

ORIGINAL

Endophytes bacterial growth promoters isolated to colosoana grass, Department of Sucre, Colombia

Bacterias endófitas promotoras de crecimiento aisladas de pasto colosoana, departamento de Sucre, Colombia

Alexander Pérez-Cordero^{1*} Ph.D, Leonardo Chamorro-Anaya¹ M.Sc, Arturo Doncel-Mestra¹ Zootec.

¹University of Sucre, Faculty of Agricultural Sciences, Agricultural Bioprospection research group, microbiological research laboratory, Cra 28 # 5-267 Barrio Puerta Roja - Sincelejo (Sucre).

*Correspondence: alexander.perez@unisucra.edu.co

Received: November 2017; Accepted: February 2018.

ABSTRACT

Objective. Evaluate *in vitro* the efficiency of endophytic growth promoting bacteria isolated from different colosoana grass tissues in the municipality of Corozal, department of Sucre, Colombia. **Materials and methods.** Endophytic bacteria were isolated, population density was determined in CFU / g of tissue, then quantitative and qualitative tests of FBN activities, phosphate solubilization, siderophore production and AIA were carried out to finally identify by sequencing the bacteria that had positive growth promotion activity. **Results.** The largest populations were found in roots (5.0×10^{10} , 3.8×10^{10} , 2.8×10^{10} , 2.4×10^{10} and 1.5×10^{10} CFU / g of tissue, for the location of the Peñas, the Mamón, Canta gallo, Chapinero and Hato Nuevo, respectively) with respect to stem and leaf. A total of 53 isolated endophytes bacteria, 18 showed reducing capacity of N_2 to ammonium; 15 morphotypes showed phosphate solubilizing capacity; 8 of indole acetic acid production and 12 of siderophore producers. **Conclusions.** This work isolated endophytes bacteria with the ability to promote plant growth. Two species of endophytic bacteria were identified as *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas hibiscicola* (*S. maltophilia*), which showed excellent solubilization results of phosphates, reduced N_2 to ammonium, production of indol acetic acid and the production of siderophores.

Keywords: Microorganisms, plant tissue, nutrition (*Source: CAB*).

RESUMEN

Objetivo. Evaluar *in vitro* la eficiencia de las bacterias endófitas promotoras de crecimiento aisladas de diferentes tejidos de pasto colosuana en el municipio de Corozal, departamento de Sucre, Colombia. **Materiales y métodos.** Se aislaron bacterias endófitas, se determinó densidad poblacional en UFC/g de tejido, seguidamente se llevó a cabo pruebas cuantitativas y cualitativas de las actividades de FBN, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos y de AIA para finalmente se realizó identificación por secuenciamiento de las aquellas bacterias que tuvieron actividad positiva de promoción de crecimiento. **Resultados.** Las mayores poblaciones fueron encontradas en raíces (5.0×10^{10} , 3.8×10^{10} , 2.8×10^{10} , 2.4×10^{10} y 1.5×10^{10} UFC/g de tejido, para los corregimientos de La Peñas, El Mamón, Cantagallo, Chapinero y Hato Nuevo, respectivamente) con respecto a tallo y hoja. Un total de 53 bacterias endófitas aisladas, 18 mostraron capacidad reductora de N_2 a amonio; 15

morfotipos mostraron capacidad solubilizadora de fosfatos; 8 de producción de ácido indol acético y 12 de productoras de sideróforo. **Conclusiones.** Este trabajo aisló bacterias endófitas con capacidad de promover el crecimiento vegetal. Dos especies de bacterias endófitas fueron identificadas como *Delftia tsuruhatensis* y *Pseudomonas hibiscicola* (*S. maltophilia*), las cuales mostraron excelentes resultados de solubilización de fosfatos, reducen N_2 a amonio, producción de ácido indol acético y la producción de sideróforos.

Palabras Clave: Microorganismos, tejido vegetal, nutrición (*Fuente: CAB*).

INTRODUCTION

Cattle ranching in the department of Sucre, Colombia, occupies 768600 ha of pastures that represent 13.7% of the cattle area of the Caribbean region; in the sub-region Sabanas of Sucre there are 164.000 ha with *Bothriochloa pertusa*, which corresponds to 21.3% of the total pasture area of the department (1). In addition, the double purpose modality represents the main economic activity of the department of Sucre, where 94.9% of the total area devoted to livestock activity is dedicated exclusively to livestock grazing (2). Pasture and forage production in Colombia is mainly for use in livestock, as a source of feed for livestock (3).

B. pertusa grass, in the Colombian Caribbean region is widely distributed, covering extensive areas of the dry tropical forest (bs-T) and very dry tropical forest (bms-T) life zones in the departments of Córdoba, Sucre, Bolívar and Magdalena (4); but due to the physiographic factors the degenerative anthropogenic actions of the environment and the use of inadequate technologies, they have brought as a consequence the degradation of the physical, chemical and biological properties of the soil, which has limited the supply and quality of this pasture mainly in the dry season (5).

Faced with this situation, the use of chemical fertilizers becomes an alternative to overcome this difficulty, which improves the productivity of the pastures, but causes an imbalance in the communities of microorganisms native to the soil, which fulfill important functions within ecosystems such as: the contribution of nutrients, moisture retention, better soil structure among others (6). In this sense, as an alternative to mitigate the effect of fertilizers in recent years, several studies conducted with endophytic bacteria associated with plant species, show an important potential for plant nutrition. Endophytes bacteria reside within the tissues of plants without causing damage to their hosts (7), They promote the growth of plants, remove pollutants, solubilize phosphates

INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina en el departamento de Sucre, Colombia, ocupa 768600 ha de pastos que representan el 13.7% del área ganadera de la región Caribe; en la subregión Sabanas de Sucre existen 164.000 ha con *Bothriochloa pertusa*, que corresponde al 21.3% del área total de pastos del departamento (1). Además, la modalidad doble propósito representa la principal actividad económica del departamento de Sucre, donde el 94.9% del área total destinada a la actividad pecuaria está dedicado exclusivamente al pastoreo del ganado (2). La producción de pastos y forrajes en Colombia se realiza principalmente para su uso en la ganadería, como fuente de alimento para el ganado (3).

El pasto *B. pertusa*, en la región del caribe colombiana está ampliamente distribuida, cubriendo extensas áreas de las zonas de vida de bosques secos tropical (bs-T) y bosque muy seco tropical (bms-T) en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar y Magdalena (4); pero debido a los factores fisiográficos, las acciones antropogénicas degenerativas del medio ambiente y el empleo de tecnologías inadecuadas, han traído como consecuencia, la degradación de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, lo cual ha limitado la oferta y calidad de esta pastura principalmente en temporada seca (5).

Ante esta situación, el uso de fertilizantes químicos se convierte en una alternativa para superar esta dificultad, la cual mejora la productividad de las pasturas, pero provoca un desequilibrio en la comunidades de microorganismos nativos del suelo, que cumplen funciones importantes dentro de los ecosistemas como: el aporte de nutrientes, retención de humedad, mejor la estructura de los suelos entre otros (6). En este sentido como, una alternativa para mitigar el efecto de los fertilizantes en los últimos años, diversos estudios realizados con bacterias endófitas asociados a especies vegetales, muestran un potencial importante para la nutrición vegetal. Las bacterias endófitas residen dentro de los tejidos de las plantas sin causar daños

and fix nitrogen, and can be used as control of phytopathogens.

The reports presented Pérez et al (8), on the *in vitro* activity of nitrogen-fixing endophytic bacteria and phosphate solubilizers in colosoana grass in the Colombian Caribbean, they identified the presence of endophytes bacteria *Aeromonas salmonicida* and *Pasteurella pneumotropica* with simultaneous ability to solubilize phosphates and biologically fix nitrogen.

