

Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar

Isolation and identification of *Azospirillum* sp. in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) of the Valle del Cesar

Diana M. Cárdenas¹, María F. Garrido², Ruth R. Bonilla³ y Vera L. Baldani⁴

¹*Departamento de Biología, Universidad Francisco de Paula Santander.*

Avenida Gran Colombia No. 12E-96 Barrio Colsag. Cúcuta, Colombia.

E-mail: dicarcaro@hotmail.com

²*Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA. Bogotá, Colombia*

³*Laboratorio de Microbiología de Suelos Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA. Bogotá, Colombia*

⁴*EMBRAPA Agrobiología. Seropedica-Brasil*

Resumen

Se evaluó el efecto de factores ambientales del Valle del Cesar y el manejo agronómico del pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.), sobre la población bacteriana del género *Azospirillum* en medios de cultivo semisólidos NFb y LGI, para lo cual se utilizó un diseño experimental en parcelas divididas con un arreglo factorial de 2 (épocas climáticas: lluvia y sequía) x 2 (manejos agronómicos: agroecológico y extractivo) x 3 (muestras analizadas: suelo rizosférico, raíces y hojas). Los resultados no revelaron diferencias estadísticas significativas, lo que indica que esta bacteria puede mantener su población en condiciones de estrés por diferentes mecanismos fisiológicos. A partir de estas muestras se obtuvieron 16 aislamientos pertenecientes al género *Azospirillum*, a los cuales se les evaluó su actividad de reducción de acetileno como indicador de la fijación biológica de nitrógeno y su capacidad en la producción de compuestos indólicos como promotores del crecimiento vegetal. Se seleccionaron las cepas SRGM2, SRGM3 y SRGM4 obtenidas de muestras de suelo rizosférico de pasto guinea de la Estación Experimental Motilonia de Corpoica, municipio Agustín Codazzi, departamento del Cesar. Estos aislamientos se caracterizaron molecularmente por el gen 16S rRNA y según el análisis BLAST en la base de datos del GenBank y presentaron 93% de similitud con *A. lipoferum* (SRGM2 y SRGM3) y 94% con *A. brasilense* (SRGM4).

Palabras clave: Crecimiento, fijación del nitrógeno, *Azospirillum* sp.

Abstract

The effect of environmental factors of the Valle del Cesar and the agronomic management of Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.), on the bacterial population of the *Azospirillum* genus in semisolid NFb and LGI culture media was evaluated, for which an experimental design was used in divided plots with a 2 (climatic seasons: rainy and dry) x 2 (agronomic managements: agroecological and extractive) x 3 (analyzed samples: rhizospheric soil, roots and leaves) factorial arrangement. The results did not reveal significant statistical differences, which indicates that this bacterium can maintain its population under stress conditions by different physiological mechanisms. From these samples 16 isolations were obtained belonging to the *Azospirillum* genus in which their acetylene-reduction activity was evaluated as indicator of biological nitrogen fixation and their capacity in the production of indolic compounds as plant growth promoters. The strains SRGM2, SRGM3 and SRGM4, obtained from rhizospheric soil samples of Guinea grass of the Experimental Station Motilonia of Corpoica, Agustín Codazzi municipality, Cesar department, were selected. These isolations were molecularly characterized by the gen 16S rRNA and according to the BLAST analysis in the GenBank database and showed 93% similarity with *A. lipoferum* (SRGM2 and SRGM3) and 94% with *A. brasilense* (SRGM4).

Key words: Growth, nitrogen fixation, *Azospirillum* sp.

Introducción

El Cesar es uno de los principales departamentos ganaderos de la región Caribe colombiana y constituye una importante región productora de leche (Gamarra, 2005). Sus suelos se derivan de materiales sedimentarios bien drenados y el pH es cercano a la neutralidad; tienen bajos niveles de materia orgánica, altos contenidos de Ca y bajos niveles de Mg, K y elementos menores; su textura varía de franco a franco-arcillosa. En ellos se cultivan especies forrajeras, entre las cuales el pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) alcanza una alta productividad en materia seca, de alrededor de 12 a 18 t/ha (Cuesta-Muñoz *et al.*, 2005). Sin embargo, estos suelos presentan deterioro físico, químico y biológico, lo que afecta severamente su capacidad productiva y compromete la viabilidad económica de los sistemas ganaderos. Lo anterior es ocasionado, entre otros factores, por el uso indiscriminado de fertilizantes químicos principalmente como fuente de N, el cual desempeña un papel importante (junto con el P y el K) para el crecimiento de las plantas (Osorio, 2007; Cordero *et al.*, 2008). La fijación biológica de nitrógeno realizada únicamente por bacterias es una alternativa viable, ambiental y económicamente, para suplir la inclusión de fuentes de N de origen sintético, ya que el nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva inagotable en la biosfera.

En la rizosfera de los pastos tropicales y subtropicales están presentes microorganismos fijadores de N_2 ; diversos estudios han demostrado que existe una alta especificidad de los aislamientos obtenidos de diferentes raíces de gramíneas con respecto a la especie de diazotrófico encontrado, es decir que los exudados radicales, el pH del suelo y otras características de la especie vegetal y del suelo podrían influir en la presencia de algunos géneros fijadores biológicos (Reis Junior *et al.*, 2004; Radwan *et al.*, 2005). Estudios de más de 20 años indican que las bacterias del género *Azospirillum* tienen una especial afinidad por las raíces de las gramíneas (Brasil *et al.*, 2005), como es el caso de los pastos que responden con incrementos en su crecimiento y rendimiento cuando son inoculados con *Azospirillum* spp. La secreción de sustancias promotoras del crecimiento de las plantas (tales como auxinas, giberelinas y citoquininas) por *Azospirillum*, parece estar involucrada parcialmente en este efecto (Reis Junior *et al.*, 2004; Radwan *et al.*, 2005; Kuss *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que en Colombia no existe hasta el momento ningún registro de la evaluación de poblaciones de esta bacteria asociadas a las pasturas, este trabajo tuvo como objetivo iniciar el estudio de cepas nativas de *Azospirillum* en el pasto guinea en el Valle del Cesar, como el primer paso hacia la búsqueda de aislamientos con potencial biofertilizante.

Materiales y Métodos

Determinación del efecto de las épocas de lluvia y sequía sobre las poblaciones de Azospirillum en el pasto guinea. Se tomaron muestras del suelo rizosférico y de la planta completa de guinea en la época de lluvia en septiembre de 2006 (158,6 mm de precipitación y 28,1°C de temperatura) y en la seca en febrero de 2007 (0 mm de precipitación y 31°C de temperatura). Los dos sitios seleccionados presentan condiciones contrastantes respecto al manejo del suelo. En la E.E. Motilonia se desarrollan prácticas agronómicas como la incorporación de materia orgánica al suelo, la planificación de la siembra y el pastoreo racional; en la finca Fernambuco se practica el sobrepastoreo y el laboreo intensivo del suelo.

