

IDENTIFICACION DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS RIZOSFÉRICAS Y ENDÓFITAS ASOCIADAS A *Lycopersicon esculentum* Mill EN EL NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA

IDENTIFICATION OF RHIZOSPHERIC AND ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA ASSOCIATED TO *Lycopersicon esculentum* Mill FROM THE NORTE OF SANTANDER, COLOMBIA

Laura Y. Moreno-Rozo¹, Fabián Galvis-Serrano^{2*}

¹Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas MAJUMBA. Universidad Francisco de Paula Santander, Sede Cúcuta, Colombia. (laurayolimamr@ufps.edu.co). ²Grupo de Investigación Biogen. Universidad de Santander, Sede Cúcuta. Colombia. (fsg999@hotmail.com).

RESUMEN

Las bacterias diazotróficas pueden estimular el crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mediante la síntesis de hormonas, fijación de N y producción de sideróforos, u otros procesos. Las bacterias diazotróficas predominantes en los agroecosistemas pueden ser biofertilizantes potenciales. El objetivo del estudio fue cuantificar y caracterizar la población de bacterias diazotróficas rizosféricas en muestras de suelo rizosférico (SR) y bacterias diazotróficas endófitas en muestras de raíces (R) y material foliar (MF), mediante pruebas fenotípicas y moleculares. El estudio fue exploratorio y con un muestreo aleatorio, con 18 muestras SR, raíces (R) y MF de cultivos de tomate en seis fincas. Las diferencias en el número más probable (NMP) de bacterias diazotróficas no fueron significativas entre los sitios de las muestras de MF y R. La media de NFB mostró diferencias altamente significativas en *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. entre las muestras de SR, R y MF, con un NMP mayor y menor en SR y MF. Esto se relaciona con la caracterización fenotípica y bioquímica de SR donde se identificaron 14 aislados como *Azotobacter* sp. y siete como *Azospirillum* sp. Los géneros *Burkholderia* y *Gluconacetobacter* no mostraron diferencias significativas en el número de aislados entre muestras de SR y R, pero sí respecto a MF, con la población celular menor. Las diferencias entre las fincas no fueron significativas en las variables del suelo relacionadas con la disimilitud de NMP. La caracterización molecular permitió identificar *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. brasilense*, *B. glumae* y *G. azotocaptans*/*G. johannae* en muestras de SR; *B. glumae*, *G. azotocaptans*/*G. johannae* en muestras de R y *G. azotocaptans*/*G. johannae* en muestras de MF.

ABSTRACT

Diazotrophic bacteria can stimulate the growth of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) crop by hormone synthesis, with N fixation and the production of siderophores, or other processes. The predominant diazotrophic bacteria in agroecosystems may be potential biofertilizers. The aim of this study was to quantify and characterize the population of rhizospheric diazotrophic bacteria in samples of rhizospheric soil (RS) and endophytic diazotrophic bacteria in root (R) and foliar material (FM) samples, with phenotypical and molecular tests. The study was exploratory and with random sampling, with 18 RS, roots (R) and FM samples of tomato plantations in six farms. The differences in the most probable number (MPN) of diazotrophic bacteria were not significant between the FM and R sampling sites. The mean of the Mfb displayed highly significant differences in *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. between the RS, R and FM samples, with a higher and lower MPN in RS and FM. This relates with the phenotypical and biochemical characterization of RS, in which 14 isolations were identified as *Azotobacter* sp., and seven as *Azospirillum* sp. The genera *Burkholderia* and *Gluconacetobacter* showed no significant differences in the number of isolations between RS and R samples, but they did with FM, with the lower cell population. The differences between the farms were not significant in the soil parameters, related to the dissimilarity of the MPN. Molecular characterization helped identify *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. brasilense*, *B. glumae* and *G. azotocaptans*/*G. johannae* in samples of RS; *B. glumae*, *G. azotocaptans*/*G. johannae* in samples of R and *G. azotocaptans*/*G. johannae* in FM samples.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2018. Aprobado: noviembre, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 843-857. 2020.

Key words: Diazotrophic, endophytic, rhizospheric, *Lycopersicon esculentum*, North Santander.

Palabras claves: diazotróficas, endófitas, rizosféricas, *Lycopersicon esculentum* Norte de Santander.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es la segunda hortaliza más importante en el mundo después de la papa (*Solanum tuberosum* L.) (Pérez *et al.*, 2015). Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística, en Colombia, el área sembrada con cultivos transitorios y permanentes aumentó 5.7 y 0.2% durante 2015 respecto a 2014 (DANE, 2016). De las 2 332 577 ha, 65.6% correspondió a cultivos permanentes y 34.4% a cultivos transitorios. La producción agrícola incrementó 0.3%, equivalente a 34 231 t más que en 2014. Del total de la producción agrícola de 2015, 49.3% correspondió a cultivos transitorios y 50.7% a permanentes; la disminución mayor en área sembrada correspondió a tomate, con 1875 ha menos que en 2014 (DANE, 2016). El municipio de Chinácota concentra la producción mayor de hortalizas de la zona sur-oriente del departamento Norte de Santander.

El tomate es una planta que demanda gran cantidad de N, P, K, Ca, Mg, Cu, B y Zn. La relación de fertilización N:K es 1:1 desde el trasplante hasta la floración y al inicio del llenado y la maduración de los frutos la demanda de K incrementa a 1:2 o 1:3. La fertilización se recomienda desde el trasplante hasta la formación del último racimo a cosechar, consistente de 200 g de N, P y K por planta (DANE, 2014). La mayoría de los cultivos agrícolas en el departamento Norte de Santander dependen de fertilizantes químicos sintéticos; sin embargo, su uso prolongado causa aumentos en los costos de producción, contaminación ambiental, daños ecológicos, e impacto negativo en la salud animal y humana (Flores *et al.*, 2012). La tendencia mundial demanda tecnologías que contribuyan con la recuperación y mantenimiento del suelo mediante estrategias de economías viables que mejoren su calidad y productividad. Las bacterias diazotróficas en la rizósfera estimulan el crecimiento de las plantas mediante mecanismos como síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, fijación del N, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y control de fitopatógenos del suelo. *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. promueven el crecimiento en cultivos

INTRODUCTION

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is the world's second most important vegetable after the potato (*Solanum tuberosum* L.) (Pérez *et al.*, 2015). According to the National Statistics Administration Department, in Colombia, the area planted with provisional and permanent crops increased 5.7 and 0.2% during 2015 in comparison with 2014 (DANE, 2016). Out of the 2,332,577 ha., 65.6% were used for permanent crops and 34.4% for provisional crops. Agricultural production increased 0.3%, equal to 34 231 t more than in 2014. Out of the total of the agricultural production of 2015, 49.3% was provisional crops, and 50.7%, permanent; the greater distribution in planted areas was of tomatoes, with 1875 ha less than in 2014 (DANE, 2016). The municipal area of Chinácota concentrates the highest production of vegetables in the southeastern area of the department of Norte de Santander.

The tomato plant demands a great amount of N, P, K, Ca, Mg, Cu, B and Zn. The N:K fertilization ratio is 1:1 from grafting until flowering and at the beginning of the filling and maturation of the fruits, the demand for K increases to 1:2 or 1:3. Fertilization is recommended between transplanting and the formation of the last bunch to be harvested, and to consist of 200 g of N, P and K per plant (DANE, 2014). Most agricultural crops in the department of Norte de Santander depend on synthetic chemical fertilizers; however, its prolonged use causes increases in production costs, environmental contamination, ecological damage and a negative impact on human and animal health (Flores *et al.*, 2012). World tendencies demand technologies that contribute with the recovery and the maintenance of soils with viable economy strategies that improve their quality and productivity. The diazotrophic bacteria in the rhizosphere stimulate plant growth with mechanisms such as the synthesis of plant growth regulators, N fixation, nutrient solubilization, siderophore production and the control of soil phytopathogens. *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. promote growth in agricultural crops, due to their ability to adapt, colonize and persist in the plant rhizosphere (Moreno and Galvis, 2013). Endophytic bacteria are organisms that reside in plant tissues, in intracellular spaces and inside

agricolas, por su capacidad de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta (Moreno y Galvis, 2013). Las bacterias endófitas son organismos que residen en los tejidos de las plantas, en espacios intercelulares y dentro de tejidos vasculares (Barraza *et al.*, 2017). Estas bacterias fijan N y fósforo, y actúan como biocontroladores y promotores de la fitoremediación (Doncel *et al.*, 2016).

