
**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS
ASIMBIÓTICAS ASOCIADAS AL EUCALIPTO (*Eucalyptus* sp.)
EN CODAZZI, CESAR (COLOMBIA)**

**Characterization of Diazotrophic Bacteria
Non-Symbiotic Associated with Eucalyptus (*Eucalyptus* sp.)
in Codazzi, Cesar (Colombia)**

DOLLY MELISSA OBANDO CASTELLANOS¹, LUDY BEATRIZ BURGOS ZABALA², DIEGO MAURICIO RIVERA BOTÍA¹, MARIA FERNANDA RUBIANO GARRIDO¹, M.Sc.; VERA LÚCIA DIVAN BALDANI³, Ph. D.; RUTH REBECA BONILLA BUITRAGO¹, M.Sc.

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Centro de Biotecnología y Bioindustria. Grupo de Investigación Sistemas Agropecuarios Sostenibles, Laboratorio Microbiología de Suelos. Bogotá, D.C., Colombia. dobando@corpoica.org.co

² Ingeniera de Producción Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula Santander. Cúcuta, Colombia. ludy854@hotmail.com

³ Embrapa Agrobiología, Laboratorio de Gramíneas, Seropédica, Brasil. verabaldani@cnpab.embrapa.br

Presentado 1 de abril de 2010, aceptado 16 de septiembre de 2010, correcciones 4 de octubre de 2010.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de las épocas climáticas (lluvia y sequía) y del estrato de la muestra (suelo rizosférico, raíces y hojas) sobre la población de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* en el Eucalipto (*Eucalyptus* sp.). Así mismo, se evaluó su capacidad en la producción de compuestos indólicos como promotores del crecimiento vegetal y su actividad de reducción de acetileno como indicador de la fijación biológica de nitrógeno. Los resultados no registraron diferencias estadísticas significativas en el test de Tukey ($P \leq 0.05$) en la población con respecto a la época climática. Con respecto al estrato de muestra, los aislamientos tentativos de *Herbaspirillum* sp. y *Azospirillum* sp. presentaron diferencias significativas en suelo rizosférico y raíces. Se obtuvieron 44 aislamientos de los cuales se agruparon por caracterización fenotípica como: 14 presuntivos de *Beijerinckia* sp., 12 de *Azotobacter* sp., ocho de *Dexia* sp., cuatro de *Herbaspirillum* sp., cinco de *Azospirillum* sp., uno de *Gluconacetobacter* sp. y uno de *Burkholderia* sp. Por su alto potencial fueron seleccionados y criopreservados los aislamientos C27, C26 y C25, las cuales presentaron los mejores valores de eficiencia *in vitro*, superando valores de producción de las cepas de referencia utilizadas (*A. chroococcum* (AC1) y *A. brasilense* (SP7)).

Palabras clave: fijación biológica de nitrógeno, compuestos indólicos, promoción del crecimiento vegetal.

ABSTRACT

The effect of climatic seasons (rainy and dry) and the stratum sample (rhizospheric soil, roots and leaves) the population of the genera *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* and *Burkholderia* in soil rhizosphere, roots and leaves of *Eucalyptus* (*Eucalyptus* sp.). It also assesses their ability to produce indoles compounds as plant growth promoters and their acetylene reduction activity as an indicator of biological fixation of nitrogen. The results showed no statistically significant differences in the Duncan test ($P \leq 0.05$) in the population with respect to the climate epoch, suggesting that these bacteria are able to tolerate stress conditions by different physiological mechanisms. With respect to the stratum sample isolates attempts of *Herbaspirillum* sp. and *Azospirillum* sp. significant differences in rhizospheric soil and roots. We obtained 44 isolates of which were grouped by phenotypic characterization as 14 suspected of *Beijerinckia* sp., 12 *Azotobacter* sp., 8 *Derxia* sp., 4 *Herbaspirillum* sp., 5 *Azospirillum* sp., 1 *Gluconacetobacter* sp. and 1 *Burkholderia* sp. Due to their high potential were selected isolates C27, C26 and C25. These four strains present the best values of efficiency *in vitro*, exceeding production values of the reference strains used (*A. chroococcum* (AC1) and *A. brasilense* (SP7)).

Key words: Biological nitrogen fixation, indolic compounds, plant growth promotion.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas silvopastoriles son sistemas de producción pecuaria en donde las leñosas perennes (árboles o arbustos) interactúan con los componentes tradicionales (forrajeras herbáceas y animales) bajo un sistema de manejo integral. Estos sistemas reúnen la producción comercial de madera junto con la ganadería, siendo una alternativa viable para el buen uso de la tierra y el cuidado de la misma. Los árboles pueden ser de vegetación natural o plantada con fines maderables, para productos industriales, o como árboles multipropósito en apoyo específico para la producción animal (Castellano *et al.*, 1989). El Eucalipto (*Eucalyptus* sp.), es una especie arbórea adaptada para las prácticas silvopastoriles, porque tiene copas estrechas que permiten la penetración de una cantidad razonable de luz directa o difusa hasta el nivel del suelo permitiendo el crecimiento de plantas forrajeras apropiado, proporciona sombra a los animales protegiéndolos durante la época de sequía y además establece barreras contra el viento que evitan la erosión de los suelos por arrastre del mismo, entre otros (Couto, 1994; Dell, 1995). Actualmente, el establecimiento y la difícil adaptación de especies arbóreas del Eucalipto en sistemas silvopastoriles en el Caribe seco ha generado altas tasas de mortalidad de las mismas, debido a que las plántulas no se establecen en las condiciones de trasplante a campo, representando cuantiosas pérdidas económicas para su producción. Teniendo en cuenta lo anterior, se crea la necesidad de mejorar las condiciones de nutrición, vigorosidad en la etapa de vivero y por ende su fácil adaptación en campo de estas plántulas, mediante prácticas biotecnológicas sostenibles que garanticen el buen desarrollo de las mismas. Una alternativa viable que contribuye a mejorar esta problemática es la utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno. La presencia de estos microorganismos benéficos asociados a cultivos de interés agrícola es de vital importancia, debido a que