For all the above and to answer the question are endophytic bacteria a natural source that help provide nutrients to pastures?, the present study was raised with the objective of evaluating *in vitro* the growth promoting activity of endophytes bacteria isolated of different colosuana grass weavings of 5 livestock farms located in the municipality of Corozal, department of Sucre, Colombia.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. The sampling was carried out in 5 livestock farms planted only with colossal grass located in the municipality of Corozal, during the second period of 2016. At each site, a random sampling was carried out in the form of a zigzag, collecting colosoana grass with roots, stems and leaves. Also, samples of soil at a depth of 20 cm were taken to know the physical-chemical conditions of the soils. The samples were labeled with the date of collection, farm and village. The samples of soil and plants of colosoana grass were stored and conserved for their transport to the Laboratory of Microbiological Investigations for the microbiological analyzes and the other part were sent to the laboratory of Soils and Waters of the University of Sucre for their physicochemical characterization.

Isolation of endophytic bacteria. The isolation of the endophytic bacteria was carried out in the following way:

Surface disinfection of tissues. To each plant collected, tissue was separated (root, stem and leaf). Each tissue separately was subjected to a superficial disinfection process by protocols described by Pérez et al (5).

Determination of population density. After the disinfection process, each tissue was deposited on porcelain plates, macerated with liquid nitrogen until homogeneous, and serial dilutions (10^{-1} to 10^{-8}) were prepared in triplicate from which aliquots were taken and deposited on the R2A agar surface, were incubated at 32°C

a sus hospederos (7), promueven el crecimiento de las plantas, remueven contaminantes, solubilizan fosfatos y fijan nitrógeno, y pueden ser empleadas como control de fitopatógenos.

Los reportes presentados por Pérez et al (8), sobre la actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos en pasto colosoana en el Caribe Colombiano, identificaron la presencia de bacterias endófitas *Aeromonas salmonicida* y *Pasteurella pneumotropica* con capacidad simultánea de solubilizar fosfatos y fijar biológicamente el nitrógeno.

Por todo lo anterior y para dar respuesta a la pregunta ¿Las bacterias endófitas son una fuente natural que ayudan a aportar nutrientes a las pasturas?, se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar *in vitro* la actividad promotora de crecimiento de bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de pasto colosuana de 5 fincas ganaderas ubicadas en el municipio de Corozal, departamento de Sucre, Colombia.

MATERIALES Y METODOS

Muestreo. El muestreo se realizó en 5 fincas ganaderas sembrada únicamente con pasto colosoana ubicadas en el municipio de Corozal, durante el segundo periodo de 2016. En cada sitio se llevó a cabo un muestreo aleatorio en forma de zig-zag recolectando pasto colosoana con raíces, tallos y hojas. Asimismo, fueron tomadas muestra de suelo a una profundidad de 20 cm para conocer el estado físico-químico de dichos suelos. Las muestras fueron rotuladas con la fecha de colecta, finca y corregimiento. Las muestras de suelo y plantas de pasto colosoana fueron almacenadas y conservadas para su transporte al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas para los análisis microbiológicos y la otra parte fueron enviadas al laboratorio de Suelos y Aguas de la Universidad de Sucre para su caracterización química.

Aislamiento de bacterias endófitas. El aislamiento de las bacterias endófitas se llevó a cabo de la siguiente manera:

Desinfección superficial de tejidos. A cada planta recolectada, se le hizo separación de tejidos (raíz, tallo y hoja). Cada tejido por separado fue sometido a un proceso de desinfección superficial mediante protocolos descrito por Pérez et al (5).

Determinación de la densidad poblacional. Después del proceso de desinfección cada tejido se depositó en platos de porcelana, se

for 72 hours. The population density of bacteria per tissue (CFU / g of tissue) was determined by direct counting of colonies on the surface of the plates and selected those colonies that differed in shape, texture, color and size (8).

In vitro evaluation of growth promotion activity of endophytic bacteria isolated from the colosoana grass tissues. The isolates of obtained endophytic bacteria were used for the in vitro evaluation of the growth promoting capacity (biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, production of indole acetic acid and siderophore).

Biological nitrogen fixation. The qualitative evaluation of nitrogen fixation was carried out by direct seeding of each morphotype on the surface of the selective medium BURK agar (5 gr $MgSO_4$, 20 gr KH_2PO_4 , 5 gr K_2HPO_4 , 3.25 gr $CaSO_4$, 1.45 gr $FeCl_3$, 0.253 gr $NaMoO_4$, 1000 ml of sterile distilled water), following the methodology proposed by (8). The amount of nitrogen fixed was determined by indirect evaluation of the reduced nitrogen amount in the form of ammonium ion, using the Berthelot colorimetric method, described by Barraza and Pérez (9).

Solubilization of phosphate. The qualitative evaluation of phosphate solubilization was carried out by direct seeding of each morphotype on the surface of the NBRID agar medium (10 gr Glucose, 5 gr $Ca_3(PO_4)_2$, 5 gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g KCl, $(NH_4)SO_4$ in 1000 ml of distilled water), following the protocol proposed by Pérez et al (8). The isolates that showed positive activity were used to determine the efficiency of the capacity of the endophytes bacteria to solubilize phosphate in NBRID culture medium through the indirect measurement of dissolved phosphate according to the protocol proposed by Rodriguez et al (10). The data obtained were analyzed using the standardized standard curve in the biotechnology laboratory of the University of Córdoba (11).

Production of indole acetic acid (IAA). The qualitative evaluation of the production of indole acetic acid (AIA) was evaluated in liquid medium Burk Coreia (0.41gr KH_2PO_4 , 0.52gr K_2HPO_4 , 0.05gr Na_2SO_4 , 0.2gr $CaCl_2$, 0.1gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01gr $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0025gr $NaMoO_4$, in 1000 ml of distilled water), and supplemented with 0.1 g tryptophan (precursor of indole acetic acid), by techniques proposed by Dawwam et al (12). For the quantitative determination, the standardized curve was used through standard solutions of pure indole acetic acid according to the protocol carried out in the biotechnology laboratory of the University of Córdoba (11).

maceró con ayuda de nitrógeno líquido hasta homogenizar y se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) por triplicado de las cuales se tomaron alícuotas y se depositaron sobre la superficie de agar R_2A , se incubaron a $32^\circ C$ por 72 horas. La densidad poblacional de bacterias por tejido (UFC/g de tejido) fue determinada mediante conteo directo de colonias sobre la superficie de las placas y seleccionaron aquellas colonias que se diferenciaban en cuanto a forma, textura, color y tamaño (8).

Evaluación In vitro actividad de promoción de crecimiento de bacterias endófitas aisladas de los tejidos de pasto colosoana.

Los aislados de bacterias endófitas obtenidos, fueron utilizados para la evaluación *in vitro* de la capacidad promotora de crecimiento (Fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfato, producción de ácido indol acético y sideróforo).

Fijación biológica de nitrógeno. La evaluación cualitativa de fijación de nitrógeno se llevó a cabo mediante la siembra directa de cada morfotipo sobre la superficie del medio selectivo agar BURK (5 gr $MgSO_4$, 20 gr KH_2PO_4 , 5 gr K_2HPO_4 , 3.25 gr $CaSO_4$, 1.45 gr $FeCl_3$, 0.253 gr $NaMoO_4$, 1000 ml de agua destilada estéril), siguiendo la metodología propuesta por (8). La cantidad de nitrógeno fijado fue determinado mediante la evaluación indirecta de la cantidad nitrógeno reducido en forma de ion amonio, empleando el método colorimétrico de Berthelot, descrito por Barraza y Pérez (9).

Solubilización de fosfato. La evaluación cualitativa de solubilización de fosfatos, se llevó a cabo mediante la siembra directa de cada morfotipo sobre la superficie del medio agar NBRID (10 gr Glucosa, 5 gr $Ca_3(PO_4)_2$, 5 gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 gr KCl, $(NH_4)SO_4$ en 1000 ml de agua destilada), siguiendo el protocolo propuesto por Pérez et al (8). Los aislados que mostraron actividad positiva, se utilizaron para determinar la eficiencia de la capacidad de las bacterias endófitas de solubilizar fosfato en medio de cultivo NBRID a través de la medición indirecta de fosfato disuelto de acuerdo a protocolo planteado por Rodriguez et al (10). Los datos obtenidos fueron analizados empleando la curva patrón estandarizada en el laboratorio de biotecnología de la Universidad de Córdoba (11).

