

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS ASOCIADAS A CULTIVOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) DEL NORTE DE SANTANDER (COLOMBIA)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RHIZOBACTERIA ASSOCIATED WITH RICE CROPS (*Oryza sativa* L.) IN NORTE DE SANTANDER (COLOMBIA)

Jessica D. Florez-Márquez¹, Gloria I. Leal-Medina¹, Leidy D. Ardila-Leal², Diana M. Cárdenas-Caro^{2*}

¹Semillero de Investigación Biotecnología para la Agricultura y la Alimentación, SIBAA. Universidad Francisco de Paula Santander. Cúcuta, Colombia. ²Departamento de Biología, Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas “Majumba”. Universidad Francisco de Paula Santander. Cúcuta, Colombia. (diana.cardenascao@hotmail.com).

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal son reconocidas y estudiadas por sus efectos benéficos en varios cultivos. Cepas de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas* se aislaron de suelo rizosférico de cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) de 10 fincas en el distrito de riego del río Zulia, Norte de Santander, Colombia. El aislamiento bacteriano se hizo a partir de gránulos de suelo y diluciones seriadas de suelo, sembradas en agar Ashby para *Azotobacter* y King B para *Pseudomonas* fluorescentes, respectivamente. Cuarenta y dos aislamientos se conservaron en viales con solución salina estéril (0.85 % NaCl) en refrigeración a 4 °C y se ingresaron al Banco de Cepas del Laboratorio de Investigaciones en Biología Aplicada de la Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia. Para seleccionar aislamientos con potencial para el desarrollo de inoculantes microbianos, en todas las cepas se determinó su capacidad de solubilización de fosfato inorgánico, fijación biológica de nitrógeno, síntesis de ácido indolacético y sideróforos. Con un conglomerado jerárquico de las medianas de las cuatro actividades se seleccionaron cuatro aislamientos por presentar los valores más cercanos a los testigos diseñados como cepas promisorias en las cuatro actividades según el dendrograma de similitudes. Estas cuatro cepas se identificaron como *Pseudomonas putida* (RzA027 y RzA035), *Azotobacter chroococcum* (RzA040) y *Azotobacter tropicalis* (RzA042) mediante amplificación del gen 16S ADNr.

ABSTRACT

The plant-growth promoting rhizobacteria are recognized and studied for their beneficial effects on several crops. Strains of the *Azotobacter* and *Pseudomonas* genera were isolated from rhizospheric soil where rice crops (*Oryza sativa* L.) are grown, from 10 farms located in the Zulia River's irrigation district, Norte de Santander, Colombia. The bacterial isolation was obtained from granular soil and serial soil dilutions, which were planted on Ashby and King B agar, for *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas*, respectively. Forty-two isolates were stored in vials with a sterile saline solution (0.85 % NaCl) in a refrigerator at 4 °C and were deposited in the Bank of Strains of the Applied Biology Research Laboratory of the Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia. The capacity to solubilize inorganic phosphate, to fix biological nitrogen, and to synthesize indoleacetic acid and siderophores were determined in all strains, in order to select isolates with potential to develop microbial inoculum. With a hierarchical clustering of the medians of the four activities, four isolations were selected because they presented the closest values to the controls designed as promising strains in the four activities, according to the similarity dendrogram. These four strains were identified as *Pseudomonas putida* (RzA027 and RzA035), *Azotobacter chroococcum* (RzA040), and *Azotobacter tropicalis* (RzA042), by amplification of the 16S rDNA gene.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2016. Aprobado: enero, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 373-391. 2017.

Key words: *Azotobacter*, *Pseudomonas putida*, phosphates solubilization, biological nitrogen fixation, indoleacetic acid, siderophores.

Palabras clave: *Azotobacter*, *Pseudomonas putida*, solubilización de fosfatos, fijación biológica de nitrógeno, ácido indolacético, sideróforos.