Las especies de bacterias diazotróficas predominantes en los agroecosistemas son importantes (Alfonso *et al.*, 2005) en los sistemas de producción de *L. esculentum* Mill. En esos sistemas es común el uso de agroquímicos sintéticos y es necesario definir la eficiencia de biofertilizantes potenciales para aumentar las alternativas en el desarrollo de una agricultura sustentable y con producción a bajo costo (Guzmán *et al.*, 2012). El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar las bacterias diazotróficas rizosféricas de muestras de suelo de la rizósfera y bacterias diazotróficas endófitas de muestras de material foliar y raíces, asociadas a cultivos de tomate de diferentes fincas, ubicadas en la principal zona de producción de hortalizas en el sur oriente del departamento Norte de Santander. Lo anterior permitirá conocer las principales bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas en el cultivo del tomate en la mayor zona de producción del departamento Norte de Santander, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Un muestreo aleatorio en diagonal se realizó para obtener muestras de suelo rizosférico (SR), material foliar (MF) y raíces (R) de cultivos de tomate, en seis fincas del municipio de Chinácota, zona sur oriental de Norte de Santander (7° 31' 00" N y 72° 37' 00" O, 21 °C promedio, 1200 mm precipitación anual promedio y 900 y 1800 msnm). En cada finca se obtuvo una muestra compuesta de SR, MF y R (18 muestras en total). Las muestras SR se formaron con cuatro submuestras, extraídas de 5 a 10 cm de profundidad (Martyniuk y Martyniuk, 2002; Tejera *et al.*, 2005). Las muestras MF y R incluyeron 10 a 15 plantas por cultivo; las muestras R incluyeron cortes con longitud aproximada de 10 cm de todo el sistema radical. En las muestras de suelo se determinó pH, conductividad eléctrica, textura, Mg, Ca, K, P, materia orgánica relación Ca/Mg y microelementos.

vascular tissues (Barraza *et al.*, 2017). These bacteria fixate N and phosphate and act as biocontrollers and promoters of phytoremediation (Doncel *et al.*, 2016).

Diazotrophic bacteria species that predominate in agroecosystems are important (Alfonso *et al.*, 2005) in the *L. esculentum* Mill. production systems. In these systems, the use of synthetic agrochemicals is common, and it is necessary to define the efficiency of potential biofertilizers to increase the alternatives in the development of a sustainable agriculture and with low production costs (Guzmán *et al.*, 2012). The aim of this study was to isolate and characterize rhizospheric diazotrophic bacteria from rhizospheric soil samples and endophytic diazotrophic bacteria from samples of foliar material and roots related to tomato plantations in different farms located in the main vegetable-producing area in the southeast of the department of Norte de Santander. This will help know the main rhizospheric and endophytic diazotrophic bacteria in the tomato plantations in the largest production area in the department of Norte de Santander, Colombia.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

A diagonal random sampling was carried out to obtain samples of rhizospheric soil (RS), foliar material (FM) and roots (R) from tomato plantations in six farms in the municipal area of Chinácota, in southeastern Norte de Santander (7° 31' 00" N y 72° 37' 00" O, 21 °C average, 1200 mm average annual rainfall and 900 and 1800 masl). In each farm, a compound sample of Rs, FM and R was taken (18 samples in total). The RS samples were formed with four subsamples, taken at a depth of 5 to 10 cm (Martyniuk and Martyniuk, 2002; Tejera *et al.*, 2005). The samples of FM and R included 10 to 15 plants per plantation; the R samples included cuts with an average length of 10 cm from the whole root system. In the soil samples, we determined pH, electrical conductivity, texture, Mg, Ca, K, P, Ca/Mg ratio organic matter and microelements.

Quantification of the Most Probable Number (MPN)

A 10 g soil sample was resuspended in 90 mL of buffered peptone water and we obtained dilutions in series up to 10⁻⁷. The

Cuantificación del Número más Probable (NMP)

Una muestra de 10 g de suelo se resuspendieron en 90 mL de agua peptona amortiguada y se obtuvieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Las raíces lavadas se segmentaron (1 cm de longitud), desinfectaron con alcohol al 70%, por 1 min, e hipoclorito de sodio al 2%, por 2 min, y se enjuagaron dos veces con agua destilada. De la muestra se maceraron 10 g con 90 mL de agua peptona amortiguada y se obtuvieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . De las muestras MF 10 g se lavaron con agua destilada y desinfectaron con alcohol al 70%, se resuspendieron en 90 mL de agua peptona amortiguada y se maceraron. De esta mezcla se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} (Cárdenas *et al.*, 2010). A partir de las diluciones 10^{-2} y hasta 10^{-7} se inocularon por triplicado, 0.1 mL, en viales con 5 mL de medio semisólido selectivo para diazotrofos (NFB para *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., JMV para *Burkholderia* sp. y LGI para *Gluconacetobacter* sp.) y se mantuvieron 8 d a 32 ± 2 °C, para formar una película subsuperficial. Los resultados se obtuvieron con la Tabla de Mc Craddy (Döbereiner *et al.*, 1995). El análisis estadístico de los datos con la técnica del NMP se hizo con el programa Infostat.

Caracterización de los aislados

El contenido de los viales con crecimiento y película en la superficie se usó para siembra directa en los medios sólidos selectivos: Asbhy (*Azotobacter* sp.), Rojo Congo (*Azospirillum* sp.), JMV (*Burkholderia* sp.) y LGI-P (*Gluconacetobacter* sp.). Con tinción de Gram se determinó la morfología celular, tipo de agregación y presencia de estructuras, como quistes.

Identificación bioquímica

Cada aislado se identificó con el sistema BBL Crystal que incluye pruebas para fermentación, oxidación, degradación, hidrólisis de diversos sustratos, oxidasa, catalasa y motilidad en fresco.

Identificación molecular

La identificación molecular se hizo en los aislados con caracterizaciones microbiológicas y bioquímicas de las muestras SR, MF y R. Los testigos positivos fueron: *Azotobacter vinelandii* ATCC® 478™, *A. nigricans* ATCC® 35009™, *A. chroococcum* ATCC® 9043™, *Azospirillum brasilense* ATCC® 29145™, *A. amazonense* ATCC® 35119™, *Burkholderia glumae* ATCC® 33617™ y *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC®700988™. El ADN de los aislados y testigos positivos se obtuvieron con el *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit* de MoBio. La identificación molecular se hizo con oligonucleótidos específicos (Cuadro 1) de

washed roots were segmented (1 cm in length), disinfected with alcohol at 70% for 1 min, and sodium hypochlorite at 2% for 2 min, and rinsed twice with distilled water. From the sample, 10 g were softened with 90 mL of buffered peptone water and we obtained dilutions in series up to 10^{-7} . From the FM samples, 10 g were washed with distilled water and disinfected with alcohol at 70%, resuspended in 90 mL of buffered peptone water and softened. This mixture was used to make dilutions in series up to 10^{-7} (Cárdenas *et al.*, 2010). The dilutions between 10^{-2} and 10^{-7} were inoculated in triplicate, 0.1 mL, in vials with 5 mL of a selective, semi-solid medium for diazotrophes (NFB for *Azospirillum* sp. and *Azotobacter* sp., JMV for *Burkholderia* sp. and LGI for *Gluconacetobacter* sp.) and they were kept 8 d at 32 ± 2 °C, to form a subsuperficial film. The results were obtained using McCraddy's chart (Döbereiner *et al.*, 1995). The statistical analysis of the data with the MPN technique was performed using the program Infostat.

Characterization of the isolations

With the content of the vials with growths and film on the surface, the planting was performed directly on the selective solid media: Asbhy (*Azotobacter* sp.), Rojo Congo (*Azospirillum* sp.), JMV (*Burkholderia* sp.) and LGI-P (*Gluconacetobacter* sp.). With a Gram stain, we determined the cell morphology, type of aggregation and the presence of structures such as cysts.