establece y acelera procesos bioquímicos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las mismas, lo que está asociado con un incremento de elementos químicos disponibles y la producción de sustancias de crecimiento o de control de patógenos (Barea *et al.*, 2005). El objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas asociadas al Eucalipto (*Eucalyptus* sp.), con el propósito de seleccionar cepas diazotróficas promisorias eficientes, que contribuyan con el crecimiento, desarrollo y establecimiento de esta especie forestal en condiciones de vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS ÉPOCAS DE LLUVIA Y SEQUÍA SOBRE LAS POBLACIONES DE ALGUNAS BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN EL EUCALIPTO (*Eucalyptus* sp.)

Se tomaron muestras de suelo rizosférico, raíces y hojas del Eucalipto en época de lluvia y sequía en la Estación Experimental Motilonia de Corpoica. A partir de ésta se realizaron las diluciones seriadas hasta 10⁻⁶ en tubos con 9 mL de solución salina al 0,85% de NaCl. Se inocularon 0,1 mL de cada dilución por triplicado, en viales de 5 mL de medio semisólido NFb, JNFb, LGI, LGI-P y JMV para el recuento de *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Burkholderia* spp. respectivamente (Döbereiner *et al.*, 1995). Para el aislamiento de *Azotobacter* spp. se realizó la técnica de siembra de gránulos de suelo en medio Ashby (Fenglerowa, 1965; Novo, 1993).

Las hojas y raíces del Eucalipto se lavaron con agua destilada, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1-2 cm de largo y se pesó 1 g de este material vegetal. De igual forma, se desarrolló el protocolo de desinfección y se realizó la técnica de diluciones seriadas ya descrita anteriormente. Las diluciones fueron inoculadas de igual forma que la muestra de suelo rizosférico (Döbereiner *et al.*, 1995).

Los frascos con medio semisólido inoculados se incubaron durante cinco días a 32 °C y se cuantificaron las bacterias diazotróficas mediante el método del Número Más Probable (NMP) de acuerdo a las metodologías descritas por Döbereiner *et al.*, 1995. Para el recuento de *Azotobacter* sp., se realizó la técnica de recuento en placa, sembrando las diluciones seriadas de suelo rizosférico sobre el medio de cultivo sólido LG (Döbereiner *et al.*, 1995). El análisis de la información se procesó mediante la prueba de comparación de Tukey con 5% de probabilidad utilizando el programa estadístico SPSS Versión 17.0.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS

A partir de la formación de película se realizó el repique en el medio de cultivo específico sólido con 20 mg L⁻¹ de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Luego se repicaron e incubaron en medio de cultivo semisólido y posteriormente, se repicaron nuevamente en medio de cultivo Batata e incubado por tres días más a 32 °C. Las bacterias aisladas se agruparon siguiendo algunas características macroscópicas (forma, borde, pigmentación, superficie, consistencia, olor, entre otras) y características microscópicas de las colonias (morfología celular) (Texeira *et al.*, 2005).

SELECCIÓN DE LAS CEPAS DIAZOTRÓFICAS EFICIENTES

Para la determinación de la eficiencia *in vitro* se utilizaron como controles positivos las cepas *Azospirillum brasilense* (Sp7) y *Azotobacter chroococcum* (AC1).

ACTIVIDAD DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO - ACTIVIDAD DE REDUCCIÓN DE ACETILENO (ARA)

Los cultivos bacterianos obtenidos se inocularon en frascos con capacidad de 10 mL con 3 mL de medio semisólido y se incubaron con tapón de algodón durante 24 horas a 32 °C. Posteriormente, se reemplazó el tapón por uno de caucho y se selló herméticamente. Se sustituyó el 10% de la atmósfera del frasco de cultivo con acetileno y se incubó durante una hora a 32 °C (Eckert *et al.*, 2001; Valero, 2002).

La concentración de etileno se midió inyectando 1 mL de la atmósfera del frasco de cultivo en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer con detector de ionización de llama y una columna Poropak N 200/300 mesh de 6 pies y 3 mm de diámetro. El nitrógeno se utilizó como gas de arrastre en un flujo de 4,2 mL/min. con un tiempo de retención aproximado del etileno de 59 seg y para el acetileno de 1,20 min. La actividad de reducción de acetileno para cada aislamiento, se calculó según la altura del pico de etileno en el cromatograma extrapolando en la ecuación $\text{Log}_{10}Y = 1,351x + 0,736$ ($R^2 = 0,964$), obtenida de la regresión lineal de la curva de calibración construida a partir de diluciones seriadas de etileno en concentraciones de 1, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000, en las mismas condiciones del cromatógrafo (Corpoica, 2009).