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos más importantes en la población mundial por ser una de las principales fuentes de alimento y para suplir su demanda en la próxima década será necesario producir de 8 a 10×10^6 Mg más de la producción actual de este cereal (Seck *et al.*, 2012). Para satisfacer la demanda de este alimento debe aumentarse la producción en la misma área de cultivo y enfrentar el cambio climático, lo cual implica aplicar estrategias como mejorar la calidad del suelo y el manejo preciso de las prácticas agrícolas (Uribe-Vélez, 2011; García de Salamone *et al.*, 2012). La aplicación de fertilizantes químicos es efectiva para proveer al suelo de nutrientes, pero un aporte excesivo tiene un efecto negativo en el ambiente a corto y largo plazo, tal es el caso de la emisión de óxido nitroso a la atmósfera y la contaminación del agua con nitratos, ya que se dispersan en la escorrentía o se convierten en formas insolubles no asimilables por las plantas (Halpern *et al.*, 2014).

Norte de Santander es un departamento de Colombia importante en la producción agrícola, pero su modelo de producción convencional ha permanecido por más de 40 años en regiones como el distrito de riego del Río Zulia. Éste se caracteriza, como en el resto del país, por el monocultivo, el laboreo excesivo, el uso continuo de fertilizantes y pesticidas sintéticos, lo cual afecta las propiedades físicoquímicas de estos suelos (Cuevas, 2012). Lo anterior ocasiona desequilibrio ecológico del agroecosistema, con disminución de la población de organismos benéficos, incremento de población de arvenses, fitopatógenos y plagas, acidificación de los suelos, disminución del contenido de materia orgánica y reducción de la actividad biológica de los microorganismos benéficos (Cañón *et al.*, 2009). En este grupo de microorganismos se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), las cuales destacan por sus efectos benéficos para las plantas y, en consecuencia, para los ecosistemas por diversos mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de

INTRODUCTION

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important crops and a major source of food for the world population. In order to meet the demand for this cereal over the next decade, it will be necessary to produce 8 to 10×10^6 Mg more than the current production (Seck *et al.*, 2012). Therefore, rice production must be increased in the same crop area and face climate change, which implies applying strategies such as improving soil quality and the precise management of agricultural practices (Uribe-Vélez, 2011; García de Salamone *et al.*, 2012). Applying chemical fertilizers is an effective way to provide the soil with nutrients, but an excessive contribution has a negative short—and long—term effect on the environment—such as the emission of nitrous oxide into the atmosphere and nitrate pollution of water—, because they are dispersed by the surface runoff or become insoluble forms that plants cannot assimilate (Halpern *et al.*, 2014).

Norte de Santander is a Colombian department with an important agricultural production, but its conventional production model has not changed for more than 40 years in regions such as the Zulia River irrigation district. As in the rest of the country, this is set apart by monoculture, excessive tillage, and the continuous use of synthetic fertilizers and pesticides, which affect the physical and chemical properties of these soils (Cuevas, 2012). This results in an ecological imbalance of the agroecosystem, with a decrease in the population of beneficial organisms, an increase of weed, phytopathogens and pests, soil acidification, reduction of organic matter content and reduction of the biological activity of beneficial microorganisms (Cañón *et al.*, 2009). This group of microorganisms includes plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), which stand out for their beneficial effects on plants and, consequently, on ecosystems by various mechanisms, including: biological nitrogen fixation, solubilization of phosphates and micronutrients, production of phytohormones and other metabolites associated with biocontrol of pathogens (such as antibiotics and siderophores), production of chitinases, and induction of resistance in plants (Ahemad and Khan, 2012; Son *et al.*, 2014).

Microorganisms adapted to a specific region can be more adequate in the selection of isolates, for

fosfatos y micronutrientes, producción de fitohormonas y otros metabolitos asociados al biocontrol de patógenos como antibióticos y sideróforos, producción de quitinasas e inducción de resistencia en las plantas (Ahemad y Khan, 2012; Son *et al.*, 2014).