El suelo rizosférico se obtuvo al removerlo de las raíces, a partir del cual se realizaron diluciones hasta 10^{-6} en solución salina al 0,85% de NaCl. Se inocularon 0,1 mL de cada dilución en tres viales de medio semisólido NFb y LGI, para el recuento de *Azospirillum* spp. y *Azospirillum amazonense*, respectivamente (Döbereiner *et al.*, 1995). Las raíces del pasto se lavaron y se cortaron en fragmentos de 1 cm y se desinfectaron con alcohol de 70° durante 1 min; después se sumergieron en

hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y se realizaron dos enjuagues sucesivos en agua estéril. Se pesó 1 g de estas raíces y se maceraron en 9 mL de solución salina estéril (0,85% de NaCl). Las hojas y los tallos se lavaron con agua destilada y se secaron. Se pesó 1 g de este material vegetal cortado en fragmentos de 2 cm, se desinfectaron con alcohol de 70° y se maceraron en 9 mL de solución salina estéril (0,85% de NaCl). Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} a partir de estos macerados y se inocularon de igual forma que la muestra de suelo rizosférico. Los viales inoculados se incubaron durante 5 días a 32°C hasta la formación de una película subsuperficial como indicador del crecimiento positivo.

Se cuantificó la población mediante el método del Número Más Probable para tres tubos, aplicando la tabla de McCrady (Döbereiner *et al.*, 1995). Se realizaron tres repeticiones y se hizo un análisis de varianza según el diseño experimental en parcelas divididas con un arreglo factorial de 2 (épocas climáticas) x 2 (manejos agronómicos) x 3 (muestras analizadas); se empleó la prueba de comparación de Duncan al 5% de probabilidad, utilizando el programa estadístico SAS versión 9.1.3.

Aislamiento e identificación fenotípica de Azospirillum spp. Se seleccionaron los viales de las diluciones más altas con crecimiento positivo y se replicaron en un nuevo medio semisólido. A partir de esta película se hizo el aislamiento en placas de agar Rojo Congo para seleccionar colonias rojo escarlata (Rodríguez-Cáceres, 1982) y en agar Batata para seleccionar colonias rosadas, pequeñas y estructuradas, después de una semana de incubación a 32°C (Döbereiner *et al.*, 1995). Las células bacterianas se observaron en microscopio con un aumento de 1000x y se realizó un frotis en agua destilada para describir la forma y el movimiento de las células. Las características de movilidad en espiral, crecimiento en agar Batata y Rojo Congo, se compararon con las de las cepas de referencia *Azospirillum brasilense* (Sp7) y *Azospirillum lipoferum* (Y2). Sus semejanzas se estimaron por el coeficiente de JACCARD y se agruparon por el método del análisis entre grupos para realizar un dendrograma, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows.

Selección de las cepas de Azospirillum spp. con potencial biofertilizante. Los aislamientos presuntivos para el género *Azospirillum* se evaluaron según la actividad de la enzima nitrogenasa y la producción de sustancias indólicas promotoras del crecimiento vegetal. Las cepas se replicaron en agar Rojo Congo y se obtuvieron suspensiones celulares ajustadas a una concentración celular de 1×10^7 UFC/mL. Se inocularon 30 mL de caldo DYGS al 2% y se llevó a incubación durante 48 horas a 32°C y 120 rpm. La biomasa obtenida se centrifugó a 8 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y las células fueron suspendidas en 30 mL de buffer fosfato estéril 0,06 M y pH 7.0. De esta suspensión celular se tomaron 100 mL y se inocularon en 50 mL de caldo NFb sin azul de Bromotimol y solución de vitaminas, con una concentración de 200 mM de triptófano como precursor del ácido indolacético y 0,2 g/L de NH_4Cl como fuente de N. Se incubó en oscuridad por 48 h, 120 rpm y 32°C (Radwan *et al.*, 2004). Se centrifugaron 10 mL del cultivo a 8 000 rpm por 10 minutos y se tomaron 2 mL del sobrenadante, al cual se le adicionaron 8 mL de reactivo de Salkowsky. Se realizó la lectura de la absorbancia de las muestras a 535 nm en espectrofotómetro Spectronic 601 Milton Roy. La concentración de compuestos indólicos se calculó utilizando la ecuación $Y=0,0033X-0,0311$ ($R^2=0,9855$) donde, Y=Absorbancia de la muestra a 535 nm y X= μM de ácido indolacético (AIA). Esta ecuación se obtuvo con la regresión lineal de la curva de calibración en diferentes concentraciones de AIA (25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μM) con la adición del reactivo de Salkowsky (Kuss *et al.*, 2007).

Para la cuantificación de la fijación biológica de nitrógeno *in vitro* se utilizó el método de reducción de acetileno. Los aislamientos se inocularon en frascos de 10 mL con 3 mL de medio semisólido (NFb o LGI) y se incubaron durante 24 horas a 32°C. Posteriormente se reemplazó el tapón por uno de caucho sellándolo herméticamente, se sustituyó el 10% de su atmósfera por acetileno y se incubó durante 1 hora a 32°C. El 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 actividad de reducción de acetileno para cada aislado se calculó según la altura del pico de etileno en el cromatograma, extrapolando en la ecuación $\text{Log}_{10} Y = 0,808 \text{ Log}_{10} X + 9,7$ ($R^2 = 0,997$), obtenida de la regresión lineal de una curva de calibración en concentraciones de etileno de 1, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10 000, en las mismas condiciones del cromatógrafo (Corpoica, 2006). Se comparó la producción de compuestos indólicos y la fijación biológica de nitrógeno, y sus similitudes se estimaron según la distancia euclidiana. Después se agruparon por el método de las medianas y se representaron gráficamente en un dendrograma, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows.

Identificación de los aislamientos de Azospirillum spp. por medio del análisis del gen 16S rrna. Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en caldo LB por 14 h a 150 rpm y 30°C. Se tomaron 25µL y se mantuvieron en baño termostático durante 15 minutos. Después se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 1 mL de agua Milli-Q estéril. La amplificación de la región 16S rRNA se realizó en 25µL de una mezcla de reacción de Buffer (1x), MgSO₄ (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), Primer 27F (Edwards *et al.*, 1989) y 1492R (0,2 mM) (Weisburg *et al.*, 1991), 0,25µL de Taq DNA Polimerasa y 1,5µL de DNA molde (muestra del aislamiento). Las condiciones del termociclador fueron: un 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) y tres ciclos de extensión final (72°C por 10 min). Los fragmentos amplificados se observaron mediante 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 QIAquick PCP Purification Kit Protocol de QIAquick® Spin Handbook de QUIAGEN, 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. El producto amplificado se secuenció en un equipo ABI PRISM Genetic Analyzer, que realiza la secuenciación automática de fragmentos de DNA marcados con fluorocromos. El resultado se analizó a través de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi.

Resultados y Discusión

Efecto de la época climática y el manejo agronómico del pasto guinea en las poblaciones de Azospirillum. Según el análisis de varianza, el recuento de la población de *Azospirillum* no presentó diferencias significativas según la época climática y el manejo agronómico de la guinea. Sin embargo, esta población tendió a ser mayor en la época de lluvia bajo un manejo agroecológico del pasto guinea en la E.E. Motilonia con respecto a la época de sequía en las dos localidades, lo que demuestra la influencia de los factores ambientales en la población bacteriana (tabla 1).

Tabla 1. Población de *Azospirillum* en el pasto guinea según la época climática.

Table 1. *Azospirillum* population in Guinea grass according to the season.

