa Rica. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey, se representan con letras distintas

4.3 Actividad antimicrobiana

Las bacterias endófitas aisladas no presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 13883™), *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606™), *Enterobacter hormaechei* (ATCC® 700323™) y *Enterococcus faecium* (ATCC®

6056TM). Tres de las cepas aisladas mostraron actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC[®] 9533TM), con porcentajes de inhibición del crecimiento que superaron el 50 %. De igual manera, otras 3 cepas de bacterias endófitas inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* (ATCC[®] 90028TM), con porcentajes menores al 25 % (Figura 6).

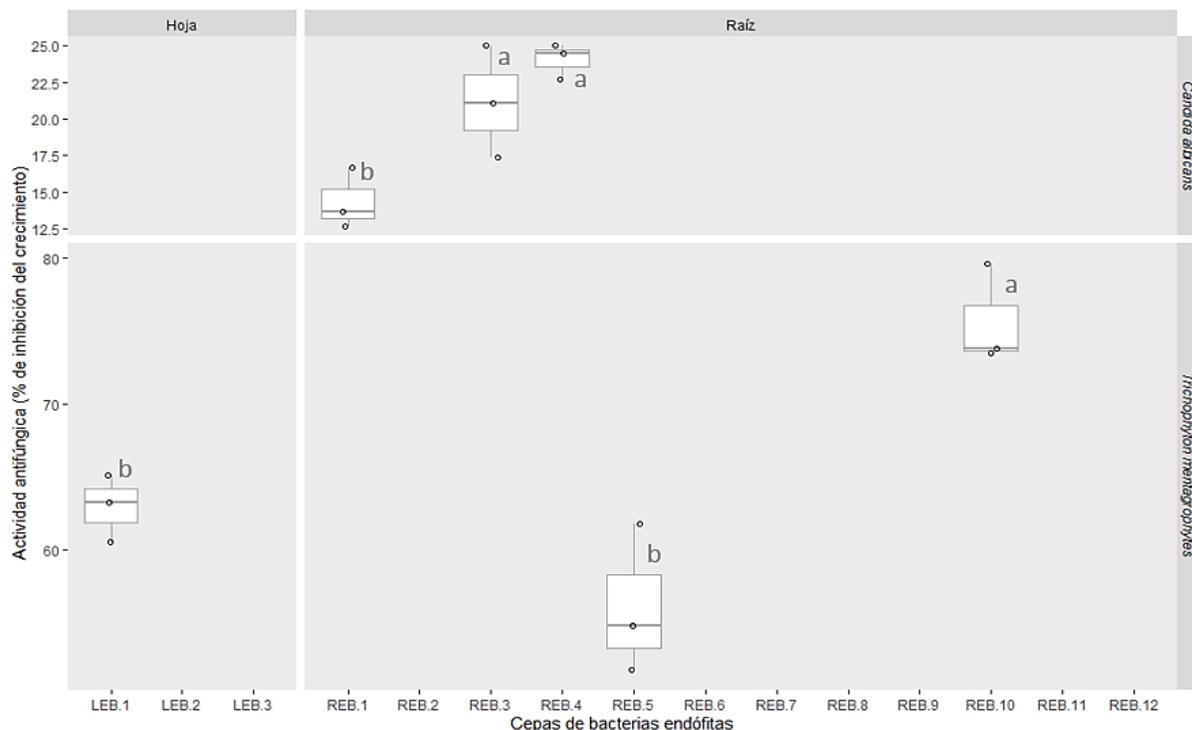


Figura 6. Actividad antifúngica de bacterias endófitas aisladas de raíces y hojas de *Rhizophora mangle* del manglar de Puntarenas, Costa Rica. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey, se representan con letras distintas

4.4 Actividad de promoción del crecimiento vegetal

En la prueba de fijación de nitrógeno, sólo la cepa REB.12 no fue capaz de crecer en el medio de cultivo. Las cepas LEB.1, REB.1, REB.3, REB.4, REB.5, REB.8 y REB.9 presentaron, en los cultivos sucesivos, actividad de fijación de nitrógeno fuerte o muy fuerte. La cepa REB.4, además, fue la única que mostró producción de AIA fuerte y los mayores valores de solubilización de fosfato, no estadísticamente significativos respecto a las cepas REB.3 y REB.5. Las cepas LEB.2 y REB.1 presentaron resultados positivos moderados para la producción de AIA (Figura 7).

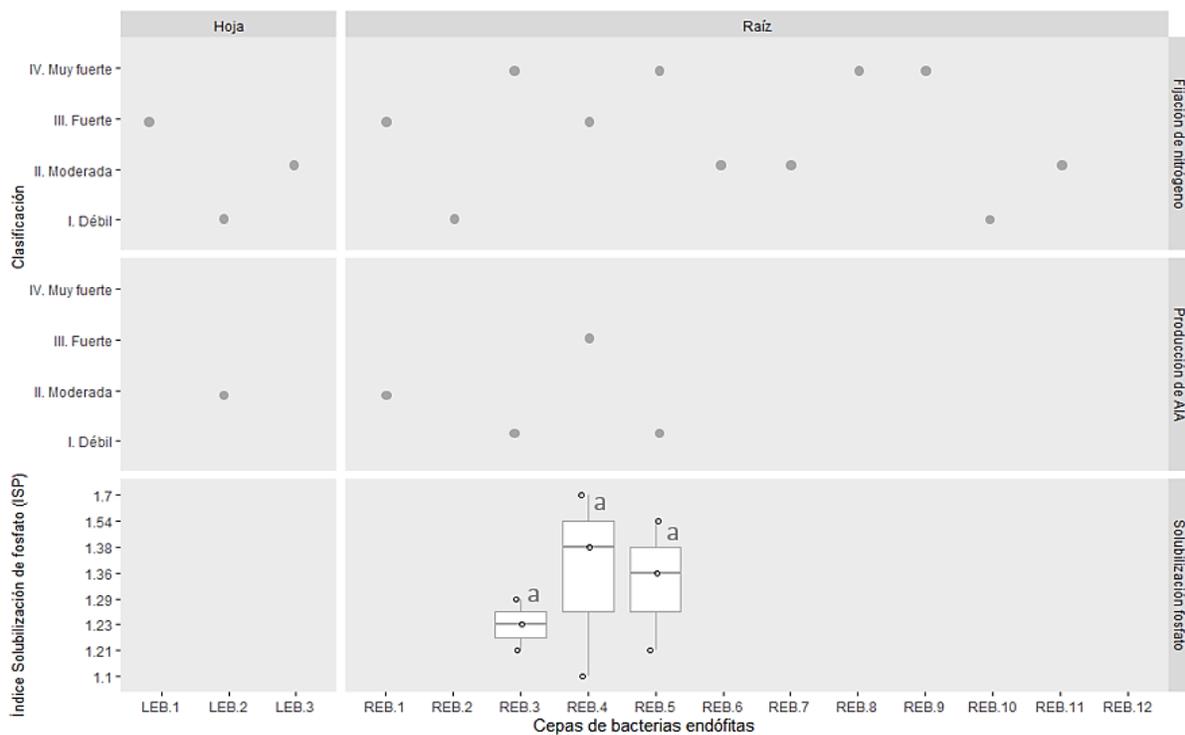


Figura 7. Actividad de promoción de crecimiento vegetal: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de ácido indol-3-acético (AIA) de bacterias endófitas aisladas de raíces y hojas de *Rhizophora mangle* del manglar de Puntarenas, Costa Rica. Las diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0.05$), según la prueba de Tukey, se representan con letras iguales

4.5 Actividad de promoción del crecimiento en *Oryza sativa*

Para este ensayo se seleccionaron las cepas REB.4 y REB.5, con base en los resultados obtenidos en las pruebas de promoción del crecimiento vegetal. Los parámetros morfológicos medidos en las plántulas de arroz inoculadas con las cepas de bacterias endófitas REB.4 y REB.5, luego de los 8 meses de cultivo, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto al tratamiento control (Figura 8) y no se percibió ninguna diferencia entre éstos tras una comparación visual (Figura 9).