Los microorganismos adaptados a una región determinada pueden preferirse en la selección de aislamientos para el desarrollo de inoculantes destinados a cultivos regionales, ya que podrían ser más competitivos que las bacterias foráneas o introducidas (Karagöz *et al.*, 2012). El desarrollo de biofertilizantes debe iniciarse con el aislamiento de microorganismos de interés y la caracterización de los mecanismos asociados con la promoción del crecimiento vegetal (Vanegas *et al.*, 2011). Hay investigaciones orientadas al aislamiento e identificación de cepas de rizobacterias en arroz (De Souza *et al.*, 2012; Sahoo *et al.*, 2013), maíz (*Zea mays* L.) (López-Ortega *et al.*, 2013), hortalizas (*Coriandrum sativum* L. y *Lattuca sativa* L.) (Cárdenas *et al.*, 2013), y banano (*Musa paradisiaca*) (Andrade *et al.*, 2014). Estas cepas fueron caracterizadas según actividades promotoras del crecimiento vegetal como la síntesis de ácido indolacético, solubilización de fosfatos, fijación biológica de nitrógeno y producción de sideróforos. Al final del proceso se seleccionan los microorganismos con efectos benéficos en los cultivos. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue aislar bacterias asociadas a plantas de arroz cultivadas en suelos del distrito de riego del Río Zulia (Norte de Santander), determinar su potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal y seleccionar las más promisorias para el desarrollo de biofertilizantes que incrementen el rendimiento de los cultivos regionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de rizobacterias

Toma de muestras

Las muestras de suelo rizosférico tomadas del cultivo de arroz corresponden a diez parcelas en las veredas El 52 (área 1), Matecaña (área 2, 3 y 10), Limoncito (área 4), San Roque (área 5 y 6), Gorgona (7 y 8) y Buena Esperanza (área 9), las cuales están ubicadas en el distrito de riego del Río Zulia (Norte de Santander). Este distrito se encuentra entre 68 y 120 m de altitud y tiene un clima cálido húmedo con temperaturas entre 27 y 34 °C

the development of inoculants destined to regional crops, because they could be more competitive than foreign or induced bacterium (Karagöz *et al.*, 2012). The development of biofertilizers should be initiated with the isolation of relevant microorganisms and the description of the mechanisms associated with the promotion of plant growth (Vanegas *et al.*, 2011). The isolation and identification of strains of rhizobacterium in rice (De Souza *et al.*, 2012; Sahoo *et al.*, 2013), corn (*Zea mays* L.) (López-Ortega *et al.*, 2013), vegetables (*Coriandrum sativum* L. and *Lattuca sativa* L.) (Cárdenas *et al.*, 2013), and banana (*Musa paradisiaca*) (Andrade *et al.*, 2014) have been subject to research. These strains were characterized according to plant growth promoting activities such as: indoleacetic acid synthesis, solubilization of phosphates, biological nitrogen fixation, and production of siderophores. At the end of the process, microorganisms with beneficial effects on crops are selected. Therefore, the objective of this research was to isolate bacterium associated with rice plants cultivated in soils of the Zulia River irrigation district (Norte de Santander), to determine their potential as promoters of plant growth, and to select the ones that are more promising for the development of biofertilizers that increase the yield of regional crops.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of rhizobacterium

Sampling

Samples of rhizospheric soil from rice crops were taken in ten plots in the following areas: El 52 (area 1), Matecaña (area 2, 3, and 10), Limoncito (area 4), San Roque (area 5 and 6), Gorgona (areas 7 and 8) and Buena Esperanza (area 9); these areas are located in the Zulia River irrigation district (Norte de Santander). This district is located between 68 and 120 m altitude. It has a warm humid climate with temperatures between 27 and 34 °C, and a relative humidity of 70-90 %. According to Holdridge life zones, this region is classified as a tropical humid forest (bh-T) (IGAC, 2006). The sampling areas were crossed in zigzag and 10 1-kg subsamples were taken from each plot (20-cm deep areas). This sampling was carried out 50-80 d after sowing. The samples were processed in the Applied Biology Research Laboratory of the University Francisco de Paula Santander.

