

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA



Facultad de Ciencias  
Maestría en Biología Aplicada

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS RIZOSFÉRICAS Y  
ENDÓFITAS ASOCIADAS A SUELOS Y PASTOS DEL VALLE Y SABANA DEL CESAR EN DOS  
ÉPOCAS CLIMÁTICAS**

**María Fernanda Garrido Rubiano**

Tesis de Maestría

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS RIZOSFÉRICAS Y  
ENDÓFITAS ASOCIADAS A SUELOS Y PASTOS DEL VALLE Y SABANA DEL CESAR EN DOS  
ÉPOCAS CLIMÁTICAS**

**María Fernanda Garrido Rubiano**

Tesis de Maestría

009

Maestría en Biología Aplicada  
Facultad de Ciencias  
Universidad Militar Nueva Granada  
Bogotá, D. C. 2007

## **Notas sobre el Autor**

**María Fernanda Garrido Rubiano**

Magíster en Biología Aplicada-Universidad Militar Nueva Granada, 2007  
Microbióloga Agrícola y Veterinaria – Pontificia Universidad Javeriana, 2004

## Resumen

La degradación de la praderas en el departamento del Cesar ha conducido a la pérdida de la competitividad de los sistemas ganaderos, siendo entre otras, la deficiencia de nitrógeno una de las principales causas. El objetivo de este proyecto fue aislar bacterias diazotróficas asociadas a pastos en el departamento del Cesar, cuantificar y evaluar su potencial de fijación biológica de nitrógeno, con el fin de seleccionar y realizar la caracterización molecular de los aislamientos promisorios para la futura inoculación en plantas. Las bacterias fijadoras de nitrógeno, asociadas a gramíneas, fueron aisladas de tres cultivos de pasto (*Panicum maximum*, *Dichanthium aristatum* y *Brachiaria* sp.) en dos épocas climáticas (lluvia y sequía) de dos tipos de suelo (localizados en sabana y valle) del departamento del Cesar encontrando que la época climática y el cultivo de pasto influyen la población de bacterias diazotróficas. El aislamiento fue realizado a partir de suelo rizosférico, raíces, hojas y tallos en medios de cultivo semiespecíficos sólidos y semisólidos sin fuente de nitrógeno, creciendo en un ambiente bajo de oxígeno (Döbereiner *et al.*, 1995). De los 352 aislamientos obtenidos en los medios de cultivo NFb (*Azospirillum* sp.), LGI (*Azospirillum amazonense*), JMV (*Burkholderia* sp.), LGI-P (*Gluconacetobacter* sp.), LG (*Azotobacter* sp.), LGD (*Derxia* sp.) y BEIJERINICKIA (*Beijerinickia* sp.), fueron escogidos los aislamientos SRG6, SRA4, SRA2, SRG4, SRA5, SRG5, SRG3, RA11, RA12, SRA3, SRA5 y SRG7 por su habilidad de fijar nitrógeno *in vitro* (2.246,17; 519,60; 269,35; 123,70; 63,34; 44,68; 10,72; 2,92; 1,41; 0,82; 0,81; 0,66 de nmol de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, respectivamente) y fueron identificados según el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA. Se observó una diversidad de bacterias diazotróficas asociadas a gramíneas, pertenecientes a los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella*.

**Palabras clave:** Aislamiento, identificación, bacterias diazotróficas, fijación de nitrógeno, gen 16S rRNA, pastos, Cesar

## Abstract

The degradation of the grassland in the department of Cesar has led to the loss of competitiveness of the cattle systems, being the nitrogen deficiency one of the main causes. The aim of this project was to isolate diazotrophic bacteria associated with pastures in the department of Cesar, and to quantify and to evaluate their potential for biological nitrogen fixation, in order to select and make the molecular characterization of the promising isolates for a future inoculation in plants. The nitrogen-fixing bacteria associated with grasses, were isolated from three crops of grass (*Panicum maximum*, *Dichanthium aristatum* and *Brachiaria* sp.) in two climatic seasons (rain and drought) and from two soil types (located in the valley and savannah) in the department of Cesar finding that climatic season and the crop of grass influence the population of diazotrophic bacteria. The isolation was made from rizospheric soil, roots, leaves and stems growing in semispecific culture media without any source of nitrogen and a low oxygen environment (Döbereiner *et al.*, 1995). Of the 352 isolates obtained from the culture media NFb (*Azospirillum* sp.), LGI (*Azospirillum amazonense*), JMV (*Burkholderia* sp.), LGI-P (*Gluconacetobacter* sp.), LG (*Azotobacter* sp.), LGD (*Derxia* sp.) BEIJERINICKIA (*Beijerinickia* sp.), were chosen the isolates SRG6, SRA4, SRA2, SRG4, SRA5, SRG5, SRG3, RA11, RA12, SRA3, SRA5 and SRG7 for their ability to fix nitrogen *in vitro* (2.246,17; 519.60, 269.35, 123.70, 63.34, 44.68, 10.72, 2.92, 1.41, 0.82, 0.81, 0.66 of nmol of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, respectively) and were identified according to the analysis of the sequence of the gene 16S rRNA. There was a variety of diazotrophic bacteria associated with grasses, belonging to the genera *Azospirillum* and *Klebsiella*.

**Key words:** Isolation, identification, diazotrophic bacteria, nitrogen fixation, 16S rRNA, grasses, Cesar.

## Contenido

	Pag.
<b>1. Introducción</b> .....	10
<b>2. Objetivos</b> .....	17
2.1 Objetivo General .....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	18
3.1 Determinación del efecto de las épocas de lluvia y sequía sobre las poblaciones de algunos géneros de microorganismos diazotróficos en pastos de valle y sabana en el departamento de Cesar.....	18
3.1.1 Área de estudio:.....	18
3.1.2 Toma de muestra: .....	18
3.1.3 Suelo rizosférico:.....	19
3.1.4 Raíces: .....	19
3.1.5 Hojas y tallos:.....	20
3.2 Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias fijadoras de nitrógeno de suelos de valle en pasto Guinea ( <i>Panicum maximum</i> ) y Angleton ( <i>Dichanthium aristatum</i> ); y sabana en pasto Braquiaria ( <i>Brachiara</i> sp.) del departamento del Cesar. ....	20
3.3 Selección e identificación molecular de las bacterias más promisorias para su utilización como bioinsumos en los cultivos de pastos de la Zona Caribe Colombiana .....	21
3.3.1 Determinación de la actividad de reducción de acetileno (ARA) .....	22
3.3.2 Identificación molecular .....	22
<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	24
4.1 Determinación del efecto de las épocas de lluvia y sequía sobre las poblaciones de algunos géneros de microorganismos diazotróficos en pastos de valle y sabana del departamento de Cesar ..	24
4.1.1 Efecto de la especie de pasto sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas en suelos de valle y sabana del Cesar .....	24
4.1.2 Efecto de la época climática sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del Cesar.....	26
4.1.3 Efecto del estrato de muestra sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del Cesar.....	27
4.1.4 Efecto de la época climática y el cultivo de pasto sobre la población de bacterias diazotróficas en suelos de valle y sabana del Cesar .....	28
4.1.5 Efecto del cultivo de pasto y el estrato de muestra sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del Cesar.....	29

4.1.6 Efecto del estrato de muestra y la época climática sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del Cesar.....	30
4.1.7 Efecto del estrato de muestra y dos épocas climáticas sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a tres cultivos de pasto en suelos de valle y sabana del Cesar.....	31
4.2 Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias fijadoras de nitrógeno de suelos de valle en pasto Guinea ( <i>Panicum maximum</i> ) y Angleton ( <i>Dichantium aristatum</i> ); y sabana en pasto Braquiaria ( <i>Brachiaria sp.</i> ) del departamento del Cesar.....	34
4.3 Selección e identificación molecular de las bacterias más promisorias para su utilización como bioinsumos en los cultivos de pastos en el valle y sabana del Cesar .....	37
4.3.1 Reducción de acetileno .....	38
4.3.2 Identificación molecular .....	39
<b>Conclusiones</b> .....	41
<b>Recomendaciones</b> .....	42
<b>Agradecimientos</b> .....	43
<b>Referencias</b> .....	44

## Tablas

	Pag.
<b>Tabla 1.</b> Relaciones entre tratamientos y variables evaluadas sobre la población de bacterias diazotróficas en suelos y pastos del departamento del Cesar	23
<b>Tabla 2.</b> Número de bacterias diazotróficas asociadas a pastos de valle y sabana del departamento del Cesar en tres estratos de muestreo ( $\text{Log}_{10}$ de número de células/mL).	26
<b>Tabla 3.</b> Número de aislamientos de bacterias diazotróficas de suelos de valle en <i>P. maximum</i> y <i>D. aristatum</i> y de suelos de sabana en <i>Brachiaria</i> sp. para dos épocas climáticas.	33
<b>Tabla 4.</b> Características fenotípicas de los aislamientos obtenidos de pastos de valle y sabana del departamento del Cesar para todas las partes muestreadas.	35
<b>Tabla 5.</b> Caracterización de los aislamientos de bacterias diazotróficas por medio del análisis de la secuencia 16S rRNA.	38

## Figuras

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Ubicación del departamento del Cesar (Tomado de Google Earth, 2007)	17
<b>Figura 2.</b> Parámetros analizados en la caracterización morfológica de las colonias, según Yano (1993)	20
<b>Figura 3.</b> Número de bacterias diazotróficas asociadas a diferentes cultivos de pastos de valle y sabana del departamento del Cesar ( $\text{Log}_{10}$ de número de células/mL).	24
<b>Figura 4.</b> Número de bacterias diazotróficas asociadas a pastos de valle y sabana del departamento del Cesar en dos épocas climáticas ( $\text{Log}_{10}$ de número de células/mL).	25
<b>Figura 5.</b> Número de bacterias diazotróficas asociadas a diferentes cultivos de pastos de valle y sabana del departamento del Cesar en dos épocas climáticas ( $\text{Log}_{10}$ de número de células/mL).	27
<b>Figura 6.</b> Número de bacterias diazotróficas asociadas a diferentes cultivos de pastos en tres estratos de muestra de valle y sabana del departamento del Cesar ( $\text{Log}_{10}$ de número de células/mL).	28
<b>Figura 7.</b> Número de bacterias diazotróficas según el estrato de la muestra en dos épocas climáticas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del departamento del Cesar ( $\text{Log}_{10}$ de número de células/mL).	29
<b>Figura 8.</b> Número de bacterias diazotróficas en tres estratos de muestras asociadas a tres cultivos de pastos de valle y sabana del departamento del Cesar en dos épocas climáticas ( $\text{Log}_{10}$ de número de células/mL).	31
<b>Figura 9.</b> Total de aislamientos obtenidos de las diferentes muestras de pastos en suelos de valle y sabana del departamento del Cesar.	34
<b>Figura 10.</b> Características macroscópicas de los grupos de aislamientos de bacterias diazotróficas asociadas a tres especies de pastos en suelos de valle y sabana del departamento del Cesar.	36
<b>Figura 11.</b> Reducción de acetileno de los aislamientos evaluados contra la cepa control Sp7 ( <i>Azospirillum brasilense</i> ).	37

## **Anexos**

	Pag.
<b>Anexo 1.</b> Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias diazotróficas.	57
<b>Anexo 2.</b> Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95% para los factores evaluados.	65
<b>Anexo 3.</b> Curva de calibración para la prueba de reducción de acetileno por cromatografía de gases.	68
<b>Anexo 4.</b> Resultados de la prueba de reducción de acetileno para los 12 aislamientos que presentaron mayor producción.	69

## 1. Introducción

Con excepción del agua, el nitrógeno es considerado generalmente el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural (Franco & Döbereiner, 1994) y es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros. El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es la única reserva de nitrógeno accesible en la biosfera, la cual es prácticamente ilimitada y no es directamente utilizada por los vegetales y animales. Para que el nitrógeno molecular pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido y los únicos seres capaces de realizar esta reacción son los organismos pertenecientes a los dominios *Eubacteria* y *Archea*, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (Baca *et al.*, 2000).

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso mediante el cual la mayor parte de nitrógeno atmosférico se ha incorporado a la materia viva, a lo largo de la evolución del planeta. Este proceso constituye la principal vía de incorporación de nitrógeno al ecosistema, que constantemente es reciclado para la atmósfera principalmente por la acción de organismos descomponedores de materia orgánica en el suelo. La transformación del nitrógeno no es exclusivamente biológica: las radiaciones ultravioleta representan un 10% del aporte global; la industria de los fertilizantes aporta un 25%, por lo que la fijación biológica de nitrógeno contribuye con el 60% aproximadamente (Baca *et al.*, 2000).

De esta forma, la acción de los microorganismos fijadores de nitrógeno y desnitrificadores garantiza un reservorio inagotable de nitrógeno en la atmósfera. La fijación biológica de nitrógeno contribuye a mantener un ecosistema en equilibrio, lo que conlleva a la reducción en la aplicación de dosis excesivas de compuestos nitrogenados de síntesis, como por ejemplo el nitrato que contamina aguas y los vegetales que serán consumidos por el hombre. De esta forma, posibilita el desarrollo de una agricultura menos agresiva con el medio ambiente (Peoples & Craswell, 1992).

Varios sistemas de fijación biológica de nitrógeno ya han sido descritos en organismos procarióticos. Dentro de los organismos que fijan nitrógeno (ó diazotróficos) muchos son heterótrofos, los cuales necesitan un suplemento de carbono reducido y otros dependen indirectamente de la energía lumínica. En general, requieren de una simbiosis con un hospedero eucariótico o pueden ser de vida libre, compitiendo con otros microorganismos por la materia orgánica disponible en el ambiente. Han sido descritas especies representantes de varios grupos de procariotes que fijan nitrógeno, tales como: bacterias fotosintéticas (*Rhodospirillum rubrum*), bacterias anaeróbicas (*Clostridium* spp.), microaeróbicas (*Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., *Klebsiella* spp., entre otros), bacterias aeróbicas (*Azotobacter* spp., *Derxia* spp.,

*Beijerinckia* spp.) y también algunas especies de cianobacterias (algas verde-azules) y actinomycetes (*Frankia* sp.) (Sprent & Sprent, 1990).

Según Evans & Burris (1992), se pueden caracterizar tres grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno: las bacterias diazotróficas de vida libre, asociativas y simbióticas.

Los diazótrofos de vida libre son heterótrofos, requiriendo ecosistemas capaces de brindar una fuente de carbono utilizable, necesario para la fijación de nitrógeno. Estos microorganismos fueron los primeros en ser conocidos como es el caso de *Beijerinckia fluminensis* y *Beijerinckia indica*, aisladas de la rizósfera de plantas de caña de azúcar en suelos tropicales, demostrando su potencial en asociaciones con gramíneas (Döbereiner & Ruschel, 1958; Döbereiner & Alvahydo, 1959). Dentro de las bacterias de vida libre encontramos la familia *Azotobacteraceae* que está representada en su mayoría por el género *Azotobacter* el cual es aeróbico, heterótrofo y fijador de nitrógeno y las especies más conocidas son *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. paspali*, siendo esta última la más estudiada ecológicamente (Becking, 1991b, Döbereiner *et al.*, 1995).

Las bacterias diazotróficas asociativas tienen la capacidad de asociación con gramíneas, dentro de las cuales se encuentran especies forrajeras utilizadas como alimento por la ganadería bovina (Döbereiner, 1970; Döbereiner & Campêlo, 1971; Becking, 1991a; Döbereiner & Day, 1976; Reinhold *et al.*, 1987; Reis *et al.*, 2004); de acuerdo a lo propuesto por Baldani *et al.* en 1997, éstas se dividen en endófitos facultativos (pueden colonizar tanto la rizósfera como el interior de las raíces) y obligados (colonizan el interior de las raíces).