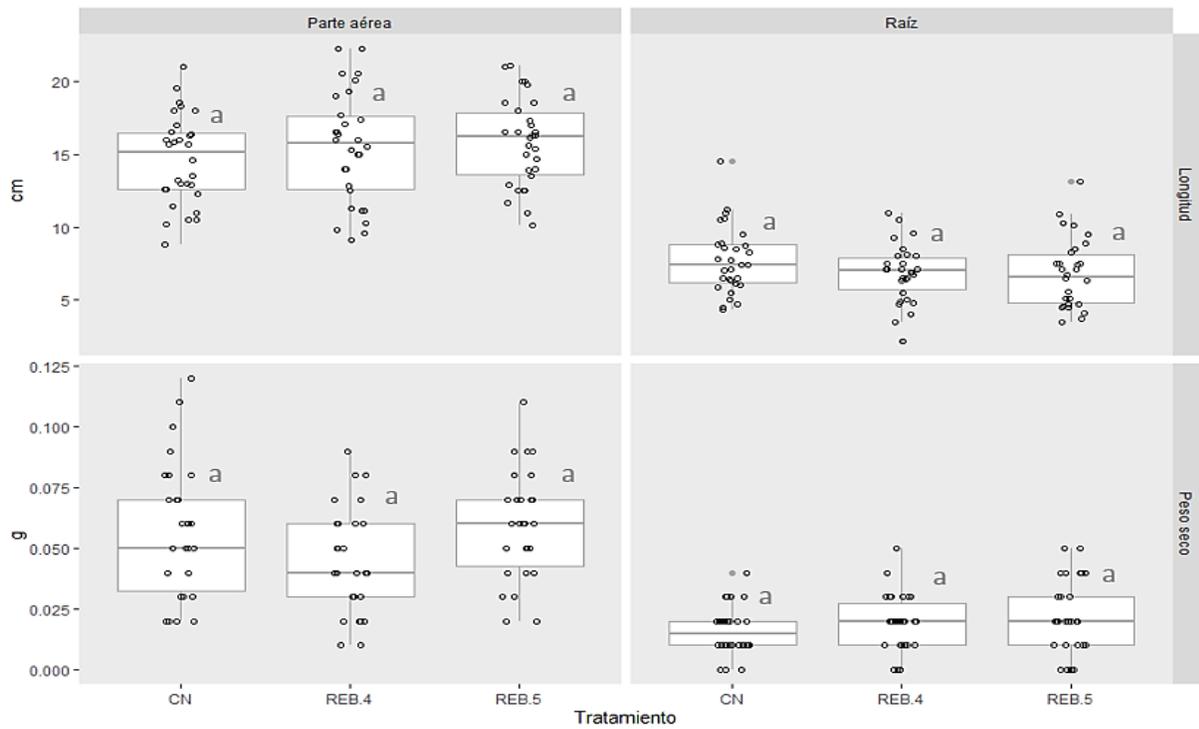


Figura 8. Longitud (cm) y peso seco (g) de raíces y parte aérea de plántulas de *Oryza sativa* con 8 meses de cultivo, inoculadas con las bacterias endófitas REB.4 (*Staphylococcus warneri*) y REB.5 (*Pantoea dispersa*) aisladas de *Rhizophora mangle* del Manglar de Puntarenas, Costa Rica. CN corresponde al tratamiento control. La letra a representa que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) de los tratamientos respecto al control, según la prueba de Tukey



Figura 9. Plántulas de *Oryza sativa*, con 8 meses de cultivo, inoculadas con las cepas de bacterias endófitas REB.4 (*Staphylococcus warneri*) y REB.5 (*Pantoea dispersa*) aisladas de *Rhizophora mangle* del Manglar de Puntarenas, Costa Rica. **A.** Control, **B.** Tratamiento con REB.4 y **C.** Tratamiento con REB.5

4.6 Identificación molecular

Según la comparación de secuencias de las bacterias endófitas seleccionadas por medio de la herramienta BLASTn se determinó que las especies más cercanas de las cepas REB.4 y REB.5 corresponden a *Staphylococcus warneri* (número de acceso MT642942.1) y *Pantoea dispersa* (número de acceso MT275631.1), respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Identificación molecular de los aislamientos de bacterias endófitas seleccionadas de *Rhizophora mangle* del manglar de Puntarenas, Costa Rica, mediante secuenciación del 16S ARNr

Aislamiento	Cobertura (%)	Identidad (%)	Especie más cercana
REB.4	100	100	<i>S.warneri</i>
REB.5	100	99.79	<i>P.dispersa</i>

5. Discusión

Las bacterias endófitas son habitantes comunes de los tejidos vegetales y los principales estudios que se han realizado en los últimos años con estos microorganismos se han centrado en la búsqueda de enzimas de importancia industrial, control biológico, agricultura sostenible y mejora de cultivos económicamente importantes (Bhutani et al., 2021).

En este estudio se logró el aislamiento de bacterias endófitas de raíces y hojas de *Rhizophora mangle* recolectadas del manglar de Puntarenas, Costa Rica, y se determinó su potencial biotecnológico. Se aislaron mayor cantidad de colonias bacterianas de las muestras de raíces que de las hojas, contrario a lo reportado en otras investigaciones, las cuales han reportado mayor cantidad de aislamientos de hojas respecto a raíces. Por ejemplo, Ntabo et al. (2018) aislaron 23 cepas de hojas y 19 de raíces de plantas de manglar en Kenia, mientras que Maulani et al. (2019) aislaron 5 cepas endófitas de hojas y ninguna de raíces de la planta *R. mucronata* en Indonesia. Según Hallmann y Berg (2006) hay mayor población bacteriana endófitas en raíces respecto a otros tejidos de las plantas, sin embargo, factores como la duración de la desinfección de la superficie, la concentración del agente desinfectante y el método en sí son las que determinan el espectro bacteriano recuperado (Hallmann y Berg, 2006).

En relación a los ensayos enzimáticos, distintos autores han mostrado interés en el estudio de la actividad enzimática de endófitos de ecosistemas de manglar debido a que muchas de las enzimas derivadas de microorganismos de ambientes marinos son relativamente más estables que las derivadas de plantas o animales (Castro et al., 2014; Sebastianes et al., 2017). La mayoría de las bacterias endófitas aisladas en este estudio mostraron la capacidad de producir al menos una de las tres enzimas evaluadas. Estudios similares en plantas de manglar evidencian bacterias endófitas con presencia de amilasas, proteasas y lipasas (Sebastianes et al., 2017).