Biochemical identification

Each isolation was identified using the BBL Crystal system, which includes tests for fermentation, oxidation degradation, the hydrolysis of several substrates, oxidase, catalase and fresh motility.

Molecular identification

The molecular identification was carried out on the isolations, with microbiological and biochemical characterizations of the samples of RS, FM and R. The positive controls were *Azotobacter vinelandii* ATCC® 478™, *A. nigricans* ATCC® 35009™, *A. chroococcum* ATCC® 9043™, *Azospirillum brasilense* ATCC® 29145™, *A. amazonense* ATCC® 35119™, *Burkholderia glumae* ATCC® 33617™ and *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC®700988™. The DNA of the isolations and positive controls were obtained with the *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit* by MoBio. Molecular identification was carried out with specific oligonucleotides (Table 1) from *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense*, *A. brasilense* (designed in this study), *Burkholderia* sp. (Gijon *et al.*, 2011), *B. glumae*

Cuadro 1. Características de los oligonucleótidos.
Table 1. Characteristics of oligonucleotides.

Bacteria diazotrófica	Cebador	Secuencia	Blanco	Tamaño (pb)	C° de hibridación	Fuente
<i>A. chroococcum</i>	AchroTF	GCTTTTCATAAGCTCCCACA	ARNr	308	58	Este trabajo
	AchroTR	CGTTTCTGAGCTTTCAGCGAT	16 S			
<i>A. nigricans</i>	AnigrTF	GCTGCGGCAGGCCTAACA	ARNr	428	60	Este trabajo
	AnigrTR	TATTAGCCCCGCGGCCCTTC	16 S			
<i>A. vinlelandii</i>	AvineTF	CGACCTCGCGCAAGGCAAGA	ARNr	230	60	Este trabajo
	AvineTR	CAGTGAAACAATCGACGCGT				
<i>A. amazonense</i>	AamaTF	GATGGTTGTGGAGACTGTCAG	ARNr	631	58	Este trabajo
	AamaTR	GAACCCCAACGTCTAGCACTC	16 S			
<i>A. brasilense</i>	AbraTF	CTCCCGCGCCAGCGAGCGGCG	<i>UbiH</i>	448	60	Este trabajo
	AbraTR	ACTCAGCATGGCGGCGGCCCT				
<i>Burkholderia</i> sp.	RHGF	GGGATTTCATTTCCCTTAGTAAC	ARNr	511	55	Gijon <i>et al.</i> , 2011
	RHGR	GCGATTACTAGCGATTCCAGC	16 S			
<i>B. glumae</i>	glu-F	GAAGTGTGCGCGATGGAG	<i>gyrB</i>	529	58	Karki <i>et al.</i> , 2012
	glu-R	CCTTCACCGACAGCACGCAT				
<i>Gluconacetobacter</i> sp.	GluG	AATGACTGGGCGTAAAG	ARNr	467	67	Fuentes <i>et al.</i> , 2001
<i>G. azotocaptans</i>	GluA	AATGCTCATCTCTGAACA	16 S			
<i>G. johannae</i>	GluJ	GAAATGAACATCTCTGCT	469			

A. chroococcum, *A. nigricans*, *A. vinlelandii*, *A. amazonense*, *A. brasilense* (diseñados en este estudio), *Burkholderia* sp. (Gijon *et al.*, 2011), *B. glumae* (Karki *et al.*, 2012), *G. azotocaptans* y *G. johannae* (Fuentes *et al.*, 2001). El diseño de oligonucleótidos se hizo con secuencias de ARNr 16s y el gen *UbiH*; su similitud se comprobó con el software en línea BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y el software Workbench y su especificidad se probó con cepas autenticadas de ATCC de *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinlelandii*, *A. amazonense* y *A. brasilense*. La mezcla de PCR se obtuvo en 50 μ L, con 1X de amortiguador de ADN polimerasa, 200 μ M de dNTP, 1 U de ADN polimerasa, 1 μ M de cada iniciador y 2 μ L de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación (temperatura específica para cada especie (Cuadro 1) por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min, y extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% y teñidos con SYBR Green.

Número de acceso a la secuencia de nucleótidos

Los números de acceso de las secuencias de nucleótidos de GenBank utilizadas en el diseño de oligonucleótidos, para la identificación de las bacterias diazotróficas mediante herramientas de bioinformática fueron las siguientes. *A. chroococcum*: AF083211.1, AB430881.1 y CP011835.1; *A. nigricans*: KP966496.1, JX262176.1, JX262168.1 y NR_041033.1;

(Karki *et al.*, 2012), *G. azotocaptans* and *G. johannae* (Fuentes *et al.*, 2001). The oligonucleotides were designed with ARNr 16s sequences and the gene *UbiH*; its similarity was verified using the online software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) and the software Workbench, and its specificity was tested with authenticated ATCC *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinlelandii*, *A. amazonense* and *A. brasilense* strains. The PCR mixture was obtained in 50 μ L, with 1X of DNA polymerase buffer, 200 μ M of dNTP, 1 U of DNA polymerase, 1 μ M of each primer and 2 μ L of DNA. Amplification conditions were as follows: initial denaturalization at 95 °C for 5 min, 35 cycles with denaturalization at 95 °C for 1 min, hybridization (specific temperature for each species (Table 1)) for 30 s, extension at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were viewed in agarose gels at 1% and dyed with SYBR Green.

Number of access to the nucleotide sequence

The numbers of access to the GenBank nucleotide sequences used in the design of oligonucleotides for the identification of diazotrophic bacteria, using bioinformatics tools were the following: *A. chroococcum*: AF083211.1, AB430881.1 y CP011835.1; *A. nigricans*: KP966496.1, JX262176.1, JX262168.1 y NR_041033.1; *A. vinlelandii*: LK473371.1, CP005095.1, CP005094.1, CP001157.1 y AF079808.1; *A. amazonense*: NR_104981.1, AB682665.1, GU458288.1,

A. vinelandii: LK473371.1, CP005095.1, CP005094.1, CP001157.1 y AF079808.1; *A. amazonense*: NR_104981.1, AB682665.1, GU458288.1, NR_117477.1, AY752913.1 y X79742.1; *A. brasilense*: CP022253.1, CP012914.1, CP007793.1, HE577327.1, AF279917.1 y X92496.1.

NR_117477.1, AY752913.1 y X79742.1; *A. brasilense*: CP022253.1, CP012914.1, CP007793.1, HE577327.1, AF279917.1 y X92496.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fisicoquímico de suelos

Los suelos analizados presentaron textura variada media a gruesa, pH entre 5.4 y 7.2 (7.2 en la finca 6), K entre 83 y 606 ppm, P entre 5 y 157 ppm y materia orgánica entre 1.5 y 3.81 % (Cuadro 2).

El tomate se adapta a una gran variedad de suelos, con pH de 5.8 a 6.8 y neutro (DANE, 2014). Vallejo y Estrada (2004) reportaron que los suelos de textura franca o franco-arcillosa con pH entre 6.5-7.9 y capacidad alta de intercambio catiónico promovieron el crecimiento y desarrollo del cultivo. Esto permite explicar por qué el pH 7.20 del suelo de la finca 6 no afecta la producción de tomate, pero pH superior a 6.5, como el de la finca 6, disminuye la disponibilidad de micronutrientes (Fe, Zn, Mn y Cu), B y P; y esos micronutrientes son necesarios para el desarrollo de bacterias diazotróficas, lo cual podría relacionarse con el número bajo de microorganismos (10^4 células g^{-1} suelo) en SR de esta finca.

RESULTS AND DISCUSSION

Physical and chemical analysis of soils

The soils analyzed presented medium to thick varied textures, with pH ranging between 5.4 and 7.2 (7.2 in farm 6), K between 83 and 606 ppm, P between 5 and 157 ppm and organic matter ranging between 1.5 and 3.81 % (Table 2).