Producción de Ácido indol acético (AIA). La evaluación cualitativa de la producción de ácido indol acético (AIA) fue evaluada en medio líquido Burk Coreia (0.41 gr KH_2PO_4 , 0.52 gr K_2HPO_4 , 0.05 gr Na_2SO_4 , 0.2 gr $CaCl_2$, 0.1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 gr $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0025 gr $NaMoO_4$, en 1000 ml de agua destilada), y suplementado

Siderophore production. The qualitative evaluation of siderophore production was carried out by direct seeding of each morphotype on the surface of the medium chromium azulol-S (CAS) described by Doncel et al (13).

Molecular identification of endophytic bacteria with positive growth promotion activity. The isolates of endophytic bacteria that showed *in vitro* positive activity for the reduction of nitrogen to ammonium ion, solubilization of phosphates, production of indol acetic acid and siderophores, were selected and proceeded to its purification and identified by Gram stain for the use of the protocol for the extraction of genomic DNA from Gram-negative or Gram-positive bacteria. The extraction of genomic DNA from endophytic bacteria with the ability to promote growth was carried out using the protocol proposed by Oliveira et al (14). The conditions used in each amplification reaction were based on the protocol described by Oliveira et al (14), using a mastercycler nexus eppendorf thermal cycler. The products obtained from the amplification were purified and sequenced in Macrogen Korea.

The sequences obtained were compared with those stored in the Genbank. The alignment of the bases was performed in the Clustal W program, the phylogenetic inferences were obtained by the maximum similarity method based on the kimura-2-parameter model in the MEGA 7 program (15).

Statistic analysis. A block design with a factorial arrangement was applied for the differences between the population density (CFU / g of tissue) of endophytic bacteria according to location and type of tissue. The multiple range test (Tukey) was used to establish significant differences between communities of endophytic bacteria (CFU / g of tissues) in relation to location and type of colonized tissue. The data was analyzed in the InfoStat program.

RESULTS

The results of the means of the chemical parameters of the soil samples of the 5 livestock farms analyzed, indicate: values of strongly acidic to slightly acidic pH; contents of organic matter and calcium from very low to abundant; phosphorus and magnesium from low to abundant; potassium from very low to low; sodium from excessive to low and texture from clay loam, sandy loam to sandy loam (Table 1).

The mean values for population density of endophytic bacteria by location (Figure 1a),

con 0,1 gr triptófano (precursor del ácido indol acético), mediante técnicas propuesta por Dawwam et al (12) . Para la determinación cuantitativa se utilizó la curva estandarizada a través de soluciones estándar de ácido 3 indol acético puro según protocolo realizado en el laboratorio de biotecnología de la Universidad de Córdoba (11).

Producción de sideróforos. La evaluación cualitativa de la producción de sideróforos se llevó a cabo mediante la siembra directa de cada morfotipo sobre la superficie del medio cromo azulol-S (CAS) descrito por Doncel et al (13).

Identificación molecular de bacterias endófitas con actividad positiva de promoción de crecimiento. Los aislados de bacterias endófitas que mostraron *in vitro* actividad positiva para la reducción del nitrógeno a ion amonio, solubilización de fosfatos, producción de ácido índol acético y sideróforos, fueron seleccionadas y se procedió a su purificación e identificados por tinción de Gram para la utilización del protocolo de extracción de ADN genómico de bacterias Gram-negativas o Gram-positivas. La extracción de ADN genómico de bacterias endófitas con capacidad de promover el crecimiento, se realizó mediante el protocolo planteado por Oliveira et al (14). Las condiciones utilizadas en cada reacción de amplificación, se basaron en el protocolo descrito por Oliveira et al (14), empleando un termociclador mastercycler nexus eppendorf. Los productos obtenidos de la amplificación, se purificaron y se secuenciaron en Macrogen Corea. Las secuencias obtenidas, se compararon con las almacenadas en el Genbank. El alineamiento de las bases, se realizó en el programa Clustal w, las inferencias filogenéticas fueron obtenidas por el método máxima similitud basado en el modelo kimura-2-parámetro en el programa MEGA 7 (15).

Análisis estadístico. Se aplicó un diseño en bloque con arreglo factorial para las diferencias entre la densidad poblacional (UFC/g de tejido) de bacterias endófitas en función a corregimiento y tipo de tejido. Se utilizó la prueba de rango múltiple (Tukey) para establecer diferencias significativas entre comunidades de bacterias endófitas (UFC/g de tejidos) con relación a corregimiento y tipo de tejido colonizado. Los datos fueron analizados en el programa InfoStat.

RESULTADOS

Los resultados de las medias de los parámetros químicos de las muestras de suelo de las 5 fincas ganaderas analizadas, indican: valores

indicate that the location of the Peñas found the highest population densities (4.48×10^{10} CFU / g of tissue), followed by Mamón (3.31×10^{10} CFU / g of tissue), Canta gallo (2.8×10^{10} CFU / g of tissue), Chapinero (2.45×10^{10} CFU / g of tissue), with respect to the Hato Nuevo location that obtained the lowest population density of endophytic bacteria 3.18×10^8 CFU / g of tissue, respectively.

A total of 53 endophytic bacteria were isolated, of which 18 showed reducing capacity of N_2 to ammonium; 15 morphotypes showed phosphate solubilizing capacity; 8 production of indole acetic acid and 12 producers of siderophore. In the Figure 2 the qualitative *in vitro* activity of nitrogen fixation is observed, phosphate solubilization, production of indole acetic and siderophore production of the endophytic bacteria evaluated.

With respect to nitrogen efficiency by endophytic bacteria, it was found that 18 isolates showed an ammonium ion production capacity in concentrations of 0.23 to 1.17 mg / L. The highest concentrations of ammonium ion production were found for M4HLP (1.17mg/L) isolated from colosoana grass leaves from cattle farms located in the location of the Peñas, followed by M2HEM (1.10 mg/L) morphotype

de pH fuertemente ácido a ligeramente ácido; contenidos de materia orgánica y calcio de muy bajos a abundante; fósforo y magnesio de bajos a abundantes; potasio de muy bajos a bajo; sodio de excesivo a bajo y textura de franco arcillosa, franco arenosa a arenoso franco (Tabla 1).

Los valores medios para densidad poblacional de bacterias endófitas por corregimiento (Figura 1a), señalan que el corregimiento de Las Peñas se encontraron las mayores densidades poblacionales (4.48×10^{10} UFC/ g de tejido), seguida del Mamón (3.31×10^{10} UFC/g de tejido), Canta gallo (2.8×10^{10} UFC/g de tejido), Chapinero (2.45×10^{10} UFC/g de tejido), con respecto al corregimiento de Hato nuevo que obtuvo la menor densidad poblacional de bacterias endófitas 3.18×10^8 UFC/g de tejido respectivamente.

Un total de 53 bacterias endófitas fueron aisladas, de las cuales 18 mostraron capacidad reductora de N_2 a amonio; 15 morfotipos mostraron capacidad solubilizadora de fosfatos; 8 de producción de ácido indol acético y 12 productoras de sideróforo. En la Figura 2 se observa la actividad cualitativa *in vitro* de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de sideróforos de las bacterias endófitas evaluadas.

Table 1. Means of chemical parameters of soils of livestock farms by location, municipality of Corozal, department of Sucre, Colombia.