Ntabo et al. (2018), concluyeron que prácticamente el 100 % de los endófitos bacterianos de hojas y brotes de plantas de manglar como *R. mucronata*, *Avicennia marina*, *Xylocarpus granatum*, *Sonneratia alba*, *Bruguiera gymnorhiz* y *Lumnitzera racemosa* mostraron presencia

de amilasas y proteasas. Castro et al. (2014) determinaron la actividad enzimática de 40 bacterias aisladas de ramas de *R.mangle* y *A.nitida*, 45 % de los aislamientos presentaron actividad amilolítica, 52.5 % lipolítica y 75 % proteolítica. Además, Deivanai et al. (2014) demostraron que todos los aislamientos (8 en total) de hojas de *Rhizophora apiculata* mostraron resultados positivos para actividad amilasa y 90 % de las bacterias presentaron actividad proteasa y lipasa.

En este estudio se evidenció, tal como lo confirmaron Castro et al. (2014), que el índice enzimático es una rápida y práctica herramienta para evaluar la producción enzimática de los aislamientos bacterianos, donde valores superiores a 1 indican secreción enzimática. Trece cepas aisladas mostraron índices superiores a 1.33, demostrando su potencial para aplicaciones industriales tales como procesamiento de alimentos, papel, fármacos, cosméticos y detergentes (Gupta et al., 2002; Souza, 2010; López et al., 2021). De igual forma, gracias a los avances en la biotecnología, se ha extendido el uso de estas enzimas en procesos de biorremediación, siendo claves en la remoción de contaminantes originados por actividades antropogénicas tales como agroquímicos e hidrocarburos (Bhandari et al., 2021).

La variación en la producción enzimática de las distintas bacterias es probablemente debido a su capacidad de colonización, ya que la producción de enzimas hidrolíticas es un mecanismo que ayuda a hidrolizar los componentes de la pared celular de las células vegetales y ayuda a que las bacterias entren a través de los pelos radiculares y las raíces laterales de las plantas (Bhutani et al., 2021).

La prueba de actividad antimicrobiana *in vitro* es importante para la detección de posibles agentes de control biológico o agentes capaces de atacar microorganismos patógenos humanos (Rodrigues et al., 2018; Kumar et al., 2020). Los endófitos bacterianos aislados no presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 13883™), *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606™), *Enterobacter hormaechei* (ATCC® 700323™) y *Enterococcus faecium* (ATCC® 6056™).

De manera similar, Bibi et al. (2017) encontraron que muy pocos de los aislamientos obtenidos (10 de 317) presentaron actividad antagonista contra bacterias patógenas, tales como

S. aureus y *P.aeruginosa*, también utilizadas en esta investigación. Jose y Christy (2013), evaluaron 26 bacterias endófitas aisladas de hojas, tallos y raíces de *R.mucronata* y determinaron que la actividad antimicrobiana fue mayor contra hongos patógenos que contra bacterias patógenas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación. La falta de actividad antibacteriana pudo deberse a que el método utilizado no estimuló la producción de antibióticos que inhibieran el crecimiento de los patógenos evaluados, esto resulta poco prometedor ya que se está en busca de potenciales fármacos de fuentes naturales para enfrentar el problema de la resistencia a los antibióticos, la cual va en aumento especialmente entre bacterias causantes de enfermedades (Fadiji y Babalola, 2020).

Tres de las cepas bacterianas endófitas (LEB.1, REB.5, REB.10) mostraron actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 9533™) y otras tres cepas (REB.1, REB.3 y REB.4) contra *Candida albicans* (ATCC® 90028™). Esta actividad podría deberse a la producción de metabolitos bioactivos tales como enzimas hidrolíticas, sideróforos o compuestos volátiles pero también a la competencia por espacio y nutrientes o a la alteración del pH del medio por parte de las bacterias endófitas (Govin et al., 2019; Ortiz et al., 2020). Enzimas como proteasas, celulasas, lipasas y quitinasas poseen acción antagonista frente a un amplio espectro de patógenos fúngicos, al degradar la pared o membrana celular de los mismos (Mohamad et al., 2018), mientras que la producción del compuesto volátil conocido como cianuro de hidrógeno (HCN) se considera una importante característica antifúngica, ya que éste actúa como un inhibidor metabólico general en hongos (Govin et al., 2019).

A su vez, el cocultivo de microorganismos es una técnica muy utilizada ya que produce interacciones célula a célula que, según se ha informado, facilitan la producción de metabolitos secundarios que no se producen en cultivos axénicos, que podrían tener actividad antimicrobiana (Mutungi et al., 2022). En un estudio previo desarrollado por Liu y Chen. (2010), encontraron que el 13.3 % de las bacterias endófitas aisladas de *Kandelia candel*, *A.marina* y *Sonneratia apetala* mostraron actividad antifúngica, incluyendo inhibición en el crecimiento de los dos hongos patógenos mencionados.

Por otra parte, el 93.33 % de los aislamientos presentaron mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, como fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de ácido

indol-3-acético (AIA). Catorce de los aislamientos se clasificaron como bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno. El crecimiento de las cepas tras cultivos sucesivos en el medio de cultivo libre de nitrógeno confirma esta actividad, debido a que existen microorganismos capaces de crecer en estos medios de cultivo y que no son fijadoras de nitrógeno, ya que pueden incorporar amonio u otras especies de nitrógeno a concentraciones muy bajas o son capaces de utilizar fracciones fijadas por otros organismos (Rodrigues et al., 2018; Ríos, 2021).

En el ensayo de solubilización de fosfato, únicamente 3 de los aislamientos presentaron una zona clara alrededor de la colonia, característica diagnóstica de esta actividad (Pande et al., 2017). La zona de solubilización se produce debido a la presencia de algunas sustancias como los ácidos orgánicos que son liberados por microorganismos y que solubilizan el P del medio (Matos et al., 2017). Los resultados del índice de solubilización (IS) obtenidos ($IS < 1.7$) reflejan una baja actividad por parte de las bacterias endófitas aisladas, esto con base en la clasificación de la capacidad de solubilización de fosfato de Costa et al. (2016): baja ($IS < 2$ mm), media ($2 \geq IS < 4,0$ mm) o alta ($IS > 4$ mm).

Según De Abreu et al. (2017) hay bacterias que muestran solubilización de fosfato en medio líquido y no en placas con agar, lo que sugiere que algunas de las cepas que no mostraron resultados bajo la metodología aplicada en este estudio podrían tener actividad usando otro tipo de medio de cultivo. Incluso en medios sólidos con distinta composición puede haber variaciones en el diámetro del halo, ya que mayor uso de nitratos y altas concentraciones de azúcares como la glucosa pueden influir en el proceso de solubilización (Matos et al., 2017).