Finca	Época climática	NFb (¹)Número de células g ⁻¹	LGI (¹)Número de células g ⁻¹
E.E. Motilonia	Lluvia	6,02±0,11	5,79±0,33
Fernambuco	Lluvia	5,58±0,28	5,75±0,21
E.E. Motilonia	Sequía	5,16±0,72	5,35±0,56
Fernambuco	Sequía	4,89±0,31	5,60± 0,79

(¹) Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias de tres repeticiones

Brasil *et al.* (2005) reportaron una disminución del número de bacterias diazotróficas en las raíces y en el suelo de las gramíneas *Axonopus purusii*, *Elyonurus muticus* y *Brachiaria humidicola*, en la época seca. Por su parte, Reis Junior *et al.* (2004) obtuvieron poblaciones de *A. amazonense* de 5,81 unidades log en raíces de *Brachiaria* spp. en invierno, estadísticamente diferente a 3,67 unidades log en la época seca en una zona tropical con estación seca en el invierno.

Sin embargo, cuando evaluaron la población de *A. amazonense* en una zona tropical sin estación seca no encontraron diferencias significativas.

Aunque se evidenció una disminución en la población de *Azospirillum* spp. en la época de sequía, estas bacterias pueden sobrevivir debido a sus características fisiológicas, ya que presentan una alta capacidad para cambiar su actividad metabólica, cuando varían las condiciones ambientales en el suelo, principalmente la disponibilidad de agua, carbono y nitrógeno y la tensión de oxígeno. De esta forma, las especies de *Azospirillum* pueden utilizar amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular como fuente de nitrógeno (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000) y, en condiciones desfavorables como la sequía y limitación de nutrientes, pueden experimentar ciertos cambios morfológicos y bioquímicos para formar estructuras similares a quistes que les permiten sobrevivir en condiciones físicas adversas, particularmente la desecación (Sadasivan y Neyra, citados por Joe *et al.*, 2009).

Por otro lado, cuando se compararon las poblaciones de *Azospirillum* spp. en el suelo rizosférico, las raíces y las hojas del pasto guinea en medio NFb y LGI, se registraron diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a estas tres muestras estudiadas. Se observó que el recuento de células en las hojas presentó el valor de población más alto, seguido de las raíces y el suelo rizosférico (tabla 2).

Tabla 2. Población de *Azospirillum* asociada al suelo rizosférico, las raíces y las hojas del pasto guinea en el Valle del Cesar.

Table 2. *Azospirillum* population associated to the rhizospheric soil, roots and leaves of Guinea grass in the Valle del Cesar.

Muestra	NFb (¹)Número de células g ⁻¹	LGI Número de células g ⁻¹
Hojas	5,741±1,27 ^a	6,079±1,15 ^a
Raíces	5,376±0,60 ^{ab}	5,520±1,76 ^{ab}
Suelo rizosférico	5,128±0,85 ^b	5,275±0,0 ^b

(¹)Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias de tres repeticiones. Medias seguidas con la misma letra en cada medio evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el test de Duncan ($P < 0,05$)

Estos resultados son similares a los reportados por Brasil *et al.* (2005) en tres gramíneas, quienes observaron un número mayor de bacterias en las hojas, en el medio NFb, y valores similares estadísticamente en medio LGI. La presencia de las bacterias en todas las estructuras de la planta ha sido descrita en diversas investigaciones, pues a pesar de que es considerada una rizobacteria y coloniza principalmente la zona de elongación de los pelos radicales, también se ha encontrado en el interior de las raíces y en la parte aérea de varias especies vegetales (Brasil *et al.*, 2005; Brasil *et al.*, 2006; Kuss, 2006). Probablemente, todas las especies de *Azospirillum* puedan desarrollar este mecanismo de colonización y es por esto que se han encontrado en mayor número colonizando las raíces, ubicadas en las capas de mucigel o penetrando las células corticales de la raíz de diferentes plantas. Sin embargo, las especies de *Azospirillum* tienen mecanismos específicos para interactuar con las raíces y colonizar su interior, e incluso ir penetrando el tejido foliar, a través de la actividad enzimática celulolítica y pecnitolítica, invadiendo los espacios intercelulares e incluso traslocándose a través de los vasos vasculares hacia el tallo y las hojas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Caracterización fenotípica de los aislamientos obtenidos. Se seleccionaron 16 aislamientos del género *Azospirillum* según las características fenotípicas, los cuales se obtuvieron de las muestras de suelo rizosférico, las raíces y las hojas del pasto cultivado en la E.E. Motilonia de Corpoica y la finca Fernambuco (tabla 3).

En la figura 1 se observa el dendrograma según la matriz de similitud y un análisis entre grupos de los 16 aislamientos, con las cepas de referencia Sp7 (*A. lipoferum*) y Y2 (*A. brasilense*). Se

obtuvieron tres grupos con diferentes valores de distancia entre ellos. El grupo I presentó cuatro aislamientos muy cercanos a las cepas Sp7 y Y2. El grupo II mostró cuatro aislamientos, pero resultó distante un 20% del grupo I. Por último, el número III incluyó ocho aislamientos y conformó un grupo independiente con 25% de distancia de los primeros (I y II).

Tabla 3. Aislamientos de *Azospirillum* asociados a la guinea

Table 3. *Azospirillum* isolations associated to Guinea grass.

Aislado	Origen	Aislado	Origen
SRGM1	Suelo rizosférico Motilonia, lluvia-LGI	RGM3	Raíces Motilonia, lluvia-NFb
SRGM2	Suelo rizosférico Motilonia, sequía-LGI	RGM4	Raíces Motilonia, lluvia-NFb
SRGM3	Suelo rizosférico Motilonia, sequía-LGI	RGM5	Raíces Motilonia, lluvia-NFb
SRGM4	Suelo rizosférico Motilonia, sequía-LGI	RGM6	Raíces Motilonia, lluvia-NFb
SRGM5	Suelo rizosférico Motilonia, lluvia-LGI	HGM1	Hojas y tallos Motilonia, lluvia-LGI
SRGF1	Suelo rizosférico Fernambuco, sequía-NFb	HGF1	Hojas y tallos Fernambuco, sequía-LGI
RGM1	Raíces Motilonia, lluvia-NFb	HGF2	Hojas y tallos Fernambuco, lluvia-LGI
RGM2	Raíces Motilonia, lluvia-NFb	HGF3	Hojas y tallos Fernambuco, lluvia-LGI

Este primer agrupamiento permitió seleccionar ocho aislamientos con un máximo de 20% de distancia con respecto a las cepas Sp7 y Y2. Los aislamientos seleccionados fueron HGF3, SRGM4, SRGM3, SRGM2, RGM1, RGM3, RGM6 y HGF1, los cuales se analizaron según su actividad fijadora de nitrógeno y síntesis de ácido indolacético.

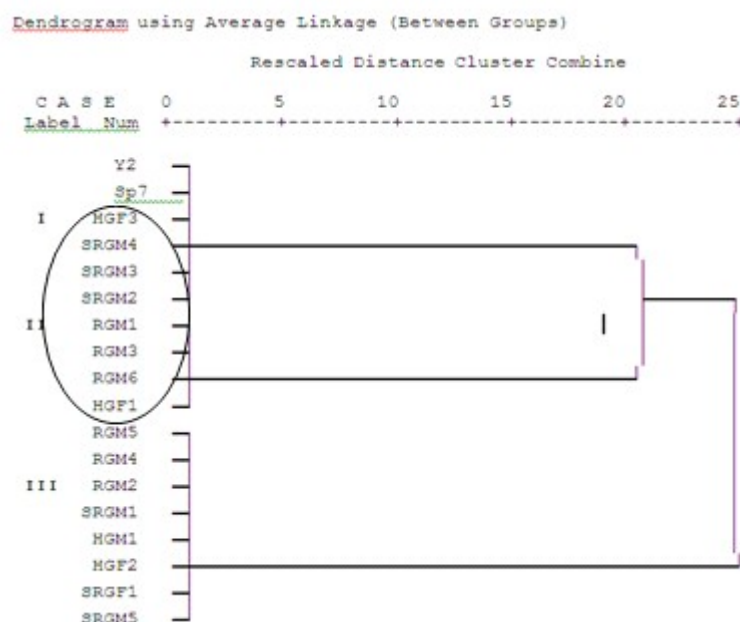


Fig. 1. Dendrograma de agrupación de los 16 aislados según sus características fenotípicas

Fig. 1. Grouping dendrogram of the 16 isolations according to their phenotypical characteristics.