Physicochemical parameters	Las Peñas	El mamón	Cantagallo	Chapinero	Hato Nuevo	Reference values
pH (water 1:1 P/V)	6.32 (slightly acid)	6.10 (slightly ácido)	4.98 (strongly acid)	5.2 (strongly ácido)	4.74 (strongly ácido)	5.80 – 7.20
Organic matter (%)	2.23 A	0.16 F	1.19 D	3.18 C	1.19 D	2.0 – 4.0
Phosphorus (ppm), Bray II	25.57 C	12.13 C	5.92 D	93.83 A	45.01 A	15 – 30
C.I.C. (meq/100 g of soil)	18.00 C	7.5 D	15.0 C	11.0 C	10 C	10 – 20
Calcium (Cmol.kg ⁻¹ soil)	11.0 A	1.6 F	2.0 F	3.0 D	2.8 F	5 – 7
Magnesium (Cmol.kg ⁻¹ soil)	5.0 A	3.73 B	3.67 B	3.67 B	2.2 C	2 – 3
Potassium (Cmol.kg ⁻¹ soil)	0.16 D	0.01 F	0.01 F	0.12 D	0.01 F	0.2-0.4
Sodium (Cmol.kg ⁻¹ soil)	1.92 E	0.6 C	1.0 A	1.00 A	0.9 B	<1.0
Exchangeable aluminium (Cmol.kg ⁻¹ soil)	-	-	0.77 B	0.98 B	0.58 B	<0.2
Texture (M. Bouyoucos)	F.AR. Sandy load	A.F. clay load	F.AR. Sandy load	A.F. Clay load	F.A. Clay load	
Sand (%)	72.50	78.21	69.58	81.25	77.92	20-50
Clay (%)	7.08	4.64	10.42	7.08	10.42	20-60
Load (%)	20.42	17.15	20	11.67	11.66	20-70
Saturation of calcium (%)	61.11 B	21.33 D	13.33 F	27.27 D	28.0 B	50 – 70
Saturation of magnesium (%)	7.78 B	49.73 A	24.47 B	33.36 A	22.0 A	20 – 30
Saturation of sodium (%)	10.67 B	8.0 C	24.47 D	9.09 C	9.0 B	<6.0
Saturation of potassium (%)	0.78 C	0.02 F	0.07 C	1.1 C	0.1 F	1.25 – 3.5
Saturation of aluminium (%)	-	-	5.13 C	8.91 C	5.8 C	<5.0
Relation calcium /magnesium	2.2 N	0.43 inverted	0.57 inverted	0.82 inverted	1.27 Close	2 – 4 (normal)
Electrical conductivity (MicroS/cms)	620 N	103.5 N	141 N	330 N	174 N	< 2.000
Salinity % in saturated pasta	0.2 N	0	0	0	0.0 N	0.0 – 0.20

A: Abundant content or high value but not excessive; B: Sufficient content or adequate value (Good); C: Moderate content or average value (regular); D: Poor content or low value (poor); E: Excessive content or very high value, can be harmful; F: Minimal content or very low value (very poor) and M.A.: Very high content.

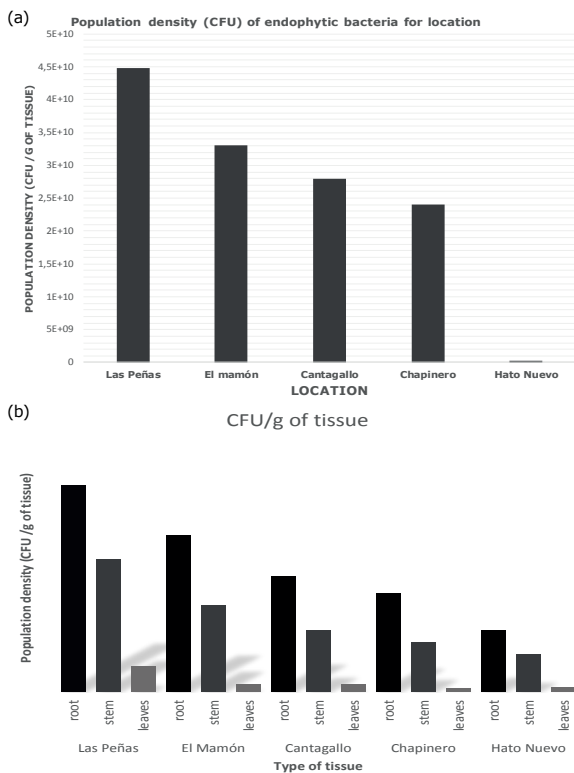


Figure 1. Population density of endophytic bacteria by location (a), and by tissue (b) isolated from Colosoana grass in the municipality of Corozal, Department of Sucre, Colombia, 2016.

isolated from leaf Colosoana grass of the location the Mamón. According to the results observed in figure 3a, it is indicated that the highest average concentrations in the production of the ammonium ion were found in the endophytic bacteria isolated from leaves, followed by the stem and the minor ones in roots.

In Figure 3b, observe the results of phosphate solubilization activity of the 12 isolates of endophytic bacteria evaluated in NBRIP liquid medium, according to the results obtained the isolates with greater solubilizing activity corresponded to M1RLP (1530mg/L), M6RLP (1210mg/L), M9REM (1112mg/L) and M6REM (1050mg/L), which came from different location, but all isolated from roots). The results indicate that the majority of isolates with phosphate solubilizing activity were isolated from the root, three of them from the stem and only two isolated from the leaf, showing this activity in a range of 85 (pH: 6.5) to 1530 mg/L (pH: 3.8).

The analysis of clustering sequences of 16 rDNA from endophytic bacteria with positive activity for growth promotion, was carried out from those isolates that had more than one activity. In Table 2, the selected isolates are related to the specific

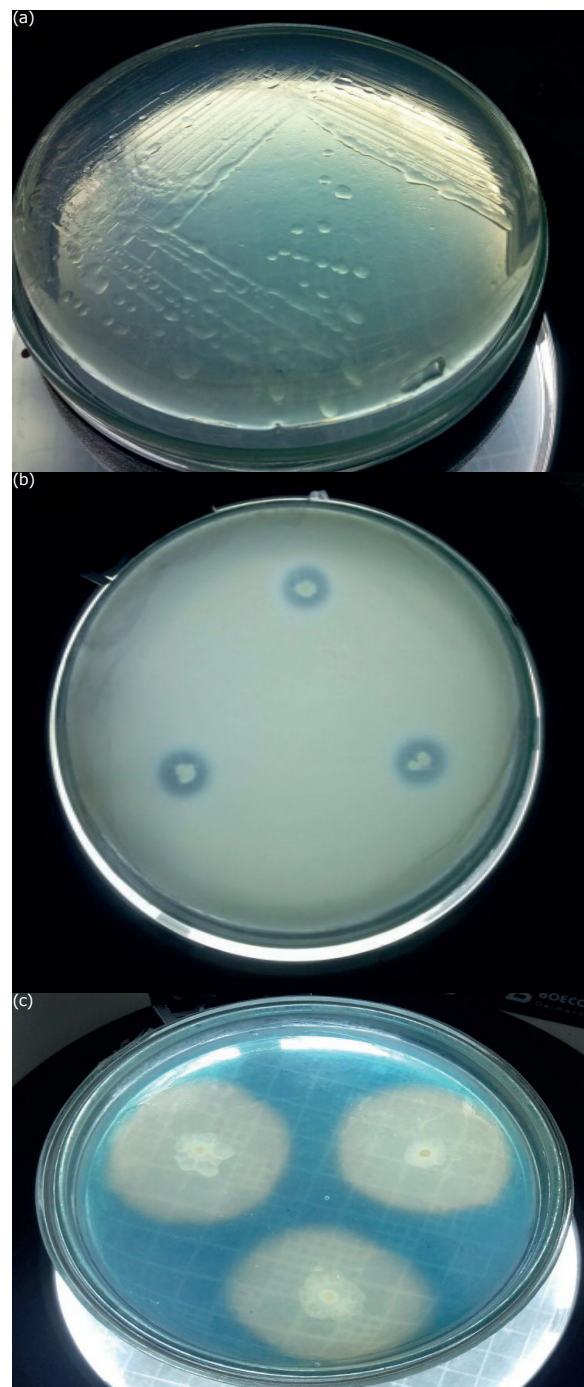


Figure 2. Shows the *in vitro* qualitative activity of nitrogen fixation (a), phosphate solubilization (b) and siderophore production (c) of the endophytic bacteria evaluated.