El uso del reactivo de Van Urk Salkowski es una importante opción para la determinación cualitativa y semicualitativa de la producción de AIA, ya que asegura la presencia de la hormona en el sobrenadante de cultivos bacterianos o formulaciones líquidas de inoculantes biológicos (Mohite, 2013). Únicamente 5 aislamientos presentaron una tonalidad rosa, color producto de un anillo indol que se forma a partir de la reacción del reactivo Salkowski y el sobrenadante de cada cepa (Putriani et al., 2019). Esta tonalidad varió entre las 5 cepas y según Putriani, Fitri y Ismail, (2019), la intensidad es un indicativo de un contenido más elevado de AIA producido por las bacterias.

Con base en los resultados de la promoción del crecimiento vegetal, se seleccionaron las cepas REB.4 y REB.5, identificadas molecularmente como *Staphylococcus warneri* y *Pantoea dispersa*, respectivamente, para evaluar su efecto en el crecimiento en *Oryza sativa*, un cultivo de interés agrícola y filogenéticamente distinto al ecosistema de manglar.

S. warneri ha sido reportada como bacteria endófito de algunas especies como *Citrus limon* (Faddetta, 2021) y *Oryza sativa* (Hameed et al., 2015), sin embargo, no hay reportes que demuestren la presencia de esta bacteria en tejidos u órganos de plantas de manglar. Por el contrario, *P. dispersa*, además, de ser identificada como bacteria endófito de una variedad de especies de plantas (Verma et al., 2017; Khan et al., 2020), si se ha reportado como endófito de manglar, específicamente en *Laguncularia racemosa*, en un manglar de Sao Paulo, Brasil (Castro et al., 2018).

Las bacterias seleccionadas para el ensayo de promoción del crecimiento vegetal en *O. sativa*, se caracterizaron por presentar resultados positivos para las 3 pruebas de promoción de crecimiento: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de AIA. Previamente, se ha demostrado que *S. warneri* y *P. dispersa* son fijadoras de N (Yousuf et al., 2020; Singh et al., 2021), solubilizadoras de fosfato (Hii et al., 2020; Chen et al., 2014) y productoras de AIA (Shurigin et al., 2020; Verma et al., 2021).

A pesar de que los rasgos de promoción del crecimiento vegetal están confirmados en estas dos especies, no hubieron diferencias significativas en los parámetros morfológicos medidos en las plantas de *O. sativa* inoculadas con las cepas de bacterias endófitas, respecto al tratamiento control. Esto coincide con lo reportado por González y Fuentes, (2017), quienes indicaron que existen microorganismos con capacidad promotora de vegetales, pero que no expresan dicha capacidad en todas las especies de plantas.

Una de las razones del porqué no se observó mayor crecimiento en las plántulas de *O. sativa* en comparación al control puede deberse a una colonización no exitosa de las raíces por parte de las bacterias inoculadas. La colonización exitosa por endófitos se ve afectada por el tipo de tejido vegetal, el genotipo de la planta, el tipo de cepa y sus mecanismos enzimáticos, así como la motilidad de las cepas para llegar a la planta huésped, los mecanismos de entrada y

propagación dentro de la planta y la capacidad de superar la inmunidad de éstas (Mengistu, 2020). Los exudados de las raíces también son influyentes como mecanismo de entrada de los endófitos ya que actúan como quimioatrayentes para un grupo diverso de comunidades microbianas (Vandana et al., 2021), sin embargo, hay ocasiones en donde más bien éstos tienen efectos negativos sobre las cepas bacterianas ya que en lugar de ser compuestos de atracción en el proceso de colonización se convierten en compuestos de repulsión (Compant et al., 2010).

De igual manera, la forma de administrar el inóculo en las plántulas de *O. sativa*, así como la naturaleza del mismo, pudo afectar el proceso de colonización de las bacterias endófitas y, por ende, la posibilidad de ver un efecto verdadero en las plantas (Chai et al., 2022). Si bien, el método de inoculación en plántulas empleado en este estudio es uno de los más utilizados por permitir una alta colonización del inoculante (Chai et al., 2022) y, que, además, ha mostrado resultados positivos en la inoculación de plántulas de *O. sativa*, su efectividad está sujeta en gran medida a la concentración utilizada de inóculo, tiempo y forma de exposición de éste (Gholamalizadeh et al., 2018; Banik et al., 2019).

En relación a lo anterior, está el ejemplo de la investigación desarrollada por Banik et al. (2019), en la que sí obtuvieron promoción de crecimiento de las plántulas de *O. sativa* al sumergir las raíces durante 6 horas en las suspensiones bacterianas (al igual que en este estudio), pero utilizando una concentración menor (1.2×10^8 células mL^{-1}) e inóculos preparados a partir de células bacterianas centrifugadas. Khan et al. (2017), obtuvieron resultados positivos de promoción en plántulas de *O. sativa* tratándolas, al igual que en esta investigación, con una suspensión bacteriana en agua destilada, pero utilizando una concentración mayor (1.0×10^9 células mL^{-1}) y un tiempo de exposición de toda la noche.

Por otra parte, en caso de que la colonización bacteriana haya sido exitosa, una razón que explicaría la falta de respuesta de las plantas de *O. sativa* tratadas con *S.warneri* y *P.dispersa* sería la presencia de condiciones abióticas no favorables. Según Kloepper et al. (1980) factores como el tipo y humedad del suelo afectan en gran medida la supervivencia bacteriana y la permanencia dentro de las plantas. Además, dado que las bacterias endófitas dependen del suministro nutricional que ofrece la planta, cualquier parámetro que afecte el estado nutricional

de la misma podría, en consecuencia, afectar la supervivencia de la comunidad endófito (Hallmann et al., 1997).

Según Velázquez et al., (2015), la temperatura máxima y mínima a la cual crecen las plantas de arroz influye en la floración y en otros estados del desarrollo. El crecimiento del tallo, hojas y raíces se da en un mínimo de 7 °C y su óptimo a los 23 °C, mientras que la germinación se produce a una temperatura mínima de 10 a 13 °C, siendo la óptima entre 30 a 35 °C. Las plantas de arroz en esta investigación crecieron a ~19 °C, por lo tanto, la falta de condiciones óptimas de temperatura pudo haber influido en que las plantas no alcanzaran la etapa de producción de grano y consecuentemente, la posibilidad de registrar un efecto real en la promoción del crecimiento.

De igual forma, pese a una colonización efectiva, las bacterias con rasgos de promoción del crecimiento vegetal no siempre influyen positivamente en el crecimiento de las plantas (Vaikuntapu et al., 2014). Según Cueva et al. (2021) la detección de éstos rasgos por ensayos *in vitro* no es concluyente para determinar el efecto de una cepa candidata para la promoción del crecimiento de las plantas, ya que el desarrollo bacteriano, además de depender de condiciones ambientales, también está sujeto a la interacción planta-bacteria. Hay ciertas bacterias promotoras del crecimiento vegetal que muestran especificidad para su huésped natural y solamente generan efectos de promoción en los mismos (Vaikuntapu et al., 2014), este podría ser el caso de las cepas de *S.warneri* y *P.dispersa* aisladas en esta investigación.

6. Conclusiones

-Este estudio representa el primer reporte de bacterias endófitas cultivables aisladas de *Rhizophora mangle* en Costa Rica.