SÍNTESIS DE COMPUESTOS INDÓLICOS - PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA)

Se tomaron los cultivos bacterianos y se realizaron suspensiones celulares ajustadas al tubo N.º 5 del patrón de turbidez de Mc Farland. Así mismo, se cuantificó su concentración por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) sobre agar semisólido. El recuento se realizó a las 72 horas y se ajustó la concentración celular con solución salina (0,85% NaCl) hasta obtener 1×10^7 UFC/mL. Se inoculó al 2%, 30 mL de caldo Dygs y se incubó durante 48 horas a 32 °C y 120 rpm. La biomasa obtenida se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se suspendieron en 30 mL de buffer fosfato estéril 0,06 M. De esta suspensión celular se tomaron 100mL y se inocularon 50 mL de caldo BT modificado, sin solución de vitaminas y con una concentración de 20g/L de triptona como precursor del ácido indolacético y 0,2 g/L de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Se incubaron en oscuridad y agitación de 120 rpm y 32 °C durante 48 horas (Celis y Gallardo, 2007; Radwan *et al.*, 2004a).

Posteriormente, se centrifugaron 10 mL del caldo microbiano a 8.000 rpm durante 10 min, se tomaron 2 mL del sobrenadante y se adicionaron 8 mL de reactivo de Salkowsky hasta obtener la coloración rosada (Confirmativa de presencia de compuestos indólicos). Se realizó la lectura de la absorbancia de las muestras a 535 nm en espectrofotómetro Spectronic 601 Milton Roy. La concentración de ácido indolacético (AIA) se calculó mediante la concentración de compuestos indólicos, utilizando la ecuación $Y = 0,0033X - 0,0311$ ($R^2 = 0,9855$) donde, Y = Absorbancia de la muestra a 535 nm y X = μM de AIA. Esta ecuación se obtuvo realizando regresión lineal a la curva de calibración construida a partir de diferentes concentraciones de ácido indolacético, AIA (25, 50, 100,150, 200, 250 y 300 μM) con la adición del reactivo de Salkowsky y leídas a 535 nm en el mismo espectrofotómetro (Kuss, 2006). Para calcular la concentración de AIA producido por mg de células, se determinó el peso seco de las células separadas de los 10 mL de muestra (Radwan *et al.*, 2004b).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS ÉPOCAS DE LLUVIA Y SEQUÍA SOBRE LAS POBLACIONES DE ALGUNOS GÉNEROS DE MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS EN *Eucalyptus* SP. EN CODAZZI (CESAR, COLOMBIA)

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza muestran que la densidad poblacional es homogénea en las dos épocas climáticas analizadas; es decir, la ocurrencia de las bacterias diazotróficas pertenecientes a los géneros preliminarmente identificados: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Dexia*, aislados a partir de muestras de suelo rizosférico, raíces y hojas, no tuvo diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en los periodos de lluvia y sequía, se infiere que no hay influencia de la época climática en el establecimiento de las bacterias diazotróficas.

Este comportamiento puede ser atribuido a características fisiológicas de los géneros diazotróficos, así como a la capacidad de modificar los patrones metabólicos propios de cada género cuando las condiciones edáficas se alteran, principalmente la disponibilidad de carbono y nitrógeno, contenido de humedad, tensión de oxígeno (Sadasivan y Neyra 1987).

Piñero *et al.*, 1988, y Combe *et al.*, 1994, señalan que la eficiencia fotosintética, las exigencias nutricionales y la resistencia a condiciones desfavorables, entre otras, son características que están ligadas a la especie de las plantas que pueden presentar influencia en la eficiencia de fijación de nitrógeno por las bacterias asociadas a éstas, igualmente la diversidad genética de éstas diazotróficas está relacionada con el genotipo de la planta.

EFFECTO DEL ESTRATO DE MUESTRA SOBRE LA POBLACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS ASOCIADAS A *Eucalyptus* SP. EN CODAZZI (CESAR, COLOMBIA)

Las poblaciones de bacterias diazotróficas no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al estrato de la planta del que fueron aisladas, con excepción del grupo tentativo de *Herbaspirillum* (Medio de cultivo JNFb) con el cual presentó una mayor población en la muestra de raíces (Tabla 1) y *Azospirillum* (Medio de cultivo NFB), que presentó una mayor población en las muestras de raíces y suelo rizosférico (Tabla 2).

Estrato	<i>Herbaspirillum</i> ⁽¹⁾ Número de células g ⁻¹
Raíces	1,6532 ^a
Suelo rizosférico	0,6494 ^b
Hojas	0,1396 ^b

Tabla 1. Número de bacterias diazotróficas del género *Herbaspirillum* asociadas a *Eucalyptus* sp. en tres estratos de muestreo en Codazzi (Cesar, Colombia). (1) Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias seguidas con la misma letra en cada medio evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Tukey ($P \leq 0,05$).