Con respecto a la eficiencia del nitrógeno por parte de las bacterias endófitas se encontró que 18 aislado mostraron capacidad de producción del ion amonio en concentraciones de 0.23 a 1.17 mg/L. Las mayores concentraciones de

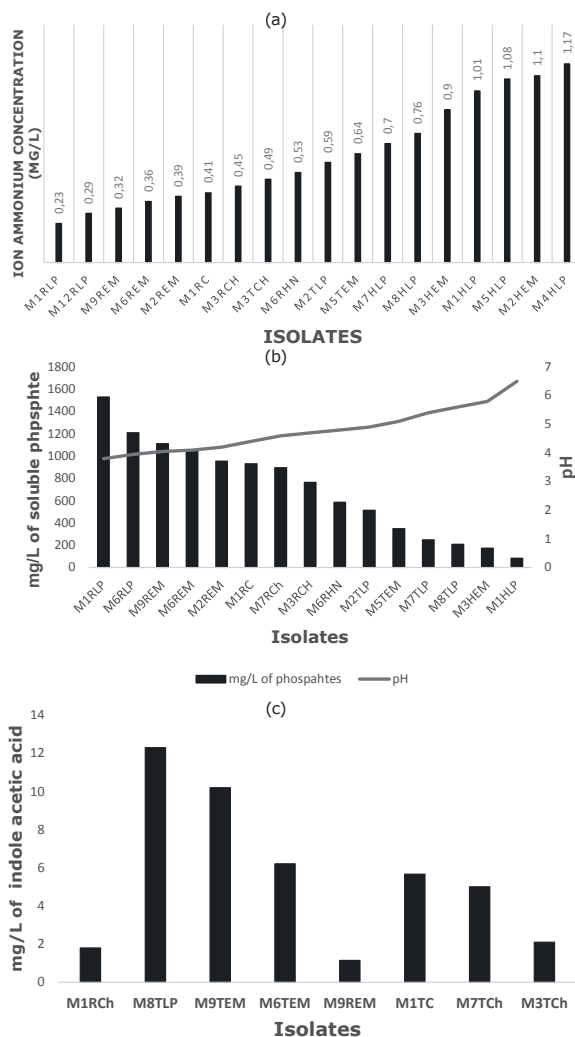


Figure 3. Determination of ammonium ion concentration (a); soluble phosphate (b) and IAA (c) in mg/L of endophytic bacteria isolated from colosoana grass, municipality of Corozal, department of Sucre, Colombia. M: morphotype; R: root, T: stem, H: leaf; LP: Las Peñas, EM: El Mamon, C: Canta gallo, CH: Chapinero, AN: Hato Nuevo.

Table 2. Isolates of endophytic bacteria with specific growth promotion activity, obtained from colosoana grass, municipality of Corozal, department of Sucre, Colombia.

Isolates	Activity promoter of growth			
	Ammonium	Phosphate	IAA	Siderophore
M1RLP	+	+	-	+
M2TLP	+	+	+	-
M9REM	-	+	+	+
M8TLP	+	-	+	+
M3RCh	+	+	+	-

M: morphotype (isolates); R: root; T: Stem; LP: Las Peñas; EM: The Mamon; Ch: Chapinero; +: positive activity; -: negative activity.

producción del ion amonio se encontró para M4HLP (1.17mg/L) aislado de hoja de pasto colosoana proveniente de fincas ganaderas localizadas en el corregimiento de Las Peñas, seguido de M2HEM (1.10 mg/L) morfotipo aislado de hoja de pasto colosoana del corregimiento El Mamón. De acuerdo a los resultados observados en la figura 3a, se indica que la mayores concentraciones promediadas en la producción del ion amonio se encontró en las bacterias endófitas aisladas de hojas, seguida del tallo y los menores en raíces.

En la figura 3b, observa los resultados de la actividad de solubilización de fosfatos de los 12 aislados de bacterias endófitas evaluados en medio líquido NBRIP, de acuerdo a los resultados obtenidos los aislados con mayor actividad solubilizadora correspondieron a M1RLP (1530 mg/L), M6RLP (1210 mg/L), M9REM (1112 mg/L) y M6REM (1050 mg/L), los cuales provinieron de corregimientos diferentes, pero aislados todos de raíces). Los resultados indican que la mayoría de aislados con actividad solubilizadoras de fosfatos se aislaron de la raíz, tres de ellos del tallo y solo dos aislado de hoja, mostrando dicha actividad en un rango de 85 (pH: 6.5) a 1530 mg/L (pH: 3.8).

El análisis de agrupamiento secuencias de 16 rDNA de bacterias endófitas con actividad positiva para la promoción de crecimiento, se realizó llevó a cabo a partir de aquellos aislados que tuvieron más de una actividad. En la tabla 2, se relacionan los aislados seleccionados con las actividades específicas de promoción de crecimiento observada en prueba *in vitro*. Los resultados del análisis de agrupamiento de secuencias 16s rDNR, de bacterias endófitas y su similitud con secuencias especies de bacterias almacenadas en base de datos del GenBank, se observan en la Figura 4. Los aislados identificados como M3RCh y M2TLP presentaron alta homología con bacterias del filo Gamma-proteobacteria (Figura 4a). La secuencia de M2TLP presentó mayor homología con un 99% de identidad y cobertura con *Pseudomonas hibiscicola* (*Stenotrophomonas maltophilia*).

Por su parte, la muestra de ADN genómico del aislado M1RLP amplificado con el ologonucleótidos F948 y R1492 sus secuencias mostro alta homología con la secuencia de la bacteria *Delftia tsuruhatensis*, una Betaproteobacteria del orden Burkholderiales, con un 100% de identidad y cobertura mediante el análisis en Blast, al momento de hacer la reconstrucción filogenética la secuencia obtenida presentó pocos sitios informativos lo que impidió construir un árbol.

growth promotion activities observed in the in vitro test. The results of the clustering analysis of 16s rDNA sequences, of endophytic bacteria and their similarity with sequences of bacterial species stored in the GenBank database, can be seen in Figure 4. The isolates identified as M3RCh and M2TLP showed high homology with bacteria from the Gamma-proteobacteria phylum (Figure 4a). The sequence of M2TLP presented greater homology with 99% identity and coverage with *Pseudomonas hibiscicola* (*Stenotrophomonas maltophilia*).

On the other hand, the sample of genomic DNA of the isolated M1RLP amplified with the oligonucleotides F948 and R1492 it is sequences showed high homology with the sequence of the bacterium *Delftia tsuruhatensis*, a Betaproteobacteria of the order Burkholderiales, with 100% identity and coverage by analysis in Blast, at the moment of doing the phylogenetic reconstruction, the sequence obtained presented few information sites which prevented the construction of a tree.

DISCUSSION

The population values of endophytic bacteria obtained in the present study ranged from $3.10 \times 10^8 \pm 4.48 \times 10^{10}$ CFU/g of tissue, and show higher values of means than those reported by Pérez et al (8), In a study conducted with the same bacteria associated with colossal grass in three municipalities

DISCUSIÓN

Los valores de poblacional de bacterias endófitas obtenidos en el presente estudio oscilaron entre $3.10 \times 10^8 \pm 4.48 \times 10^{10}$ UFC/g de tejido, y muestran valores mayores de medias a los reportado por Pérez et al (8), en estudio realizado con las mismas bacterias asociadas a pasto colosuana en tres municipios del departamento de Sucre, los valores de densidades poblacional encontrada por los autores corresponden a $3.24 \times 10^9 \pm 2.2 \times 10^{10}$ UFC/g de tejido.