-Los resultados de actividad enzimática, antimicrobiana y promotora del crecimiento vegetal de las bacterias endófitas aisladas demuestran el potencial biotecnológico de los microorganismos procedentes de ambientes marino costeros.

-La mayoría de las cepas aisladas mostraron presencia de amilasas, lipasas o proteasas, las cuales son enzimas de importancia industrial.

-Se detectó actividad antifúngica contra *Candida albicans* (ATCC® 90028™) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 9533™) en algunas de las cepas aisladas de raíces de *R. mangle*, lo que puede representar una alternativa para el control biológico de esos patógenos.

-Dos aislamientos, identificados como *Staphylococcus warneri* y *Pantoea dispersa*, mostraron excelentes resultados en las pruebas *in vitro* de promoción de crecimiento vegetal, lo que representa una alternativa para la agricultura sostenible.

-*S. warneri* y *P. dispersa* han sido documentadas por otros autores como bacterias endófitas de distintas plantas. *P. dispersa* fue reportada como endófito de una planta de manglar en Brasil.

-No se observó mayor crecimiento en las plántulas de *O. sativa* al ser inoculadas con *S. warneri* o *P. dispersa* en comparación al control, debido, posiblemente, a factores como las interacciones específicas huésped-bacterias, el proceso de colonización y los parámetros ambientales de cultivo.

-Se confirmó que cepas que muestran rasgos de promoción del crecimiento vegetal en ensayos *in vitro*, no producen necesariamente efectos de promoción en condiciones reales de crecimiento.

7. Recomendaciones

- Promover la bioprospección de microorganismos endófitos en otros órganos o tejidos de *Rhizophora mangle* o en otras especies de plantas de los ecosistemas de manglar con potencial biotecnológico para la I+D+i (investigación, desarrollo e innovación) y el Desarrollo Sostenible de las zonas marino-costeras.
- Aplicar otras técnicas para la evaluación de más enzimas con importancia económica y para la estimulación de la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana.
- Desarrollar el ensayo de promoción de crecimiento vegetal bajo un sistema gnotobiótico que permita la validación de la colonización de las bacterias endófitas en las plántulas de *Oryza sativa*.
- Optimizar el método de inoculación de las bacterias endófitas en plántulas de cultivos de interés socioeconómico que promueva mecanismos de promoción del crecimiento vegetal como alternativa para la agricultura sostenible.
- Generar investigaciones adicionales en biotecnología azul para el descubrimiento en el país de compuestos bioactivos con importancia biotecnológica.

8. Fuentes de Financiamiento

Esta investigación contó con el financiamiento del Fondo Especial para la Educación Superior (FEES) y del Fondo para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles (FOCAES) de la Universidad Nacional de Costa Rica.

9. Conflictos de intereses

Las personas participantes de esta investigación declaran que no existe conflicto de intereses en el desarrollo de esta investigación.

10. Referencias

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., y Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Alnahdi, H. S. (2012). Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 71-74. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2915>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrade, G., Esteban, E., Velasco, L., Lorite, M. J., y Bedmar, E. J. (1997). Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). *Plant and Soil*, 197(1), 19-23.
- Anu C. J., Priscilla H. C., y Jijo C. J. (2014). Production and purification of cellulase enzyme by endophytic *Bacillus* sp. isolated from *Rhizophora mucronata*. *International Journal of Agriculture Environment and Biotechnology*, 7, 367-370. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2014.00257.5>
- Ashitha, A., Midhun, S. J., Sunil, M. A., Nithin, T. U., Radhakrishnan, E. K., y Mathew, J. (2019). Bacterial endophytes from *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp., with antibacterial efficacy against human pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103624. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103624>
- Azman A. S., Othman I., Velu S. S., Chan K. G., y Lee L. H. (2015). Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Frontiers in Microbiology*, 6, 856. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00856>
- Banik, A., Dash, G. K., Swain, P., Kumar, U., Mukhopadhyay, S. K., y Dangar, T. K. (2019). Application of rice (*Oryza sativa* L.) root endophytic diazotrophic *Azotobacter* sp. strain Avi2 (MCC 3432) can increase rice yield under green house and field condition. *Microbiological Research*, 219, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.004>

- Banik, A., Mukhopadhaya, S. K., y Dangar, T. K. (2016). Characterization of N₂-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes. *Planta*, 243(3), 799-812. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2444-8>
- Benavides, C., Samper, J., y Cortés, J. (2016). Cambios en la cobertura de manglares en Bahía Culebra, Pacífico Norte de Costa Rica (1945-2010). *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 955-964.
- Bhandari, S., Poudel, D. K., Marahatha, R., Dawadi, S., Khadayat, K., Phuyal, S., Shrestha., S., Gaire, S., Basnet, K., Khadka, U., y Parajuli, N. (2021). Microbial enzymes used in bioremediation. *Journal of Chemistry*, 2021, 1-17.
- Bhutani, N., Maheshwari, R., Kumar, P., Dahiya, R., y Suneja, P. (2021). Bioprospecting for extracellular enzymes from endophytic bacteria isolated from *Vigna radiata* and *Cajanus cajan*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(3), 2-4.
- Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S. A., Bakhsh, S. A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A. A. K., y Azhar, E. I. (2017). Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo-and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 16(2). 1-12. <https://doi.org/10.4238/gmr16029657>
- Bind, M., y Nema, S. (2019). Isolation and Molecular Characterization of Endophytic Bacteria from Pigeon Pea Along With Antimicrobial Evaluation against *Fusarium udum*. *Applied Microbiology Open Access*, 5, 163.
- Boontanom, P., y Chantarasiri, A. (2020). Diversity of culturable epiphytic bacteria isolated from seagrass (*Halodule uninervis*) in Thailand and their preliminary antibacterial activity. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(7), 2907-2913. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210706>
- Carvajal, M., Herrera, A., Valdés, B., y Campos, R. (2019). Manglares y sus Servicios Ecosistémicos: hacia un Desarrollo Sostenible. *Gestión y Ambiente*, 22(2), 277-290. <https://doi.org/10.15446/ga.v22n2.80639>
- Castro, R. A., Dourado, M. N., Almeida, J. R. D., Lacava, P. T., Nave, A., Melo, I. S. D., Azevedo, J.L., y Quecine, M. C. (2018). Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.04.002>