The tomato adapts to a large variety of soils with a pH of 5.8 to 6.8 and neutral (DANE, 2014). Vallejo and Estrada (2004) reported that the soils with loamy or clay-loam textured soils with a pH of between 6.5-7.9 and a high ability for cationic exchange promoted the growth and development of the crop. This helps explain why the pH of 7.20 of the soil in farm 6 did not affect the tomato production, yet a pH higher than 6.5, like in farm 6, reduces the availability of micronutrients (Fe, Zn, Mn and Cu), B and P; and those micronutrients are required for the development of diazotrophic bacteria, which could be related to the low number of microorganisms (10^4 cells g^{-1} soil) in the RS of this farm.

Cuadro 2. Ubicación y características físico químicas del suelo de las fincas estudiadas.

Table 2. Location and physical and chemical characteristics of the soil in the farms studied.

Finca	Ubicación	msnm	Textura	Materia Orgánica %	Nitrógeno %	Fosforo ppm	Potasio ppm	Calcio ppm	Magnesio ppm	pH
La Primavera (F1)	N 07° 31' 793" O 072° 34' 413"	1847.7	Franco	1.50	0.075	157	419	2348	165	5.50
El Bordo (F2)	N 07° 32' 486" O 072° 34' 518"	1759.6	Franco arenoso	1.86	0.093	148	496	2306	207	6.04
La Ponderosa (F3)	N 07° 34' 347" O 072° 35' 912"	1412.37	Franco arenoso	2.25	0.112	44	289	1033	109	5.54
El Amparito (F4)	N 07° 36' 717" O 072° 35' 704"	1238.65	Franco arenoso	2.75	0.137	35	83	1580	39	5.40
Lindarte (F5)	N 07° 37'564" O 072° 37'627"	955.50	Franco arcilloso arenoso	2.49	0.124	30	606	4545	333	6.40
Los Ibarra (F6)	N 07° 37'001" O 072° 35'441"	1392.56	Franco arcilloso arenoso	3.81	0.191	5	525	16303	422	7.20

Cuantificación del NMP

Las diferencias significativas en las variables del suelo que se relacionan con la disimilitud de NMP en SR, MF y R no fueron significativas (Cuadro 3). Las muestras SR, con textura gruesa, de las fincas 2, 3 y 4 mostraron 10^6 a 10^7 células g^{-1} de suelo, en comparación con las fincas 1, 5 y 6, con textura media y 10^4 a 10^5 células g^{-1} de suelo (Cuadro 3). Lacasta *et al.* (2005) señalaron que la textura de los suelos origina diferente porosidad y agregación, que pueden generar problemas de endurecimiento, aireación, capacidad de retención hídrica y permeabilidad. En condiciones ambientales similares se debe prever que en suelos de texturas más gruesas la aireación es mayor, lo que favorece los procesos de degradación producto de la actividad microbiana. Las diferencias entre NMP de los tipos de muestras con el medio NFb, específico para los géneros *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp., fueron altamente significativas en el número de bacterias entre SR, R y MF; el aumento mayor fue en SR y el menor en MF. Esto coincidió con lo observado por Castro *et al.* (2007) de que en la rizósfera se depositan 5 a 20 % de los exudados derivados de la fotosíntesis, que permiten la proliferación de la microbiota y originan aumento en las poblaciones microbianas en el suelo. Remans (2007) afirmó que en los suelos agrícolas, excepto por los aportes antropogénicos, las comunidades diazotróficas son la fuente principal de N y puede mejorar la producción de los cultivos y disminuir el uso de fertilizantes sintéticos.

MPN quantification

The significant differences in the soil variables that relate to the dissimilitud of MPN in RS, FM significant (Table 3). The RS samples with a coarse texture from farms 2, 3 and 4 displayed 10^6 to 10^7 cells g^{-1} of soil, in comparison with farms 1, 5 and 6, with a medium texture and 10^4 and 10^5 cells g^{-1} of soil (Table 3). Lacasta *et al.* (2005) pointed out that the texture of soils originates different porosity and aggregation, which can cause problems with hardening, airing and capacity of water retention and permeability. Under similar environmental conditions, the fact that coarser soils display higher airing must be foreseen, and this favors the degradation processes resulting from microbial activity. The differences between the MPN of the type of samples with the Nfb medium, specific to the genera *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp., were highly significant in the number of bacteria between RS, R and FM; the increase was greater in RS and lowest in FM. This agrees with observations by Castro *et al.* (2007) regarding the fact that 5 to 20% of the exudates derived from photosynthesis are deposited in the rhizosphere, allowing microbiota to proliferate and causing an increase in the microbial populations in the soil. Remans (2007) claimed that in agricultural soils, with the exception of anthropogenic contributions, diazotrophic communities are the main source of N and can improve the production of crops and reduce the use of synthetic fertilizers.

Cuadro 3. Población de bacterias diazotróficas en muestras de suelo rizosférico, raíces y material foliar.
Table 3. Population of diazotrophic bacteria in samples of rhizospheric soil, roots and foliar material.

Muestra	Medio de cultivo	NMP ^b por finca (células/gramo)						Análisis estadístico
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	
SR [†]	NFb	7.0×10^4	1.2×10^7	4.6×10^7	3.8×10^7	4.5×10^5	1.4×10^4	36.33 C
	JMV	4.5×10^5	5.3×10^6	6.0×10^6	5.7×10^6	3.1×10^5	2.6×10^4	36.17 C
	LGI	3.8×10^5	2.3×10^6	1.0×10^6	7.4×10^6	2.3×10^5	5.0×10^4	35.50 C
R [‡]	NFb	2.3×10^4	5.8×10^5	4.5×10^5	3.8×10^6	1.9×10^5	7.8×10^5	32.42 BC
	JMV	2.4×10^5	2.6×10^5	7.0×10^5	5.7×10^5	7.0×10^5	2.1×10^7	38.17 C
	LGI	9.8×10^4	2.1×10^6	1.1×10^5	7.4×10^4	1.2×10^5	8.4×10^6	32.17 BC
MF [§]	NFb	4.3×10^2	1.1×10^3	2.8×10^4	8.8×10^4	4.5×10^4	5.5×10^3	8.67 A
	JMV	6.2×10^4	4.3×10^4	6.3×10^4	9.0×10^4	6.7×10^4	2.3×10^4	16.75 AB
	LGI	4.7×10^4	5.7×10^4	2.9×10^4	1.9×10^4	1.5×10^4	4.7×10^4	11.33 A

[†]Suelo rizosférico, [‡]Raíces, [§]Material Foliar, ^bNumero más probable ♦ [†]Rhizospheric soil, [‡]Roots, [§]Foliar material,

^bMost Probable Number.

Los medios selectivos para los géneros *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp., no evidencian diferencias significativas entre las poblaciones obtenidas en SR y R, pero sí con respecto a MF en el cual la población celular es menor (Cuadro 3). Esto se ajusta a lo reportado por Khalid *et al.* (2006), de que la rizósfera de la planta es un ambiente ecológico muy importante para los microorganismos que colonizan las raíces de las plantas en crecimiento. Distintas comunidades de microorganismos beneficiosos del suelo están asociadas con los sistemas radicales de todas las plantas superiores.

Las muestras de SR de las fincas 2, 3 y 4 tuvieron un NMP de 10^7 células g^{-1} de suelo con base al resultado en medio Nfb. Estos resultados coinciden con lo descrito por Alfonso *et al.* (2005) quienes obtuvieron un NMP de 10^6 células g^{-1} de suelo e identificaron estos dos géneros. Los resultados en la cuantificación de *Burkholderia* sp. coinciden con los experimentos de Cárdenas *et al.* (2010) y Mantilla *et al.* (2009) en condiciones climáticas diferentes y reportan la predominancia del género en muestras de SR, debido al parecer a la amplia gama de hormonas vegetales que exudan, y permiten su adaptación en múltiples ambientes. *Gluconacetobacter* sp. también se aisló en muestras de SR, a pesar de ser endófito. Mantilla *et al.* (2009) indican la presencia del género *Gluconacetobacter* sp. en SR al ser liberado por medio de lixiviados. Garrido *et al.* (2010) reportan la presencia de *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. en muestras de R y MF de pastos, similar a lo encontrado en nuestro estudio.