y humedad relativa de 70-90 % y clasificación según Holdrige de bosque húmedo tropical (bh-T) (IGAC, 2006). El muestreo se realizó en un recorrido en zigzag tomando 10 submuestras, cercanas a 1 kg, de cada parcela a una profundidad de 20 cm en cultivos de 50 y 80 d después de la siembra. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Investigaciones en Biología Aplicada de la Universidad Francisco de Paula Santander.

Aislamiento de bacterias del género *Azotobacter*

El aislamiento se realizó sembrando de 10 a 30 gránulos de suelo rizosférico en agar Ashby (Aquilanti *et al.*, 2004). Los cultivos se incubaron a 32 °C hasta obtener crecimiento abundante de colonias viscosas con pigmento amarillento, verde o marrón alrededor de los granos de suelo. Estas colonias se sembraron en nuevo agar Ashby hasta obtener cultivos puros. En los aislamientos se realizó la tinción de Gram para confirmar desarrollo de células Gram negativas y quistes característicos de éste género.

Aislamiento de bacterias del género *Pseudomonas*

El aislamiento se realizó con la metodología de diluciones seriadas de suelo rizosférico en solución salina (0.85 % de NaCl). Las placas de agar King B (King *et al.*, 1954) fueron inoculadas con 100 μ L de las diluciones 10^{-2} a 10^{-7} y se incubaron a 32 °C hasta el crecimiento de colonias con formación de pigmento soluble a su alrededor. Las colonias se sembraron en un nuevo agar King B hasta obtener el cultivo puro. Después se realizó tinción de Gram para confirmar el desarrollo de células con forma de bacilos Gram negativos. Las colonias en agar King B se expusieron a luz ultravioleta para observar la presencia del pigmento fluorescente, característico de las especies de este género.

Los aislamientos se conservaron usando el método de viales en refrigeración con solución salina estéril (0.85 % de NaCl) (Sarmiento *et al.*, 2013).

Caracterización de los aislamientos de las rizobacterias según actividades de promoción del crecimiento vegetal

Activación de los microorganismos

Los aislamientos conservados en solución salina estéril se activaron en agar Ashby y agar King B para los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*, respectivamente, y se incubaron a 32 °C hasta el crecimiento de las colonias. Con los cultivos viables obtenidos se realizó la evaluación cuantitativa de las actividades promotoras de crecimiento vegetal.

Isolation of *Azotobacter* genus bacteria

The isolation was carried out spreading 10 to 30 rhizospheric granular soil on Ashby agar (Aquilanti *et al.*, 2004). Cultures were incubated at 32 °C until an abundant growth of viscous colonies with yellowish, green or brown pigment appeared around the soil grains. These colonies were cultured on new Ashby agar until pure cultures were obtained. Gram staining was performed in the isolations, to confirm the development of Gram-negative cells and cysts characteristic of this genus.

Isolation of *Pseudomonas* genus bacteria

The isolation was developed using the serial dilution methodology of rhizospheric soil in a saline solution (0.85 % NaCl). King B agar plates (King *et al.*, 1954) were inoculated with 100 μ l of 10^{-2} to 10^{-7} dilutions, and incubated at 32 °C until colonies surrounded with a soluble pigment formation appeared. The colonies were spread in a new agar King B until a pure culture was obtained. Later, Gram staining was performed to confirm the development of Gram-negative bacilli. The colonies on King B agar were exposed to ultraviolet light to observe the fluorescent pigment presence, a distinctive trait of the species of this genus.

The isolations were preserved using the method of vials under refrigeration with a sterile saline solution (0.85 % NaCl) (Sarmiento *et al.*, 2013).