- Castro, R. A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Batista, B. D., Luvizotto, D. M., Marcon, J., Ferreira, A., Melo, I y Azevedo, J. L. (2014). Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*, 3(1), 382. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-382>
- Cavalcanti, L., Damasceno, G., Costa, A. A. A., y Bezerra, A. C. C. (2016). Myxomycetes in Brazilian mangroves: species associated with *Avicennia nitida*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*. *Marine Biodiversity Records*, 9(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s41200-016-0035-4>
- Chai, Y. N., Futrell, S., y Schachtman, D. P. (2022). Assessment of bacterial inoculant delivery methods for cereal crops. *Frontiers in Microbiology*, 13, 791110.
- Chen, Q., Zhao, Q., Li, J., Jian, S., y Ren, H. (2016). Mangrove succession enriches the sediment microbial community in South China. *Scientific Reports*, 6, 27468. <https://doi.org/10.1038/srep27468>
- Chen, Y., Fan, J. B., Du, L., Xu, H., Zhang, Q. H., y He, Y. Q. (2014). The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Applied Soil Ecology*, 84, 235-244.
- Chen, Y. L., Lee, C. C., Lin, Y. L., Yin, K. M., Ho, C. L., y Liu, T. (2015). Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, 16(18), 2-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S18-S13>
- Chowdhury, M. E. K., Jeon, J., Rim, S. O., Park, Y. H., Lee, S. K., y Bae, H. (2017). Composition, diversity and bioactivity of culturable bacterial endophytes in mountain-cultivated ginseng in Korea. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10280-7>
- Compant, S., Clément, C., y Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.
- Costa, E. M. D., Carvalho, F. D., Nóbrega, R. S. A., Silva, J. S., y Moreira, F. M. D. S. (2016). Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. *Scientia Agricola*, 73, 301-310. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0294>

- Cueva, L. G., Goulart, M. C., Attili de Angelis, D., Nopper Alves, M., y Fantinatti-Garboggini, F. (2021). Multiple plant growth-promotion traits in endophytic bacteria retrieved in the vegetative stage from passionflower. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 621740.
- Da Silva, C. F., Vitorino, L. C., Mendonca, M. A. C., Souchie, E. L., de Araujo, W. L., Ribeiro, M. N. De Albuquerque, L.C., y Soares, M. A. (2018). Bioprospection of Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria from the Roots of the Medicinal Plant *Aloe vera*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *7*(3), 41-61.
- De Abreu, C. S., Figueiredo, J. E. F., Oliveira-Paiva, C. A., Dos Santos, V. L., Gomes, E. A., Ribeiro, V. P., Barros, B.A., Lana U.G.P., y Marriel, I. E. (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, *16*(1).
- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., y Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, *33*(2), 133-148.
- Deivanai, S., Bindusara, A. S., Prabhakaran, G., y Bhore, S. J. (2014). Culturable bacterial endophytes isolated from Mangrove tree (*Rhizophora apiculata* Blume) enhance seedling growth in Rice. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, *5*(2), 437-444. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.136233>
- dos Santos, M. L. D., Berlitz, D. L., Wiest, S. L. F., Schünemann, R., Knaak, N., y Fiuza, L. M. (2018). Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *61*, 1-11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160431>
- dos Santos, M. S., Sanglard, L. M., Barbosa, M. L., Namorato, F. A., de Melo, D. C., Franco, W. C., Pérez, J., Martins, S., y DaMatta, F. M. (2019). Silicon nutrition mitigates the negative impacts of iron toxicity on rice photosynthesis and grain yield. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *189*, 110008.
- Du, B., Luo, H., He, L., Zhang, L., Liu, Y., Mo, Z., Shenggang, P., Tian, H., Duan, M., y Tang, X. (2019). Rice seed priming with sodium selenate: Effects on germination, seedling growth, and biochemical attributes. *Scientific Reports*, *9*(1), 4311.
- Ek, M., Gómez, R., Orozco, A., Rodríguez, C., González, G., y Tamez, P. (2019). Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 463. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00463>

- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y. I., Morisaki, H., Mitsui, H., y Minamisawa, K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46(3), 617-629. <https://doi.org/10.1080/00380768.2000.10409127>
- Etesami, H., Mirsyed Hosseini, H., y Alikhani, H. A. (2014). In planta selection of plant growth promoting endophytic bacteria for rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(2), 491-503. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162014005000039>
- Faddetta, T., Abbate, L., Alibrandi, P., Arancio, W., Siino, D., Strati, F., Filippo, C., Del Bosco, S., Carimi, F., Puglia, A.M., Cardinale, M., Gallo, G y Mercati, F. (2021). The endophytic microbiota of *Citrus limon* is transmitted from seed to shoot highlighting differences of bacterial and fungal community structures. *Scientific Reports*, 11(1), 7078.
- Fadiji, A. E., y Babalola, O. O. (2020). Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 467.
- Finlayson, C. (2018). Mangroves. En *The Wetland Book II: Distribution, Description and Conservation* (pp. 93-108). Springer. https://doi-org.una.idm.oclc.org/10.1007/978-94-007-4001-3_258
- Flores, A. C., Delgado, M., Ascacio, J. A., Villareal, S., Michel, M. R., Aguilar, C. N., y Rodríguez, R. (2019). Hydrolases of Halophilic Origin with Importance for the Food Industry. En *Enzymes in Food Biotechnology*, 197-219. México: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00013-X>
- Galippe V. (1887). Note sur la présence de micro-organismes dans les tissus végétaux. *C R Seances Soc Biol Fil*, 39, 410–416.
- Gayathri, S., Saravanan, D., Radhakrishnan, M., Balagurunathan, R., y Kathiresan, K. (2010). Bioprospecting potential of fast growing endophytic bacteria from leaves of mangrove and salt-marsh plant species. *Indian Journal of Biotechnology*, 9, 397-402.
- Gholamalizadeh, R., Khodakaramian, G., Ebadi, A. A., y Khoshkdaman, M. (2018). Identification of predominant epiphytic and endophytic bacterial isolates in rice seeds effective for enhancement of seed germination and plant growth. *Iran Agricultural Research*, 37(2), 91-98. <https://doi.org/10.22099/IAR.2019.5089>

- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L. L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J. y Duke, N. (2011). Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*, 20(1), 154-159. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x>
- González F, H., y Fuentes M, N. (2017). Action mechanism of five microorganism promoters of plan growth. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17-31.
- Gould, S. W., Chadwick, M., Cuschieri, P., Easmon, S., Richardson, A. C., Price, R. G., y Fielder, M. D. (2009). The evaluation of novel chromogenic substrates for the detection of lipolytic activity in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and MRSA from two European study groups. *FEMS Microbiology Letters*, 297(1), 10-16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01654.x>
- Govin, A., Leal, G., y López, D. (2019). Actividad antagónica de bacterias endófitas de *Leucocroton havanensis* Borhidi frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 34(2). 1-6.
- Gull, M. (2016). Plant Health. En *Plant Growth*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/64869>
- Gupta, R., Beg, Q., y Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., y Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.
- Hallmann, J., y Berg, G. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *Microbial Root Endophytes*, 15-31.
- Hameed, A., Yeh, M. W., Hsieh, Y. T., Chung, W. C., Lo, C. T., y Young, L. S. (2015). Diversity and functional characterization of bacterial endophytes dwelling in various rice (*Oryza sativa* L.) tissues, and their seed-borne dissemination into rhizosphere under gnotobiotic P-stress. *Plant and Soil*, 394, 177-197.
- Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., y Sessitsch, A. (2015). The hidden world within Plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79, 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>