Selección de aislamientos de Azospirillum con potencial biofertilizante. Aunque originalmente se sugirió que el mecanismo de acción de *Azospirillum* para promover el crecimiento de las plantas era su habilidad para fijar el nitrógeno atmosférico, en la actualidad se han propuesto mecanismos alternativos, como la producción de reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006). Por esta razón, la selección de cepas de *Azospirillum* se realizó teniendo en

cuenta su actividad fijadora de nitrógeno y la capacidad de producción de compuestos indólicos, entre las cuales se observaron diferencias estadísticas para todos los aislamientos evaluados (tabla 4).

Tabla 4. Actividad nitrogenasa y producción de sustancias indólicas por los aislamientos de *Azospirillum* sp.

Table 4. Nitrogenase activity and production of indolic substances by the *Azospirillum* sp. Isolations.

Cepa	nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹ mL ⁻¹	μM AIA	μg/mL
Sp7	⁽¹⁾ 845,6±2 ^a	238,45±4,1 ^c	40,17±0,87 ^c
SRGM4	123,70±5 ^b	132,15±6,02 ^h	23,15±0,97 ^h
SRGM3	44,69±3 ^c	19,73±3 ⁱ	3,46±0,41 ⁱ
SRGM2	10,72±1 ^d	247,00±2,03 ^b	43,27±0,71 ^b
HGF1	0,50±0,03 ^e	203,06±6,2 ^c	35,57±1,56 ^e
RGM1	0,20±0,02 ^{fg}	257,91±7,01 ^a	45,18±1,67 ^a
RGM3	0,13±0,04 ^{gh}	155,79±6,08 ^g	27,29±1,19 ^g
RGM6	0,11±0,03 ^{hi}	200,04±4 ^f	33,05±2,88 ^f
HGF3	0,04±0,02 ⁱ	217,60±7 ^d	38,12±1,58 ^d

(1) Medias de tres repeticiones. Medias seguidas con diferente letras no presentan diferencia significativa entre sí por el test de Duncan (P≤0,05)

Actividad nitrogenasa de los diferentes aislamientos. La cepa Sp7 (*A. brasilense*) registró el mayor valor de reducción de acetileno, con 845,6 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹. Con respecto a los aislamientos nativos, la cepa SRGM2 presentó una actividad de reducción de acetileno de 10,72 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, similar a lo reportado por los aislamientos de *A. lipoferum* N7 y *A. brasilense* N8 con una actividad nitrogenasa de 6,6 y 7,95 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, respectivamente (Mehnaz y Lazarovits, 2006). SRGM3, según su actividad reductora de acetileno de 44,69 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, fue similar a las cepas de *Azospirillum* aisladas de maíz silvestre (Teocintle) con actividad nitrogenasa hasta de 46,44 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006). Por su parte, SRGM4 fue más eficiente con un valor de 123,70 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, similar a lo reportado para la cepa *Azospirillum doebereineriae* aislada de *Miscanthus sinensis* cv. Giganteus, que presentó un valor de 100 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ para la reducción de acetileno (Eckert *et al.*, 2001). Los demás aislamientos presentaron valores de ARA inferiores a 1 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, similar a las cepas de *A. brasilense* Cd y Az39 con 0,162 y 0,1 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, respectivamente (Perrig *et al.*, 2007).

Aunque se observó una variación en la actividad enzimática de la fijación biológica de nitrógeno, pudo demostrarse que *Azospirillum* es un género importante asociado a las gramíneas tropicales, capaz de reducir el nitrógeno atmosférico en amonio bajo condiciones microaerofílicas, a través de la actividad del complejo nitrogenasa, la cual contiene un cofactor hierro-molibdeno, que es el sitio de reducción de N₂, y de la proteína reductasa dinitrogenasa que transfiere electrones desde un donador de electrones hasta la proteína nitrogenasa (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Producción de hormonas indólicas. Cuando se cuantificó la producción de compuestos indólicos por los aislamientos estudiados, se encontró que la cepa RGM1 tuvo una producción de 45,18 μg/mL de AIA, seguida por SRGM2 con 43,27 μg/mL de AIA, los cuales representan los mayores valores y Sp7 (*A. brasilense*) que registró 40,170 μg/mL de AIA. Los aislamientos SRGM4, RGM3, RGM6, HGF1 y HGF3 produjeron entre 38,12 y 23,15 μg/mL de AIA, y la cepa SRGM3 presentó el menor valor, 3,46 μg/mL de AIA (tabla 4). La producción de compuestos indólicos de SRGM3 es comparable con las reportadas por Perrig *et al.* (2007), quienes registraron 2,9 μg/mL de

AIA, por la cepa Az39 (recomendada para maíz y trigo en Argentina), lo cual indica que esta es una concentración que permite la promoción del crecimiento de las plantas, teniendo en cuenta que estas cepas han sido evaluadas en gramíneas y seleccionadas por sus óptimos resultados. Las demás cepas presentaron valores entre 23,15 y 45,18 $\mu\text{g/mL}$ de AIA, los cuales oscilan entre aquellos que han registrado diferentes cepas de *A. amazonense* aisladas de raíces de *Brachiaria* spp. en Brasil, con 6,13 a 19,27 $\mu\text{g/mL}$ de AIA (Reis Junior *et al.* 2004), *A. brasilense* (Cd) y *A. lipoferum* (Br17) productoras de 58,71 y 63,49 $\mu\text{g/mL}$ de AIA (Radwan *et al.* 2005), y aislamientos de *Azospirillum* spp. de plantas de maíz en Méjico con valores de hasta de 49,65 $\mu\text{g/mL}$ de AIA (Carcaño-Montiel *et al.* 2006).

Algunos estudios han demostrado la variación cuantitativa de esta actividad biofertilizante en cada cepa evaluada, teniendo en cuenta la diversidad genética que presentan en cuanto a su capacidad de utilizar algunas fuentes de C y N, la presencia de triptófano como precursor de los compuestos indólicos, de sus rutas metabólicas y la actividad enzimática reguladas por diferentes genes que pueden expresarse por las condiciones de su ambiente natural (Radwan *et al.*, 2004; Carcaño-Montiel *et al.*, 2006), las cuales variaron de acuerdo con la zona muestreada, el estrato de la planta y la época climática.

En muchos reportes, *Azospirillum* es considerado el género bacteriano más importante para el mejoramiento del crecimiento de las plantas o el rendimiento de los cultivos en diferentes países (Perrig *et al.*, 2007), especialmente por su alta producción de reguladores de crecimiento vegetal (Radwan *et al.*, 2004) como las auxinas, varias giberelinas y citoquininas (Bashan *et al.*, citados por Perrig *et al.*, 2007), y el ácido 3-indolacético (AIA) es la principal fitohormona producida por *Azospirillum* (Radwan *et al.*, 2004). El AIA es una auxina conocida por estimular respuestas rápidas en el crecimiento, el incremento en la elongación celular, la división celular y su diferenciación (Cassán *et al.*, 2008).