Respecto a los endófitos facultativos, solamente después del redescubrimiento del género *Azospirillum* (grupo predominante) por Döbereiner & Day (1975), los científicos del mundo mostraron interés por la asociación de diazótrofos con gramíneas. Los microorganismos de este género se encuentran tanto en el interior como en la superficie de las raíces de muchas gramíneas forrajeras (Döbereiner & Baldani, 1982). La distribución ecológica de *Azospirillum* spp. es extremadamente amplia, siendo considerada como una bacteria universal que coloniza plantas que crecen en diferentes hábitats (Döbereiner *et al.*, 1976; Döbereiner & Pedrosa, 1987). Otras especies también han sido encontradas en asociación con plantas monocotiledóneas incluyendo arroz, sorgo, caña de azúcar, gramíneas forrajeras, entre otras (Döbereiner *et al.*, 1976; Haahtela *et al.*, 1981; Reinhold *et al.*, 1987) y con dicotiledóneas. El género fue definido por Tarrand *et al.* (1978) y comprende nueve especies caracterizadas fenotípicamente, por análisis DNA:DNA y por secuencia del gen 16S rRNA: *A. brasilense* y *A. lipoferum* (Tarrand *et al.*, 1978), *A. amazonense* (Magalhães *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987), *A. irakense* (Khammans *et al.*, 1989), *A. largimobile* y *A. dobereineriae* (Eckert *et al.*,

2001). Algunas especies de *Azospirillum* son capaces de producir reguladores de crecimiento vegetal como el ácido indolacético (Vanderleyden, 2000).

La característica de diazótrofos endófitos obligados fue descubierta recientemente y parece ser clave para explicar una contribución de la fijación de nitrógeno mucho más eficiente, especialmente en los trópicos, en relación con las asociaciones rizosféricas en otros cultivos (Döbereiner, 1995; Döbereiner *et al*, 1995). A este grupo de microorganismos pertenecen: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante & Döbereiner, 1988), *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al*, 1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Baldani, 1996; Gillis *et al*, 1991; Baldani *et al.*, 1996), *Klebsiella pneumoniae* (Doolittle *et al.*, 2007) y *Burkholderia* spp. (Yabuuchi *et al*, 1992).

La capacidad de fijar nitrógeno simbióticamente se encuentra en varios grupos de microorganismos y en algunos casos se observa la formación de estructuras diferenciadas. En relación a los rizobios, durante su asociación con las plantas leguminosas, se observan estructuras que se denominan nódulos. Estos microorganismos tienen la capacidad de invadir las raíces de las plantas leguminosas en zonas estacionales y en zonas tropicales, haciendo que ocurra la formación del nódulo. En el nódulo, la bacteria, en su forma de bacteroide está involucrada en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico de una forma combinada (amónio) que puede ser utilizado por la planta huésped. Actualmente son conocidos cinco géneros de diazótrofos simbióticos de la familia *Rhizobiaceae*: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988; De Lajudie *et al.*, 1994; Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996; Jarvis *et al.*, 1997; De Lajudie *et al.*, 1998).

Historica y económicamente, varios diazótrofos han sido ampliamente utilizados como organismos modelo para investigaciones en laboratorio. Así como *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum* fueron utilizados para el aislamiento y caracterización de la enzima nitrogenasa. *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y una especie de *Anabaena*, han sido utilizados en estudios de genética en la fijación biológica de nitrógeno (Haselkorn *et al.*, 1985; Postgate, 1983).

Para el aislamiento de microorganismos diazotróficos se han utilizado medios de cultivo libres de nitrógeno, siendo el caso de los medios de cultivo libres de nitrógeno semisólidos, que han sido la clave para el aislamiento de un gran número de diazótrofos microaerófilos. La técnica del uso de estos medios de cultivo es muy sencilla y útil cuando hay gran abundancia de microorganismos diazotróficos asociados con las raíces. Se pueden obtener cultivos puros con pocos pasos de purificación y sin mucha dificultad. Esta técnica ha permitido el descubrimiento de cuatro cepas de *Azospirillum*, *Campilobacter nitrofigilias*, *Herbaspirillum seripeducaae*, algunas especies diazotróficas de *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Bacillus azotofixans*.

En Colombia la ganadería bovina se desarrolla a lo largo y ancho de toda la geografía nacional. La actividad se desarrolla en cinco regiones ganaderas bien definidas:

- Zona Norte o Llanuras del Caribe, conformada por los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, La Guajira, Magdalena, Sucre y norte de Antioquia. La región está dedicada en su gran mayoría a la ganadería de carne y doble propósito (carne y leche).
- Zona del Valle del Magdalena y Región Andina: incluye los departamentos de Boyacá, Caldas, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Santander, Tolima y sur de Antioquia. Predomina la ganadería de leche y doble propósito.
- Zona del Valle del Río Cauca, que comprende los departamentos de Cauca, Valle del Cauca, Quindío y Risaralda donde predomina la ganadería doble propósito.
- Región del Sur, integrada por Vaupés, Putumayo, Caquetá y Nariño. Es una región con perspectivas para ganadería de leche en Caquetá, Sibundoy (Putumayo) y Nariño (Viloria, 2003).

La región Caribe posee 3.3 millones de hectáreas en pastos y una población bovina de 6.9 millones de cabezas, que generan el 38.7% de la leche y el 38% de la carne que produce el país, lo que muestra la amplia participación de la región en los mercados nacionales de estos productos (Cuesta, 2005).

En el departamento del Cesar el área destinada a la actividad ganadera es alrededor de 2.700.000 has, con una población ganadera de 1.450.000 bovinos que contribuyen con una producción diaria de 900.000 litros de leche. La producción ganadera esta limitada por un proceso de degradación de las praderas que se refleja en la baja producción y calidad del forraje; la pérdida de la fertilidad principalmente del nitrógeno ha sido asociada como el más importante factor de degradación de las praderas (Oliveira *et al*, 2004). Este nutriente puede ser removido del sistema suelo-planta mediante la exportación a producto animal (carne principalmente), lixiviación, desnitrificación y volatización de los depósitos en forma de los excrementos bovinos (Ferreira *et al*, 1997). Para suplir la deficiencia de este nutriente se ha recomendado la fertilización nitrogenada de síntesis, la cual es inviable por los altos costos ambientales, económicos y sociales.

Como opción tecnológica se avizora la utilización de microorganismos nativos fijadores de nitrógeno con el propósito de reducir la fertilización nitrogenada de síntesis, con las ventajas de reducir la contaminación de los suelos y aguas freáticas, disminución de los costos de producción y mejorar la competitividad de los sistemas ganaderos.

De otra parte, en los últimos 10 años ha aumentado el interés en la microbiología y ecología del suelo así mismo, se ha permitido mejorar su entendimiento debido al uso de tecnologías moleculares que facilitan explorar la expresión de los genes involucrados en los papeles que desempeñan los microorganismos en los

ecosistemas (Brock, 2000). El uso de los rRNA de las subunidades pequeñas de los ribosomas, en la ecología microbiana ha sido aplicado recientemente para determinar la gran diversidad de microorganismos en el suelo (Head *et al.*, 1998).

Los ribosomas son complejos riboprotéicos encargados de llevar a cabo la síntesis protéica. Están compuestos por diferentes moléculas de rRNA (RNA ribosomal) y más de 50 proteínas organizadas en dos subunidades, una grande (50S en procariotas) y otra pequeña (30s en procariotas) (Lodish *et al.*, 2000). De los tipos de rRNA presentes en los ribosomas, el más estudiado es el gen 16S rRNA, polirribonucleótido de 1500nt aproximadamente. Esta fracción es codificada por el gen *rrs* (16S rDNA). Su secuencia posee regiones altamente conservadas, comunes a todos los organismos, y otras variables que se concentran en zonas específicas de la secuencia. Adicionalmente existen secuencias cortas características, compartidas entre los miembros de un grupo filogenético específico, los cuales no se encuentran (o muy rara vez) en otros grupos (Mendoza & Rodicio, 2004).

El desafío para los ecólogos del suelo es identificar las poblaciones y gremios de microorganismos que tienen papeles funcionales dominantes en los procesos específicos del suelo. Las poblaciones bacterianas y los gremios comenzaron a ser descritos en varios lugares alrededor del mundo usando las tecnologías del rDNA 16S (Chandler *et al.*, 1997; Felske, 1999; Felske *et al.*, 1997; Macrae, 1998; Rheims *et al.*, 1999, Macrae, 2000).

La extracción de los ácidos nucleicos es la etapa más importante en la investigación de la microbiología molecular. Se han descrito muchos métodos para la extracción de DNA, donde se requiere la lisis de las células, ya sea mecánicamente, por uso de altas temperaturas o por enzimas, de acuerdo a las condiciones del laboratorio de trabajo y se alcance una eficiencia durante el proceso (obtención de una buena cantidad de material genético de interés) (Macrae, 2000).

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes 16S rRNA (16S rDNA) usando primers universales y la separación de los amplicones resultantes de PCR ya sea por clonación, por electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) ó electroforesis en gel con gradiente térmico (TGGE) constituyen las técnicas más populares usadas para describir la ecología bacteriana del suelo a la fecha (Muyzer & Smalla, 1998). Los clones o las bandas en los geles pueden ser secuenciadas y la información resultante permite inferir sobre la diversidad de la muestra original. Durante los últimos años ha aumentado el uso de estas técnicas aplicadas a los suelos en muchos ambientes (Rheims *et al.*, 1996; Kuske *et al.*, 1997; Duinveld *et al.*, 1998; Macrae, 2000). Con el uso de estas tecnologías hasta ahora inicia el entendimiento de los procesos importantes en el suelo, su regulación y cómo pueden ser estos manipulados. Por lo tanto, uno de los objetivos futuros del estudio de la diversidad genética usando los métodos 16S rDNA debe ser facilitar el

aislamiento de nuevos organismos para la industria biotecnológica (Wagner *et al.*, 1994; Macrae, 2000). Esto se puede lograr y se ha facilitado por la expansión rápida en el número de secuencias ambientales que han sido depositados *on-line* y la importancia de esta información para el diseño y aplicación de pruebas de oligonucleótidos para la identificación *in situ* y la exploración de bacterias ambientales (Busse *et al.*, 1996).

Después de obtener las secuencias del gen 16S rDNA, estas pueden ser comparadas con las secuencias que han sido introducidas en las bases de datos usando la herramienta de búsqueda básica de alineamiento local (basic local alignment search tool, BLAST) en la página de internet (world wide web) National Center of Biotechnology Information (NCBI): <http://ncbi.nih.gov/cgi-bin/nph-blast?jform=1>, este sitio es de uso gratuito (Macrae, 2000).

La secuencia del gen 16S rRNA permite realizar inferencias filogenéticas y taxonómicas debido a que:

- Esta molécula es muy antigua y está presente en todas las bacterias.
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un largo periodo de tiempo
- Los cambios ocurren a tasas muy pequeñas, por lo que aportan información evolutiva de los procariontes. Sin embargo, poseen variabilidad suficiente como para discriminar grupos bacterianos tanto próximos como alejados.
- Por la longitud de la secuencia del 16S rRNA, se minimizan las fluctuaciones estadísticas.
- Por la conservación de la estructura secundaria entre procariontes se pueden realizar alineamientos precisos, facilitando las comparaciones entre organismos.
- Su fácil secuenciación ha permitido obtener una amplia base de datos para el análisis (Woese & Fox, 1977).

Estos estudios apoyan generalmente el trabajo previo basado en el cultivo de los microorganismos del suelo en laboratorio; pero, señalan la importancia de la presencia activa de los nuevos consorcios que deben seguir cultivándose en el laboratorio. La aplicación de métodos de biología molecular para la identificación de microorganismos asociados a gramíneas permitió hacer un acercamiento de la diversidad de estos en los suelos del Departamento del Cesar.

En el departamento del Cesar no existen estudios de evaluación de poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno asociados a pasturas ni a su dinámica. Esto reviste especial importancia teniendo en cuenta que la población microbiana está condicionada a la vegetación nativa y es posible que las diferentes especies de pastos puedan presentar un efecto selectivo sobre las mismas, lo que podría resultar en diferentes respuestas en cuanto a la contribución de la fijación biológica de nitrógeno obtenida por cada uno de estos microorganismos (Reis *et al.*, 2004).

Por lo anterior se aislaron e identificaron bacterias diazotróficas nativas con el fin de evaluar su interacción con diferentes gramíneas durante los cambios climáticos que se presentan en el departamento del Cesar con el objetivo final de producir biofertilizantes que suplan parcialmente la necesidad de nitrógeno, aplicando una práctica amigable con el medio ambiente al reducirse los niveles de nitratos en suelos y aguas. Es importante conocer los microorganismos asociados a los diferentes pastos, en las diferentes épocas del cultivo, tipos de suelos y estaciones climáticas con el propósito de identificar los géneros de microorganismos promisorios eficientes en la fijación de nitrógeno.

Estos resultados podrían contribuir con el mejoramiento de la producción de forrajes en términos de cantidad y calidad, creando condiciones más favorables de competitividad y sostenibilidad de los sistemas ganaderos del departamento del Cesar.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Contribuir al conocimiento de la diversidad de bacterias diazotróficas provenientes de suelos localizados en zonas de sabana y valle del departamento del Cesar, Colombia

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de las épocas de lluvia y sequía sobre el tamaño de las poblaciones de algunos géneros de microorganismos diazotróficos en gramíneas de valle y sabana en el departamento de Cesar.
- Aislar y caracterizar fenotípicamente bacterias fijadoras de nitrógeno provenientes de suelos de valle del Cesar en pasto Guinea (*Panicum maximum*) y Angleton (*Dichantium aristatum*) y sabana del Cesar en pasto Braquiaria (*Brachiaria* sp.).
- Seleccionar e identificar por técnica molecular las bacterias fijadoras de nitrógeno más promisorias para su utilización como bioinsumos en los cultivos de gramíneas.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Determinación del efecto de las épocas de lluvia y sequía sobre las poblaciones de algunos géneros de microorganismos diazotróficos en pastos de valle y sabana en el departamento de Cesar

##### 3.1.1 Área de estudio:

El estudio fue realizado en dos zonas ganaderas del departamento del Cesar, identificadas como microregiones de sabana y valle del Cesar, donde están ubicados los municipios de Chiriguana y Agustín Codazzi, respectivamente (Figura 1), las cuales corresponden al piso térmico cálido seco.

La microrregión Valle del Cesar tiene una extensión de 1.038.052 y la Sabanas del Cesar 507.457 ha. (Pulido *et al.*, 1999). La región posee precipitación media anual de 1500 mm, humedad relativa de 68% y promedio de temperatura anual de 29°C. Se presenta un régimen de lluvias bimodal con dos periodos lluviosos, el primero de Abril a Junio y el segundo de Septiembre a Noviembre. Los períodos secos se registran en los meses de Diciembre a Enero, y de Junio a Agosto. Se registran vientos fuertes especialmente en los meses de Febrero, Marzo y Abril



Figura 1. Ubicación del departamento del Cesar (Tomado de Google Earth, 2007)

##### 3.1.2 Toma de muestra:

Las muestras de suelo fueron tomadas en diferentes puntos de áreas homogéneas dedicadas a la actividad ganadera a 20 cm de profundidad, obteniendo 5 submuestras de 200 g cada una, las cuales fueron homogenizadas para formar una única muestra que fue procesada en el laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación Tibaitatá (CORPOICA). En cada punto donde se realizó el muestreo se obtuvo una planta completa (raíz, tallos y hojas) de pasto Guinea (*Panicum maximum*), pasto Angleton

(*Dichantium aristatum*) y pasto Braquiaria (*Brachiaria* sp.) durante las épocas de lluvia y sequía. Las muestras del período de lluvias se tomaron en septiembre de 2006 y las correspondientes a la época de sequía, en marzo de 2007. Para el aislamiento de bacterias diazotróficas, las muestras fueron separadas en suelo rizosférico, raíces y hojas y tallos (parte aérea).

### 3.1.3 Suelo rizosférico:

Para obtener el suelo rizosférico de cada muestra, se removieron las raíces en condiciones estériles para obtener el suelo adherido a éstas. Se colectó una muestra de 11 g de éste y fue diluída en 99mL de solución salina estéril (0.85% NaCl) con una agitación de 100rpm durante 5 minutos aproximadamente. Se obtuvo una interfase, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas con base 10 desde  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  inoculando 1 mL en tubos con 9ml de solución salina estéril (0,85% NaCl). De cada dilución se inoculó 0,1mL en diferentes medios de cultivo semisólidos libres de nitrógeno para el recuento de diferentes bacterias diazotróficas, así:

- NFb y LGI para *Azospirillum* spp. (Tarrand *et al.*, 1978; Döbereiner *et al.*, 1995)
- JNFb para *Herbaspirillum* spp. (Baldani *et al.*, 1986; Döbereiner *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 1991).
- LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. (Döbereiner *et al.*, 1995)
- JMV para *Burkholderia* spp. (Döbereiner *et al.*, 1995, Reis *et al.*, 2004)

Para el aislamiento de bacterias aeróbicas asociativas como *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* spp. y *Derxia* spp., se sembraron las diluciones seriadas del suelo rizosférico sobre los medios de cultivo sólidos LG, BEIJ. y LGD para cada microorganismo respectivamente (Döbereiner *et al.*, 1995; Novo, 1997). Los medios se incubaron durante a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 5 días.