- Hii, Y. S., San, C. Y., Lau, S. W., y Danquah, M. K. (2020). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganisms from peat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101643.
- Jiang, Z., Tuo, L., Huang, D., Osterman, I., Tyurin, A., Liu, S., y Li, F. (2018). Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 868. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00868>
- Jose, A. C., y Christy, P. H. (2013). Assessment of antimicrobial potential of endophytic bacteria isolated from *Rhizophora mucronata*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(10), 188-194.
- Kandel, S. L., Joubert, P. M., y Doty, S. L. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*. 5(4), 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
- Khan, A. L., Shahzad, R., Al-Harrasi, A., y Lee, I. J. (2017). Endophytic microbes: a resource for producing extracellular enzymes. En *Endophytes: Crop Productivity and Protection*, 95-110. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66544-3_5
- Khan, M. M. A., Haque, E., Paul, N. C., Khaleque, M. A., Al-Garni, S. M., Rahman, M., y Islam, M. T. (2017). Enhancement of growth and grain yield of rice in nutrient deficient soils by rice probiotic bacteria. *Rice Science*, 24(5), 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2017.02.002>
- Khan, S. S., Verma, V., y Rasool, S. (2020). Diversity and the role of endophytic bacteria: a review. *Botanica Serbica*, 44(2), 103-120.
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., y Miller, T. D. (1980). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70(11), 1078-1082.
- Kumar, V., Jain, L., Jain, S. K., Chaturvedi, S., y Kaushal, P. (2020). Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities. *South African Journal of Botany*, 134, 50-63.
- Lanka, S., y Latha, J. N. L. (2015). A short review on various screening methods to isolate potential lipase producers: lipases-the present and future enzymes of biotech industry. *International Journal of Biological Chemistry*, 9(5), 207-219.

<https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.207.219>

- Lata, R. K., Divjot, K., y Nath, Y. A. (2019). Endophytic microbiomes: biodiversity, ecological significance and biotechnological applications. *Research Journal of Biotechnology*, 14, 142-162.
- Latif, A., Ahmed, B., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., y Lee, I. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(3), 58-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.001>
- Liu, Y., y Chen, G. (2010). Isolation of endophyte bacteria from mangrove and screening of antagonistic strains against dematiaceous fungi. *China Tropical Medicine*, 10(1), 13-42.
- Liu, M., Zhang, H., Lin, G., Lin, H., y Tang, D. (2018). Zonation and directional dynamics of mangrove forests derived from time-series satellite imagery in Mai Po, Hong Kong. *Sustainability*, 10(6), 1913. <https://doi.org/10.3390/su10061913>
- López Benítez, Y. A., Moreira, L. M., y Benítez Rodas, G. A. (2021). Bacterias asociadas a *Sarcocornia neei* (Lag.) con aparente actividad hidrolítica y control biológico provenientes del Chaco seco Paraguayo. *Reportes Científicos de la FACEN*, 12(1), 21-31.
- Maheshwari, R., Bhutani, N., y Suneja, P. (2019). Screening and characterization of siderophore producing endophytic bacteria from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum* plants. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7, 7-14. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70502>
- Manikkam, R., Pati, P., Thangavel, S., Venugopal, G., Joseph, J., Ramasamy, B., y Dastager, S. G. (2019). Distribution and Bioprospecting Potential of Actinobacteria from Indian Mangrove Ecosystems. En *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications* (pp. 319-353). Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_11
- Matos, A. D., Gomes, I. C., Nietsche, S., Xavier, A. A., Gomes, W. S., Dos Santos Neto, J. A., y Pereira, M. C. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 2945-2954. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>
- Maulani, B. I. G., Rasmi, D. A. C., y Zulkifli, L. (2019). Isolation and characterization of endophytic bacteria from mangrove *Rhizophora mucronata* Lam. and antibacterial

- activity test against some pathogenic bacteria. *Journal of Physics: Conference Series*, 1402(3), 033038
- Mengistu, A. A. (2020). Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. *International Journal of Microbiology*. 2020. 1-8. <https://doi.org/10.1155/2020/6927219>
- Mohamad, O. A., Li, L., Ma, J. B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J. W., Rasulov, B.A., Liu, Y.H., Hedlund, B., y Li, W. J. (2018). Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atropheus* against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 924.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638-649.
- Moronta, F., Gionechetti, F., Pallavicini, A., Marys, E., y Venturi, V. (2017). Rice Bacterial Endophytes; 16S-Based Taxonomic Profiling, Isolation and Simplified Endophytic Community from Two Venezuelan Cultivars. *Microorganisms*, 6(14), 1-31. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010014>
- Mutungi, P. M., Wekesa, V. W., Onguso, J., Kanga, E., Baleba, S., y Boga, H. I. (2022). Culturable bacterial endophytes associated with shrubs growing along the draw-down zone of lake Bogoria, Kenya: Assessment of antifungal potential against *Fusarium solani* and induction of bean root rot protection. *Frontiers in Plant Science*, 12, 3394.
- Ngo, V. A., Wang, S. L., Nguyen, V. B., Doan, C. T., Tran, T. N., Tran, D. M., Tran, T.D. y Nguyen, A. D. (2020). Phytophthora antagonism of endophytic bacteria isolated from roots of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Agronomy*, 10(2), 286. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020286>
- Ntabo, R. M., Nyamache, A. K., Lwande, W., Kabii, J., y Nonoh, J. (2018). Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates from Selected Mangrove Plants in Kenya. *The Open Microbiology Journal*, 12(1), 354-363. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010354>
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., y Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

- Ortiz, C.P., de Andrade, S.L., y Procópio, R.E.L. (2020). Antifungal activity of endophytic microorganisms isolated from *Acmella ciliata*. *Genetics and Molecular Research*, 19(2), 2-14.
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., y Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>
- Passari, A. K., Mishra, V. K., Leo, V. V., Gupta, V. K., y Singh, B. P. (2016). Phytohormone production endowed with antagonistic potential and plant growth promoting abilities of culturable endophytic bacteria isolated from *Clerodendrum colebrookianum* Walp. *Microbiological Research*, 193, 57-73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.006>
- Picado, Y. S., y Solano, M. F. V. (2018). Situación del mercado del arroz en Costa Rica: una mirada a la realidad. *Revista ABRA*, 38(56), 1-22. <http://dx.doi.org/10.15359/abra.38-56.1>
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Pradhan, A., y Mishra, B. B. (2015). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on germination and growth of rice (*Oryza sativa* L.). *The Ecoscan*, 9(1&2), 213-216.
- Puri, A., Padda, K. P., y Chanway, C. P. (2018). Nitrogen-fixation by endophytic bacteria in agricultural crops: recent advances. *Nitrogen in Agriculture*, 73-94. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71988>
- Putriani, P., Fitri, L., y Ismail, Y. S. (2019). The Potential Endophytic Bacteria Isolated from Rice (*Oryza sativa*) as Biofertilizer. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 11(2), 178-185. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v11i2.18401>
- Raweekul, W., Wuttitummaporn, S., Sodchuen, W., y Kittiwongwattana, C. (2016). Plant growth promotion by endophytic bacteria isolated from rice (*Oryza sativa*). *Science & Technology Asia*, 6-17.
- RCoreTeam. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