Caracterización fenotípica y molecular

Caracterizaciones fenotípicas y bioquímicas se hicieron en los 37 aislados obtenidos de bacterias diazotróficas, 30 de las cuales se aislaron de SR. Como *Azotobacter* sp. se identificaron 14 aislados rizosféricos, muestras SR1-SR14, (Cuadro 4), con características macroscópicas de colonias irregulares, opacas, mucosas o secas de color café o crema y producción de quistes (Flores *et al.*, 2012). Los aislados SR10 y SR12 presentaron pigmento verde fluorescente, característico de *A. vinelandii* o *A. paspali*. En la identificación bioquímica 12 aislados fueron positivos con sacarosa, melibiosa, manitol, sorbitol, ureasa y oxidasa, propio de *A. vinelandii* y *A. chroococcum*; los aislados SR3 y SR8 fueron positivos con sacarosa,

The selective media for the genera *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp., do not display significant differences between the populations obtained in RS and R, but they do regarding FM, in which the cell population is lower (Table 3). This agrees with Khalid *et al.* (2006), who claims that the plant rhizosphere is a very important ecological environment for the microorganisms that colonize the roots of growing plants. Different communities of microorganisms that benefit the soil are related to the root systems of all higher plants.

The RS samples from farms 2, 3 and 4 had an MPN of 10^7 cells g^{-1} of soil, based on the result in the Nfb medium. These results coincide with descriptions by Alfonso *et al.* (2005), who obtained an MPN of 10^6 cells g^{-1} of soils and identified these two genera. The results of the quantification of *Burkholderia* sp. coincide with the experiments by Cárdenas *et al.* (2010) and Mantilla *et al.* (2009) under different weather conditions and report the predominance of the genus in RS, due, seemingly, to the wide range of plant hormones they exude and help them adapt to multiple environments. *Gluconacetobacter* sp. was also isolated in RS samples, despite being endophytic. Mantilla *et al.* (2009) indicate the presence of the genus *Gluconacetobacter* sp. in RS which were released by leachates. Garrido *et al.* (2010) report the presence of *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. in grass R and FM samples, similar to what was found in this study.

Phenotypic and molecular characterization

Phenotypic characterizations were carried out on the 37 isolations taken from diazotrophic bacteria, 30 of which were isolated from the RS. Fourteen rhizospheric isolations were identified as *Azotobacter* sp., along with SR1-SR14 samples (Table 4), with macroscopic characteristics of irregular cultures, dull-colored, mucous or dry, brown or cream-colored cultures and production of cysts (Flores *et al.*, 2012). Isolations SR10 and SR12 presented a fluorescent green pigment, typical of *A. vinelandii* or *A. paspali*. In the biochemical identification, 12 isolations were positive with sucrose, melibiose, mannitol, sorbitol, urease and oxidase, typical of *A. vinelandii* and *A. chroococcum*; isolations SR3 and SR8 were positive with sucrose, urease and oxidase, and negative with melibiose, mannitol and sorbitol, typical of

Cuadro 4. Identificación bioquímica y molecular de aislados diazotróficos rizosféricos y endófitos.
Table 4. Biochemical and molecular identification of diazotrophic, rhizospheric and endophytic isolations.

Muestra	Ubicación Bacteria	Bioquímica Probable Genero	Identificación			
			#	Especie	#	
SR [†]	Rizosférico	<i>Azotobacter</i> sp.	14	<i>A. chroococcum</i>	5	
				<i>A. vinelandii</i>	2	
				<i>A. nigricans</i>	2	
			<i>Azospirillum</i> sp.	7	<i>A. brasilense</i>	6
			<i>Burkholderia</i> sp.	6	<i>B. glumae</i>	3
			<i>Gluconacetobacter</i> sp.	3	<i>G. azotocaptans/johannae</i>	3
R [‡]	Endófito	<i>Burkholderia</i> sp.	3	<i>B. glumae</i>	2	
		<i>Gluconacetobacter</i> sp.	2	<i>G. azotocaptans/johannae</i>	2	
MF [§]		<i>Burkholderia</i> sp.	2	<i>B. glumae</i>	1	

[†]Suelo rizosférico, [‡]Raíces, [§]Material Foliar ♦ [†]Rhizospheric soil, [‡]Roots, [§]Foliar material.

ureasa y oxidasa, y negativos con melibiosa, manitol y sorbitol, características de *A. nigricans*. Siete se identificaron como *Azospirillum* sp. (SR15-SR21) con características macroscópicas propias del género: colonias de color rosado, con detalle óptico opaco y formas irregulares o redondas, frecuentemente arrugadas y con elevación variable (Obando *et al.*, 2010). Los aislados correspondieron al género *Azospirillum*: positivo con oxidasa, fosfatasa, ureasa e hidrólisis de esculina, negativo con hidrólisis de gelatina, producción de pigmentos solubles en agua y producción de indol y variable para catalasa y azúcares (Garrity *et al.*, 2005).

Once aislados se identificaron como *Burkholderia* sp., 6 rizosféricos (SR22- SR27) y 5 endófitos de los cuales 3 se aislaron de muestras de R (R28- R30) y 2 de muestras de MF (MF31-MF32) (Cuadro 4). Los aislados presentaron características macroscópicas como colonias medianas a pequeñas, húmedas, blanquecinas con centro amarillo (Galvis y Carrillo, 2015). En las pruebas bioquímicas mostraron resultados positivos característicos a catalasa, oxidasa, arabinosa y sacarosa. Seis aislados dieron negativo para melibiosa y 2 débil, propio de *B. glumae* y *B. cepacea*, respectivamente (Garrity *et al.*, 2005). También se obtuvieron cinco aislados de *Gluconacetobacter* sp., tres rizosféricos (SR33- SR35) y dos endófitos a partir de muestras de R (R36 y R37) (Cuadro 4). Los aislados presentaron colonias de forma redonda, superficie lisa, elevación convexa o plano-convexa, color anaranjado y margen traslúcido o amarillo, que

A. nigricans. Seven were identified as *Azospirillum* sp. (SR15-SR21) with typical macroscopic characteristics of the genus: pink-colored cultures with a dull appearance and irregular or round shapes, frequently wrinkled and with a variable elevation (Obando *et al.*, 2010). The isolations belonged to the *Azospirillum* genus: positive with oxidase, phosphatase, urease and esculin hydrolysis, negative with gelatin hydrolysis, production of water-soluble pigments and the production of indole and variable for catalase and sugars (Garrity *et al.*, 2005).

Eleven isolations were identified as *Burkholderia* sp., 6 rhizospheric isolations (SR22- SR27) and 5 endophytic ones, 3 of which were isolated from samples of R (R28- R30) and 2 samples of FM MF (MF31-MF32) (Table 4). The isolations presented macroscopic characteristics such as small to medium, moist, whitish cultures with yellow centers (Galvis and Carrillo, 2015). Biochemical tests gave positive results, typical of catalase, oxidase, arabinose and sucrose. Six isolations were negative to melibiose and 2 were weak, typical of *B. glumae* and *B. cepacea*, respectively (Garrity *et al.*, 2005). Five isolations of *Gluconacetobacter* sp., three rhizospheric (SR33- SR35) and two endophytic, were also taken from R samples (R36 y R37) (Table 4). The isolations presented round cultures with smooth surfaces, convex or flat-convex elevations, orange in color and translucent or yellow edge, which matched the genus (Mehnaz *et al.*, 2006). These isolations displayed positive results in the tests with catalase, oxidase and

concordó con el género (Mehnaz *et al.*, 2006). Estos aislados mostraron resultados positivos con la prueba catalasa, oxidasa y sacarosa y negativos a glicina (Madhaiyana *et al.*, 2004).

No hubo diferencias significativas entre las poblaciones de *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp., sobre medios selectivos a partir de muestras de SR y R, pero sí respecto a muestras de MF. Esto es probable que se deba a la ventaja competitiva de las bacterias rizosféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes es mayor al interior de las plantas y menor el número de microorganismos endófitos (James, 2000).

Los oligonucleótidos diseñados en este experimento y la estandarización de la PCR mostraron especificidad para la identificación de *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* y *A. brasilense*, y se usaron cepas testigo ATCC (Figura 1). En el análisis molecular por PCR de los 14 aislados caracterizados fenotípicamente y bioquímicamente como *Azotobacter* sp., 5 se identificaron como *A. chroococcum* (SR5, SR7, SR9, SR11 y SR14), 2 como *A. vinelandii* (SR10 y SR12) y 2 como *A. nigricans* (SR3 y SR8) (Figura 2A, 2B y 2C). De los 7 aislados caracterizados como *Azospirillum* sp., todos, excepto el SR21, se identificaron por PCR como *A. brasilense* (Figura 2D).