### 3.1.4 Raíces:

Las raíces obtenidas de cada muestra fueron lavadas con agua corriente para retirar las partículas de suelo adheridas a éstas y luego fueron cortadas en trozos de 1cm aproximadamente. Se pesó 1g de trozos de raíz y se sumergieron en alcohol etílico (70%) durante 5 minutos para retirar la grasa. Posteriormente, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (2%) durante 2 minutos. Se realizaron enjuagues en agua destilada estéril para eliminar los residuos de estas soluciones y se maceraron en un mortero con 9ml de solución salina (0,85% NaCl) para permitir la salida de los microorganismos endófitos presentes en estas. De este macerado se extrajo 1ml y se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$  inoculando 1mL en tubos con 9mL de solución salina estéril (0,85% NaCl) y cada dilución fue inoculada de la misma forma en los mismos medios de cultivo utilizados para la muestra de suelo rizosférico (Döbereiner *et al.*, 1995).

### **3.1.5 Hojas y tallos:**

Los tallos y hojas pertenecientes a las diferentes muestras de plantas fueron lavados con agua corriente para retirar las partículas de suelo adheridas y fueron desinfectados superficialmente con un algodón estéril impregnado de alcohol (70%). Posteriormente se hizo un macerado de estas muestras utilizando 1 g de trozos de hojas y tallos en 9mL de solución salina estéril (0,85% NaCl), para de esta forma, permitir la salida de los microorganismos endófitos presentes en estos tejidos. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$ , inoculando 0,1mL de cada dilución en los medios de cultivo libres de nitrógeno utilizados para las muestras de suelo rizosférico y raíces (Döbereiner *et al.*, 1995).

Se inocularon todas las diluciones en en tres frascos por dilución con medios de cultivo semisólidos para realizar el recuento de la población por la técnica del Número más Probable (NMP). Se consideraron como positivos los frascos que presentaron una película 2mm debajo de la superficie del medio. Estas pruebas se hicieron por triplicado con el fin de realizar un análisis de varianza univariante (UNIANOVA); en esta fase se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con un arreglo factorial de 3 (especie de pasto) x 3 (estratos de muestreo: suelo rizosférico, raíces, hojas y tallos) x 2 (épocas climáticas) con el programa SPSS y la comparación de medias fue realizada por el Test de Duncan al 5% de probabilidad.

Para el caso de los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre, se realizó un recuento en placa por triplicado de las colonias con morfologías similares a los géneros de estudio, según Döbereiner *et al.* (1995) con la información obtenida se realizó un análisis de varianza univariante (UNIANOVA) con el programa SPSS y la comparación separación de medios fue realizada por el Test de Duncan al 5% de probabilidad.

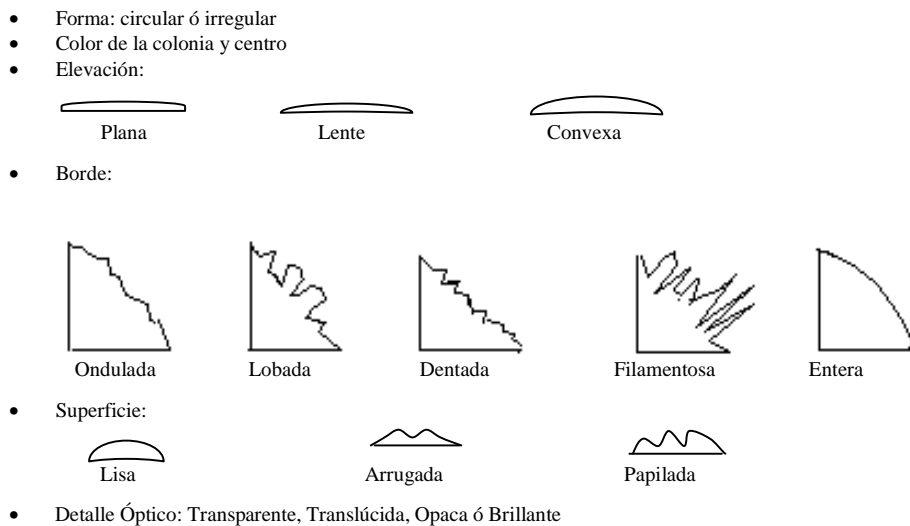
### **3.2 Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias fijadoras de nitrógeno de suelos de valle en pasto Guinea (*Panicum maximum*) y Angleton (*Dichantium aristatum*); y sabana en pasto Braquiaria (*Brachiaria sp.*) del departamento del Cesar.**

A partir de los tubos de mayor dilución que presentaron la formación de película característica en cada uno de los medios de cultivo utilizados y para cada una de las muestras provenientes de los diferentes cultivos de pasto, fueron inoculados en frascos con 5mL de nuevos medios de cultivo semisólidos en tres repeticiones. Después de la incubación por 5 días, se realizó un nuevo repique y los frascos fueron incubados por tres días. Uno de los tubos de cada medio fue utilizado para realizar siembras en placas con el medio de cultivo específico sólido con  $20\text{mg L}^{-1}$  de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Las placas fueron incubadas por siete días a  $32^{\circ}\text{C}$ , las colonias con las características de los géneros de interés fueron seleccionadas y repicadas nuevamente en frascos con 5mL de medio de cultivo semisólido. Después de cuatro

días, fueron repicadas nuevamente en medio de cultivo Batata (Anexo 1) e incubadas por tres días más, a 32°C.

La conservación de los aislamientos de interés, se realizó sembrando los aislamientos en 50mL de caldo de cultivo DYGS e incubándolos a 30°C a 150rpm durante 3 días. Después de su crecimiento se agregó glicerol (30%) al caldo de cultivo y fue dispuesto 1mL en viales de 1,5mL y almacenados en el congelador a -20°C.

Las bacterias aisladas fueron agrupadas siguiendo algunas características macroscópicas (forma, borde, pigmentación, superficie, consistencia, olor, entre otras) y características microscópicas de las colonias (forma de las células) (Texeira *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2.** Parámetros analizados en la caracterización morfológica de las colonias, según Yano (1993)

### 3.3 Selección e identificación molecular de las bacterias más promisorias para su utilización como bioinsumos en los cultivos de pastos de la Zona Caribe Colombiana

Después de realizar el agrupamiento de acuerdo a las características fenotípicas de los aislamientos, se realizó la medición de la fijación biológica de nitrógeno *in vitro* a las cepas que fueron agrupadas por la caracterización fenotípica, para evaluar la actividad de la enzima nitrogenasa, característica que se aplicó como criterio para la selección de los mejores aislamientos para su identificación genética.

### 3.3.1 Determinación de la actividad de reducción de acetileno (ARA)

Los cultivos bacterianos se inocularon en frascos de 10 mL con 3 mL de medio semisólido según su aislamiento y se incubaron con tapón de algodón durante 24 horas a 32° C. Al cabo de este tiempo, se reemplazó el tapón por uno de caucho y se selló herméticamente. Se reemplazó el 10% de la atmósfera del frasco de cultivo con acetileno y se incubó durante 1 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. La temperatura en la columna fue de 50° C, en el inyector 70° C, en el detector 120° C. 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 segundos y para el acetileno de 1,20 minutos. 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  $\text{Log}_{10}Y = 0,808 \text{Log}_{10}X + 9,7$  ( $R^2 = 0,997$ ) (Anexo 2), a partir de una curva de calibración sometida a regresión lineal, 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.

### 3.3.2 Identificación molecular

**Caracterización de los aislamientos de bacterias diazotróficas por medio del análisis de la secuencia 16S rRNA.** Las bacterias que presentaron mayor capacidad de reducción de acetileno, se cultivaron en 5 mL de caldo LB durante 14 horas en agitación a 150 rpm a 30° C. De esta suspensión se tomaron 25µL en tubo Eppendorf de 1,5 mL y se pusieron en Baño María a una temperatura aproximada de 80°C durante 15 minutos para lisar el material celular y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 1,0 mL de agua Milli-Q estéril.

La amplificación de la región 16S rDNA se realizó en 25 µL de una mezcla de reacción de Buffer (1x); MgSO<sub>4</sub> (1,5mM); dNTP (0,2 mM), Primers 27F y 1492R (0,2mM) (Edwards *et al.* 1989); 0,25 µL de Taq DNA Polimerasa (Platinum) y 1,5 µL de DNA molde (muestra del aislamiento). Las condiciones del termociclador fueron: 1 ciclo inicial de denaturación (94° C por 5 min), 50 ciclos de denaturación (94° C por 30 seg), anillaje (66° C por 30 seg) y extensión (72° C por 1 min); 3 ciclos de extensión final (72° C por 10 min).

Los fragmentos amplificados fueron observados usando electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE acondicionado con 0,5 µg/mL de Bromuro de Etidio para visualizar las bandas resultantes. El ADN amplificado se purificó utilizando el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. El DNA se cuantificó

en un NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 y se analizó en el programa ND-1000 V.3.3.0. a una longitud de onda de 260 nm.

La secuenciación de este producto se llevó a cabo en el secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, el cual es utilizado para llevar a cabo la secuenciación automática de fragmentos de DNA marcados con fluorocromos (Applied BioSystems, 2001).

Las secuencias obtenidas, fueron comparadas con las secuencias que han sido introducidas en la base de datos National Center of Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para realizar un análisis “Basic Local Alignment Search Tool” para nucleótidos (BLASTn).

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Determinación del efecto de las épocas de lluvia y sequía sobre las poblaciones de algunos géneros de microorganismos diazotróficos en pastos de valle y sabana del departamento de Cesar

El suelo de la zona de valle donde estaban establecidos los cultivos de *P. maximum* y *D. aristatum*, presentó un pH de 6.6, con un contenido de materia orgánica menor de 2.0%, el cual es considerado bajo; entretanto, el suelo de la zona de sabana proveniente del cultivo de *Brachiaria* sp. posee un pH de 4.5 y un porcentaje medio de materia orgánica de 2 a 2.5.

Los resultados obtenidos muestran la ocurrencia de las bacterias diazotróficas pertenecientes a los géneros *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp. y *Derxia* sp., para las muestras de suelo, y la presencia de las bacterias diazotróficas pertenecientes a los géneros *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp., para las muestras de raíces, hojas y tallos en los pastos de valle y de sabana del Cesar durante las épocas de lluvia y sequía donde se reveló la influencia de los factores evaluados (pasto; época climática: lluvia y sequía; y estrato: suelo rizosférico, raíces, hojas y tallos) y sus interacciones sobre la población de bacterias diazotróficas están resumidos en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Relaciones entre tratamientos y variables evaluadas sobre la población de bacterias diazotróficas en suelos y pastos del departamento del Cesar.

Tratamiento	<i>Azospirillum</i>	<i>A. amazonense</i>	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Derxia</i>	<i>Beijerinckia</i>
Pasto	*	ns	*	ns	ns	*	*	*
Época climática	*	*	*	ns	*	*	*	*
Estrato	ns	ns	*	ns	ns	na	na	na
Pasto x Época climática	*	ns	ns	ns	ns	*	*	*
Pasto x Estrato	*	*	*	*	*	na	na	na
Época x Estrato	*	*	ns	ns	*	na	na	na
Pasto x Época climática x Estrato	*	ns	*	*	*	na	na	na

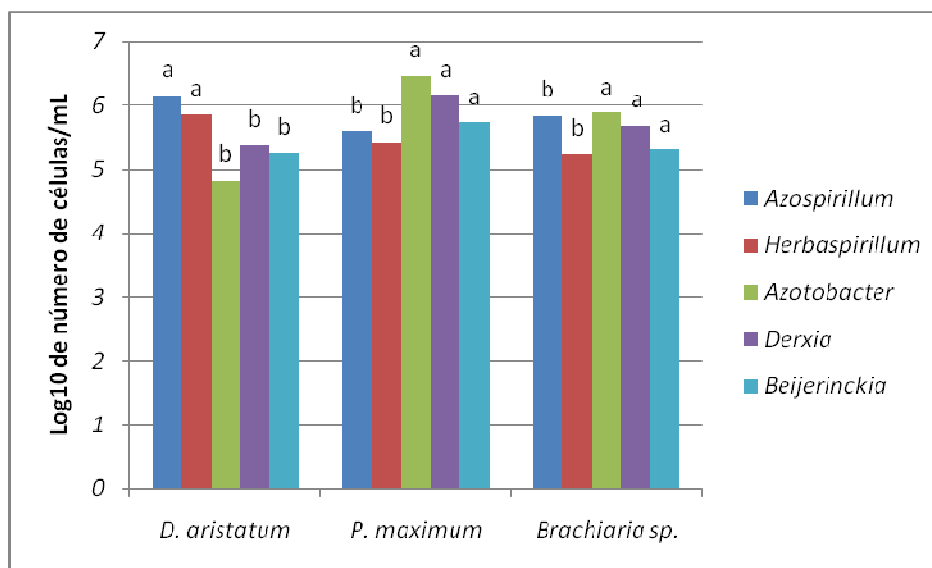
\*: estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ); ns: no significativo ( $p > 0,05$ ); na: no aplica

#### 4.1.1 Efecto de la especie de pasto sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas en suelos de valle y sabana del Cesar

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que la especie de pasto afecta las poblaciones de los géneros *Azospirillum* (medio de cultivo NFb), *Herbaspirillum* (JNFb), *Azotobacter* (LG), *Derxia* (LGD) y

*Beijerinckia* (BEIJ), presentando diferencias estadísticamente significativas en el análisis de varianza univariante (Figura 3).

El recuento del número de bacterias diazotróficas asociadas a gramíneas en los diferentes medios de cultivo se ve influenciado por la especie de planta. Al analizar el comportamiento de las poblaciones de diazótrofos en *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las poblaciones asociadas a *D. aristatum*, mientras que las poblaciones de *Azotobacter*, *Derxia* y *Beijerinckia* se ven favorecidas en la asociación con *P. maximum*, encontrando mayores poblaciones asociadas a este cultivo en relación con los otros dos pastos de estudio (Figura 3).

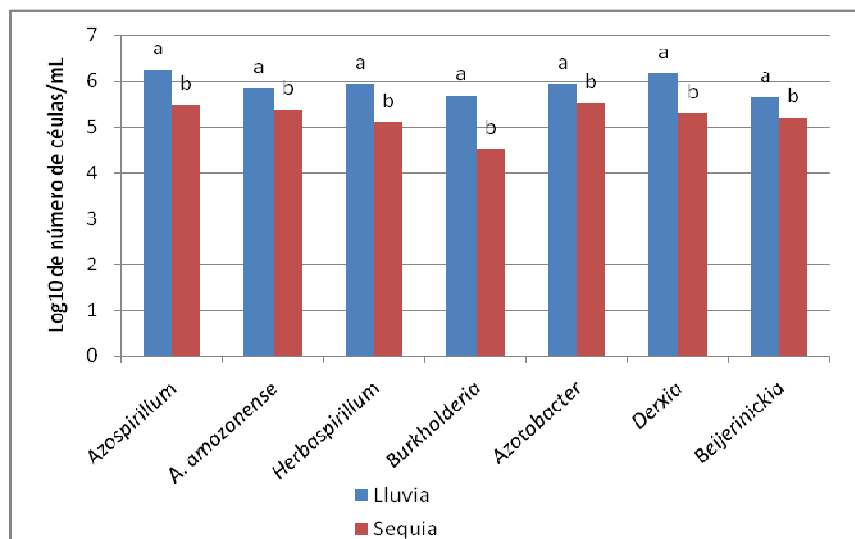


**Figura 3.** Número de bacterias diazotróficas asociadas a diferentes cultivos de pastos de valle y sabana del departamento de Cesar ( $\text{Log}_{10}$  de número de células/mL). Medias seguidas con la misma letra en cada medio de cultivo evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rodrigues *et al.* (2006) quienes concluyen que las poblaciones de bacterias diazotróficas difieren de acuerdo a las variedades de cultivo de arroz y los tipos de suelo en donde se realizaron los estudios. Reis *et al.* (2000) aislaron bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* y *Herbaspirillum* en cuatro genotipos de caña de azúcar, encontrando variaciones en las poblaciones de estos microorganismos de acuerdo al genotipo en estudio. Esto permite señalar que tanto la especie de planta analizada como las variedades influyen directamente sobre las poblaciones de microorganismos diazotróficos, facilitando el crecimiento de diferentes géneros. Debe resaltarse también 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 estas, igualmente la diversidad genética de las bacterias diazotróficas de la misma especie está relacionada con el genotipo de la planta (Piñero *et al.*, 1988; Combe *et al.*, 1994).