Description of rhizobacteria isolates according to plant growth promoting activities

Activation of microorganisms

Isolates preserved in a sterile saline solution were activated in Ashby and King B agar, for *Azotobacter* and *Pseudomonas* genera, respectively; they were incubated at 32 °C until the colonies grew. Plant growth promoting activities were carried out using a quantitative evaluation of the viable cultures obtained.

Preparation of bacterial inocula

From one strain of each isolation, an inoculum was prepared in 50 mL of DYGS culture broth (Radwan *et al.*, 2005) and incubated 24 h at 32 °C. A 10 mL suspension of this culture was transferred to a tube and centrifuged for 10 min at 4124 g. The supernatant was discarded, and 10 mL of a sterile phosphate buffer solution (0.06 M and pH 7.0) was added, in order to resuspend the cells and adjust the cell concentration to O.D._{605nm} = 0.5 in a Spectroquant NOVA60 spectrophotometer. The cell suspensions

Preparación de inóculos bacterianos

Desde una cepa de cada aislamiento se preparó un inóculo en 50 mL de caldo DYGS (Radwan *et al.*, 2005) y se incubó 24 h a 32 °C. Una suspensión de 10 mL de este cultivo se transfirió a un tubo y se centrifugó 10 min a 4124 g. El sobrenadante se descartó y se adicionaron 10 mL de amortiguador fosfato estéril (0.06 M y pH 7.0) para resuspender las células y ajustar la concentración celular a una $D.O_{605nm}=0.5$ en un espectrofotómetro Spectroquant NOVA60. Estas suspensiones celulares obtenidas de cada aislamiento se usaron para determinar la producción de ácido indolacético (AIA), actividad solubilizadora de fosfatos, fijación biológica de nitrógeno y síntesis de sideróforos.

Determinación de la producción ácido indolacético(AIA)

De la suspensión celular ajustada se tomaron 100 μ L y se inocularon en 25 mL de caldo DYGS más un suplemento de 0.15 g L⁻¹ de triptófano y 0.2 g L⁻¹ de NH₄Cl. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 120 rpm y 32 °C. Cada aislamiento se inoculó en tres réplicas y se instaló un testigo sin inocular en las mismas condiciones. Después de 72 h de incubación, 10 mL del caldo microbiano se centrifugaron 10 min a 4124 g. La determinación de compuestos indólicos se realizó adicionando 1 mL del sobrenadante y 4 mL de reactivo de Salkowsky (5 mL de FeCl₃·6H₂O [0.5M] en 250 mL de HClO₄ [35 %] para un volumen de 500 mL), hasta obtener una coloración rosada. La absorbancia de las muestras se leyó a 525 nm en el espectrofotómetro Spectroquant NOVA60. La concentración de compuestos indólicos se calculó con la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración construida con siete concentraciones de ácido indolacético, AIA (25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM) (Cárdenas *et al.*, 2010).

Determinación de actividad solubilizadora de fosfatos

La determinación de P disponible se realizó según el método de Bray II, adaptada para cultivos bacterianos (Cárdenas *et al.*, 2013). De la suspensión celular ajustada a una $D.O_{605nm}=0.5$ de cada aislamiento como ya se describió, se tomaron 100 μ L y se inocularon en 25 mL de caldo SRS (Sundara-Rao y Sinha, 1963) con fosfato tricálcico como fuente de P insoluble. Los cultivos se incubaron 48 h a 30 °C, a 120 rpm. Cada aislamiento se inoculó en tres réplicas y se instaló un testigo sin inocular bajo las mismas condiciones. Después de la incubación se centrifugaron 10 mL del cultivo microbiano a 4124 g por 10 min. La extracción de P disponible se realizó en 10 mL del sobrenadante con la adición de 10 mL de la solución

obtenida from each isolate were used to determine indoleacetic acid (AIA) production, solubilization of phosphates, biological nitrogen fixation, and siderophore synthesis.