Análisis de los agrupamientos para la selección de las cepas con potencial biofertilizante. El dendograma de la interacción de las medianas de producción de compuestos indólicos y la actividad fijadora de nitrógeno, mostró dos grupos separados por más del 25% de distancia (fig. 2). Las cepas Sp7, SRGM3 y SRGM4 formaron el grupo I, con un 7% de distancia entre sus medianas. En el grupo II se formaron dos subgrupos, donde HGF1, HGF3, RGM1, RGM3 y RGM6 presentaron 2% de distancia y, a su vez, este mismo subgrupo (IIA) presentó 7% de distancia de la cepa SRGM2, conformando el subgrupo IIB. Este análisis de clasificación jerárquica permitió seleccionar los aislamientos del grupo I como las cepas con mayor actividad biofertilizante en condiciones *in vitro*. Por esta razón, se seleccionaron las cepas SRGM3, SRGM4 y la cepa SRGM2 por su cercanía al grupo I, donde se agrupó Sp7 (*A. brasilense*).

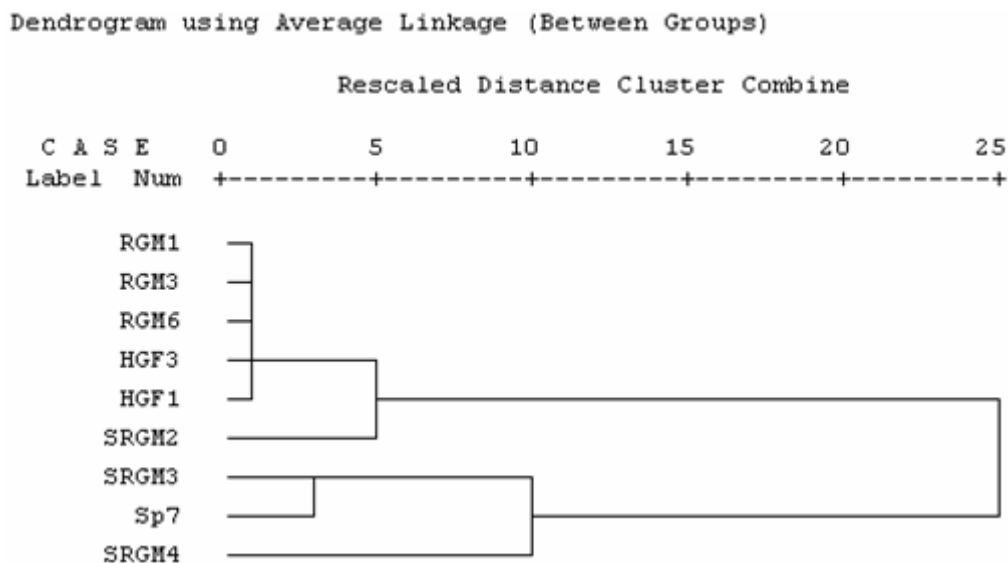


Fig. 2. Dendrograma de las actividades biofertilizantes por los aislamientos de *Azospirillum* spp.

Fig. 2. Dendrogram of the biofertilizer activities by the *Azospirillum* spp. isolations.

Identificación genética de los aislamientos de *Azospirillum* spp. El análisis primario de la similitud entre las secuencias de los nucleótidos obtenidos y los depositados en la base de datos del GenBank utilizando el análisis BLAST, mostró que los aislamientos pertenecen a la subclase alfa proteobacterias de la familia *Rhodospirillaceae* y están fuertemente relacionados con el género *Azospirillum* por presentar hasta un 94% de similitud (tabla 5).

Tabla 5. Identificación por el gen 16S rRNA de las tres cepas seleccionadas con potencial biofertilizante.

Table 5. Identification by the gen 16S rRNA of the three selected strains with biofertilizer potential.

Aislamiento	16S rRNA	Número de acceso	Valor E	Similitud %
SRGM2	<i>Azospirillum</i> sp.	EF100149 <i>Azospirillum lipoferum</i> cepa ICMP 8672	0,0	93
SRGM3	<i>Azospirillum</i> sp.	EF100149 <i>Azospirillum lipoferum</i> cepa ICMP 8672	0,0	93
SRGM4	<i>Azospirillum</i> sp.	DQ288687 <i>Azospirillum brasilense</i> cepa MTCC4036	0,0	94

Las cepas SRGM2 y SRGM3 presentaron un 93% de similitud con *A. lipoferum* y la SRGM4 un 94% de similitud con *A. brasilense*.

Conclusiones

No se encontraron variaciones en el tamaño de la población de *Azospirillum* por efecto de las épocas climáticas, lo que permite inferir que tolera condiciones de estrés hídrico.

Se obtuvieron 184 aislamientos de las muestras de suelo, las raíces, las hojas y los tallos del pasto guinea, de los cuales 16 fueron caracterizados fenotípicamente como del género *Azospirillum* y se seleccionaron ocho por su similitud con el género en estudio.

Se seleccionaron tres cepas promisorias para ser utilizadas como biofertilizante, por su alta fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético, se identificaron molecularmente y se encontraron semejanzas con *A. lipoferum* y *A. brasilense*, según la base de datos del GenBank.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Microbiología de Suelos y a la Estación Experimental Motilonia de CORPOICA, por su colaboración y apoyo económico a través del proyecto financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, la Federación Colombiana de Ganaderos –FEDEGAN- y la Gobernación del Departamento del Cesar.

Referencias bibliográficas

- Brasil, M.S. *et al.* 2005. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. *R. Bras. Ci. Solo.* 29:179
- Brasil, M.S. *et al.* 2006. Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal. Bolsista de Pós-Graduação da UFRRJ, em Seropédica-RJ.
- Carcaño-Montiel, M.G. *et al.* 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana.* 24 (4):493
- Cassán, R. *et al.* 2008. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. (F.F. Cassán and I. García de Salamone, Eds.). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. p. 61
- Cordero, J. *et al.* 2008. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp. bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 10 (1):111
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. 2006. Manual de procedimientos técnicos. Laboratorio de control de calidad de inoculantes. Versión 02, p. 14
- Cuesta-Muñoz, P.A. *et al.* 2005. Estrategias de manejo de praderas para mejorar la productividad de la ganadería en las regiones Caribe y Valles Interandinos. Manual técnico: Producción y utilización de recursos forrajeros en sistemas de producción bovina de las regiones Caribe y Valles interandinos. Corpoica, Colombia. 24 p.
- Döbereiner, J. *et al.* 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. EMBRAPA-SPI, Brazil
- Eckert, B. *et al.* 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51:17
- Edwards, U. *et al.* 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17:7843
- Gamarra, J.R. 2005. La economía del Cesar después del algodón. En: Documentos de trabajo sobre economía regional. No. 59. Banco de la República, Centro de Estudios Regionales (CEER). Cartagena, Colombia. 116 p.
- Joe, M.M. *et al.* 2009. Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect of physical and chemical factors and stress endurance ability. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 40:491
- Kuss, A.V. 2006. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Brazil
- Kuss, A.V. *et al.* 2007. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesq. Agropec. Brás.* 42 (10):1459