#### 4.1.2 Efecto de la época climática sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del Cesar

La época climática de sequía afectó las poblaciones de bacterias diazotróficas pertenecientes a los géneros *Azospirillum* (medio de cultivo NFb y LGI), *Herbaspirillum* (JNFb), *Burkholderia* (JMV), *Azotobacter* (LG), *Dexia* (LGD) y *Beijerinckia* (BEIJ) (Figura 4). La disminución de la población celular pudo ser ocasionada porque las condiciones ambientales no favorecieron la producción de exudados que pudieran ser aprovechados por las poblaciones de bacterias diazotróficas presentes en la rizósfera (Dos Reis Junior *et al.*, 2000; Itzigsohn *et al.*, 2000; Bürgmann *et al.*, 2005; Texeira *et al.*, 2005). Por lo tanto, las poblaciones microbianas se redujeron, debido a las presiones ambientales existentes, afectando posiblemente la promoción del crecimiento vegetal por parte de las bacterias diazotróficas (Okon & Itzigsohn, 1995; Okon & Labandera-González, 1994). Oliveira *et al.* (2004), determinaron que el aumento en la humedad del suelo favorece el crecimiento, el mantenimiento de la población y la migración de los microorganismos diazotróficos en diferentes cultivos, posiblemente debido a mecanismos que permiten su sobrevivencia durante largos periodos de tiempo en condiciones adversas. Entre los mecanismos utilizados por diferentes géneros de bacterias diazotróficas para sobrevivir en condiciones desfavorables se encuentran la formación de quistes, la floculación, producción de melanina, síntesis de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), síntesis de polisacáridos y asociación con micorrizas (Bashan *et al.*, 1995).



**Figura 4.** Número de bacterias diazotróficas asociadas a pastos de valle y sabana del departamento de Cesar en dos épocas climáticas (Log<sub>10</sub> de número de células/mL). Medias seguidas con la misma letra en cada medio de cultivo evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

Los niveles de humedad influyen la sobrevivencia de *Azospirillum brasilense* según lo reportado por Oliveira *et al.* (2004). Costa & Ruschel (1981) mostraron que las poblaciones de microorganismos diazotróficos asociadas al cultivo de caña de azúcar, están influenciadas por la época del año, así como el estado fisiológico de las plantas. Melloni *et al.* (2004) reportaron que en épocas de verano, en suelos en recuperación cultivados con *Brachiaria* sp. las poblaciones de microorganismos diazotróficos proliferan rápidamente, posiblemente por la fácil diseminación de estas especies por medio de las semillas plantadas en el área y por la afinidad de estas bacterias con gramíneas. Por lo tanto, se puede concluir que las épocas climáticas a las cuales está sometido el departamento del Cesar influyen en las poblaciones de bacterias diazotróficas debido a que se disminuye el contenido de humedad del suelo.

#### 4.1.3 Efecto del estrato de muestra sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del Cesar

Las poblaciones de bacterias diazotróficas no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al estrato de la planta del que fueron aisladas (Tabla 2), con excepción del género *Herbaspirillum* (medio de cultivo JNFb), el cuál presentó una menor población en la muestra de hojas y tallo.

**Tabla 2.** Número de bacterias diazotróficas asociadas a pastos de valle y sabana del departamento de Cesar en tres estratos de muestreo ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL).

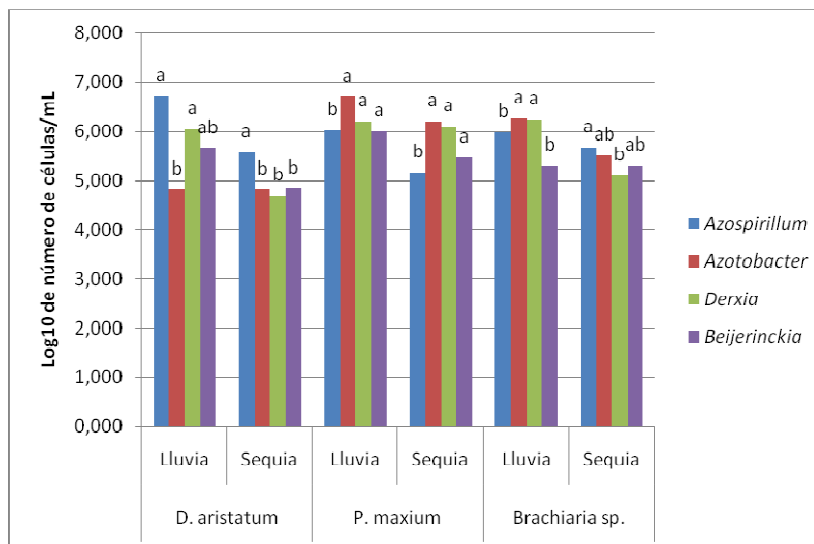
Estrato	<i>Herbaspirillum</i> *
Suelo rizosférico	5.206b
Raíces	5.348a
Hojas y tallos	5.966a

\*Medias seguidas con la misma letra en cada medio de cultivo evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

Sin embargo, las poblaciones de microorganismos endófitos fueron altas posiblemente porque el tallo y las hojas son nichos más sustentables para bacterias diazotróficas endófitas por ser un ambiente menos concurrido por fotosintatos (Rodrigues *et al.*, 2006). Según Brasil *et al.* (2005) la población de *Azospirillum* en las hojas está altamente correlacionado con la producción de materia seca foliar, lo cual sugiere que los nutrientes están presentes en mayor concentración en períodos intermitentes de sequía, por lo que las bacterias que llegan a colonizar el tallo y las hojas pueden tener acceso a los fotoasimilados allí producidos y sobrevivir en condiciones de estrés ambiental (Reis *et al.*, 2000).

#### 4.1.4 Efecto de la época climática y el cultivo de pasto sobre la población de bacterias diazotróficas en suelos de valle y sabana del Cesar

La población de *Azospirillum* fue mayor en las dos épocas climáticas en el cultivo de *D. aristatum*, y en la época de lluvia en el cultivo de *Brachiaria* sp. Para *Azotobacter* la mayores poblaciones están asociadas a la época de lluvia en el cultivo de *P. maximum* y *Brachiaria* sp., posiblemente por la capacidad de la bacteria de formar quistes resistentes a la desecación. *Derxia* presentó las mayores poblaciones en la época de lluvia en los tres cultivos de pastos. *Beijerinckia* presentó las mayores poblaciones en las dos épocas climáticas asociada al cultivo de *P. maximum*, posiblemente hay preferencia por los exudados de esta especie (Figura 5). Ésta característica puede ser importante para desarrollar otros trabajos de investigación (no hay reportes en el país) asociados a la especie *P. maximum* con el género *Beijerinckia*.



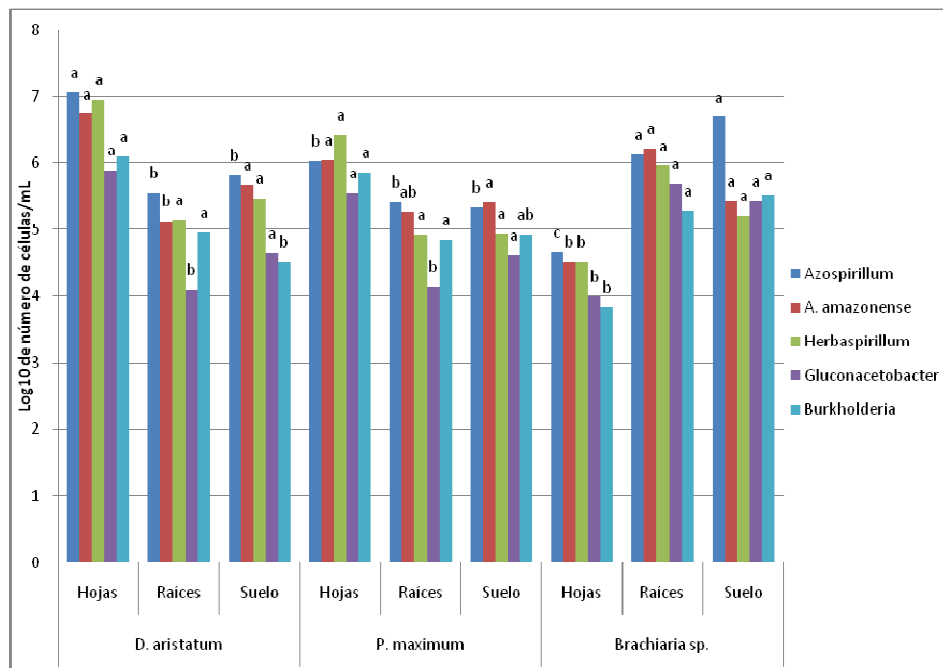
**Figura 5.** Número de bacterias diazotróficas asociadas a diferentes cultivos de pastos de valle y sabana del departamento de Cesar en dos épocas climáticas (Log<sub>10</sub> de número de células/mL). Medias seguidas con la misma letra en cada medio de cultivo evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Melloni *et al.* (2004) al evaluar la diversidad de microorganismos diazotróficos en suelos de minas en rehabilitación, encontraron que los mayores valores de la densidad total de bacterias diazotróficas endofíticas fueron obtenidas en las muestras de suelos de las áreas recuperadas con gramíneas debido a que estas plantas son hospederos comunes de estas bacterias. Estudios realizados por Perin *et al.* (2004) concluyen que los diazotrofos están relacionados con la especie de la planta, la variedad de caña de azúcar estudiada, la parte de la planta y la estacionalidad del área de estudio. Miranda *et al.* (1990) citado por Dos Reis Junior *et al.* (2000), al cuantificar la fijación de nitrógeno por el método de la dilución isotópica de <sup>15</sup>N, complementada

por el balance de N, compararon que varios ecotipos de *Panicum maximum* influyen el porcentaje de nitrógeno proveniente de la fijación biológica de nitrógeno.

#### 4.1.5 Efecto del cultivo de pasto y el estrato de muestra sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del Cesar

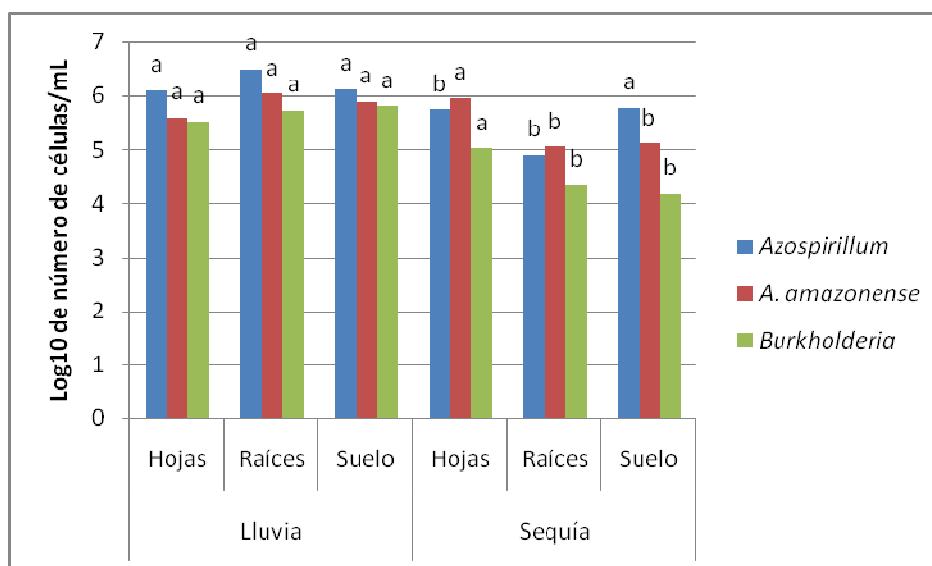
En las muestras de hojas, los recuentos de microorganismos diazotróficos endófitos fueron altos para las tres especies de pasto en estudio, posiblemente existe una migración por parte del microorganismo buscando lugares de almacenamiento de compuestos ricos en carbono (fotoasimilados) y protección de las condiciones adversas a las que las plantas se encuentran sometidas. Además los microorganismos que presentaron diferencias significativas tienen la capacidad de colonizar otros tejidos de las plantas (hojas y tallos) (Figura 6).



**Figura 6.** Número de bacterias diazotróficas asociadas a diferentes cultivos de pastos en tres estratos de muestra de valle y sabana del departamento de Cesar ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL). Medias seguidas con la misma letra en cada medio de cultivo evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.6 Efecto del estrato de muestra y la época climática sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del Cesar

Las poblaciones de *Azospirillum* fueron más altas en hojas y raíces de las plantas durante la época de lluvia y durante la época de sequía, las poblaciones fueron más altas en suelo, posiblemente por la formación de estructuras de resistencia de la bacteria. *A. amazonense* en la época de lluvia no presentó diferencias, mientras que en la época de sequía su población fue más alta en hojas y tallos por la posible migración quimiotáctica de la bacteria. En la época de lluvia, para *Burkholderia* no hubo diferencias en su población, mientras que en sequía la mayor población estuvo presente en las hojas, posiblemente por su condición endofítica obligada (Figura 7).



**Figura 7.** Número de bacterias diazotróficas según el estrato de la muestra en dos épocas climáticas asociadas a cultivos de pastos de valle y sabana del departamento de Cesar (Log<sub>10</sub> de número de células/mL). Medias seguidas con la misma letra en cada medio de cultivo evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Las poblaciones *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum* fueron estadísticamente superiores en raíces y no sufrieron variaciones con relación a otras partes de la planta (Dos Reis Junior *et al.*, 2000). Sin embargo, Reis *et al.* (2000) presentaron resultados de la cuantificación de *G. diazotrophicus* en relación a la parte de la planta muestreada de caña de azúcar y la mayoría de los aislamientos se obtuvieron en la raíz cuando durante la época de primavera. Estos resultados indican que las raíces son el sitio preferido de la localización de las bacterias, debido a que las raíces son un drenaje de los fotoasimilados producidos en la parte aérea de la planta.