La presencia de *Herbaspirillum* sp. en las raíces confirma su condición de microorganismo endófito. No obstante, estudios realizados por Baldani *et al.*, (1986) reportaron que *H. seropedicae* está estrechamente asociada con las raíces de arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) contribuyendo notablemente en la fijación biológica de nitrógeno. Así mismo, Olivares *et al.*, 1996, describió el aislamiento de *H. seropedicae*, a

Estrato	<i>Azospirillum</i> ⁽¹⁾ Número de células g ⁻¹
Raíces	1,9509 ^a
Suelo rizosférico	1,1178 ^b
Hojas	0.8169 ^b

Tabla 2. Número de bacterias diazotróficas del género *Azospirillum* asociadas *Eucalyptus* sp. en tres estratos de muestreo en Codazzi (Cesar, Colombia). (1) Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias seguidas con la misma letra en cada medio evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Tukey ($P \leq 0,05$).

partir de raíces de Gandul (*Cajanus cajan*) demostrando que además de aislarse en especies gramíneas, también puede obtenerse a partir de raíces de especies leguminosas. Igualmente, respecto a *H. seropedicae*, Barraquio *et al.*, 1997, determinaron que ésta coloniza las regiones subepidérmicas en las raíces del arroz. Posteriormente, Valverde *et al.*, 2003, describen el aislamiento de *Herbaspirillum lusitanum*, especie endófito aislada de nódulos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) que tiene la característica única de comportarse como rizobio, al interactuar asociativamente con esta especie leguminosa y en este estudio muy posiblemente de forestales.

En relación a *Azospirillum* sp., su capacidad de colonización en todas las estructuras de la planta ha sido descrita en diversas investigaciones Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Brasil *et al.*, 2005; Brasil *et al.*, 2006; Kuss, 2006, a pesar de que es considerada una rizobacteria y coloniza principalmente la zona de elongación de los pelos radiculares, también se ha encontrado en el interior de las raíces y en la parte aérea de varias especies vegetales (Brasil *et al.*, 2005; Brasil *et al.*, 2006; Kuss, 2006).

La presencia de esta bacteria en raíces y suelo rizosférico ha sido reportado en numerosos estudios que indican que la quimiotaxis a los exudados de la raíz es uno de los factores que influyen en la colonización de los microorganismos en la rizósfera Schmid, 1991. Tanto en *A. lipoferum* como en *A. brasilense* se ha demostrado una fuerte actividad quimiotáctica hacia diversos azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos Barak *et al.*, 1982; Barak *et al.*, 1983; Heinrich *et al.*, 1985; Reinhold *et al.*, 1985, así como hacia compuestos aromáticos López-De Victoria *et al.*, 1993, y exudados radicales (Heinrich *et al.*, 1985; Gafny *et al.*, 1986).

Otros posibles factores de la presencia de esta bacteria en los dos estratos mencionados anteriormente, se atribuye a la capacidad de producir sideróforos por algunas cepas de *A. brasilense* Tapia-Hernández *et al.*, 1992 lo cual pudiera ser de gran importancia durante la colonización del ambiente rizosférico y de la superficie de las raíces, al ejercer efectos antagonicos contra otros microorganismos rizosféricos, incluyendo fitopatógenos (Caballero, 2000).

Así mismo, diferentes estudios han mostrado que *A. brasilense* tiene la capacidad para adherirse a las raíces de plantas gramíneas como el mijo, pasto pangola Umali-García *et al.*, 1980, trigo Jain *et al.*, 1984, y maíz Gafny *et al.*, 1986, así como a las raíces de plantas de otras familias que incluyen al algodón y tomate Lambrecht, 2000, e incluso a superficies inertes como poliestireno y arena (Levanony *et al.*, 1991).

La capacidad de *Azospirillum* sp. para adherirse a las raíces en gramíneas, como en el caso del mijo, es significativamente mayor que la mostrada por otras bacterias de la comunidad rizosférica como *Rhizobium* sp., *Azotobacter* sp., *Klebsiella* sp. o *Pseudomonas* sp., e incluso que

E. coli (Umali-García *et al.*, 1980). Burdman *et al.*, 2000, refieren en su investigación la posibilidad de que una proteína de la membrana externa de *Azospirillum* sp. participe en el proceso de adherencia a las raíces de las plantas. En diversos casos, se ha reportado la aparición de material fibrilar que contribuye al anclaje de *Azospirillum* sp., a las raíces de diversas plantas de interés agrícola (Umali-García *et al.*, 1980; Levanony *et al.*, 1991).

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS

Se seleccionaron 44 aislamientos de hojas, raíces y suelo asociados al Eucalipto. Se escogieron las colonias que presentaron características morfológicas propias de cada género diazotrófico en estudio (Tabla 3).

Género Presuntivo	Aislamientos*	Característica Macroscópica	Característica Microscópica
<i>Beijerinckia</i>	B1* - B2* B3** - B10**	Diez aislamientos presuntivos. Colonias translúcidas con centro oscuro, pequeñas, bordes lisos, elásticas y con elevación convexa.	Bacilos Gram - negativos con gránulos de PHB en los extremos. Motilidad positiva.
<i>Azotobacter</i>	GSE1* - GSE2* GSE3** - GSE12**	Doce aislamientos presuntivos. Colonias color café a negro y colonias verdes fluorescentes, brillantes, circular, con bordes irregulares, consistencia viscosa.	Bacilos Gram - negativos grandes, con formación de quistes. No mótils.
<i>Derris</i>	D1* - D2* D3** - D4** - D5**	Cinco aislamientos presuntivos. Colonias traslúcidas, pequeñas, no elásticas, bordes lisos, sin elevación y superficie lisa.	Bacilos Gram negativos con varios gránulos de PHB. Motilidad positiva.
<i>Herbaspirillum</i>	JNFb1* - JNFb2* JNFb 3**	Tres aislamientos presuntivos. Colonias grandes, de forma circular a irregular, con elevación convexa, bordes ondulados, superficie lisa y cremosa con color inicial crema hasta tomar color rojo.	Bacilos pequeños Gram - negativos. Motilidad positiva.
<i>Azospirillum</i>	NFb1* NFb2** - NFb5**	Cinco aislamientos presuntivos. Colonias pequeñas, apariencia rugosa, secas, bordes irregulares, color crema - rosadas en medio Batata.	Bacilos Gram - negativos, delgados, curvos, cortos. Motilidad positiva.
<i>Glucanacetobacter diazotrophicus</i>	LGI-P1*	Un aislamiento presuntivo. Colonias amarillas, en medio batata, bordes lisos, sin elevación, brillantes y cremosas.	Bacilos cortos Gram - negativos. Motilidad positiva (vibran sobre sí).
<i>Burkholderia</i>	JMV1*	Un aislamiento presuntivo. Colonias convexas, crema, grandes, brillantes, mucosas, con centro amarillo.	Bacilos largos Gram - negativos, delgados, cortos. Motilidad Positiva.