- Regalado, A. I., Sánchez, L. M., y Mancebo, B. (2016). *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(1), 1-17.
- Ríos, Y. (2021). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de clones de ajo conservados *in vitro*. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 9(1).
- Rodrigues, A. A., Araujo, M. V. F., Soares, R. S., Oliveira, B. F. D., Ribeiro, I. D., Sibov, S. T., y Vieira, J. D. G. (2018). Isolation and prospection of diazotrophic rhizobacteria associated with sugarcane under organic management. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 3813-3829.
- Samper, J., y Silva, A. M. (2015). Structural complexity of mangroves in Playa Blanca, Escondido and Rincón de Osa, Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 63, 199-208.
- Sánchez, Y. G., Ortega, G. R., Martín, E. E., Sancho, A. L. A., Solano, J. A. V., & Chacón, L. V. (2022). Estructura vegetal y flora asociada del manglar de Mata de Limón, Puntarenas, Costa Rica. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 14(1), 51-64.
- Saravanakumar, K., Rajendran, N., Kathiresan, K., y Chen, J. (2016). Bioprospects of microbial enzymes from mangrove-associated fungi and bacteria. En *Advances in Food and Nutrition Research*, 79, 99-115. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.08.003>
- Sebastianes, F. L. S., de Azevedo, J. L., y Lacava, P. T. (2017). Diversity and biotechnological potential of endophytic microorganisms associated with tropical mangrove forests. En *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*, 37-56. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_3
- Shah, A., Hassan, Q. P., Mushtaq, S., Shah, A. M., y Hussain, A. (2017). Chemoprofile and functional diversity of fungal and bacterial endophytes and role of ecofactors—A review. *Journal of Basic Microbiology*, 57(10), 814-826.
- Shurigin, V., Egamberdieva, D., Li, L., Davranov, K., Panosyan, H., Birkeland, N. K., Wirth, S y Bellingrath-Kimura, S. D. (2020). Endophytic bacteria associated with halophyte *Seidlitzia rosmarinus* Ehrenb. ex Boiss. from saline soil of Uzbekistan and their plant beneficial traits. *Journal of Arid Land*, 12, 730-740.
- Singh, M. K., Singh, D. P., Mesapogu, S., Babu, B. K., y Bontemps, C. (2011). Concomitant colonization of nifH positive endophytic *Burkholderia* sp. in rice (*Oryza sativa* L.)

- promotes plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 2023-2031. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0664-z>
- Singh, P., Singh, R. K., Li, H. B., Guo, D. J., Sharma, A., Lakshmanan, P., Malviya, M.K., Song, X.P., y Li, Y. R. (2021). Diazotrophic bacteria *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae* promote sugarcane growth by inducing nitrogen uptake and defense-related gene expression. *Frontiers in Microbiology*, 3272.
- Soldan, R., Mapelli, F., Crotti, E., Schnell, S., Daffonchio, D., Marasco, R., y Cardinale, M. (2019). Bacterial endophytes of mangrove propagules elicit early establishment of the natural host and promote growth of cereal crops under salt stress. *Microbiological Research*, 223, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.008>
- Souza, P. M. D. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Strobel, G. (2018). The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *Journal of Fungi*, 4(2), 57. <https://doi.org/10.3390/jof4020057>
- Swarnalakshmi K., Rajkhowa S., Senthilkumar M., Dhar D.W. (2019) Influence of endophytic bacteria on growth promotion and protection against diseases in associated plants. En: *Microbial Interventions in Agriculture and Environment*. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9084-6_12
- Tam, H. T., Phuong, T. V., y Diep, C. N. (2018). Isolation and identification of endophytic bacteria associated with *Rhizophora mucronata* and *Avicennia alba* of Nam Can district, Ca Mau Mangrove Ecosystem. *International Journal of Innovations in Engineering and Technology (IJJET)*, 10(4), 147-159. <http://dx.doi.org/10.21172/ijjet.104.25>
- Vaikuntapu, P. R., Dutta, S., Samudrala, R. B., Rao, V. R., Kalam, S., y Podile, A. R. (2014). Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated with tomato. *Indian Journal of Microbiology*, 54, 403-412.
- Vandana, U. K., Rajkumari, J., Singha, L. P., Satish, L., Alavilli, H., Sudheer, P. D., Chauhan, S., Ratnala, R., Satturu, V., Mazumder, P.B, y Pandey, P. (2021). The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions, with prospects of plant growth promotion. *Biology*, 10(2), 101.

- Vega, P., Canchignia, H., González, M., y Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.
- Velasco, M. L., Hernández, C. A., Gómez, E. D., Torres, C., y Caro, P. A. (2019). Bacterias endófitas de *Capsicum frutescens* antagónicas a *Fusarium* spp. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 367-380. <https://doi.org/doi:10.15517/am.v30i2.31760>
- Velázquez, J., Rosales, A., Rodríguez, H., y Salas, R. (2015). Determinación de las etapas de inicio de macollamiento, inicio de primordio, floración y madurez en la planta de arroz, con el sistema s, v y r correlacionado con la sumatoria térmica. *Agronomía Costarricense*, 39(2), 121-130.
- Verma, S. K., Kingsley, K., Irizarry, I., Bergen, M., Kharwar, R. N., y White Jr, J. F. (2017). Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1680-1691.
- Verma, S. K., Kumar, K., Pal, G., y Verma, A. (2021). The roles of endophytes in modulating crop plant development. En: *Microbiome Stimulants for Crops* (pp. 33-39). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822122-8.00007-8>
- Walia, A., Guleria, S., Chauhan, A., y Mehta, P. (2017). Endophytic bacteria: Role in phosphate solubilization. En: *Endophytes: Crop Productivity and Protection* (pp. 61-93). Cham: Springer. https://doi-org.una.idm.oclc.org/10.1007/978-3-319-66544-3_4
- Wu, P., Xiong, X., Xu, Z., Lu, C., Cheng, H., Lyu, X., Zhang, J., él, W., Deng, W., Lyu, Y., y Lou, Q. (2016). Bacterial communities in the rhizospheres of three mangrove tree species from Beilun Estuary, China. *PloS One*, 11(10), e0164082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164082>
- Yadav, A., y Yadav, K. (2017). Exploring the potential of endophytes in agriculture: a minireview. *Advances in Plants y Agriculture Research*, 6(4), 00221. <https://doi.org/10.15406/apar.2017.06.00221>
- Yousuf, J., Thajudeen, J., Aneesa, P. A., Joseph, A., Divya, P. S., Varghese, A., y AA, M. H. (2020). Diversity and activity of culturable nitrogen fixing heterotrophic bacteria from estuarine and coastal environments of Southeastern Arabian Sea (SEAS). *Regional Studies in Marine Science*, 33, 100973.

- Zamora, P., y Cortés, J. (2009). Los manglares de Costa Rica: el Pacífico norte. *Revista de Biología Tropical*, 57(3), 473-488.
- Zhang, Q., Acuña, J. J., Inostroza, N. G., Mora, M. L., Radic, S., Sadowsky, M. J., y Jorquera, M. A. (2019). Endophytic Bacterial Communities Associated with Roots and Leaves of plants growing in Chilean extreme environments. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41160-x>
- Zhang, Y., Chen, F. S., Wu, X. Q., Luan, F. G., Zhang, L. P., Fang, X. M., Wan S.Z., H, X.F y Ye, J. R. (2018). Isolation and characterization of two phosphate-solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments. *PloS One*, 13(7), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199625>