*Herbaspirillum* colonizó los espacios intercelulares de tejidos vegetales en el estudio realizado por Elbeltagy *et al.* (2001), confirmando su característica de bacteria diazotrófica endofítica. Esta característica posiblemente permitió la colonización de la bacteria en los tejidos de la parte aérea de los pastos estudiados. Es de gran relevancia tener en cuenta que el estado fisiológico de la planta afecta las poblaciones de diazotrofos (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

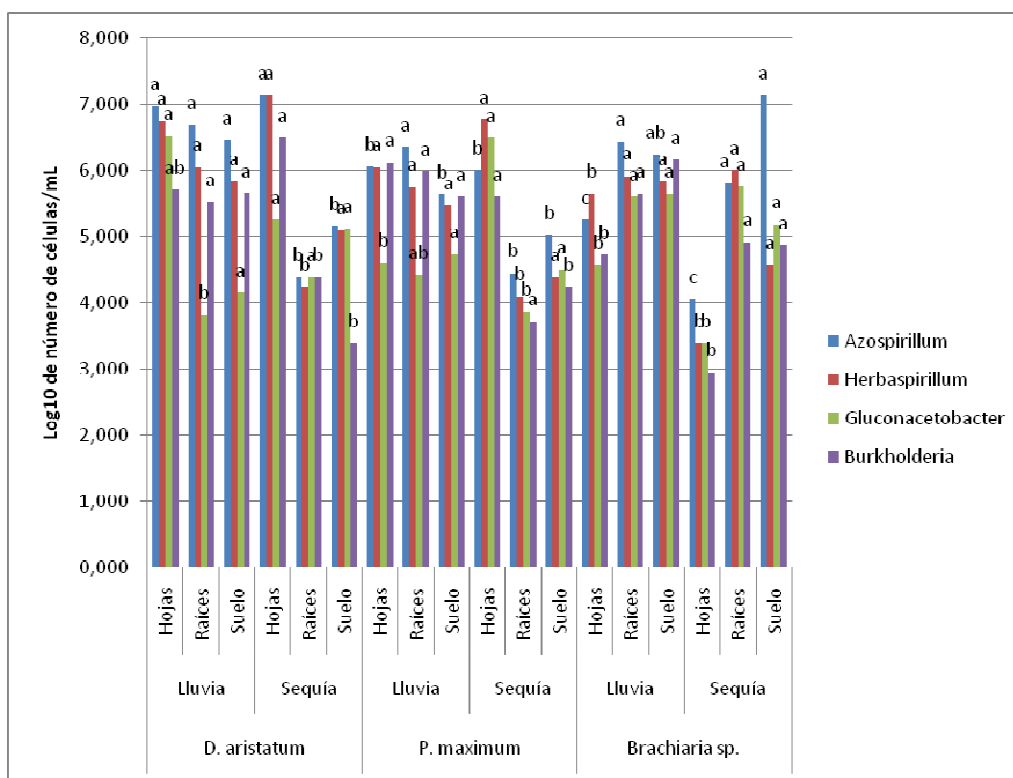
#### **4.1.7 Efecto del estrato de muestra y dos épocas climáticas sobre la población de bacterias diazotróficas asociadas a tres cultivos de pasto en suelos de valle y sabana del Cesar**

El género *Azospirillum* presentó la mayor población en todos los estratos de *D. aristatum*, durante la época de lluvia, esto es posible porque este género tiene gran afinidad con plantas gramíneas. En la época de sequía se puede visualizar la disminución de la población en las muestras de raíces y hojas, posiblemente porque durante el periodo de estrés hídrico, la bacteria viaja a través del xilema hasta llegar al tejido foliar donde obtendrá fuentes de carbono utilizables por la bacteria. En *P. maximum*, *Azospirillum* presenta una disminución de su población en casi todos los estratos muestreados durante las dos épocas climáticas. En *Brachiaria* sp., la población más alta se encuentra en las muestras de raíces y suelo durante las dos épocas climáticas (Figura 8).

*Herbaspirillum* (Figura 8) presentó poblaciones altas asociadas a *D. aristatum* durante las dos épocas climáticas en casi todos los estratos, menos en raíz y el suelo durante la época de sequía. La población de *Herbaspirillum* asociada a *P. maximum* es alta durante las dos épocas climáticas, con excepción de la muestra de raíz en la época de sequía. En *Brachiaria* sp., al igual que *Azospirillum*, su población más baja se encuentra en hojas durante la época de sequía.

*Gluconacetobacter* asociado con *D. aristatum* presenta su menor población en la muestra de raíces durante el periodo de lluvia, posiblemente por su condición de endofítico obligado. En *P. maximum*, las poblaciones más altas son encontradas en las muestras de hojas y suelo durante la época de sequía. Como ha ocurrido con los otros géneros, la población de *Gluconacetobacter* asociada a *Brachiaria* sp., es menor en las hojas durante la época de sequía (Figura 8).

La muestra de suelo en la época de sequía señala la población de *Burkholderia* (Figura 8) más baja asociada a *D. aristatum*. La asociación *Burkholderia* – *P. maximum*, únicamente señala una disminución en la población del suelo durante la época de sequía. En *Brachiaria* sp., la población menor está en hojas durante la sequía.



**Figura 8.** Número de bacterias diazotróficas en tres estratos de muestra asociadas a tres cultivos de pastos de valle y sabana del departamento de Cesar en dos épocas climáticas ( $\text{Log}_{10}$  de número de células/mL). Medias seguidas con la misma letra en cada medio de cultivo evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el Test de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

En general, las épocas climáticas de lluvia y sequía a las que el departamento del Cesar se encuentra sometido, influenciaron el número de bacterias diazotróficas asociadas a las tres especies de pastos estudiadas. En la época de sequía, en general, fue observada una disminución del número de bacterias en las raíces y en el suelo rizosférico; sin embargo predominó en las hojas, una mayor población de bacterias en la época de sequía siendo posible una migración de la bacteria dentro de la planta, buscando lugares con mayor humedad con ligero descenso en las poblaciones del suelo.

El suelo de la rizósfera de la planta es considerado como una fuente primaria para la colonización de microorganismos endofíticos (Hallman *et al.*, 1997). Muchos autores han comparado las comunidades bacterianas internas y externas de diferentes cultivos y casi todas las bacterias endofíticas también fueron encontradas en la rizósfera (Sturtz, 1995; Hallman *et al.*, 1997).

Muchos estudios han demostrado que las raíces y las rizósferas de muchas plantas no leguminosas son colonizadas por uno o más géneros de microorganismos diazotróficos asimbióticos (Ueda *et al.*, 1995; Piceno *et al.*, 1999; Hamelin *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2003; Diallo *et al.*, 2004). Algunos de los microorganismos diazotróficos encontrados en la rizósfera ó en las raíces son *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Azotobacter*

(Döbereiner, 1992; Boddey *et al.*, 1995). Mientras el nitrógeno fijado por microorganismos diazotróficos asimbióticos no está inmediatamente disponible para la planta, la cual puede beneficiarse de la fijación de N asimbiótica en un largo plazo, cuando el N es liberado con la muerte de los microorganismos (Gaskins *et al.*, 1985; Okon *et al.*, 1995; Dobbelaere *et al.*, 2003).

Melloni *et al.* (2004) en un estudio sobre la densidad y diversidad fenotípica de bacterias diazotróficas endofíticas en suelos de minas en rehabilitación demostraron que las condiciones del suelo, los tipos de vegetación y la época climática durante el muestreo afectan las poblaciones de *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Esto pudo ser determinado durante este estudio donde se encontraron diferencias en las poblaciones de acuerdo al tipo de pasto, época climática y estrato de la planta donde fue realizado el muestreo.

La humedad del suelo afecta la motilidad de las bacterias, favoreciendo el comportamiento quimiotáctico (Oliveira *et al.*, 2004), razón por la cual las bacterias diazotróficas endófitas estaban presentes en las muestras de los tejidos de las plantas (raíces, hojas y tallos). Estudios en otros países demuestran que el contenido de arcillas, nitrógeno, materia orgánica y la capacidad de retención de agua del suelo están correlacionados positivamente con la viabilidad de cepas de *Azospirillum brasilense* (Bashan *et al.*, 1995).

La influencia de factores ambientales, principalmente el estrés hídrico sobre las poblaciones de microorganismos diazotróficos y sobre el proceso de fijación de nitrógeno, fue demostrada en diversos estudios. Costa & Ruschel (1981), trabajando con plantas de caña de azúcar, verificaron que la distribución de microorganismos fijadores de N, sufría una influencia de acuerdo con la época del año, mostrando que la actividad de los microorganismos en el interior del tallo fue bastante irregular en primavera relativamente, uniforme en verano y cae bruscamente en otoño. Bellone *et al.* (1996) demostraron que, en suelos con progresiva diferencia hídrica (más de 20 días), las plantas de caña de azúcar presentaron bajos niveles de actividad de reducción de acetileno (ARA) asociados a un bajo número de microorganismos por gramo de raíz. Reis Jr *et al.* (2000) también encontraron variaciones en el número de bacterias diazotróficas asociadas a caña de azúcar en virtud de las diferencias en la tasa de precipitación pluvial.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el recuento de las poblaciones en las muestras de raíces; hojas y tallos, se pudo verificar que las mayores poblaciones son de bacterias diazotróficas endófitas. La presencia de bacterias diazotróficas endofíticas en los tejidos de las plantas ha sido reportada para muchas especies cultivadas, en diferentes etapas de crecimiento (Fisher *et al.*, 1992). Musson (1994), cita que la penetración de los microorganismos endófitos en las plantas puede ser, probablemente controlada por la propia planta y por las condiciones ambientales.

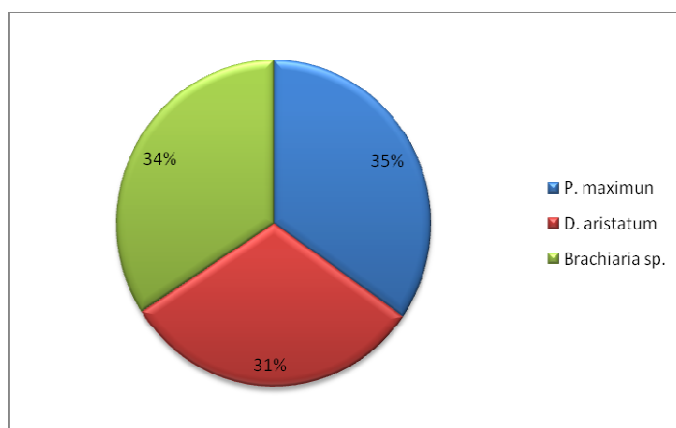
**4.2 Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias fijadoras de nitrógeno de suelos de valle en pasto Guinea (*Panicum maximum*) y Angleton (*Dichantium aristatum*); y sabana en pasto Braquiaria (*Brachiaria sp.*) del departamento del Cesar.**

Las bacterias diazotróficas fueron aisladas tanto de las estructuras muestreadas (raíces, hojas y tallos) de los pastos, como de los suelos. Las bacterias fueron consideradas como diazotróficas debido a su capacidad de crecer en condiciones de microaerofilia para el caso de microorganismos endófitos; en lo referente a los microorganismos de vida libre, se tomaron las colonias que presentaron características similares a las descritas por Döbereiner *et al.* (1995) en el medio de cultivo utilizado. Se obtuvo una cantidad similar en cuanto al número de aislamientos en los tres pastos en estudio debido a que se tomaron los viales con un desarrollo de película visible (Tabla 3).

**Tabla 3.** Número de aislamientos de bacterias diazotróficas de suelos del valle en *P. maximum*, *D. aristatum* y de sabana en *Brachiaria sp.* en el departamento del Cesar para dos épocas climáticas de muestreo

Medio de cultivo	Cultivo de Pasto		<i>P. maximum</i>	<i>D. aristatum</i>	<i>Brachiaria sp.</i>
	Época climática	Número de aislamientos	Número de aislamientos	Número de aislamientos	Número de aislamientos
NFb	Lluvia	13	10	5	
	Sequía	5	3	8	
LGI	Lluvia	9	7	10	
	Sequía	6	2	8	
JNFb	Lluvia	10	2	10	
	Sequía	6	2	5	
JMV	Lluvia	11	5	12	
	Sequía	4	5	7	
LGI-P	Lluvia	8	2	12	
	Sequía	7	2	5	
LG	Lluvia	6	9	12	
	Sequía	12	19	5	
LGD	Lluvia	14	6	4	
	Sequía	4	14	5	
BEIJ	Lluvia	4	12	8	
	Sequía	3	10	4	
<b>Total Aislamientos</b>		<b>122</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	

La figura 9 registra el valor porcentual correspondiente a los aislamientos obtenidos de las muestras provenientes de cultivos de pastos establecidos en suelos de sabana y valle del Cesar, en la cual se observa una similitud en lo que respecta a la cantidad de aislamientos obtenidos en cada pasto en estudio.



**Figura 9.** Total de aislamientos obtenidos de las diferentes muestras de pastos en suelos de valle y sabana del Cesar

La caracterización macroscópica se llevó a cabo con el fin de evaluar las características morfológicas y de crecimiento de las colonias en medio de cultivo sólido de purificación (Agar Batata ó medio enriquecido con extracto de levadura) y la caracterización microscópica se llevó a cabo por medio de la coloración de Gram para determinar la forma bacteriana (Valero, 2002)

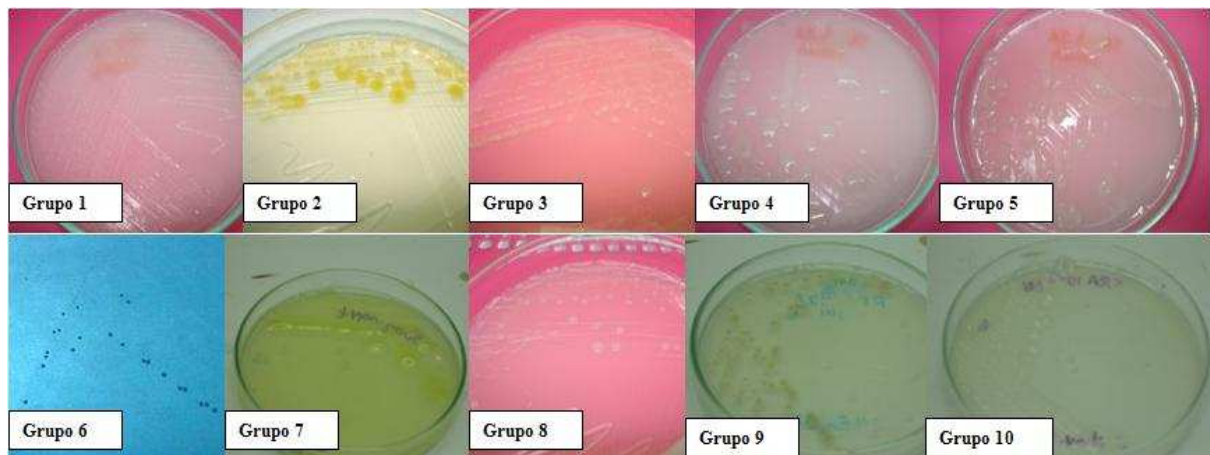
De acuerdo a la asesoría de la Doctora Vera Lúcia Divan Baldani (Embrapa Agrobiología), fue posible agrupar los 352 aislamientos en 10 diferentes grupos de acuerdo a su caracterización fenotípica (Figura 10), los cuales son descritos en la tabla 4. Es relevante resaltar que los grupos 5, 8, 3 y 6 agruparon el mayor número de aislamientos, siendo de 9, 8, 7 y 7 representates respectivamente.

**Tabla 4.** Características fenotípicas de los aislamientos obtenidos de pastos del valle y sabana de Cesar para todas las partes muestreadas.