Tabla 3. Características fenotípicas de los aislamientos a partir de suelo rizosférico, raíces y hojas de *Eucalyptus* sp. en Codazzi. * Aislamiento época de lluvia - ** Aislamiento época de sequía.

Al analizar la selección de géneros diazotróficos presuntivos asociados al Eucalipto, se evidenció preliminarmente que predominaron en las dos épocas climáticas las poblaciones bacterianas tentativas de los géneros *Beijerinckia* (diez aislamientos), *Azotobacter* (12 aislamientos) y *Derxia* (cinco aislamientos) los cuales fueron aislados principalmente de la raíz y rizósfera, lo cual permite inferir que las bacterias colonizaron de forma local o sistemática los tejidos radiculares del Eucalipto (Sturz *et al.*, 2000).

De acuerdo a estos resultados, existe un predominio en las dos épocas climáticas (lluvia y sequía) de estos tres géneros tentativos, que pertenecen a la familia Azotobacteriaceae, la cual se denomina como grupo principal de bacterias diazotróficas aerobias heterótrofas. Según Sturz *et al.*, 2000, la densidad y diversidad de microorganismos son susceptibles a variar dependiendo de la especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta, de las características físico químicas del suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales. Esta familia presenta particularmente características fundamentales de resistencia a condiciones adversas, como la producción de gránulos de poli-*b*-hidroxibutirato (PHB) en condiciones de estrés y sequía, intervalos amplios de tolerancia al pH, protección a la enzima nitrogenasa mediante diversos mecanismos, predominancia habitual en suelos tropicales, entre otros.

De otra parte, la mayoría de los grupos presenta aislamientos en períodos de lluvia y sequía, por lo cual se permite nuevamente inferir que la época climática no influyó significativamente en la población de bacterias diazotróficas de esta especie arbórea. Sin embargo, pudo presuntivamente alterar la densidad poblacional de las mismas, de acuerdo con el bajo número de aislamientos que preliminarmente fueron clasificados como *Azospirillum sp.* (cinco aislamientos), *Herbaspirillum sp.* (tres aislamientos), *Gluconacetobacter sp.* (un aislamiento) y *Burkholderia sp.* (un aislamiento).

PRUEBA DE ACTIVIDAD DE REDUCCIÓN DE ACETILENO (ARA)

Se presentaron diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) en las medias de ARA, en la actividad de reducción de acetileno en las cepas C27 ($8,51 \times 10^8$ nmol/mL.min), C25 ($5,49 \times 10^8$ nmol/mL.min) y la C26 ($7,58 \times 10^8$ nmol/mL.min) con respecto a las cepas de referencia utilizadas (AC1 y SP7) (Fig. 1).

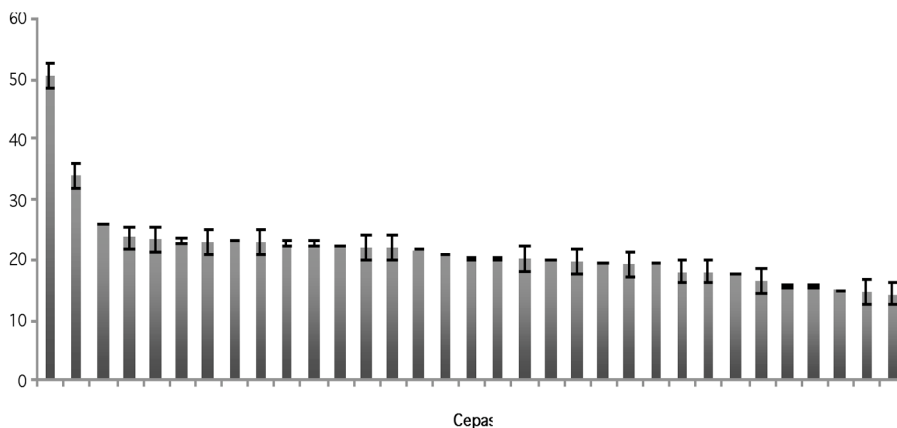


Figura 1. Producción de ARA, en diferentes bacterias aisladas de Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) ($P \leq 0,05$).

Las bacterias diazotróficas más conocidas por su eficiencia forman parte de las familias Azotobacteriaceae, Spirillaceae y Bacillaceae. Del género *Azotobacter* se han descrito varias especies: *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. agilis* y *A. paspali*; las cuales han sido ampliamente estudiadas por su potencial como fijadoras de nitrógeno (Martínez-Viera 1986; Itzigsohn *et al.*, 2000).