- Mehnaz, S. & Lazarovits, G. 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*. 51:326
- Osorio, N.W. 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 60 (1):3621
- Perrig, D. *et al.* 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (5):955
- Radwan, T.E.E. *et al.* 2004. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesq. Agropec. Brás.* 39 (10):987
- Radwan, T.E.E. *et al.* 2005. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. *Pesq. Agropec. Bras.* 40 (10):997
- Reis Junior, R.B. *et al.* 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
- Rodríguez-Cáceres, E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:990
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:487
- Weisburg, W.G. *et al.* 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173:697

Recibido el 16 de marzo del 2009

Aceptado el 15 de marzo del 2010

Isolation and identification of *Azospirillum* sp. in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) of the Valle del Cesar

Abstract

The effect of environmental factors of the Valle del Cesar and the agronomic management of Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.), on the bacterial population of the *Azospirillum* genus in semisolid NFB and LGI culture media was evaluated, for which an experimental design was used in divided plots with a 2 (climatic seasons: rainy and dry) x 2 (agronomic managements: agroecological and extractive) x 3 (analyzed samples: rhizospheric soil, roots and leaves) factorial arrangement. The results did not reveal significant statistical differences, which indicates that this bacterium can maintain its population under stress conditions by different physiological mechanisms. From these samples 16 isolations were obtained belonging to the *Azospirillum* genus in which their acetylene-reduction activity was evaluated as indicator of biological nitrogen fixation and their capacity in the production of indolic compounds as plant growth promoters. The strains SRGM2, SRGM3 and SRGM4, obtained from rhizospheric soil samples of Guinea grass of the Experimental Station Motilonia of Corpoica, Agustín Codazzi municipality, Cesar department, were selected. These isolations were molecularly characterized by the gen 16S rRNA and according to the BLAST analysis in the GenBank database and showed 93% similarity with *A. lipoferum* (SRGM2 and SRGM3) and 94% with *A. brasilense* (SRGM4).

Key words: Growth, nitrogen fixation, *Azospirillum* sp.

Introduction

Cesar is one of the main livestock production departments of the Colombian Caribbean region and constitutes an important milk-producing region (Gamarra, 2005). Its soils are derived from well-drained sedimentary materials and the pH is close to neutrality; they have low organic matter levels, high Ca contents and low levels of Mg, K and minor elements; its texture varies from loamy to loamy-clayey. Forage species are cultivated on them, among which Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) reaches high productivity in dry matter, around 12 to 18 t/ha (Cuesta-Muñoz *et al.*, 2005). However, these soils show physical, chemical and biological deterioration, which severely affects their productive capacity and compromises the economic viability of livestock production systems. The above-expressed is caused, among other factors, by the indiscriminate use of chemical fertilizers, mainly as source of N, which plays an important role (together with P and K), for plant growth (Osorio, 2007; Cordero *et al.*, 2008). Biological nitrogen fixation done only by bacteria is an environmentally and economically viable alternative, to supply the inclusion of N sources of synthetic origin, because molecular nitrogen (N_2) is the only inexhaustible reserve in the biosphere.

In the rhizosphere of tropical and subtropical pastures there are N_2 -fixing microorganisms; diverse studies have proven that there is high specificity of the isolations obtained from different grass roots, with regards to the diazotrophic species found, that is, root exudates, soil pH and other characteristics of the plant species and the soil could influence the presence of some genera of biological fixatives (Reis Junior *et al.*, 2004; Radwan *et al.*, 2005). Studies for more than 20 years indicate that the bacteria from the *Azospirillum* genus have special affinity for grass roots (Brasil *et al.*, 2005), as in the case of the pastures that respond with increases in their growth and yield when they are inoculated with *Azospirillum* spp. The secretion of plant growth-promoting substances (such as auxins, gibberellins and cytoquinines) by *Azospirillum*, seems to be partially involved in this effect (Reis Junior *et al.*, Radwan *et al.*, 2005; Kuss *et al.*, 2007).

Taking into consideration that in Colombia there is not any record of the evaluation of populations of this bacterium associated to pastures until now, the objective of this work was to

begin the study of native *Azospirillum* strains in Guinea grass in Valle del Cesar, as the first step towards the search for isolations with biofertilizer potential.

Materials and Methods

Determination of the effect of the rainy and dry seasons on the Azospirillum populations in Guinea grass. Samples were taken from the rhizospheric soil and the whole Guinea grass plant in the rainy season in September, 2006 (158,6 mm rainfall and 28,1°C temperature) and in the dry season in February, 2007 (0 mm rainfall and 31°C temperature). Both selected sites show contrasting conditions regarding soil management. At the E.S. Motilonia agronomic practices are developed such as the incorporation of organic matter to the soil, planting planning and rational grazing; at the Fernambuco farm overgrazing and intensive laboring of the soil are practiced.

The rhizospheric soil was obtained by removing it from the roots, from which dilutions up to 10^{-6} were made in saline solution at 0,85% of NaCl. Of each dilution 0,1 mL were inoculated in three vials of NFb and LGI semisolid medium, for the recount of *Azospirillum* spp. and *Azospirillum amazonense*, respectively (Döbereiner *et al.*, 1995). The pasture roots were washed and cut into 1 cm-fragments and were disinfected with 70° alcohol for 1 min; they were later submerged in sodium hypochlorite at 2% for 2 min and were rinsed twice successively in sterile water. One gram of these roots was weighed and they were macerated in 9 mL of sterile saline solution (0,85% NaCl). The leaves and stems were washed with distilled water and dried. One gram of this plant material was weighed cut in 2 cm-fragments, they were disinfected with 70° alcohol and macerated in 9 mL sterile saline solution (0,85% NaCl). Seriated dilutions were made up to 10^{-6} from these macerates and they were inoculated in the same way as the rhizospheric soil sample. The inoculated vials were incubated for 5 days at 32°C until the formation of a subsurface film as indicator of positive growth.

The population was quantified through the Most Likely Number method for three tubes, applying McCrady's table (Döbereiner *et al.*, 1995). Three repetitions were made and a variance analysis was done according to the experimental design in divided plots with 2 (climatic seasons) x 2 (agronomic managements) x 3 (analyzed samples) factorial arrangement; Duncan's comparison test at 5% probability was used, with the statistical program SAS version 9.1.3.

Isolation and phenotypical identification of Azospirillum spp. The vials of the higher dilutions with positive growth were selected and replicated in a new semisolid medium. From this film the isolation was done in Congo Red agar dishes to select scarlet red colonies (Rodríguez-Cáceres, 1982) and in Batata agar to select pink, small and structured colonies, after a week of incubation at 32°C (Döbereiner *et al.*, 1995). The bacterial cells were observed under a microscope with 1000x magnification and a smear was done in distilled water to describe the shape and movement of the cells. The characteristics of spiral mobility, growth in Batata and Congo Red agar, were compared to the reference strains *Azospirillum brasilense* (Sp7) and *Azospirillum lipoferum* (Y2). Their similarities were estimated through the JACCARD coefficient and were grouped by the analysis between groups to make a dendrogram, using the program SPSS 10.0 for Windows.