Grupo	Aislamiento*	Época climática	Medio de cultivo	Características macroscópicas	Características microscópicas
1	RA1	Sequía	LGI-P	Colonias de forma circular, con elevación en forma de lente, borde ondulado, superficie lisa, transparentes, pequeñas.	Bacilos Gram negativos
	RB1	Sequía	JMV		
	RB2	Lluvia	JMV		
2	RB3	Lluvia	LGI	Colonias amarillas, de forma irregular, con elevación planta, borde lobado, superficie lisa, mucosas y pequeñas.	Bacilos Gram negativos grandes
	SRB1	Lluvia	LGI		
	HA1	Lluvia	LGI		
	HA2	Lluvia	LGI		
3	RA2	Sequía	JNFb	Colonias color crema con centro oscuro, de forma irregular, con elevación plana, borde ondulado, superficie lisa, pequeñas.	Bacilos Gram negativos delgados
	RB4	Sequía	JNFb		
	RA3	Sequía	JNFb		
	RA4	Sequía	JNFb		
	RB5	Sequía	JNFb		
	RA5	Lluvia	JNFb		
4	RA6	Lluvia	JNFb	Colonias color crema, de forma circular a irregular, con elevación en forma de lente, borde ondulado, superficie lisa, translúcidas, mucosas y grandes.	Bacilos Gram negativos
	RA7	Sequía	JMV		
	RA8	Lluvia	JMV		
5	SRA1	Sequía	JMV	Colonias grandes, de forma circular a irregular, con elevación convexa, borde ondulado, superficie lisa y cremosa.	Bacilos Gram negativos, curvos.
	SRG1	Sequía	JNFb		
	RG1	Sequía	JNFb		
	RG2	Sequía	JNFb		
	HA3	Sequía	JNFb		
	RA9	Sequía	JNFb		
	RA10	Sequía	JNFb		
	RG3	Sequía	JNFb		
	RG4	Sequía	JNFb		
	RB6	Lluvia	JNFb		
6	RB7	Lluvia	JNFb	Colonias pequeñas con centro azul en medio JNFb, de forma circular, con elevación convexa, borde ondulado, superficie lisa y en medio Rojo Congo son colonias rojas, pequeñas y puntiformes.	Bacilos Gram negativos, curvos, cortos.
	RB8	Lluvia	JNFb		
	RB9	Lluvia	JNFb		
	HG1	Lluvia	NFb		
	SRG2	Lluvia	NFb		
	RG5	Lluvia	LGI		
7	HG2	Lluvia	NFb	Colonias amarillas, mucosas, redondas, alargadas, con elevación en forma de lente, borde ondulado y superficie lisa	Bacilos Gram negativos, curvos, cortos.
	RG6	Lluvia	NFb		
	RG7	Lluvia	NFb		
8	RG8	Sequía	LGI	Colonias rojo escarlata en medio Rojo Congo. Arrugadas, secas, rosadas en medio Batata	Bacilos Gram negativos, curvos, cortos.
	SRG3	Lluvia	NFb		
	SRG4	Lluvia	NFb		
	SRG5	Lluvia	LGI		
	SRA2	Sequía	NFb		
	SRA3	Lluvia	NFb		
	RB10	Sequía	LGI		
RB11	Sequía	NFb			
9	RB12	Sequía	NFb	Colinas convexas, crema, grandes, brillantes, mucosas, con centro amarillo.	Bacilos Gram negativos con inclusiones
	SRG6	Lluvia	LG		
	SRA4	Lluvia	LG		
	SRA5	Lluvia	LG		
10	SRG7	Lluvia	LG	Colinas convexas, crema, grandes, brillantes, mucosas	Bacilos Gram negativos con inclusiones
	RA11	Sequía	BEIJ		
	RA12	Sequía	LGD		
	SRA6	Sequía	LGD		

\*SR: suelo rizosférico, R: raíces, H: hojas y tallos; G: *P. maximum*; A: *D. aristatum*; B: *Brachiaria* sp.

En los grupos 3 y 5 existe un predominio de los aislamientos realizados en época de sequía, los cuales provienen de medio de cultivo JNFb, utilizado para el aislamiento de bacterias diazotróficas pertenecientes al género *Herbaspirillum*, cuya característica principal es ser endófito. Los aislamientos de estos grupos fueron aislados principalmente de la raíz, lo cual indica que las bacterias colonizaron de forma local o sistemática los tejidos radiculares de los pastos (Sturtz *et al.*, 2000). El grupo 6 corresponde en su totalidad a aislamientos obtenidos en la época de lluvia, lo cual permite señalar que la época climática afecta las poblaciones del suelo de acuerdo a la planta asociada (Costa & Ruschel, 1981; Bellone *et al.*, 1996; Dos Reis Junior *et al.*, 2000). De otra parte, los aislamientos del grupo 8 no presentan una tendencia influenciada por la época climática, pero se observa que provienen de suelo rizosférico del valle del Cesar y de raíces de Braquiaria, pudiendo ser influenciado por los exudados producidos por las plantas que permiten la colonización de bacterias (Hutsch *et al.*, 2002).



**Figura 10.** Características macroscópicas de los grupos de aislamientos de bacterias diazotróficas asociadas a tres especies de pastos en suelos de valle y sabana del Cesar.

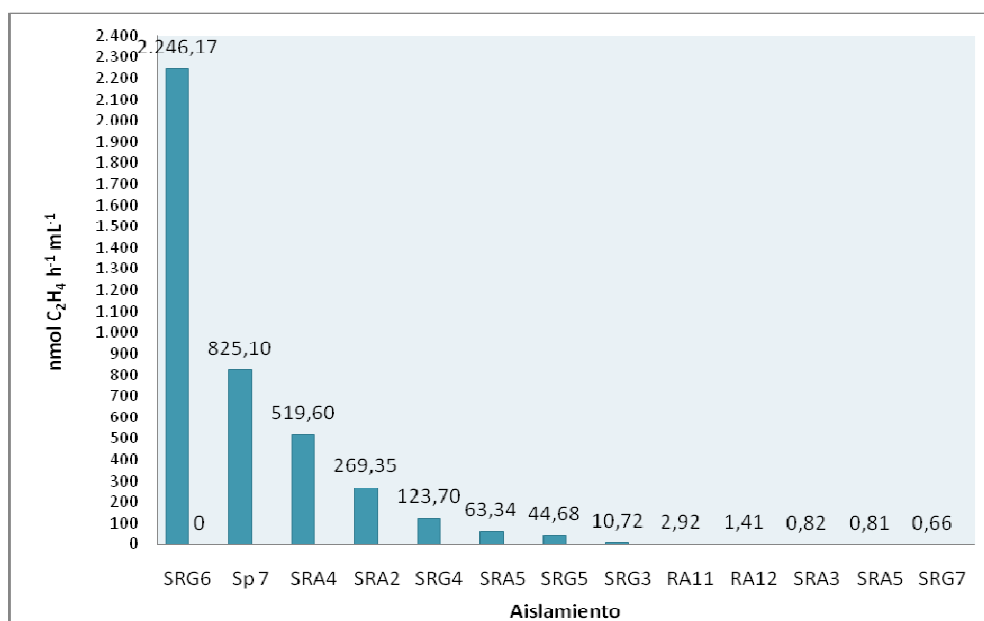
#### **4.3 Selección e identificación molecular de las bacterias más promisorias para su utilización como bioinsumos en los cultivos de pastos en el valle y sabana del Cesar**

La fijación biológica de nitrógeno es realizada por una amplia gama de microorganismos procarióticos que presentan una gran diversidad morfológica, fisiológica, bioquímica y genética. Esta diversidad no solo garantiza la fijación biológica de nitrógeno en el ecosistema como tal sino también la ocurrencia de este proceso en hábitats terrestres diferentes (Nóbrega *et al.*, 2004). Generalmente las bacterias diazotróficas asociativas pueden ser aisladas de las raíces y las partes aéreas de las gramíneas y granos (Magalhães &

Döbereiner, 1984; Baldani et al., 1986; Döbereiner, 1992; Baldani, 1996; Dicello et al., 1997, Eckert et al., 2001).

### 4.3.1 Reducción de acetileno

La prueba de reducción de acetileno (ARA) se realizó a los 51 aislamientos seleccionados por su caracterización fenotípica de los cuales se seleccionaron 11 aislamientos que presentaron mayor actividad de reducción de acetileno ( $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ) (Figura 2); utilizando como control positivo una cepa de referencia de *Azospirillum brasilense* (Sp7).



\*SR: suelo rizosférico, R: raíces, H: hojas y tallos; G: *P. maximum*; A: *D. aristatum*; B: *Brachiaria* sp.

**Figura 11.** Reducción de acetileno de los aislamientos evaluados contra la cepa control Sp7 (*Azospirillum brasilense*).

La capacidad de reducción de acetileno varió significativamente en los aislamientos, esto es debido a que el genotipo de la bacteria influye sobre la cantidad de nitrógeno fijado por la bacteria (Eckert *et al.*, 2001).

Un ejemplo que diferencia las poblaciones de determinada especie de bacterias diazotróficas, que pueden tener influencia sobre las variaciones en las tasas de fijación biológica de nitrógeno está descrita en el trabajo de Döbereiner (1977), quien estudiando los genotipos de *Paspalum notatum* y la presencia de *Azotobacter paspali*, correlacionó las diferencias en la actividad de la nitrogenasa con la población de este microorganismo.

Ruschel & Ruschel (1977) evaluaron la reducción de acetileno en raíces, tallos y planta entera en dos meses de edad en sistemas intactos y perturbados; y sobre la presión de oxígeno baja y normal demostrando diferentes medidas de ARA en seis variedades comerciales estudiadas.

Basado en la prueba de reducción de acetileno (ARA) realizada en los 11 aislamientos que presentaron mayor producción de etileno, se hizo la identificación genética de las cepas con la metodología del análisis 16S rRNA en el laboratorio del CIMIC de la Universidad de los Andes.

### 4.3.2 Identificación molecular

Se realizó la caracterización de los 11 aislamientos de bacterias diazotróficas que presentaron mayor reducción de acetileno, por medio del análisis de la secuencia del gen 16S rRNA utilizando los primers universales 27F y 1492R (Tabla 5). Se encontró que los aislamientos SRA4, SRA5 y RA12 presentaron porcentajes de similitud de 81, 84 y 88% a *Klebsiella pneumoniae*. El aislamiento SRG4 presentó un porcentaje de similitud de 93% a *Azospirillum brasilense*, el aislamiento SRG5 presentó un porcentaje de similitud de 97% a *Azospirillum lipoferum*.

**Tabla 5.** Caracterización de los aislamientos de bacterias diazotróficas por medio del análisis de la secuencia 16S rRNA.

Aislamiento*	Primer	16S rRNA	Número de acceso	Score	Max Ident
SRG6	27F 1492R	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EU078621.1	491	81%
SRA4	27F 1492R	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EU078621.1	491	81%
SRA2	27F 1492R	<i>Azospirillum lipoferum</i>	EF100149.1	185	97%
SRG4	27F 1492R	<i>Azospirillum brasilense</i>	DQ288686.1	780	93%
SRA5	27F 1492R	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AY918489.1	536	84%
SRG5	27F 1492R	<i>Azospirillum lipoferum</i>	EF100149.1	185	97%
SRG3	27F 1492R	<i>Azospirillum lipoferum</i>	EF100149.1	185	94%
RA11	27F 1492R	<i>Klebsiella</i> spp.	EF100149.1	536	84%
RA12	27F 1492R	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AY552753.1	493	88%
SRA3	27F 1492R	<i>Azospirillum brasilense</i>	DQ288686.1	780	91%
SRA6	27F 1492R	<i>Klebsiella</i>	EF100149.1	185	94%

\*SR: suelo rizosférico, R: raíces, H: hojas y tallos; G: *P. maximum*; A: *D. aristatum*; B: *Brachiaria* sp.

La identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno y la medición de la actividad de su nitrogenasa ha revelado que el número de especies diazotróficas asociadas con pastos y cereales (James & Olivares, 1997),

colonizan tanto la rizósfera de la planta como los espacios intercelulares entre los vasos del xilema de las monocotiledóneas (Govindarajan *et al.*, 2007).

El acercamiento al género de los aislamientos identificados, permitió confirmar que la caracterización fenotípica previamente realizada coincide con las características reportadas por diferentes autores (Tarrand, 1978; Ladha *et al.*, 1983; Magalhães, 1983; Reinhold *et al.*, 1987; Khammas, 1989; Okon, 1994; Döbereiner *et al.*, 1995; Wong & Yuen, 1996; Okon & Vanderleyden, 1997; Podschun & Ullmann, 1998; Sinha *et al.*, 2007). Los aislamientos SRG3, SRG4, SRG5, SRA2 y SRA3, pertenecientes al grupo 8 por su caracterización fenotípica fueron identificados como *Azospirillum*, lo cual concuerda con sus características morfológicas presentando colonias rojo escarlata, puntiformes en medio de cultivo Rojo Congo y colonias arrugadas, secas, rosadas, de borde irregular en medio de cultivo Batata. Los aislamientos SRG6, SRA4, SRA5 pertenecen al grupo 9 por caracterización fenotípica y los aislamientos RA11, RA12 y SRA6 fueron identificados por el análisis de la secuencia 16S rRNA como *Klebsiella*, presentando colonias convexas, color crema, grandes, brillantes y mucosas.

Debido a que las secuencias obtenidas fueron comparadas en una base de datos internacional (NCBI), y se encontraron porcentajes de similitud muy bajas, es posible que se hayan encontrado nuevas especies de bacterias diazotróficas asociadas a los cultivos de pasto establecidos en el departamento del Cesar.

## **Conclusiones**

Las épocas climáticas de lluvia y sequía a las que el departamento del Cesar se encuentra sometido influenciaron el número de bacterias diazotróficas asociadas a las tres especies de pasto estudiadas.

Las poblaciones de microorganismos diazotróficos endófitos fueron altas, posiblemente porque las hojas y tallos de los pastos, son nichos más sustentables para la colonización de éstas bacterias, protegiéndose de la desecación y asegurando la fuente de C y nutrientes (fotosintatos).

Se obtuvieron 352 aislamientos de las muestras de suelo, raíces, hojas y tallos para los tres pastos estudiados, de los cuales 51 aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente y al realizar la prueba de reducción de acetileno (ARA), se seleccionaron once aislamientos con mayor reducción de acetileno.

Los once aislamientos fueron caracterizados por medio del análisis de la secuencia 16S rRNA, encontrando que los aislamientos pertenecen a los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella*.

## **Recomendaciones**

Realizar estudios de dinámica de poblaciones de los microorganismos diazotróficos en diferentes épocas climáticas durante periodos de tiempo definidos para determinar si los microorganismos pueden recuperarse después de marcadas épocas de estrés hídrico.

Identificar genéticamente los aislamientos identificados en este estudio, utilizando primers específicos para los géneros encontrados, con el fin de permitir un mayor acercamiento a la especie bacteriana.

Evaluar los aislamientos obtenidos en invernadero y campo con el fin de determinar los efectos de las bacterias en la promoción del crecimiento vegetal y en los índices de producción de los cultivos.

Realizar estudios a nivel de campo en diferentes tipos de suelo y diferentes épocas climáticas dentro de la Región Caribe Colombiana para determinar la posible utilización de los aislamientos obtenidos, como promisorios biofertilizantes.

Evaluar la inoculación mixta de plantas de pastos con los aislamientos obtenidos y bacterias solubilizadoras de fosfato para un futuro mejoramiento de la fertilización biológica de los cultivos, debido a que el nitrógeno y el fósforo son elementos limitantes en suelos tropicales.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Doctora Ruth Bonilla Buitrago, por la dirección de este proyecto y su apoyo incondicional durante el desarrollo del trabajo.

A la Estación Experimental Motilonia por su ayuda, colaboración y apoyo económico de la investigación a través del proyecto “*Producción de fertilizantes biológicos a partir de microorganismos nativos del género Azospirillum para mejorar la productividad y sostenibilidad de las gramíneas en suelos del Valle del Cesar*” financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, IICA, FEDEGAN y la Gobernación del Cesar.

A todo el personal de CORPOICA – CBB (C.I. Tibaitatá) por su ayuda.

A la Doctora Vera Lúcia Divan Baldani de EMBRAPA, por su asesoría y por compartir desmedidamente su conocimiento.

A la Universidad de los Andes por el apoyo brindado durante la ejecución de parte de este proyecto.

A la Universidad Militar Nueva Granada, por brindarme la oportunidad de terminar satisfactoriamente con mi maestría y por todos los conocimientos adquiridos, en especial al Doctor Aristóbulo López por toda la paciencia y colaboración que me brindó durante mis estudios.

## Referencias

APPLIED BIOSYSTEMS. 2006. BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Protocol.

ARAÚJO, W., MARCON, J., MACCHERONI, W., VAN ELSAS, J., VAN VUURDE, J. & AZEVEDO, J. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microb.* **68**: 4906 – 4914.

BACA, B., SOTO, L. & PARDO, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos.* **1**: 39 – 49.

BAGLEY, S., SEIDLER, R. & BRENNER, D. 1981. *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of Enterobacteriaceae found primarily in nonclinical environments. *Curr. Microbiol.* **6**:105-109.

BALDANI, J., CARUSO, BALDANI, V., GOI, S. & DÖBEREINER, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry.* **29**: 911 – 922.

BALDANI, J., POT, B., KIRCHHOF, G., FALSEN, E., BALDANI, V., OLIVARES, F., HOSTE, B., KERSTERS, K., HARTMANN, A., GILLIS, M. & DÖBEREINER, J., 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **46**: 802 – 810.

BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L., & DÖBEREINER, J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:86 – 93.

BALDANI, J.I.: BALDANI, V.L.D.: SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 86-93, 1986.

BALDANI, V. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1996. 234 p.

BALDANI, V., ALVAREZ, M., BALDANI, J. & DÖBEREINER, J. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*. **90**: 35 – 46.

BASHAN, Y. 1986. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3407-3414. En: STEENHOUDT, O. & BASHAN, Y. 1999. Interactions of *Azospirillum* in soils: a review. *Biol Fertil Soils*. **29**: 246 – 256. En: OLIVEIRA, A., CANUTO, E., SILVA, E., REIS, V. & BALDANI, J. 2004. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian Journal of Microbiology*. **35**: 295 – 299.