De acuerdo a los análisis obtenidos, la capacidad de fijación de nitrógeno varió significativamente en los aislamientos, lo cual se observó en la notable diferencia en los valores de eficiencia en la actividad de reducción entre los grupos, esto es debido probablemente a que el genotipo de las bacterias influye sobre la cantidad de nitrógeno fijado por las mismas (Eckert *et al.*, 2001).

La cepa C27 correspondiente a la especie tentativa de *Azotobacter vinelandii* presentó la mayor reducción de acetileno ($8,51 \times 10^8$ nmol/mL.min), probablemente la constitución biológica de esta bacteria pudo influir en este proceso, debido a que *Azotobacter vinelandii* fija nitrógeno en condiciones de aerobiosis gracias a que posee un sistema bien integrado de protección de la enzima nitrogenada. Dicho sistema comprende: protección conformacional, protección respiratoria, autoprotección y otros cambios morfológicos y fisiológicos que le permiten crecer diazotróficamente en condiciones totalmente aeróbicas (Marchal y Vanderleyden. 2000).

Las cepas C25 y C26 (tentativas de *Azotobacter chroococcum*) presentaron valores estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$) en la reducción del acetileno ($7,41 \times 10^8$ nmol/mL.min) y ($7,58 \times 10^8$ nmol/mL.min), con respecto a los beneficios de la actividad fijadora de nitrógeno de *Azotobacter chroococcum*, Martínez *et al.*, 1996, plantean que el efecto de esta especie sobre la germinación y crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en suelos ferralíticos rojos, resulta igual para todas las variedades analizadas, sugiriendo la amplia adaptación y promoción del crecimiento vegetal de esta especie.

PRUEBA DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA)

Se presentaron diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) en las medias de AIA en la producción de ácido indolacético producida por la cepa C27 (tentativa de *Azotobacter vinelandii*) de 49,57 µg AIA/mL, con respecto a las cepas de referencia utilizadas: Sp7 (40,17 µg AIA/mL) y AC1 (38,26 µg AIA/mL).

Estadísticamente se presentaron diferencias significativas entre la cepa C27 y el resto del grupo, observándose que la media de producción de AIA para esta cepa fue superior en relación a todas las cepas diazotróficas analizadas en esta prueba (Fig. 2).

Dentro de las especies que han sido reportados como las mayores productoras de AIA se encuentran *Azospirillum brasilense* (20-0 mg/mL), *Azospirillum lipoferum* (16-32 mg/mL), *Rhizobium* sp. (22 mg/mL), *Xanthomonas* sp. (22 mg/mL), *Pseudomonas* sp. (20-65 mg/mL), *Azotobacter* sp. (>22 mg/mL), *Acinetobacter* sp. (3-18 mg/mL), *Bacillus* sp. (30-40 mg/mL), *Corynebacterium* sp., y *Flavobacterium* spp., (20-30 mg/mL) (Taller y Wong 1989).

Se conoce que algunas especies del género *Azotobacter* penetran la corteza y producen fitohormonas como giberelinas, auxinas como ácido indolacético, citoquininas y ácido abscísico estimulando el crecimiento, la producción de raíces laterales y pelos radicales que a su vez favorecen la absorción de nutrimentos Freitas *et al.*, 2002 e incrementan el rendimiento en gramíneas (Taller y Wong 1989; Bashan *et al.*, 1986). De igual forma, resultados reportados por Bhattacharya *et al.*, 1986, demuestran que en determinadas

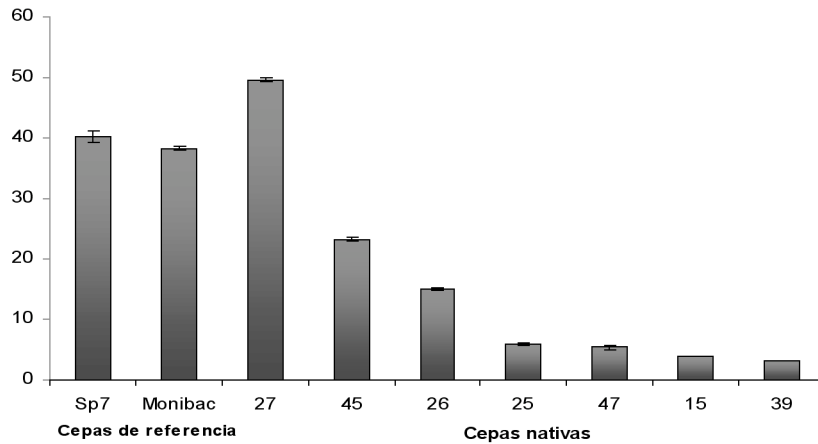


Figura 2. Producción de AIA, en diferentes bacterias aisladas de Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) ($P \leq 0,05$).

condiciones ambientales el efecto beneficioso de estas bacterias no se debe a la cantidad fijada, sino a la presencia de vitaminas y sustancias fisiológicamente activas que sintetizan, estimulando el crecimiento y vigorosidad de la planta hospedera.