Selection of the Azospirillum spp. strains with biofertilizer potential. The presumptive isolations for the *Azospirillum* genus were evaluated according to the activity of the nitrogenase enzyme and the production of plant growth-promoting indolic substances. The strains were replicated in Congo Red agar and cellular suspensions were obtained adjusted to a cell concentration of 1×10^7 UFC/mL; 30 mL of 2% DYGS broth were inoculated and it was taken to incubation during 48 hours at 32°C and 120 rpm. The obtained biomass was centrifuged at 8 000 rpm during 10 minutes. The supernatant was discarded and the cells were suspended in 30 mL of sterile phosphate buffer 0,06M and pH 7.0. From this cell suspension 100 µL were taken and inoculated in 50 mL of NFb broth without Bromothymol blue and vitamin solution, with a concentration of 200 µM of tryptophan as precursor of indoleacetic acid and 0,2 g/L of NH_4Cl as

source of N. It was incubated in the dark during 48 hours, 120 rpm and 32°C (Radwan *et al.*, 2004). Ten mL of the culture were centrifuged at 8 000 rpm for 10 minutes and 2 mL of the supernatant were taken, to which 8 mL of Salkowsky reagent were added. The sample absorbance reading was made at 535 nm in spectrophotometer Spectronic 601 Milton Roy. The concentration of indolic compounds was calculated using the equation $Y=0,0033X-0,0311$ ($R^2=0,9855$) where, Y=Absorbance of the sample at 535 nm and X= μ M of indoleacetic acid (IAA). This equation was obtained with the lineal regression of the calibration curve in different concentrations of IAA (25, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 μ M) with the addition of the Salkowsky reagent (Kuss *et al.*, 2007).

For quantifying the *in vitro* biological nitrogen fixation the acetylene reduction method was used. The isolations were inoculated in 10 mL-flasks with 3 mL of semisolid medium (Nfb or LGI) and were incubated for 24 hours at 32°C. Afterwards, the stopper was replaced by a rubber one, sealing it hermetically, 10% of its atmosphere was substituted by acetylene and it was incubated during 1 hour at 32°C. The ethylene was measured injecting 1 mL of the atmosphere of the culture flask in a Perkin Elmer gas chromatograph with flame ionization detector and a Poropak column N 200/300 mesh of 6 feet and 3 mm diameter. The acetylene reduction activity for each isolate was calculated according to the height of the ethylene peak in the chromatogram, extrapolating in the equation $\text{Log}_{10} Y = 0,808 \text{Log}_{10} X + 9,7$ ($R^2 = 0,997$), obtained from the lineal regression of a calibration curve in ethylene concentrations of 1, 1:10, 1:100, 1:1000 and 1:10 000, under the same conditions as the chromatograph (Corpoica, 2006). The production of indolic compounds and the biological nitrogen fixation were compared, and their similarities were estimated according to the Euclidian distance. Afterwards, they were grouped by the median method and graphically represented in a dendrogram, using the program SPSS 10.0 for Windows.

Identification of the Azospirillum spp. isolations by analyzing the gen 16S rrna. The selected strains were cultivated in LB broth for 14 hours at 150 rpm and 30°C; 25 μ L were taken and kept in thermostated bath during 15 minutes. Afterwards, it was centrifuged at 13 000 rpm for 1 min. The supernatant was discarded and the precipitate was re-suspended in 1 mL of sterile Milli-Q water. The amplification of the 16S rRNA region was done in 25 μ L of a Buffer reaction mixture (1x), MgSO_4 (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), Primer 27F (Edwards *et al.*, 1989) and 1492R (0,2 mM) (Weisburg *et al.*, 1991), 0,25 μ L of Taq DNA Polimerase and 1,5 μ L of DNA mold (isolation sample). The conditions of the thermocycler were: an initial cycle of denaturation (94°C for 5 min), 50 denaturation cycles (94°C for 30 sec), ringing (66°C for 30 sec) and extension (72°C for 1 min) and three cycles of final extension (72°C for 10 min). The amplified fragments were observed by means of agarose gel electrophoresis at 0,8% in TAE conditioned with 0,5 μ g/mL of ethidium bromide, to visualize the resulting strips. The amplified DNA was purified using QIAquick PCP Purification Kit Protocol of QIAquick® Spin Handbook of QUIAGEN, it was quantified in a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 and it was analyzed in the program ND-10 00 V.3.3.0 at a wavelength of 260 nm. The amplified product was sequenced in an ABI PRISM Genetic Analyzer, which makes the automatic sequentiation of DNA fragments marked with fluorochromes. The result was analyzed through BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi.

Results and Discussion

Effect of the season and agronomic management of Guinea grass on Azospirillum populations. According to the variance analysis, the recount of the *Azospirillum* population did not show significant differences according to the season and the agronomic management of Guinea grass. However, this population tended to be higher in the rainy season under an agroecological management of Guinea grass at the E.S. Motilonia as compared to the dry season in the two localities, which shows the influence of environmental factors on the bacterial population (table 1).

Brasil *et al.* (2005) reported a decrease of the number of diazotrophic bacteria in the root and soil of the grasses *Axonopus purusii*, *Elyonurus muticus* and *Brachiaria humidicola*, in the dry season. On the other hand, Reis Junior *et al.* (2004) obtained *A. amazonense* populations of 5,81 log units in roots of *Brachiaria* spp. in the winter, statistically different from 3,67 log units in the dry season in a tropical zone with dry season in winter. Yet, when they evaluated the *A. amazonense* population in a tropical zone without dry season they did not found significant differences.

Although a decrease in the *Azospirillum* spp. population in the dry season was observed, these bacteria can survive due to their physiological characteristics, because they show high capacity to change their metabolic activity, when the soil environmental conditions vary, mainly the availability of water, carbon and nitrogen and oxygen tension. Thus, the *Azospirillum* species can use ammonium, nitrate, nitrite, aminoacids and molecular nitrogen as nitrogen source (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000) and, under unfavorable conditions, such as drought and nutrient limitation, they can experience certain morphological and biochemical changes to form structures similar to cysts which allow them to survive under adverse physical conditions, particularly desiccation (Sadasivan and Neyra, cited by Joe *et al.*, 2009).

On the other hand, when the *Azospirillum* spp. populations were compared in the rhizospheric soil, roots and leaves of Guinea grass in Nfb and LGI medium, significant differences were recorded ($P < 0,05$) with regards to these three studied samples. The recount of cells in the leaves was observed to show the highest population value, followed by the roots and rhizospheric soil (table 2).

These results are similar to the ones reported by Brasil *et al.* (2005) in three grasses, who observed a higher number of bacteria in the leaves, in the Nfb medium, and statistically similar values in LGI medium. The presence of bacteria in all the structures of the plant has been described in diverse studies, because although it is considered a rhizobacteria and colonizes mainly the elongation zone of the root hairs, it has also been found within the roots and the aerial part of several plant species (Brasil *et al.*, 2005; Brasil *et al.*, 2006; Kuss, 2006). Probably all *Azospirillum* species can develop this colonization mechanism and that is why they have been found in higher number colonizing the roots, located in the mucigel or penetrating the cortical cells of the root of different plants. Yet, the *Azospirillum* species have specific mechanisms to interact with the roots and colonize their interior, and even penetrate progressively the leaf tissue, through the cellulolytic and pectinolytic enzymatic activity, invading the intercellular spaces and even being translocated through the vascular vessels towards the stem and leaves (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000).

Phenotypical characterization of the obtained isolations. Sixteen isolations of the *Azospirillum* genus were selected according to the phenotypical characteristics, which were obtained from the rhizospheric soil, root and leaf samples of the pasture cultivated in the E.S. Motilonia of Corpoica and the Femambuco farm (table 3).