BASHAN, Y., SINGH, M. & LEVANONY, H. 1989. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J. Bot.* **67**: 2429-2434. En: STEENHOUDT, O. &

BASHAN, Y., PUENTE, M., RODRIGUEZ-MENDOZA, M., TOLEDO, G., HOLGUIN, G. FERRERA-CERRATO, R. & PEDRIN, S. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environm. Microbiol.* **61**: 1938 – 1945.

BECKING, J. The family *Azotobacteraceae*. En: BALOWS, A., TRIPPER, H., DWORKING, M., HARDER, W. & SCHELEIDER, K. 1991b. The prokaryotes. Springer - Verlag. Disponible en: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=165>

BECKING, J. The genus *Beijerinckia*. En: BALOWS, A., TRIPPER, H., DWORKING, M., HARDER, W. & SCHELEIDER, K. 1991a. The prokaryotes. Springer. Disponible en: [http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=110&initsec=06\\_00](http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=110&initsec=06_00)

BELLONE, C., BELONE, S. & PEDRAZA, R. 1996. Hydric deficiency and acetylen reduction in sugar cane roots. In: International Symposium of Nitrogen Fixation with Non-Legumes, 7. Faisalabd. Abstracts. Faisalabad, 1996. 125 – 126. En: REIS-JUNIOR, F., SILVA, M., TEIXEIRA, K., URQUIAGA, S. & REIS, V. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R Bras Ci Solo*. **28**: 103 – 113.

BODDEY, R., DEOLIVEIRA, O., URQUIAGA, S., REIS, V. DEOLIVARES, F., BALDANI, V. & DÖBEREINER, J. 1995. Biological nitrogen-fixation associated with sugar-cane and rice – contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*. **174**: 195 – 209.

BODDEY, R.M., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. AND DÖBEREINER, J. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant Soil* **95**: 109 - 121.

BRASIL, M., BALDANI, J., BALDANI, V. 2005. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. *Rev. Bras. Cienc. Solo*. **29**: 179 – 190.

BROCK, T. Principles of microbial ecology. Englewood Cliffs, NJ. Prentice-Hall. 1996. Prefacio. En: MACRAE, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J Microbiol.* **31**: 77 - 82.

BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol.* **7**(11): 1711 -1724.

BUSSE, H., DENNER, E. & LUBITZ, W. 1996. Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problema. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnol.* **47**: 3 – 38.

CALVACANTE, V. & DÖBEREINER, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar-cane. *Plant and Soil*. **108**: 23 – 31.

CHANDLER, D., LI, S., SPADONI, C. DRAKE, G., BALWILL, D., FREDRICKSON, J. & BROCKMAN, F. 1997. A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS. Microbiol Ecol.* **23**: 131 – 144. En: MACRAE, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J Microbiol.* **31**: 77 -82.

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

COSTA, J. & RUSHEL, A. 1981. Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: VOSE, P. & RUSHEL, A. eds. Associative N<sub>2</sub>-fixation. Vol II. São Paulo. University of São Paulo. 109 – 118. En: REIS-JUNIOR, F., SILVA, M., TEIXEIRA, K., URQUIAGA, S. & REIS, V. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R Bras Ci Solo*. **28**: 103 – 113.

CUESTA, P. Manual Técnico. Producción y utilización de recursos forrajeros en sistemas de producción bovina de las regiones Caribe y Valles interandinos. Colombia: Arteprint Ltda, 2005. ISBN 958-8210-79-8. 97 pp.

DeLAJUDIE, P.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K. & GILLIS, M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Inter J Syst Bact.* **44**: 715 - 733.

DeLAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B. & GILLIS, M. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Inter J of Syst Bact.* **48**:1277 - 1290.

DIALLO, M., WILLENS, A., VLOEMANS, N., COUSIN, S., VANDEKERCKHOVE, T., DE LAJUDIE, P., *et al.* 2004. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortillis* ssp *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology.* **6**: 400 – 415. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environl Microbiol.* **7**(11): 1711 -1724.

DICELLO, F.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHINIONI, S. & DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacea* population isolated from teh maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4485-4493, 1997.

DOBBLELAERE, S., VANDERLEYDEN, J. & OKON, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci.* **22**: 107 – 149. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol.* **7**(11): 1711 -1724.

DÖBEREINER, J. & ALVAHYDO, R. 1959. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II - Influência das diversas partes do vegetal. *Revista Brasileira de Biologia.* **19**: 401 – 412.

DÖBEREINER, J. & BALDANI, J. 1982. Bases científicas para uma agricultura biológica. *Ciência e Cultura.* **34**: 869 – 881.

DÖBEREINER, J. & CAMPELO, A. 1971. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. En: DÖBEREINER, J., BALDANI, V. & BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa – CNPAB. 1995. 60 pp.

DÖBEREINER, J. & DAY, J. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Proceedings of the 1st International Symposium on N<sub>2</sub> Fixation (Newton, W.E. and Nyman, C.J., Eds.), pp. 518 - 538. Washington State University Press, Pullman. En: STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Review*. **24(2000)**: 487 – 506.

DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. 1987. Nitrogen fixing bacteria in non-leguminous plants. Springer – Verlag. En: DÖBEREINER, J., BALDANI, V. & BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa – CNPAB. 1995. 60 pp.

DÖBEREINER, J. & RUSCHEL, A. 1958. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*. **1**: 261 – 272.

DÖBEREINER, J. 1970. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. En: DÖBEREINER, J., BALDANI, V. & BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa – CNPAB. 1995. 60 pp.

DÖBEREINER, J. 1977. Plant genotype effects on nitrogen fixation in grasses. In: MUHAMMED, A., AKSEL, R. & BORSTEL, R., eds. Genetic diversity in plants, Itaguaí, EMBRAPA UEPAE. 325 – 334. En: REIS-JUNIOR, F., SILVA, M., TEIXEIRA, K., URQUIAGA, S. & REIS, V. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R Bras Ci Solo*. **28**: 103 – 113.

DÖBEREINER, J. 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with nonleguminous plants. *Symbiosis*. **13**: 1 – 13. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol*. **7(11)**: 1711 -1724.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V. & BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa – CNPAB. 1995. 60 pp.

DÖBEREINER, J., MARRIEL, I. & NERY, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology. **22**: 1464 – 1473.

DÖBOEREINER, J. 1995. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. Revista de Biologia. **19**: 251 – 258.

DOOLITTLE, M., RAINA, A., LAX, A. & BOOPATHY, R. 2007. Presence of nitrogen fixing *Klebsiella pneumoniae* in the gut of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). *Bioresource Technology*. **In Press, Corrected Proof**, Available online 20 August 2007, En: ScienceDirect

DOS REIS JUNIOR, F., DA SILVA, L., REIS, V. & DÖBEREINER, J. 2000. Ocorrência de bactérias diazotóficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesq Agropec Bras*. **35**: 985 – 994.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L. & GILLIS, M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbani rostrata*. *Inter J Syst Bact*. **38(1)**: 89 - 98.

DUINVELD, B., ROSADO, A., VAN ELSAS, J. & VAN VEEN, J. 1998. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilisation patterns. *Appl. Environ. Microbiol*. **64**: 4950 – 4957.

ECKERT, B., BALLER, O., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M. & HARTMANN, A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov. a nitrogen fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass *Miscanthus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **51**: 17 - 26.

ELBELTAGY, A., NISHIOKA, K., TADASHI, T., SUZUKI, H., YE, B., HAMADA, T., ISAWA, T., MITSUI, H. & MINAMISAWA, K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. *Appl. Environm. Microbiol*. **67(11)**: 5285 – 5293.

EVANS, H. & BURRIS, R. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. En: STACEY, G., BURRIS, R. & EVANS, H. Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall. New York – USA. 1992. pp. 1 - 42.

FELSKE, A. 1999. Reviewing the DA001 files: a 16S rRNA chase on suspect #X99967, a *Bacillus* and Dutch underground activist. *J Microbiol Methods*. **36**: 77 – 93. En: MACRAE, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J Microbiol*. **31**: 77 -82.

FELSKE, A. RHEIMS, H., WOLTERINK, A., STACKEBRAND, E. & AKKERMANS, A. 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiol*. **143**: 2983 – 2989. En: MACRAE, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J Microbiol*. **31**: 77 -82.

FERREIRA, E., RESENDE, A., ALVES, B., BODDEY, R. & URQUIAGA, S. 1997. Destino do <sup>15</sup>N-urina bovina aplicado na superfície de um solo Podzólico descoberto, ou sob cultura de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. En: REIS, F., SILVA, M., TEIXEIRA, K., URQUIAGA, S. & REIS, V. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira do Ciência do Solo*. **28**: 103 -113.

FISHER, P., PETRINI, O. & LAPPIN-SCOTT, H. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*. **122**: 299 – 305.

FRANCO, A. & DÖBEREINER, J. 1994. A biología do solo e sustentabilidad dos solos tropicais. *Summa Phytopathologica*. **20**: 68 -74.

GASKINS, M., ALBRECHT, S. & HUBBEL, D. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity – a review. *Agric Ecosyst Environ*. **12**: 99 – 116. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol*. **7**(11): 1711 -1724.

GILLIS, M., DÖBEREINER, J., POT, P., GOOR, M., FALSEN, E., HOSTE, B., REINHOLD, B. & KERSTERS, K. 1991. Taxonomic relationship between (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autotrophicum*. En: POLSINELLI, M., MATERASSI, R. & VICENZINI, M. Nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers. 1991. p. 293 – 294.

GOVINDARAJAN, KWON, S. & WEON, H. 2007. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World J Microbiol Biotechnol*. **23**: 997 – 1006.

HAAHTELA, A., BALDANI, J., KIRCHHOF, G., ABMUS, B., HUTZLER, P., SPRINGER, N., LUDWING, W., BALDANI, V. & DÖBEREINER, J. 1981. Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. En: PENDRIK, I., DEL GALLO, M., VANDERLEYDEN, J. & ZAMAROCZY, M. *Azospirillum* VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology. Springer. 1994. p. 415 – 427.

HALLMAN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W., & KLOEPPER, J. 1997. Bacterial endophytes in agricultura crops. *Canadian Journal of Microbiology*. **43**: 895 – 914.

HAMELIN, J., FROMIN, N., TARNAWSKI, S., TEYSSIER-CUVELLE, S. & ARAGNO, M. 2002. *nifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. *Environ Microbiol* **4**: 477 – 481. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol*. **7**(11): 1711 -1724.

HASELKORN, R., GOLDEN, J., LAMMERS, P. & MULLIGAN, M. Organization of the genes for nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena*. En: EVANS, H., BOTTOMLEY, P. & NEWTON, W. 1985. Nitrogen fixation research progress. Martinus Nijhoff. p. 485 – 490.

HEAD, I., SAUNDERS, J. & PICKUP, R. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecol*. **35**: 1- 21.

HUTSCH, B., AUGUSTIN, J. & MERBACH, W. 2002. Plant rhizodeposition – an important source for carbon turnover in soils. *J Plant Nutr Soil Sci*. **165**: 397 – 407. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol*. **7**(11): 1711 -1724.

ITZIGSOHN, R., BURDMAN, S.; OKON, Y., ZAADY, E., YONATAN, R. & PEREVOLOTSKY, A. 2000. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil Res Rehab*. **13**: 151 – 158.

JAMES, E. & OLIVARES, F. 1997. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci*. **17**: 77 – 119.

JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C. & GILLIS, M. 1997. Transfer of *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. *Inter J Syst Bact* **47(3)**: 895 - 898.

KHAMMAS, K.M., AGERON, E., GRIMONT, P.A.D. AND KAISER, P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* **140**: 679-693.

KUSKE, C., BARNS, S. & BUSCH, J. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3614 – 3621.

LADHA, J., BARRAQUIO, W. & WANTABE, I. 1983. Isolation and identification of nitrogen fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Can J Microbiol.* **29**: 1301 – 1308. En: SINHA, M., KAPLEY, A. & PUROHIT, H. 2007. Study of biodiversity of *Klebsiella* sp. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-007-9457-9

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, J., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. & DARNELL, J. 2000. Molecular cell biology. (4ta Ed.). W.H. Freeman. New York. EEUU.

MACRAE, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J Microbiol.* **31**: 77 - 82.

MACRAE, A. Rhizobacterial ecology using 16S rRNA approaches. Newcastle Upon Tyne, England, 1998 (PhD Thesis. Department of Agricultural and Environmental Science, University of Newcastle Upon Tyne England). En: MACRAE, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J Microbiol.* **31**: 77 -82.

MAGALHÃES, F.M., BALDANI, J.I., SOUTO, S.M., KUYKENDALL, J.R. AND DÖBEREINER, J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Cienc.* **55**: 417-429.

MAGALHÃES, F.M. & DÖBEREINER, J. 1984. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazonia. *R. Microbiol.*, 15: 246-252.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Review in Plant Sciences*. **15**: 113 - 140.

MELLONI, R., NÓBREGA, R., MOREIRA, F. & SIQUEIRA, J. 2004. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxite, em reabilitação. *R. Bras. Ci. Solo*. **28**: 85 – 94.

MENDOZA, M. & RODICIO, M. 2004. Identificación bacteriana mediante la secuenciación del 16S rARN: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22(4)**: 238 – 245.

MUSSON, G. 1994. Ecology And effects of endophytic bacteria in plants. Master Thesis. Auburn University, Auburn. En: TEXEIRA, M., SOARES, I., VIEIRA, R. 2005. Diversidade de Bactérias Edofíticas na Cultura da Mandioca. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 33 - Embrapa. 22p.

MUYZER, G. & SMALLA, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperatura gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Ant Van Leeuwen Int. J. Gen. Mol. Mol. Micrbiol.* **73**: 127 – 141.

NÓBREGA, R., MOREIRA, F., SIQUEIRA, J. & LIMA, A. 2004. Caracterizacao fenotípica e diversidade de bacterias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitacao após a mineracao de bauxita. *R Bras Ci Solo*. **28**: 269 – 279.

NOVO, R. Los microorganismos y la recuperación de la fertilidad de los suelos. En: Memorias del Primer Simposio de Microbiología del Suelo. 1997. Universidad de los Andes. Bogotá DC.

OKON, Y. & ITZIGSOHN, R. 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology Advances*. **13**: 415 – 424.

OKON, Y. & LABANDERA-GONZALES, C. 1994. Agronomic application of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years world-wide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*. **26**: 1591 – 1601.

OKON, Y. & VANDERLEYDEN, J. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* **63**: 366 - 370. En: STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living

nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Review*. **24(2000)**: 487 – 506.

OKON, Y. 1994. *Azospirillum*/plant associations, pp. 175. CRC Press, Boca Raton, FL. En: STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Review*. **24(2000)**: 487 – 506.

OKON, Y., ITZIGSOHN, R., BURDMAN, S. & HAMPEL, M. 1995. Advances in agronomy and ecology of the *Azospirillum*/plant association. En: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Tikhnovich, I.A., Provorov, N.A.

OLIVEIRA, A., CANUTO, E., SILVA, E., REIS, V. & BALDANI, J. 2004. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian Journal of Microbiology*. **35**: 295 – 299.

PEOPLES, M. & CRASWELL, E. 1992. Biological nitrogen fixation; investments expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*. **141**: 13 – 39.

PICENO, Y., NOBLE, P. & LOVELL, C. 1999. Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Microb Ecol*. **38**: 157 – 167. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol*. **7(11)**: 1711 -1724.

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

PODSCHUN, R. & ULLMANN, U. 1998. *Klebsiella* sp. as nosocomial pathogens, epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. **11**: 589 – 603. En: SINHA, M., KAPLEY, A. & PUROHIT, H. 2007. Study of biodiversity of *Klebsiella* sp. *World J Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s11274-007-9457-9

POSTGATE, J. The fundamental of nitrogen fixation. University Press Cambridge. 1983. 252 pp.

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

REINHOLD, B., HUREK, T., FENDRIK, I., POT, B. GILLIS, M., KERSTERS, K., THIELEMANS, S. & DE LEY, J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organisms associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth]. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37**: 43 – 51.