Rodríguez y Blanco, 1992, realizaron un trabajo experimental en condiciones semicontroladas en viveros de café (*Coffea arabica*), demostrando que con el uso de *Azotobacter chroococcum* había una mejor uniformidad en las posturas de este cultivo, así como un mayor vigor de las mismas, las cuales en el momento de la extracción del vivero hacia el campo presentaban un color uniforme en su sistema radicular, características de posturas sanas, vigorosas y con alto valor ecológico. En este sentido González, 1995, al analizar los resultados de la inoculación de ocho cepas de *Azotobacter* sp. sobre los parámetros de crecimiento y desarrollo de vitroplantas de piña (*Anana comosa* cv Cayena lisa), durante la fase de adaptación demostraron que en sentido general, todas las cepas estudiadas estimularon el crecimiento de las vitroplantas, con valores significativamente superiores al testigo, lo que permite acortar el periodo de adaptación de las mismas. Según González y Llunch, 1992, la producción de estas sustancias por *Azotobacter* sp. se ve influenciada por el estado fisiológico de la bacteria y por la edad de los cultivos, habiéndose demostrado, que la presencia de nitrógeno combinado modifica la producción de auxinas y giberelinas. De igual forma, se ha reportado que la presencia de exudados radiculares de la planta incrementan considerablemente la producción de auxinas, giberelinas y citoquininas por *Azotobacter chroococcum* Mok y Mok, 2001. De acuerdo a lo anterior, se infiere que una mayor producción de exudados radiculares secretados por Eucalipto (*Eucalyptus* sp.), ha estimulado una mayor población de microorganismos del género *Azotobacter* sp. induciendo en estas bacterias una mayor producción de fitohormonas, especialmente del ácido indolacético.

CONCLUSIONES

Las conclusiones en las condiciones en las que se realizó el presente estudio son las siguientes:

No se encontraron variaciones en el tamaño de la población de las especies diazotróficas tentativas de *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp. y *Derxia* sp., por efecto de épocas climáticas. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) para el estrato de muestra, encontrándose las mayores poblaciones en las raíces para el caso de los aislamientos presuntivos de *Herbaspirillum* sp. y suelo rizosférico para *Azospirillum* sp. Se seleccionaron las cepas C27, C26 y C25 por su eficiencia *in vitro* en la pruebas de ARA y AIA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -Corpoica-, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural -MADR-, la Gobernación del Cesar y a la Cooperativa Lechera del Cesar -COOLESAR- por su financiación.

BIBLIOGRAFÍA

- BALDANI JI, BALDANI VLD, SELDIN L, DÖBEREINER J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1986;36:86-93.
- BARAK R, NUR I, OKON Y, HENIS Y. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol.* 1982;152:643-649.
- BARAK R, NUR I, OKON Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J Appl Bacteriol.* 1983;53:399-403.
- BAREA JM, POZO MJ, AZCÓN-AGUILAR. Microbial cooperation in the rhizosphere. *J Exp. Bot.* 2005;56(417):1761-1776.
- BARRAQUIO WL, REVILLA L, LADHA JK. Isolation of endophytic bacteria from wetland rice. *Plant Soil. of sterile plants with Acetobacter diazotrophicus wild-type and nif.* 1997;194:15-24
- BASHAN Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J Gen Microbiol.* 1986;132:3407-3414.
- BRASIL MS, BALDANI JI, BALDANI VL. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. *R Bras Ci Solo.* 2005;29:179-190.
- BRASIL MS, BALDANI VL, BALDANI JI, MANHAES S. Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal. *Revista Pasturas tropicales. Seropédica.* 2005;27(3):22-33.
- BHATTACHARYA P, DEY BK, BANIK S, NATH S. Organic manures in relation to rhizosphere effect. IV. Effect of organic manures on phosphate solubilising power of rice and succeeding wheat rhizosphere soils. *Zbl Mikrobiol.* 1986;141:357-365.
- BURDMAN S, JURKEVITCH E, SORIA-DÍAZ ME, GIL SERRANO AM, OKON Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;89:259-264.
- CABALLERO-MELLADO J. El género *Azospirillum*: Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2000. Disponible en:<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>

CASTELLANO MA, MOLINA R. Mycorrhizae. In: Landis TD, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP, edit. The container Tree Nursery Manual, Volume 5. Agric. Handbook. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 1989; p. 101-167.

CELIS B, GALLARDO I. Estandarización de métodos de detección de promotores de crecimiento vegetal (Ácido indolacético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Trabajo de grado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. 2007;153-155

COMBE M, PONS J, SESBOUE R, MARTIN J. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. Appl Environ Microbiol. 1994;60(1):26-30

CORPORACIÓN COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA, CORPOICA. Manual interno de procedimientos técnicos. Laboratorio de control de calidad de inoculantes. Mosquera. Versión 02. 2009; p.14-27.

COUTO L, ROATH RL, BETTERS DR, GARCIA R, ALMEIDA JCC. Cattle and sheep in eucalypt plantations: a silvipastoral alternative in Minas Gerais, Brazil. Agroforestry Systems, Dordrecht. 1994;28:173-185.

DELL B, MALAJCZUK NY, GRAVES T. Nutrient disorders in plantation eucalyptus. Australian Centre for Int Agric Research En: Monograph Series (Australia), No.31 ACIAR. Canberra. 1995; p. 417-43

DÖBEREINER J, BALDANI VL, BALDANI JI. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Seropédica. EMBRAPA-SPI. 1995; p. 12-28

ECKERT B, BALLER O, KIRCHHOF G, HALBRITTER A, STOFFELS M, HARTMANN A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. Inter J of Syst and Evol Microbiol. 2001;51:17-26.