La identificación de los 11 aislamientos de *Burkholderia* sp., se comprobó con oligonucleótidos específicos y características fenotípicas. Los aislamientos SR22, SR24, SR25, R28, R30 y MF32 se identificaron como *B. glumae* (Figura 2E) y los de *Gluconacetobacter* sp. descritos fenotípicamente y bioquímicamente, se identificaron por PCR como *G. azotocaptans* o *G. johannae* (Figura 2F).

Las pruebas fenotípicas utilizadas en la identificación de microorganismos pueden presentar discordancia entre las características del aislamiento en estudio y las correspondientes de la especie. La identificación se considera probable pero no definitiva. Para resolver estos problemas se propusieron métodos genotípicos de identificación bacteriana como el uso de una amplia variedad de genes utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en la determinación de géneros y especies bacterianas; el análisis del ARNr 16S el marcador inicial, y en numerosas situaciones, suficiente para realizar una identificación específica (Bou *et al.*, 2011). De acuerdo con lo anterior, en este estudio se utilizó el ARNr 16S para el diseño de oligonucleótidos en

sucrose and negative to glycine (Madhaiyana *et al.*, 2004).

No significant differences were reported between the *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. populations regarding selective media from RS and R samples, although there were regarding FM samples. This is probably due to the competitive advantages of rhizospheric bacteria, since the availability of nutrients is greater inside the plant, where the number of endophytic microorganisms is also lower (James, 2000).

The oligonucleotides designed in this experiment and the standardization of PCR displayed specificity for the identification of *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* and *A. brasilense*, and ATCC control strains were used (Figure 1). In the molecular analysis with PCR of the 14 isolations characterized phenotypically and biochemically as *Azotobacter* sp., 5 were identified as *A. chroococcum* (SR5, SR7, SR9, SR11 and SR14), 2 as *A. vinelandii* (SR10 and SR12) and 2 as *A. nigricans* (SR3 and SR8) (Figure 2A, 2B and 2C). Out of the 7 isolations characterized as *Azospirillum* sp., all but SR21 were identified with PCR as *A. brasilense* (Figure 2D).

The identification of the 11 *Burkholderia* sp. isolations was verified with specific oligonucleotides and phenotypical characteristics. Isolations SR22, SR24, SR25, R28, R30 and MF32 were identified as *B. glumae* (Figure 2E) and the *Gluconacetobacter* sp. isolations described phenotypically and biochemically were identified with PCR as *G. azotocaptans* or *G. johannae* (Figure 2F).

The phenotypical tests used to identify microorganisms can present discrepancies between the characteristics of the isolation under study and those of the species. Identification is considered probable but not definitive. In order to solve these problems, genotypical methods were proposed for the identification of bacteria, such as the use of a wide variety of genes utilized as molecular target in taxonomic or phylogenetic studies when determining bacterial genera and species; the analysis of rRNA 16S the initial marker, and in numerous situations, enough for a specific identification (Bou *et al.*, 2011). According to this, this study used rRNA 16S to design oligonucleotides in determining *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* and *A. brasilense*, amplifications with the expected size are produced (verification by PCR and *in silico*

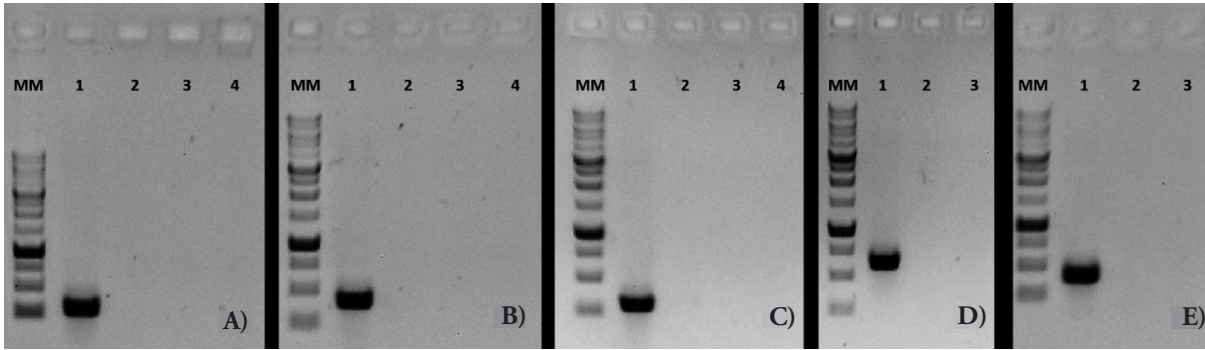


Figura 1. Comprobación de la especificidad de los oligonucleótidos diseñados en cepas de referencia ATCC. A) *A. chroococcum*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. chroococcum* ATCC® 9043™, producto esperado de 308 pb.; línea 2: *A. nigricans* ATCC® 35009™; línea 3: *A. vinelandii* ATCC® 478™; línea 4: control negativo. B) *A. nigricans*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. nigricans* ATCC® 35009™, producto esperado de 428 pb.; línea 2: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; línea 3: *A. vinelandii* ATCC® 478™; línea 4: control negativo. C) *A. vinelandii*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. vinelandii* ATCC® 478™, producto esperado de 230 pb.; línea 2: *A. nigricans* ATCC® 35009™; línea 3: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; línea 4: control negativo. D) *A. amazonense*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. brasilense* ATCC® 29145™, producto esperado de 631 pb.; línea 2: *A. amazonense* ATCC® 35119™; línea 3: control negativo. E) *A. brasilense*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. amazonense* ATCC® 35119™, producto esperado de 448 pb.; línea 2: *A. brasilense* ATCC® 29145™; línea 3: control negativo.

Figure 1. Verification of the specificity of the oligonucleotides designed in ATCC reference strains. A) *A. chroococcum*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. chroococcum* ATCC® 9043™, expected 308 pb. product; line 2: *A. nigricans* ATCC® 35009™; line 3: *A. vinelandii* ATCC® 478™; line 4: negative control. B) *A. nigricans*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. nigricans* ATCC® 35009™, expected 428 pb. product; line 2: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; line 3: *A. vinelandii* ATCC® 478™; line 4: negative control. C) *A. vinelandii*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. vinelandii* ATCC® 478™, expected 230 pb. product; line 2: *A. nigricans* ATCC® 35009™; line 3: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; line 4: negative control. D) *A. amazonense*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. brasilense* ATCC® 29145™, expected 631 pb product; line 2: *A. amazonense* ATCC® 35119™; line 3: negative control. E) *A. brasilense*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. amazonense* ATCC® 35119™, expected 448 pb product; line 2: *A. brasilense* ATCC® 29145™; line 3: negative control.

la determinación de *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* y *A. brasilense*, se generan amplificaciones con el tamaño esperado (verificación por PCR y validación *in silico*) y se logra una identificación específica, empleando testigos positivos y negativos certificados.

Los microorganismos diazotróficos asociados con el cultivo del tomate en la región de estudio parece que no se habían documentado. En este estudio los géneros de diazotróficas rizosféricas predominantes en SR fueron *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Burkholderia*. Las bacterias endófitas características en las muestras R y MF fueron de los géneros *Burkholderia* y *Gluconacetobacter*. Alfonso *et al.* (2005), en un estudio en Cuba con 26 °C, identificaron los géneros

validation) and a specific identification is achieved, using certified positive and negative controls.