En la Figura 1b, se muestra los valores de densidades de bacterias endófitas aisladas de raíces (5.0×10^{10} ; 3.8×10^{10} ; 2.8×10^{10} ; 2.4×10^{10} y 1.5×10^{10} UFC/g de tejido), indicando esto que los mayores valores de bacterias endófitas aisladas de raíces fueron para los corregimientos de La Peñas, El Mamón, Cantagallo, Chapinero y Hato Nuevo, respectivamente, mientras que la menores valores se encontraron en tallos y hojas respectivamente. De otra parte, los suelos del corregimiento Las Peñas presentaron pH (6.32) ligeramente ácido y valores de materia orgánica alto, con respecto al corregimiento de Hato Nuevo, predominaron suelos con valores de pH de 4.74, de reacción fuertemente ácido y valores de materia orgánica de deficiente. Posiblemente la diferencia encontrada con respecto a la densidad poblacional de bacterias endófitas y localidad, pueda estar sustentado a lo planteado por Axelrood et al (16), quienes manifiestan que las bacterias no funcionan eficientemente

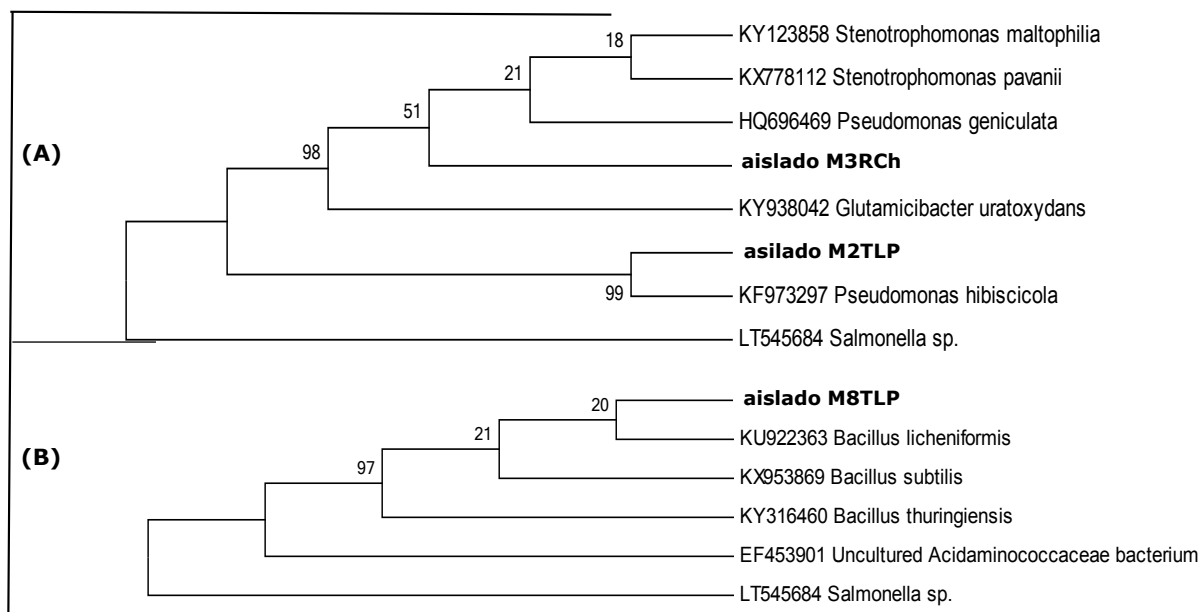


Figure 4. Phylogenetic tree of the M3RCh and M2TLP isolates and their relationships with species of bacteria of the genus *Pseudomonas* (A) and of the isolate M8TLP and its relationship with bacterial species of the genus *Bacillus* (B). M: morphotype; R: root; T: Tallo, Ch: Chapinero and LP: Las Peñas.

of the department of Sucre, the population densities found by the authors correspond to $3.24 \times 10^9 \pm 2.2 \times 10^{10}$ CFU/g of tissue.

Figure 1b shows the densities values of endophyte bacteria isolated from roots (5.0×10^{10} , 3.8×10^{10} , 2.8×10^{10} , 2.4×10^{10} and 1.5×10^{10} CFU/g of tissue), indicating that the highest values of endophyte bacteria isolated from roots were for the location of The Peñas, The Mamon, Canta gallo, Chapinero and Hato Nuevo, respectively, while the lowest values were found in stems and leaves respectively. On the other hand, the soils of The Peñas location presented pH (6.32) slightly acidic and values of high organic matter, with respect to the location of Hato Nuevo, soils with pH values of 4.74, strongly acid reaction and values of organic matter predominated of deficient. Possibly the difference found with respect to the population density of endophytic bacteria and locality, can be supported to what is posed by Axelrood et al (16), who state that bacteria do not work efficiently in acid soils. As the pH of the soil decreases, the activity of the microorganisms that decompose the organic matter and provide nutrients to the plants also decreases. Although most bacteria work best at soil pH levels of 7.0, their effectiveness rapidly decreases until pH levels are below 6.0.

With respect to the results found in the *in vitro* test of qualitative activity of ammonium ion production by endophytic bacteria isolated from colossal grass, values of 0.23 to 1.17 mg/L were found. At the date of this study, no information is reported in national databases, which allow the results obtained to be compared. However, the results of the study carried out by Lara et al (17) with asymbiotic nitrogen-fixing bacteria in the agricultural area of San Carlos, Córdoba, Colombia, reported the presence of 14 ammonium-producing isolates at a concentration range of 0.9 to 5.2 mg/L. The genus of bacteria *Azotobacter sp*, A16PG and A26M1P, produced values of 5.1545 and 5.1743 mg/L of ammonium, respectively, while the values obtained for the genus *Azospirillum spp*, A5M1G was 4.6741 mg/L of ammonium. These authors concluded that the biological fixation of nitrogen (FBN) by diazotrophic bacteria has contributed to increase yields in crops, reducing the need for nitrogen fertilizers and the emission of toxic gases such as N_2O , obtaining economic and environmental benefits in the farms.

In vitro tests on the production of soluble phosphate by endophytic bacteria show a decrease in pH as the concentration of soluble phosphate increases. Study carried out by Barraza and Pérez (9), on the evaluation of the efficiency in the production of phosphate by isolated endophytic bacteria of different rice varieties in the department of

en suelos ácidos. A medida que disminuye el pH del suelo disminuye también la actividad de los microorganismos que descomponen la materia orgánica y proveen nutrientes a las plantas. Aunque la mayoría de las bacterias funcionan mejor en niveles de pH del suelo de 7.0, su eficacia disminuye rápidamente hasta que los niveles del pH están por debajo de 6.0.

Con respecto a los resultados encontrados en la prueba *in vitro* de actividad cualitativa de producción del ion amonio por parte de bacterias endófitas aisladas de pasto colosoana, se encontraron valores de 0.23 a 1.17 mg/L. A la fecha del presente estudio, no se reporta información en bases de datos nacionales, que permitan comparar los resultados obtenidos. Sin embargo, Pero los resultados del estudio realizado por Lara et al (17) con bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno en zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia, reportaron la presencia de 14 aislados productores de amonio a un rango de concentraciones de 0.9 a 5.2 mg/L. El género de bacteria *Azotobacter sp*, A16PG y A26M1P, produjeron valores de 5.1545 y 5.1743 mg/L de amonio, respectivamente, mientras que los valores obtenidos para el género *Azospirillum spp*, A5M1G fue de 4.6741 mg/L de amonio. Estos autores concluyeron que la fijación biológica del nitrógeno (FBN) por bacterias diazotróficas ha contribuido a incrementar el rendimiento en las cosechas, reduciendo la necesidad de fertilizantes nitrogenados y la emisión de gases tóxicos como el N_2O , obteniendo beneficios económicos y ambientales en las fincas.