REIS-JUNIOR, F., REIS, V., SILVA, L. & DÖBEREINER, J. 2000. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Pesq Agropec Bras*. **35**: 985 – 994.

REIS-JUNIOR, F., SILVA, M., TEIXEIRA, K., URQUIAGA, S. & REIS, V. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R Bras Ci Solo*. **28**: 103 – 113.

RHEIMS, H., RAINEY, F. & STACKEBRANDT, E. 1996. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *J. Indust. Microbiol*. **17**: 159 – 167.

RHEIMS, H., FELSKE, A., SEUFERT, S. & STACKEBRANDT, E. 1999. Molecular monitoring of an uncultured group of the class Actinobacteria in two terrestrial environments. *J Microbiol Methods*. **36**: 65 – 75. En: MACRAE, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J Microbiol*. **31**: 77 -82.

RODRIGUES, L., BALDANI, V., REIS, V. & BALDANI, J. 2006. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos generos *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. *Pesq Agropec Bras*. **41(2)**: 275 – 284.

RUSCHEL, A. & RUSCHEL, R. 1977. Varietal differences affecting nitrogenase activity in rizosphere of sugar cane. *Proceedings for International Society Sugar Cane Tecnology*. **2**: 1941 – 1947.

SCHMID, M., BALDANI, J. & HARTMANN, A. The genus *Herbaspirillum*. En: BALOWS, A., TRIPPER, H., DWORKING, M., HARDER, W. & SCHELEIDER, K. 1991. *The prokaryotes*. Springer – Verlag. Disponível em: [http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=363&initsec=02\\_00](http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=363&initsec=02_00)

SINHA, M., KAPLEY, A. & PUROHIT, H. 2007. Study of biodiversity of *Klebsiella* sp. *World J Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s11274-007-9457-9

SPRENT, J. & SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall, 2 ed., London – England. 1990. 256p.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Review*. **24(2000)**: 487 – 506.

STURTZ, A. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*. **175**: 257 – 263.

STURZ, A. CHRISTIC., B. & NOWAK, J. 2000. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Rev Plant Sci*. **19**: 1 – 30. En: KUKLINSKY-SOBRAI, J., ARAÚJO, W., MENDES, R., PIZZIRANI-KLEINER, A. & AZEVEDO, J. 2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosphate herbicide. *Plant and Soil*. **273**: 91 – 99.

TARRAND, J.J., KRIEG, N.R. AND DÖBEREINER, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol*. **24**: 967-980.

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

UEDA, T., SUGA, Y., YAHIRO, N. & MATSUGUCHI, T. 1995. Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol*. **177**: 1414 – 1417. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol*. **7(11)**: 1711 - 1724.

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 DC. 2002. 98pp.

VANDERLEYDEN, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Review*. **24(2000)**: 487 – 506.

VILORIA, J. 2003. La ganadería bovina en las llanuras del Caribe colombiano. Documentos de Trabajo sobre Economía Regional. Centro de Estudios Económicos Regionales. Banco de la República. Cartagena de Indias. No. 40, 63p.

WAGNER, A., BLACKSTONE, N., CARTWRIGHT, P., DICK, M., MISOF, B. SNOW, P., WAGNER, G., BARTELS, J., MURTHA, M. & PENDELTON, J. 1994. Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Systematic Biology*. **43**: 250 – 261. En: MACRAE, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J Microbiol*. **31**: 77 -82.

WOESE, C. & FOX, G. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci*. **74(11)**: 5088 – 5090.

WONG, P. & YUEN, P. 1996. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. *Wat Res*. **30**: 1736 – 1744. En: SINHA, M., KAPLEY, A. & PUROHIT, H. 2007. Study of biodiversity of *Klebsiella* sp. *World J Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s11274-007-9457-9

XIE, G., CAI, M., TAO, G. & STEINBERGER, Y. 2003. Cultivable heterotrophic N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. *Biol Fert Soils*. **37**: 29 – 38. En: BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol*. **7(11)**: 1711 -1724.

YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., OYAIZU, H., YANO, I., HOTTA, H., HASHIMOTO, Y., ESAKI, T. & ARAKAWA, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. **36**: 1251 – 1275.

## **Anexos**

### **Anexo 1. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias diazotróficas**

#### **Medio de cultivo LG (*Azotobacter* spp. y *Azomonas* spp.)**

El medio LG fue elaborado por Lipman (1904) y su composición por es la siguiente:

##### Comosición por litro:

Sacarosa	20,00g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15g
CaCl <sub>2</sub>	0,02g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,20g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,002g
FeCl <sub>3</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,01g
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	5,00mL
CaCO <sub>3</sub>	1,00g

##### Preparación

Completar a 1000mL con agua destilada. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y adicionar 15g de agar.

### **Medio de cultivo LGD (*Derxia spp.*)**

El medio LGD o medio LG (Lipman, 1094) fue modificado por Campêlo & Döbereiner (1970) y su composición es la siguiente:

#### Comosición por litro:

Glucosa	20,00g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15g
CaCl <sub>2</sub>	0,01g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,20g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,002g
FeCl <sub>3</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,01g
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	5,00mL
NaHCO <sub>3</sub>	1,00g

#### Preparación

Completar a 1000mL con agua destilada. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y adicionar 15g de agar.

### **Medio de cultivo BEIJERINCKIA (*Beijerinickia* spp.)**

#### Composición por litro:

Glucosa	10,00g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,80g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,10g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	20,00mg
MnSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2,00mg
ZnSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	5,00mg
CuSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	4,00 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	5,00 mg

#### Preparación

Completar a 1000mL con agua destilada. Ajustar el pH a 6,5 con NaOH y adicionar 15g de agar. Esterilizar la glucosa por separado (10g en 50mL de H<sub>2</sub>O) y mezclar después de frío.

**Medio de cultivo NFb (*Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum irakense* y *Azospirillum halopraeferans*).**

Este medio inicialmente fue denominado Fb, haciendo referencia a las iniciales del investigador Fabio Pedrosa (quien lo desarrollo). Con algunas modificaciones posteriores paso a llamarse NFb, en donde la N signica Nuevo.

Composición por litro:

Acido malico	5.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.1g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.02g
Solucion de Micronutrientes	2ml
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	2ml
FeEDTA (Solucion 1.64%)	4ml
Solucion de Vitaminas	1ml
KOH	4.5g

Preparación:

Colocar los compuestos en el orden indicado, posteriormente completar el volumen 1000ml con agua destilada y ajustar el pH entre 6.5 y 6.8.

Para el medio semisólido se debe agrgar entre 1.75 y 1.8g de agar-agar/l y para el medio solido se adicionan 15g de agar-agar/l.

1. Solucion de Micronutrientes		2. Solución de Vitaminas	
CuSO <sub>4</sub>	0.04g	Biotina	10mg
ZnSO <sub>4</sub>	1.20g	Piridoxal-HCl	20mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.40g	Completar el volumen a 100ml y guardar en nevera	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1.00g		
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	1.175g		

Completar el volumen para 1000ml de agua destilada.

### **Medio de Cultivo BATATA (Purificación de *Azzopirillum spp* y *Herbaspirillum spp*)**

#### Composición por litro:

Batata	200g
Acido malico	2.5g
Azucar	2.5g
Solucion de micronutrientes	2ml
Solucion de vitaminas	1ml

#### Preparación:

Pesar 200g de batata inglesa, pelar y hervir durante 30 minutos. Enseguida filtrar con algodón. Mezclar las cantidades de acido malico y azucar en 50ml de agua destilada y ajustando el ph entre 6.5 y 7.0. Posteriormente mezclar las soluciones y completar el volumen a 1000ml con agua destilada.

### **Medio de cultivo LGI (*Azospirillum amazonense*)**

El medio de cultivo LGI, desarrollado a partir del medio LG (Lipman, 1904). La I hace referencia al investigador J. Ivo Baldani, este medio promueve el aislamiento de *Azospirillum amazonense*.

#### Composición por litro:

Azucar cristal	5.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6g
MgSO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.2g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.02g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	0.002g
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	5ml
FeEDTA (Solucion 1.64%)	4ml
Solucion de Vitaminas	1ml

#### Preparación:

Completar el volumen a 1000ml con agua destilada y ajustar el pH entre 6.0y 6.2. Para el medio semisólido se debe adicionar 1.75g de agar/l y para medio solido 15g de agar/l.

### **Medio de Cultivo JNFb (*Herbaspirillum* spp)**

El medio JNFb fue desarrollado por la investigadora Johanna Döbereiner a partir del medio NFb. La J hace referencia a la investigadora.

#### Composición por litro:

Acido malico	5.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.1g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.02g
Solucion de micronutrientes	2ml
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	2ml
FeEDTA (Solucion 1.64%)	4ml
Solucion de Vitaminas	1ml
KOH	4.5g

#### Preparación:

Completar el volumen a 1000ml con agua destilada. Ajustar el pH a 5.8. Para medio semisólido agregar 1.8g de agar/l y para medio solido 18g de agar/l.

### **Medio de cultivo LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)**

Este medio fue desarrollado a partir del medio de cultivo LGI (Baldani, 1984); en donde la P hace referencia a Pernambuco, lugar de aislamiento de la primera cepa de *Acetobacter diazotrophicus*.

#### Composición por litro:

Azúcar cristal	100g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.02g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	0.002g
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	5ml
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.01g

#### Preparación:

Completar el volumen a 100ml con agua destilada y ajustar el pH a 5.5. Para medios semisólidos se debe agregar 1.8g de agar/l y para medio sólido 17g de agar/l.

### **Medio de cultivo BATATA-P (Purificación de *Acetobacter diazotrophicus*)**

Este medio se prepara de la misma forma que el medio BATATA, descrito anteriormente. En este medio se sustituye el ácido málico por 100g de azúcar cristal/l.

**Anexo 2.** Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95% para los factores evaluados.

Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95%, con 2 grados de libertad, para determinar el efecto de las especies de pasto sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas estudiadas ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL).

Medio de Cultivo	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F	Significación
NFb	2,274	1,362	10,300	0,000*
LGI	1,906	0,953	1,730	0,192
JNFb	3,655	1,828	7,111	0,002*
LGI-P	0,617	0,309	0,504	0,608
JMV	1,267	0,334	1,616	0,213
LG	8,212	4,106	31,723	0,000*
LGD	1,906	0,653	9,419	0,003*
BEIJ	0,820	0,410	6,656	0,011*

\* Análisis estadísticos con datos transformados en Log con nivel de significancia del 95% ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95%, con 1 grado de libertad, para determinar el efecto de la época climática sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas estudiadas ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL).

Medio de Cultivo	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F	Significación
NFb	8,018	8,018	60,633	0,000*
LGI	2,945	2,945	5,347	0,027*
JNFb	9,578	9,578	37,264	0,000*
LGI-P	$2,604 \times 10^{-3}$	$2,604 \times 10^{-3}$	0,004	0,948
JMV	18,544	18,544	47,294	0,000*
LG	0,791	0,791	6,111	0,029*
LGD	3,358	3,358	33,191	0,000*
BEIJ	0,915	0,915	14,845	0,002*

\* Análisis estadísticos con datos transformados en Log con nivel de significancia del 95% ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95%, con 2 grados de libertad, para determinar el efecto del estrato de muestra sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas estudiadas ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL).

Medio de Cultivo	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F	Significación
NFb	0,706	0,353	2,670	0,083
LGI	0,753	0,377	0,684	0,511
JNFb	5,871	2,935	11,420	0,000*
LGI-P	2,212	1,108	1,810	0,178
JMV	0,802	0,401	1,022	1,022

\* Análisis estadísticos con datos transformados en Log con nivel de significancia del 95% ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95%, con 2 grados de libertad, para determinar el efecto de la especie de pasto y la época climática sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas estudiadas ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL).

Medio de Cultivo	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F	Significación
NFb	1,630	0,815	6,165	0,005*
LGI	0,145	$7,229 \times 10^{-2}$	0,131	0,877
JNFb	0,617	0,308	1,199	0,313
LGI-P	1,756	0,878	1,435	0,251
JMV	0,645	0,323	0,823	0,447
LG	0,442	0,221	1,707	0,223
LGD	1,317	0,658	6,506	0,012*
BEIJ	0,518	0,259	4,204	0,041*

\* Análisis estadísticos con datos transformados en Log con nivel de significancia del 95% ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95%, con 2 grados de libertad, para determinar el efecto de la especie de pasto y el estrato de muestra sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas estudiadas ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL).

Medio de Cultivo	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F	Significación
NFb	22,144	5,536	41,864	0,000*
LGI	18,144	4,536	8,236	0,000*
JNFb	20,237	5,059	19,683	0,000*
LGI-P	23,893	5,973	9,759	0,000*
JMV	20,844	5,211	13,290	0,000*

\* Análisis estadísticos con datos transformados en Log con nivel de significancia del 95% ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95%, con 2 grados de libertad, para determinar el efecto de la época climática y el estrato de muestra sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas estudiadas ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL).

Medio de Cultivo	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F	Significación
NFb	4,774	2,387	18,052	0,000*
LGI	4,924	2,462	4,470	0,018*
JNFb	1,459	0,730	2,839	0,072
LGI-P	0,201	0,100	0,164	0,849
JMV	3,185	1,593	4,062	0,026*

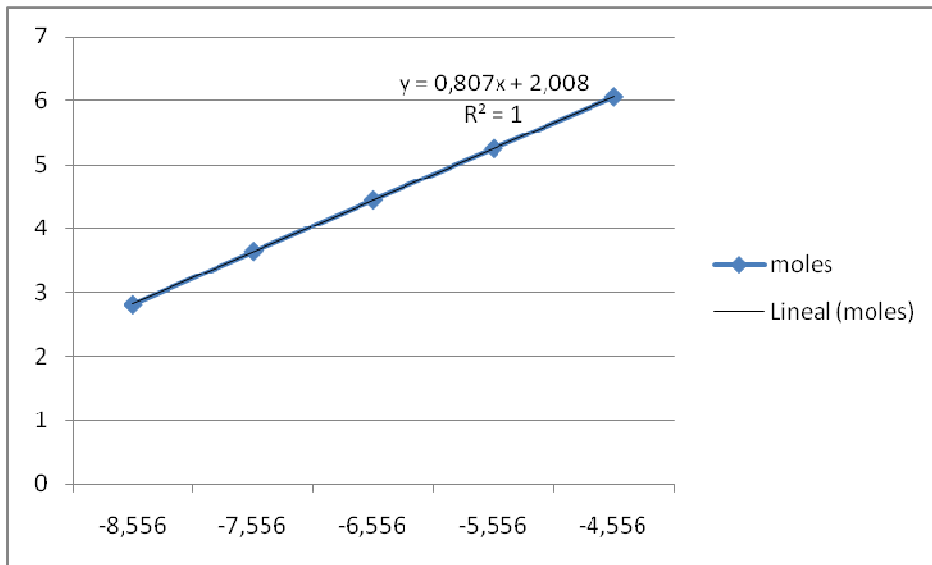
\* Análisis estadísticos con datos transformados en Log con nivel de significancia del 95% ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de varianza univariante (UNIANOVA) a un nivel de significancia del 95%, con 4 grados de libertad, para determinar el efecto de la especie de pasto, la época climática y el estrato de muestra sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas estudiadas ( $\text{Log}^{10}$  de número de células/mL).

<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Significación</b>
NFb	6,068	1,517	11,471	0,000*
LGI	1,791	0,448	0,813	0,525
JNFb	10,943	2,736	10,643	0,000*
LGI-P	10,733	2,683	4,384	0,005*
JMV	7,079	1,770	4,514	0,005*

\* Análisis estadísticos con datos transformados en Log con nivel de significancia del 95% ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 3.** Curva de calibración para la prueba de reducción de acetileno por cromatografía de gases.



**Anexo 4.** Resultados de la prueba de reducción de acetileno para los 12 aislamientos que presentaron mayor producción

<b>Aislamiento*</b>	<b>nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup></b>
SRG6	2.246,17
Sp 7	825,10
SRA4	519,60
SRA2	269,35
SRG4	123,70
SRA5	63,34
SRG5	44,68
SRG3	10,72
RA11	2,92
RA12	1,41
SRA3	0,82
SRA5	0,81
SRG7	0,66