Diazotrophic microorganisms related to the tomato crop in the area under study seem not to have been documented. In this study, the genera of rhizospheric diazotrophes predominant in RS were *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Burkholderia*. Characteristic endophytic bacteria in the R and FM samples belonged to the genera *Burkholderia* and *Gluconacetobacter*. Alfonso *et al.* (2005), in a study carried out in Cuba with 26 °C, identified the genera of *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* and *Streptomyces*; the tomato rhizosphere predominated, and *Azospirillum* was the dominant genus (Alfonso *et al.*, 2005). The population density

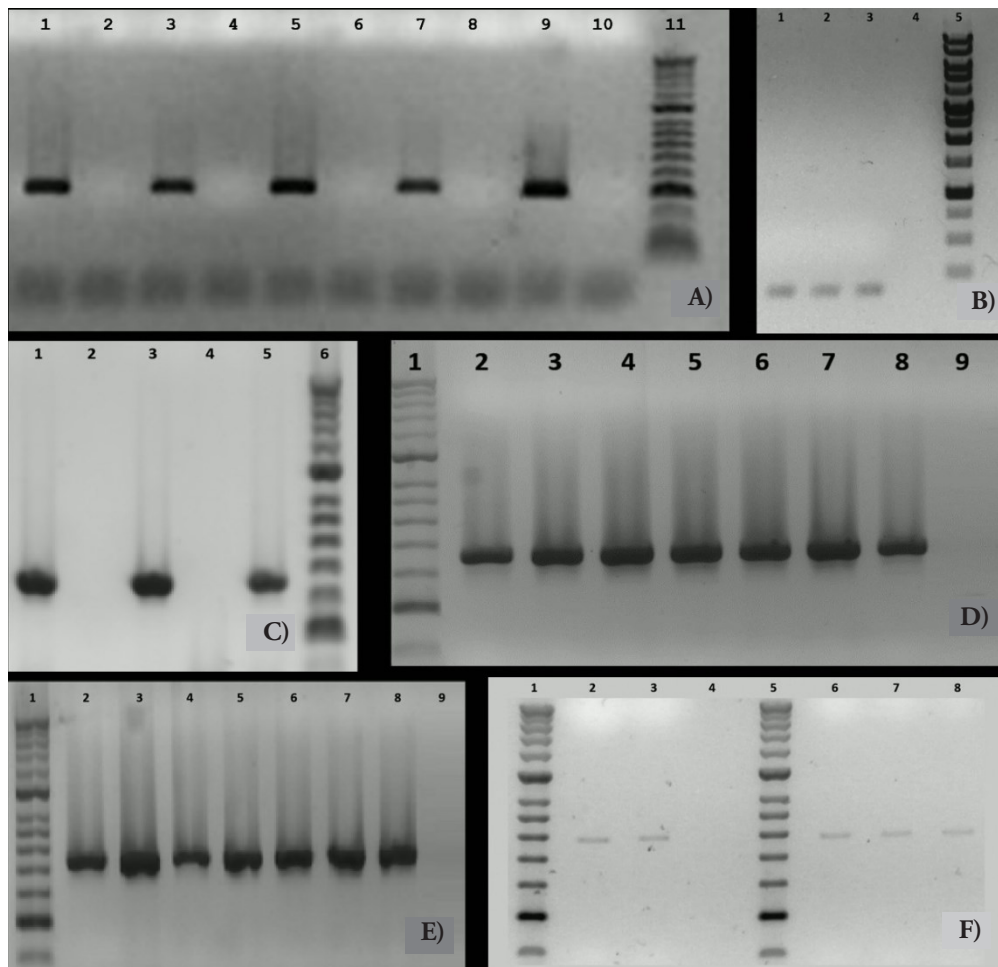


Figura 2. Identificación por PCR de bacterias diazotróficas. a. *A. chroococcum*. Líneas 1 a 8: aislados SR5, SR6, SR7, SR8, SR9, SR10, SR11 y SR12; línea 9: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; línea 10: control negativo; línea 11: *HyperLadder*™ 50bp. Producto esperado de 308 pb. b. *A. vinelandii*. Líneas 1 y 2: aislados SR10 y SR12; línea 3: *Azotobacter vinelandii* ATCC® 478™; línea 4: control negativo; línea 5: 1Kb *DNA Ladder RTU*. Producto esperado de 230 pb. c. *A. nigricans*. Líneas 1 a 3: aislados SR3, SR5 y SR8; línea 4: control negativo; línea 5: *A. nigricans* ATCC® 35009™; línea 6: *HyperLadder*™ 50bp. Producto esperado de 230 pb. d. *A. brasilense*. Línea 1: *HyperLadder*™ 50bp; líneas 2 a 7: aislados SR15 a SR20; línea 8: *Azospirillum brasilense* ATCC® 29145™; línea 9: control negativo. Producto esperado de 448 pb. e. *B. glumae*. Línea 1: *HyperLadder*™ 50bp; líneas 2 a 7: aislados SR22, SR24, SR25, R28, R30 y MF32; línea 8: *Burkholderia glumae* ATCC® 33617™; línea 9: control negativo. Producto esperado de 529 pb. f. *G. azotocaptans*/*G. johannae*. Líneas 1 y 5: *HyperLadder*™ 50bp; líneas 2, 6, 7 y 8: aislados SR33, SR35, R36 y R37; línea 3: *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC®700988™; línea 4: control negativo. Producto esperado de 467-469 pb.

Figure 2. Identification by PCR of diazotrophic bacteria. A) *A. chroococcum*. Lines 1 to 8: isolations SR5, SR6, SR7, SR8, SR9, SR10, SR11 and SR12; line 9: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; line 10: negative control; line 11: *HyperLadder*™ 50bp. Expected 308 pb product. B) *A. vinelandii*. Lines 1 and 2: isolations SR10 and SR12; line 3: *Azotobacter vinelandii* ATCC® 478™; line 4: negative control; line 5: 1Kb *DNA Ladder RTU*. Expected 230 pb product. C) *A. nigricans*. Lines 1 to 3: isolations SR3, SR5 and SR8; line 4: negative control; line 5: *A. nigricans* ATCC® 35009™; line 6: *HyperLadder*™ 50bp. Expected 230 pb product. D) *A. brasilense*. Line 1: *HyperLadder*™ 50bp; lines 2 to 7: isolations SR15 to SR20; line 8: *Azospirillum brasilense* ATCC® 29145™; line 9: negative control. Expected 448 pb product. E) *B. glumae*. Line 1: *HyperLadder*™ 50bp; lines 2 to 7: isolations SR22, SR24, SR25, R28, R30 and MF32; line 8: *Burkholderia glumae* ATCC® 33617™; line 9: negative control. Expected 529 pb product. F) *G. azotocaptans*/*G. johannae*. Lines 1 and 5: *HyperLadder*™ 50bp; lines 2, 6, 7 and 8: isolations SR33, SR35, R36 and R37; line 3: *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC®700988™; line 4: negative control. Expected 467-469 pb. product.

Pseudomonas, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, dominó la rizósfera del tomate, y *Azospirillum* fue el género dominante (Alfonso *et al.*, 2005). La densidad poblacional de bacterias endófitas es altamente variable y depende de la bacteria y la planta hospedante, además del estado de desarrollo de la planta, la densidad del inóculo y las condiciones ambientales. La mayor densidad poblacional de bacterias endófitas nativas o introducidas, se observan de manera normal en la raíz y en la parte inferior del tallo; se presenta una disminución gradual del tallo hasta la hoja (Cordero *et al.*, 2010).

Azospirillum brasilense en tomate causa un aumento significativo en el peso de la raíz, la longitud de los pelos radicales y el brote, debido probablemente a una secreción mayor de ácido indol-3-acético (IAA) y etileno (Ribaudó *et al.*, 2006). *Azospirillum vinelandii* también induce aumento de la biomasa radical del tomate mediante la solubilización de fósforo y adquisición de microelementos, que favorecen la floración y su desarrollo en general (Sashidhar y Podile, 2009). En invernadero *Azotobacter* sp. tiene influencia positiva en el desarrollo vegetativo de tomate, disminuye el número de días a la floración y aumento la altura, volumen radical y peso de la biomasa seca total (Escobar *et al.*, 2011). La presencia de *Burkholderia* en la rizósfera y el rizoplano en el cultivo de tomate se relaciona con un desarrollo mejor del sistema radicular y foliar de la planta, debido probablemente a la producción de sideróforos y la actividad antagonica contra patógenos (Caballero *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

La diferencia en NMP entre fincas y su relación con las características físico-químicos del suelo no es significativa. Los suelos con textura gruesa favorecen el crecimiento de la microbiota en la rizósfera. La diversidad mayor de especies en muestras de SR, correspondió a las bacterias diazotróficas rizosféricas *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. brasilense*, *B. glumae* y *G. azotocaptans*/*G. johannae*, las bacterias diazotróficas endofíticas, en muestras R, y *B. glumae*, *G. azotocaptans*/*G. johannae*. en muestras de MF, *B. glumae*.

of endophytic bacteria is highly variable and depends on the bacteria and host plant, as well as the state of development of the plant, the density of the inoculant and environmental conditions. The highest population density of endophytic bacteria, whether native or introduced, appear normally in the root and the lower part of the shoot; a gradual reduction is observed between the shoot and the leaf (Cordero *et al.*, 2010).