Figure 1 shows the dendrogram according to the similarity matrix and an analysis between groups of the 16 isolations, with the reference strains SP7 (*A. lipoferum*) and Y2 (*A. brasilense*). Three groups were obtained with different distance values among them. Group I showed four isolations very close to strains Sp7 and Y2. Group II showed four isolations, but it was distant in 20% from group I. Finally, number III included eight isolations and formed an independent group with 25% distance from the first ones (I and II).

This first grouping allowed selecting eight isolations with a maximum of 20% distance with regards to strain Sp7 and Y2. The selected isolations were HGF3, SRGM4, SRGM3, SGRM2, RGM1, RGM3, RGM6 and HGF1, which were analyzed according to their nitrogen fixing activity and indoleacetic acid synthesis.

Selection of Azospirillum isolations with biofertilizer potential. Although it was originally suggested that the action mechanism of *Azospirillum* to promote plant growth was its ability to fix atmospheric nitrogen, at present alternative mechanisms have been proposed, such as the

production of plant growth regulators or phytohormones (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006). For such reason, the selection of *Azospirillum* strains was done taking into consideration their nitrogen fixation activity and the production capacity of indolic compounds, among which statistical differences were observed for all the evaluated isolations (table 4).

Nitrogenase activity of the different isolations. The strain Sp7 (*A. brasilense*) recorded the highest value of acetylene reduction, with 845,6 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹. Regarding the native isolations, the strain SRGM2 showed an acetylene reduction activity of 10,72 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, similar to the one reported for the isolations of *A. lipoferum* N7 and *A. brasilense* N8 with a nitrogenase activity of 6,6 and 7,95 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, respectively (Mehnaz and Lazarovits, 2006). SRGM3, according to its acetylene reduction activity of 44,69 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, was similar to the *Azospirillum* strains isolated from wild corn (Teocintle) with nitrogenase activity of up to 46,44 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006). On the other hand, SRGM4 was more efficient with a value of 123,70 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, similar to the report for the strain *Azospirillum doebereineriae* isolated from *Miscanthus sinensis* cv. Giganteus, which showed a value of 100 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ for acetylene reduction (Eckert *et al.*, 2001). The other isolations showed ARA values lower than 1 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, similar to the *A. brasilense* strains Cd and Az39 with 0,162 and 0,1 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, respectively (Perrig *et al.*, 2007).

Although a variation was observed in the enzymatic activity of the biological nitrogen fixation, it could be proven that *Azospirillum* is an important genus associated to tropical grasses, capable of reducing the atmospheric nitrogen in ammonium under microaerophilic conditions, through the activity of the nitrogenase complex, which has an iron-molybdenum cofactor, which is the reduction site of N₂, and of the protein reductase dinitrogenase which transfer electrons from an electron donor to the protein nitrogenase (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000).

Production of indolic hormones. When the production of indolic compounds was quantified according to the studied isolations, the strain RGM1 had a production of 45,18 µg/mL of IAA, followed by SRGM2 with 43,27 µg/mL of IAA, which represent the highest values and Sp7 (*A. brasilense*) which recorded 40,170 µg/mL of IAA. The isolations SRGM4, RGM3, RGM6, HGF1 and HGF3 produced between 38,12 and 23,15 µg/mL of IAA and the strain SRGM3 showed the lowest value, 3,46 µg/mL of IAA (table 4). The production of indolic compounds of SRGM3 is comparable to the ones reported by Perrig *et al.* (2007), who recorded 2,9 µg/mL of IAA for the strain Az39 (recommended for corn and wheat in Argentina), which indicates that this a concentration that allows plant growth promotion, taking into consideration that these strains have been evaluated in grasses and selected for their optimum results. The other strains showed values between 23,15 and 45,18 µg/mL of IAA, which oscillate between those that have been recorded by different strains of *A. amazonense* isolated from roots of *Brachiaria* spp. in Brazil, with 6,13 to 19,27 µg/mL of IAA (Reis Junior *et al.*, 2004), *A. brasilense* (Cd) and *A. lipoferum* (Br17), producing 58,71 and 63,49 µg/mL of IAA (Radwan *et al.*, 2005), and isolations of *Azospirillum* spp. from corn plants in Mexico with values up to 49,65 µg/mL of IAA (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006).

Some studies have shown the quantitative variation of this biofertilizer activity in each evaluated strain, taking into consideration the genetic diversity they present regarding their ability to use some C and N sources, the presence of tryptophan as precursor of the indolic compounds, of their metabolic routes and the enzymatic activity regulated by different genes that can be expressed by the conditions of their natural environment (Radwan *et al.*, 2004; Carcaño-Montiel *et al.*, 2006), which varied according to the sampled zone, the plant stratum and the season.

In many reports, *Azospirillum* is considered the most important bacterial genus for crop growth or yield improvement in different countries (Perrig *et al.*, 2007), especially for its high production of plant growth regulators (Radwan *et al.*, 2004) such as auxins, several gibberellins and cytokinins (Bashan *et al.* cited by Perrig *et al.*, 2007), and 3-indoleacetic acid (IAA) is the main phytohormone produced by *Azospirillum* (Radwan *et al.*, 2004). IAA is an auxin known for stimulating fast responses in growth, increase of cell elongation, cell division and their differentiation (Cassán *et al.*, 2008).

Analysis of the groupings for the selection of the strains with biofertilizer potential. The dendrogram of the interaction of the medians of indolic compound production and the nitrogen fixing activity, showed two groups separated by more than 25% distance (fig. 2). The strains Sp7, SRGM3 and SRGM4 formed group 1, with 7% distance among its medians. In group II two subgroups were formed, where HGF1, HGF3, RGM1, RGM3 and RGM6 showed 2% distance and, in turn, this same subgroup (IIA) showed 7% distance from the strain SRGM2, forming subgroup IIB. This analysis of hierarchical classification allowed to select the isolations of group I as the strains of higher biofertilizer activity under *in vitro* conditions. For such reason, the strains SRGM3, SRGM4 and the strain SRGM2 were selected for their closeness to group I, where Sp7 (*A. brasilense*) was grouped.

Genetic identification of the *Azospirillum* spp. isolations. The primary analysis of similarity among the sequences of the obtained nucleotides and the ones deposited in the GenBank database using the BLAST analysis, showed that the isolations belong to the alpha subclass proteobacteria of the Rhodospirillaceae family and are strongly related to the *Azospirillum* genus for presenting up to 94% similarity (table 5).

The strains SGRM2 and SGRM3 showed 93% similarity with *A. lipoferum* and SRGM4 94% similarity with *A. brasilense*.

Conclusions

No variations were found in the size of the *Azospirillum* population due to the season, which allows inferring that it tolerates hydric stress conditions.

From the soil, root, leaf and stem samples of Guinea grass 184 isolations were obtained, from which 16 were phenotypically characterized as belonging to the *Azospirillum* genus and eight were selected for their similarity with the studied genus.

Three promising strains were selected to be used as biofertilizer, because of their high nitrogen fixation and production of indoleacetic acid, they were molecularly identified and similarities were found with *A. lipoferum* and *A. brasilense*, according to the GenBank database.

Acknowledgements

To the Soil Microbiology Laboratory and the Experimental Station Motilonia of CORPOICA, for their collaboration and economic support through the project financed by the Ministry of Agriculture and Rural Development of the Republic of Colombia, the Colombian Federation of Livestock Raisers – FEDEGAN – and the Government of the Cesar Department.