FENGLEROWA, W. Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. Acta Microb Pol. 1965;14(21):203.

FREITAS ADS, STAMFORD NP. Associative nitrogen fixation and growth of maize in a Brazilian rainforest soil as affected by *Azospirillum* and organic materials. Tropical Grasslands. 2002;36:77-82.

GAFNY R, OKON Y, KAPULNIK Y, FISCHER M. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. Soil Biol Biochem. 1986;18:69-76.

GONZÁLEZ, R. Efectividad de ocho cepas de *Azotobacter* spp. en la adaptación de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Cv Cayena Lisa. Centro Agrícola; Villa Clara, Cuba. Acta Horticulturae.1995;(3):68-75

GONZALEZ J, LLUNCH YC. Biología del nitrógeno. Interacción planta-microorganismo. Madrid: Ed Rueda. 1992; p. 141-161.

HEINRICH D, HESS D. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. Can J Microbiol. 1985;(31):26-31.

ITZIGSOHN R, BURDMAN S, OKON Y, ZAADY E, YONATAN R, PEREVOLOTSKY E. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. J Arid land Res and Manag. 2000;(14):151-158.

JAIN DK, PATRIQUIN DG. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. Appl Environ Microbiol. 1984;48(6):1208-1213.

KUSS AV. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado [Tese de Doutorado] Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais. 2006; p. 151-158.

LAMBRECHT M, OKON Y, VANDE BROEK A, VANDERLEYDEN J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. Trends Microbiol. 2000;8(7):298-300. Disponible en: http://www.ufv.br/DBV/PGFVG/BVE684/htms/pdfs_revisao/sinais/hormonios/IAAplantbact.pdf

LEVANONY H, BASHAN Y. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. Plant Soil. 1991;137(1):91-97.

LÓPEZ-DE VICTORIA G, LOVELL CR. Chemotactic behavior of *Azospirillum* species to aromatic compounds. Appl Environ Microbiol. 1993;59:2951-2955.

MARTÍNEZ-ROMERO E, CABALLERO-MELLADO J. *Rhizobium phylogenies* and bacterial genetic diversity. Crit Rev Plant Sci. 1996;15:113-140.

MARTINEZ-VIERA R. Ciclo biológico del nitrógeno cap. I y II. La Habana: Ed. Científico técnica; 1986. p. 127-135.

MARCHAL J, VANDERLEYDEN J. La paradoja de *Azospirillum*. Biología y fertilidad de los suelos. 2000;183:23-9.

MOK DW, MOK MC. Cytokinin metabolism and action. Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 2001;52:89-118.

NOVO B. Microbiología del suelo y biofertilización. En: Fundases. Memorias de la Fundación de Asesorías para el Sector Rural. Santa fe de Bogotá: Fundases; 1993. p. 101.

OLIVARES FL, BALDANI VLD, REIS VM, BALDANI JI, DOBEREINER J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in root, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. Biol Fertil Soils. 1996;21:197-200.

PIÑERO D, MARTÍNEZ E, SELANDER RK. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Appl Environ Microbiol. 1988;54:2825-2832.

RADWAN TEE, MOHAMED ZK, REIS VM. Aeração e adição na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. Pesq Agropec Brás. 2004a;40(10):997-1004.

RADWAN TEE, MOHAMED ZK, REIS VM. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. Pesq Agropec Brás. 2004b;39(10):987-994.

REINHOLD B, HUREK T, FENDRIK I. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. J Bacteriol. 1985;162:190-195.

RODRÍGUEZ V, BLANCO A. Eficiencia del *Azotobacter chroococcum* en la producción de posturas de *coffea arabica* L. La Habana: Instituto superior de ciencias agrícolas (INCA); 1992.

SADASIVAN L, NEYRA CA. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. J Bacteriol. 1987;169(4):1670-1677.

STEENHOUDT O, VANDERLEYDEN J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews. 2000;(24):487-506. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x/pdf>

SCHMID M, BALDANI J, HARTMANN A. The genus *Herbaspirillum*. En: Balows A, Tripper H, Dworking M, Harder W, Scheleider K. The prokaryotes. Springer - Verlag. Part 1, New York, USA. 2006; 3.1141-150 pp. Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/schmid/schmidherbaspirillum.pdf>

STURZ A, CHRISTIC B, NOWAK J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. Rev Plant Sci. 2000;19:1-30.

TAPIA-HERNÁNDEZ A, MASCARÚA-ESPARZA MA, CABALLERO- MELLADO J. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. Microbios. 1992;64:73-83

TALLER BJ, WONG YT. Cytoquinins in *Azotobacter vinelandii* culture médium .Appl Environ Microbiol. 1989;55(1):266-267. Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/55/1/266.pdf>.

TEXEIRA M, SOARES I, VIEIRA R. Diversidade de Bactérias Edofíticas na Cultura da Mandioca. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa. 2005;33:5-22.

UMALI-GARCÍA M, HUBBELL DH, GASKINS MH, DAZZO FB. Association of *Azospirillum* with grass roots. Applied and Environmental Microbiology. 1980;39:219-226.

VALERO N. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Universidad Nacional de Colombia. Maestría Interfacultades en Microbiología. Bogotá, D.C. 2002;29(3):331-349.

VALVERDE A, VELAZQUEZ E, GUTIERREZ C, CERVANTES E, VENTOSA A, IGUAL J. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53:1979-1983.