Azospirillum brasilense in tomato causes a significant increase in the weight of the root, the length of root hairs and sprouting, probably due to a greater secretion of indol-3-acetic acid (IAA) and ethylene (Ribaudó *et al.*, 2006). *Azospirillum vinelandii* also leads to an increase in the radical biomass in tomato via the solubilization of phosphorous and acquisition of microelements that favor flowering and its general development (Sashidhar and Podile, 2009). In greenhouses, *Azotobacter* sp. has a positive influence on the vegetative development of tomato, it reduces the number of days until flowering and increases total height, radical volume and total dry biomass weight (Escobar *et al.*, 2011). The presence of *Burkholderia* in the rhizosphere and the rhizoplane in the tomato plantation is related to a better development of the radical and foliar systems of the plant, due mainly to the production of siderophores and antagonistic activity against pathogens (Caballero *et al.*, 2007).

CONCLUSIONS

The difference in MPN between farms and their relation with the physical and chemical characteristics of the soil is not significant. Soils with a coarse texture favor the growth of microbiota in the rhizosphere. The greatest diversity of species in RS samples was found in the diazotrophic rhizospheric bacteria *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. brasilense*, *B. glumae* and *G. azotocaptans*/*G. johannae*, diazotrophic endophytic bacteria, in samples of R, and *B. glumae*, *G. azotocaptans*/*G. johannae*. In FM samples, *B. glumae*.

—End of the English version—

---*---

LITERATURA CITADA

- Alfonso, E. T., A. Leyva, y A. Hernández. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Rev. Colomb. Biotecnol. 7: 47-54.
- Barraza, Z., A. Bravo, y A. Pérez. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* productora de metabolito con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae*. Rev. Colomb. Cienc. Anim. 9(S): 114-121.
- Bou, G., A. Fernández, C. García, J. Sáez, y S. Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm. Infec. Microbiol. Clín. 29: 601-608.
- Caballero, J., J. Onofre, P. Estrada, y L. Martínez-Aguilar, L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5308-5319.
- Cárdenas, D. M., M. Garrido, R. Bonilla, y V. L. Baldani. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. Pastos Forrajes 33: 1-11.
- Castro S., Y. Herschokovits, Y. Okon, y E. Jurkevich. 2007. Efectos de la inoculación en planta, crecimiento - promoción rizobacterias como microorganismos residentes de la rizosfera. Microbiol. FEMS 276: 311-329.
- Cordero, A., J. Sierra, y J. Cuello. 2010. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriobloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre. Colombia. Acta Biol. Colomb. 15: 219-228.
- DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). 2016. Encuesta nacional agropecuaria ENA 2015. Boletín técnico. Bogotá, Colombia. 25 p.
- DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). 2014. Insumos y factores asociados a la producción agrícola. Boletín mensual. Bogotá, Colombia. 72 p.
- Döbereiner, J., V. L. Baldani, y J. I. Baldani. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília (EMBRAPA-SPI). 60 p.
- Doncel, A., L. Chamorro, y A. Pérez A. 2016. Actividad in vitro de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas con pasto colosuana en el municipio de Corozal, Sucre. Rev. Colomb. Cienc. Anim. 8: 351-360.
- Escobar, C., Y. Horna, C. Carreño, y G. Mendoza. 2011. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. Sci. Agropec. 2: 39-49.
- Flores, A. C., J. C. Contreras, Reyes M. H., y Rodríguez H. 2012. Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. Rev. Cient. 4: 32-41.
- Fuentes, L. E., R. Bustillos, A. Tapia, T. Jiménez, E. T. Wang, E. Martínez, and J. Caballero. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. Int. J. Syst. Evol. Micr. 51: 1305-1314.
- Galvis, F., y M. Carrillo. 2015. Identificación y caracterización molecular de aislados de *Burkholderia glumae*. Agente causante del añublo bacterial en el cultivo de arroz. Inf. Tecnol. 26: 33-40.
- Garrido, M., D. Cárdenas, R. Bonilla, y V. Baldani, 2010. Efecto de los factores edafoclimáticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotróficas. Pastos Forrajes 33: 1-11.
- Garrity, G., D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (eds). 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Springer, New York. 1256 p.
- Gijon, A., D. Teliz, D. Mejia, R. De La Torre, E. Cardenas, R. C. De León, and A. Mora. 2011. Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. J. Phytopathol. 159: 377-381.
- Guzmán, A., M. Obando, D. Rivera, y R. Bonilla. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). Rev. Colomb. Biotecnol. 14: 182-190.
- Karki, H. S., B. Shrestha, J. W. Han, D. E. Groth, I. K. Barphagha, M. C. Rush, and J. H. Ham. 2012. Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. PLoS One 7: 1-12.
- Khalid A., M. Arshad, and Z. A. Zahir. 2006. Phytohormones: microbial production and applications. In: Uphoff N. et al. (eds). Biological Approaches to Sustainable Soil Systems. Taylor & Francis, Boca Raton, Flo. 220 p.
- James, E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res. 65: 197-209.
- Lacasta, C., R. Meco, y N. Maire. 2005. Evolución de las producciones y de los parámetros químicos y bioquímicos del suelo, en un agrosistema de cereales sometido a diferentes manejos de suelo durante 21 años. Congreso Internacional sobre Agricultura de Conservación. 436p.
- Madhaiyan, M., V. Saravanan, D. Jovi, H. Lee, R. Thenmozhi, K. Hari, and T. Sa, T. 2004. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. Microbiol. Res. 159: 233-243.
- Mantilla, A. J., G. Cardona, C. P. Peña, U. Murcia, M. Rodríguez, y M. M. Zambrano. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. Rev. Biol. Trop. 57: 915-927.
- Martyniuk, S., and M. Martyniuk. 2002. Occurrence of *Azotobacter* spp. in some polish soils. Pol. J Environ. Stud. 12: 371-374.
- Mehnaz, S., B. Weselowski, and G. Lazarovits. 2006. Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. Syst. App. Microbiol. 29: 496-501. Int. J. Syst. Evol. Micr.
- Moreno, L. Y., y F. Galvis. 2013. Potencial biofertilizante de bacterias diazotólicas aisladas de muestras de suelo rizosférico. Pastos Forrajes 36: 33-37.
- Obando, D. M., L. B. Burgos, D. Rivera, M. Rubiano, V. Divan, y R. Bonilla. 2010. Caracterización de bacterias diazotólicas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). Acta Biol. Colomb. 15: 107-120.
- Pérez, J. R., J. A. Rodríguez, B. M. Amador, M. F. Herrera, F. G. Izquierdo, R. A. Murillo, y G. E. Goya. 2015. Humatos de vermicompost y su efecto en el crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Biotecnia 17: 9-12.

- Remans, R. 2007. Searching for nitrogen under phosphorus deficiency: the interplay between common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Rhizobium and plant growth-promoting rhizobacteria. PhD thesis, KULeuven. Belgium. 172 p.
- Ribaudo, C. M., E. M. Krumpholz, F. D. Cassán, R. Bottini, M. L. Cantore, y J. A. Curá. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. J. Plant Growth Reg. 25: 175-185.
- Sashidhar, B., y A. R. Podile. 2009. Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. Microbial Biotechnol. 2: 521-529.
- Tejera, J., C. Llunch, M. Martínez, y J. González. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strain from the sugarcane rhizosphere. Plant Soil 7: 223-232.
- Vallejo, F., y E. Estrada. 2004. Producción de Hortalizas en Clima Cálido. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 346 p.