Los ensayo *in vitro* sobre la producción de fosfato soluble por parte de bacterias endófitas muestran disminución del pH a medida que aumenta la concentración de fosfato soluble. Estudio realizados por Barraza y Pérez (9), sobre la evaluación de la eficiencia en la producción de fosfato por bacterias endófitas aisladas de diferentes variedades arroz en el departamento de Córdoba, observaron disminución del valor del pH a medida que las concentraciones de fosfato soluble aumentan. Esta disminución del pH posiblemente se debe a la relación directamente que existe entre la producción de ácidos y la liberación de compuestos tipo fosfatos. Sin embargo, como lo señalan otros estudios, no siempre se presenta disminución del pH, debido a que no todas las especies de bacterias utilizan el mismo mecanismo para liberar el fosfato y hacerlo disponible para las plantas (18).

Con respecto a los resultados indicados en la Figura 3c, se observan que los valores de producción de AIA oscilaron de 1.15 a 12.3 mg/L para en los 8 aislado de bacterias endófitas

Córdoba, observed a decrease in the pH value as the soluble phosphate concentrations increase. This decrease in pH is possibly due to the direct relationship between the production of acids and the release of phosphate-type compounds. However, as other studies point out, pH decrease does not always occur, because not all bacterial species use the same mechanism to release phosphate and make it available to plants (18).

With respect to the results indicated in Figure 3c, it is observed that the production values of IAA ranged from 1.15 to 12.3 mg / L for 8 isolates of endophytic bacteria evaluated. The values found in the present studies were not purchased with other studies because there are no similar works in national and national databases. However, although the research on evaluation of the production of AIA show high or low values when compared to each other, it is demonstrated that low concentrations of phytohormone are able to stimulate plant development and high concentrations inhibit and reduce the area of elongation; taking into account that native microorganisms are adapted to their own conditions and environments, only performing bioassays *in vivo* can find the appropriate dose and check the effect exerted on the crops to be applied (19).

On the other hand, 12 isolates of endophytic bacteria showed qualitative capacity to produce siderophores. It has been shown that endophytic bacteria have various indirect mechanisms for promoting the growth of plants, which include: the production of antimicrobial metabolites and lytic enzymes, the induction of systemic resistance, competition for nutrients (production of siderophores) and the saturation of ecological niches (20).

The species of related endophytic bacteria such as *Delftia tsuruhatensis* was isolated from colossal grass roots belonging to the Peñas location, which according to *in vitro* growth promotion tests, showed phosphate solubilization capacity, siderophore production and N₂ reducing capacity to ammonium. Meanwhile, the species of endophytic bacteria identified as *Pseudomonas hibiscicola* isolated from colosoana grass stalk in the same location of The Peñas, showed reducing capacity of N₂ to ammonium phosphate solubilization, production of siderophore.

Several studies have found that *Pseudomonas hibiscicola* (*S. maltophilia*) has been reported as an endophytic bacteria of black pepper plant (*Piper nigrum*), isolating 20 strains of bacteria related to the species of *Ps. hibiscicola* and the tests carried out proved that this species has the capacity to produce siderophores and in a lesser amount of

evaluados. Los valores encontrados en el presente estudios no fueron comprados con otros estudios por no existir trabajos similares en base de datos nacionales y nacionales. Sin embargo, aunque las investigaciones sobre evaluación de la producción de AIA arrojen valores altos o bajos si se comparan entre sí, está demostrado que bajas concentraciones de fitohormona son capaces de estimular el desarrollo vegetal y altas concentraciones inhiben y reducen la zona de alargamiento; teniendo en cuenta que los microorganismos nativos están adaptados a condiciones y ambientes propios, sólo realizando bioensayos *in vivo* se podrá encontrar la dosis adecuada y comprobar el efecto ejercido sobre los cultivos a aplicar (19).

De otra parte, 12 aislados de bacterias endófitas mostraron capacidad cualitativa de producir sideróforos. Se ha evidenciado que las bacterias endófitas poseen diversos mecanismos indirectos para la promoción del crecimiento de las plantas, los cuales incluyen: la producción de metabolitos antimicrobianos y de enzimas líticas, la inducción de resistencia sistémica, competencia por nutrientes (producción de sideróforos) y la saturación de nichos ecológicos (20).

La especie de bacteria endófitas relacionada como *Delftia tsuruhatensis* fue aislada de raíz pasto colosoana pertenecientes al corregimiento Las Peñas, la cual según ensayos *in vitro* de promoción de crecimiento, mostro capacidad de solubilización de fosfato, producción de sideróforo y capacidad reductora de N₂ a amonio. En tanto, la especie de bacteria endófitas identificada como *Pseudomonas hibiscicola* aislada de tallo de pasto colosoana en el mismo corregimiento de Las Peñas, presento capacidad reductora de N₂ a amonio solubilización de fosfato, producción de sideróforo.

Varios estudios han encontrado que *Pseudomonas hibiscicola* (*S. maltophilia*) ha sido reportada como bacteria endófitas de planta de pimienta negra (*Piper nigrum*), aislándose 20 cepas de bacterias relacionadas a la especie de *Ps. hibiscicola* y los ensayo realizados compraron que esta especie tiene la capacidad de producir produce sideróforos y en menor cantidad de AIA (21). Otro estudio, señala que esta especie de bacteria, se asocia con plantas medicinales de la China en las cuales se demostró la capacidad de producción de IAA (8.51 µg/mL), y actividad de control biológica ejercida contra los fitopatógenos *Dothiorella gregaria* y *Botryosphaeria dothidea* (22). Asimismo, la capacidad de fijación de nitrógeno de esta bacteria en leguminosa (*Parkia roxburghii*) fue reportado por Singh y Mazumder (23). Otros trabajos relacionan a esta bacteria

IAA (21). Another study indicates that this species of bacteria is associated with medicinal plants from China in which the production capacity of IAA (8.51 µg/mL) was demonstrated, and biological control activity exerted against the phytopathogens *Dothiorella gregaria* and *Botryosphaeria dothidea* (22). Likewise, the nitrogen fixation capacity of this bacterium in legume (*Parkia roxburghii*) was reported by Singh and Mazumder (23). Other works relate to this bacterium as an endophyte of corn seeds (*Zea mays*) (24). And in Aloe Vera (*Aloe vera*), where it was found producing metabolites with antioxidant activity (25).

Recent studies show *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 (*Ps. Hibiscicola*) as an endophytic bacterium that according to the results of in vitro tests presents excellent antagonistic action against the fungal mycelia of Fitopatógeno *Botrytis cinerea*, through the emission of volatile organic compounds (VOCs). acronym in English). In greenhouse trials in this, same species of bacteria inoculated in tomato plants) showed efficient activity as a growth promoter in these plants (26).

With respect to the species of bacteria known as *Delftia tsuruhatensis*, it has been isolated from roots of rice cultivation (27), and its potential promoter growth promoting activity has been described by Han et al (28) when found in rice rhizoplane and in wheat cultivation (29). Likewise, this bacterium was reported by Wurdig et al (30), in a study on the diversity of diazotrophic endophytic bacteria associated with millet plants of the Rio Grande do Sul region of Brazil, the results showed that there is a high diversity of endophytic bacteria among which was identified *D. tsuruhatensis* with nitrogen fixation capacity in millet culture.

In conclusion, these two new species of endophytic bacteria were identified as *Delftia tsuruhatensis* M1RLP and *Pseudomonas hibiscicola* (*S. maltophilia*) M2TLP, isolated from colossal grass, with excellent results due to their direct capacity to promote growth through the solubilization of soluble phosphates, biological fixation of nitrogen (production of ammonium), production of indole acetic acid and the production of siderophores. Finally, these species of endophytic bacteria isolated from colossal grass in the present study can be used as microbial consortiums to effectively act as growth promoters and for biological control simultaneously in said pasture of livestock farms in the municipality of Corozal, department of Sucre, Colombia.

Conflict of interests

The author (s) did not declare potential conflicts of interest with respect to the investigation, authorship and/or publication of this article.

como una endófito de semillas de maíz (*Zea mays*) (24). y en Sábila (*Aloe vera*), donde se encontró produciendo metabolitos con actividad antioxidante (25).

Estudio recientes, muestran a *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 (*Ps. Hibiscicola*) como una bacteria endófito que según los resultados de ensayos *in vitro* presenta excelente acción antagónica contra el micelio del hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea*, mediante la emisión de compuestos volátiles orgánicos (VOCs, por su siglas en ingles). En ensayos de invernadero en esta, misma especie de bacteria inoculada en plantas de tomate) mostró eficiente actividad como promotora de crecimiento en dichas plantas (26).

Con respecto a la especie de bacteria conocida como *Delftia tsuruhatensis*, ha sido aislada de raíces de cultivo de arroz (27), y su potencial promotor actividad promotora de crecimiento ha sido descrito por Han et al (28) al ser encontrada en el rizoplane del arroz y en cultivo de trigo (29). Asimismo, esta bacteria fue reportada por Wurdig et al (30), en estudio sobre diversidad de bacterias endófitas diazotróficas asociadas a plantas de millo de la región Rio Grande del Sur en Brasil, los resultados demostraron que existe una alta diversidad de bacterias endófitas entre las que se identificó a *D. tsuruhatensis* con capacidad de fijación de nitrógeno en cultivo de millo.

En conclusión, estas dos nuevas especies de bacterias endófitas fueron identificadas como *Delftia tsuruhatensis* M1RLP y *Pseudomonas hibiscicola* (*S. maltophilia*) M2TLP, aisladas de pasto colosoana, con excelentes resultados por su capacidades directas de promoción del crecimiento a través de la solubilización de fosfatos soluble, fijación biológica de nitrógeno (producción del amonio), producción de ácido indol acético y la producción de sideróforos. Finalmente estas especies de bacterias endófitas aisladas de pasto colosoana en el presente estudio pueden ser utilizadas como consorcios microbianos para actuar efectivamente como promotoras de crecimiento y para el control biológico simultáneamente en dicha pastura de fincas ganaderas del municipio de Corozal, departamento de Sucre, Colombia.

Conflicto de Intereses

El (los) autor (es) no declararon conflictos de interés potenciales con respecto a la investigación, autoría y / o publicación de este artículo.

Acknowledgment

We thank the University of Sucre for the support provided in the use of the microbiological research laboratory. This study was partially funded by the University of Sucre and is part of the project "Evaluation of the activity promoting the growth of endophytic bacteria associated with colossal grass on livestock farms in the municipality of Corozal, Sucre, Colombia."

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad de Sucre por el apoyo brindado en el uso del laboratorio de investigaciones microbiológicas. Este estudio fue parcialmente financiado por la Universidad de Sucre y se enmarca dentro del proyecto "Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de bacterias endófitas asociadas a pasto colosoana en fincas ganaderas del municipio de Corozal, Sucre, Colombia".

REFERENCES

1. Pérez CR., Vertel MM., Pérez CA. 2015. Effect of different types of fertilizers on soil fungi in the agroecosystem *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus, in the Sabanas sucreñas, Colombia. *Livestock*. 27(1) <http://www.lrrd.org/lrrd27/1/pere27004.html>.
2. Gomez C, Mercado J, Payares F, Perez A. Identification of nematodes associated with the grass colosuana (*Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus) in the municipality of Sampués department of Sucre, Colombia. *Rev Colombiana Cienc Anim* 2010; 2(2):325-330.
3. Cardona E, Rios L, Peña J. Availability of Grasses and Forages as Potential Lignocellulosic Materials for Bioethanol Production in Colombia. *Technological Information* 2012; 23(6):87-96.
4. Peters M, Franco T, Schmidt A, Hincapie B. Species forrajeras multiintention: Options for producers of the American Tropic. International Center of Tropical Agriculture (CIAT). 2011. URL disponible en: http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/jspui/bitstream/123456789/7035/1/Especies_Forrajeras_Multiproposito_2011.pdf
5. Pérez A, Rojas J, Fuentes J. Endophytes Bacteria diversity of associated with roots of colosuana (*Bothriochloa pertusa*) Pasture in three locations of the department Sucre, Colombia. *Acta Biol Colomb*. 2010; 15(2):219-228
6. Lara, C., Avila E.L, Peñata, N. Native phosphate solubilizing bacteria to increase the crops in the department of Cordova-Colombia. *Rev Bio Agro*. 2011; 9(2):114-120.
7. Zinniel K, Lambrecht P, Harris B., Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Vidaver A. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *J Appl Environ Microbiol* 2002; 68(5):2198-2208.
8. Pérez A, Tuberquia A, Amell D. In vitro activity of nitrogen fixating and phosphate solubilizing bacteria. *Agron Mesoam*. 2014; 25(2):267-276.
9. Barraza Z, Pérez A. Endophytes bacteria promoters of growth associated with varieties of rice of the Colombian Caribe. [Thesis masters in Biotechnology]. University of Córdoba: Montería, Córdoba; 2015.
10. Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 2006; 287(1-2):15-21.
11. Lara C, Sanes S, Oviedo L. Impact of native phosphate solubilizing bacteria on the growth and development of radish (*Raphanus sativus*) plants. *Applied Biotechnology* 2013; 30(4):276-279.
12. Dawwam G, Elbeltagy A, Emara H, Abbas I, Hassan M. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Ann Agric Sci*. 2013; 58(2):195-201.
13. Doncel A, Chamorro L, Pérez A. Activity in vitro of bacteria endophytes promoters of growth associated with colosoana pasture in the municipality of Corozal, Sucre. *Rev Colombiana Cienc Anim*. 2016; 8(Supl):351-360.

14. Oliveira M, Santos T, Vale H, Delvaux J, Cordero A, Ferreira A, Moraes C. A. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Can J Microbiol.* 2013; 59(4):221-230.
15. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12):2725-2729.
16. Axelrod PE, Chow ML, Radomski CC, Dermot JM, Davies J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Can J Microbiol.* 2002; 48:655-674.
17. Lara C, Villalba M, Oviedo L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs from of agricultural crops of San Carlos. Córdoba, Colombia. *Rev Colomb Biotechnol.* 2007; 9(2):6-14.
18. Anzuay MS, Frola O, Angelini JG, Ludueña LM, Fabra A, Taurian T. Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis.* 2013; 60(3):143-154.
19. Lara C, Oviedo L, Aleman A. Strain native with potential in the acetic acid production indol to improve the agriculture. *Rev Bio Agro Vol.* 2011; 9(1):17-23.
20. Zheng YK, Qiao XG, Miao CP, Liu K, Chen YW, Xu LH, Zhao LX. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol.* 2016; 66:529-542.
21. Jasim B, Jimtha CJ, Jyothis M, Radhakrishnan E. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regulation.* 2013; 71(1):1-11.
22. Liu X, Dou G, Ma Y. Potential of endophytes from medicinal plants for biocontrol and plant growth promotion. *J Gen Plant Pathol.* 2016; 82(3):165-173.
23. Singh RS, Mazumder P. Molecular characterization of endophytic bacteria capable of nitrogen fixation Isolated from Young *Parkia Roxburghii* Plant Of Manipur, India. *IJSRES.* 2015; 2(8):91-95
24. Liu Y, Zuo S, Zou Y, Wang J, Song W. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Ann Microbiol* 2013; 63(1):71-79.
25. Akinsanya MA, Goh JK, Lim SP, Ting AS. Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophytes communities in *Aloe vera*. *FEMS Microbiol Lett.* 2015; 362(23):1-8.
26. Rojas D, Zetter E, Contreras Miguel, Rocha M, Macías L, Santoyo G. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2018; 13:46-52.
27. Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb Ecol.* 2008; 55(3):415-424.
28. Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Song W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol.* 2005; 28(1):66-76.
29. Ringelberg D, Foley K, Reynolds CM. Bacterial endophyte communities of two wheatgrass varieties following propagation in different growing media. *Can J Microbiol.* 2012; 58(1):67-80.
30. Wurdig L, Pereira L, Menezes F, Triplett W, Oliveira F. Diversity of diazotrophic endophytic bacteria associated with maize plants. *Rev Bras Ciênc Solo.* 2007; 31:1367-1380.