Determination of indoleacetic acid (AIA) production

One-hundred μ L were taken from the adjusted cell suspension, and they were inoculated into 25 mL of DYGS culture broth, plus a supplement of 0.15 g L⁻¹ tryptophan and 0.2 g L⁻¹ NH₄Cl. Cultures were incubated in the dark at 120 rpm and 32 °C. Each isolate was inoculated in three replicates and an uninoculated control was set up under the same conditions. After 72 h of incubation, 10 mL of the microbial broth were centrifuged for 10 min at 4124 g. Indolic compounds were determined by adding 1 mL of the supernatant and 4 mL of the Salkowsky reagent (5 mL of FeCl₃·6H₂O [0.5M] in 250 mL of HClO₄ [35 %] for a 500 mL volume), until a pink coloration was obtained. The samples' absorbance was recorded at 525 nm in the Spectroquant NOVA60 spectrophotometer. The concentration of indole compounds was calculated using the linear regression equation of the calibration curve constructed with seven concentrations of indoleacetic acid, AIA (25, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM) (Cárdenas *et al.*, 2010).

Determination of phosphate solubilization

The determination of available P was carried out according to the Bray II method, adapted for bacterial cultures (Cárdenas *et al.*, 2013). 100 μ L were taken from the cell suspension—adjusted to a $D.O_{605nm}=0.5$ from each isolation, as described above—and inoculated into 25 mL SRS broth (Sundara-Rao and Sinha, 1963), with tricalcium phosphate as an insoluble P source. Cultures were incubated for 48 h at 30 °C at 120 rpm. Each isolation was inoculated in three replicates and an uninoculated control was set up under the same conditions. After incubation, 10 mL of microbial culture were centrifuged at 4124 g for 10 min. The available P was extracted from 10 mL of supernatant, plus 10 mL of the extraction solution (1.11 g of NH₄F and 25 mL of HCl [4N] in a volume of 1 L), and stirred 1 min. Then 1 mL of this solution was taken and 9 mL of a coloring solution were added (5 mL of solution A and 2 mL of solution B in 200 mL of distilled water) (Solution A: 30 g (NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O in 100 mL of distilled water and 0.728 g of K(SbO)C₄H₄O₆·½H₂O in 160 mL of distilled water. Solution B: 3.05 g of ascorbic acid in 25 mL of distilled water.) The absorbance (605 nm) was recorded in a spectrophotometer 15 min after the reaction. The available P concentration (μ g of P₂O₅ mL⁻¹)—which indicates the phosphate solubilization capacity— was calculated using the linear regression equation

extractora (1.11 g de NH_4F y 25 mL de HCl [4N] en un volumen de 1 L) y se agitaron 1 min. Luego se tomó un 1 mL de esta solución y se adicionaron 9 mL de la solución coloreadora (5 mL de la solución A y 2 mL de solución B en 200 mL de agua destilada) (Solución A: 30 g $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada y 0.728 g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ en 160 mL de agua destilada. Solución B: 3.05 g de ácido ascórbico en 25 mL de agua destilada). La lectura de la absorbancia (605 nm) en espectrofotómetro se realizó después de 15 min de la reacción. La concentración de P disponible (μg de P_2O_5 mL^{-1}) que indica la capacidad de solubilización de fosfatos, se calculó usando la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración construida a partir de concentraciones de KH_2PO_4 : 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μg mL^{-1} .

Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno

La determinación de la fijación de nitrógeno (N) por las cepas de rizobacterias aisladas se realizó según la metodología de micro-Kjeldhal (Kuss *et al.*, 2007) con modificaciones. De la suspensión celular ajustada a una $\text{D.O.}_{605\text{nm}}=0.5$, de cada aislamiento como ya se describió, se inocularon 1000 μL en viales con 10 mL de medio semisólido JMV semisólido (g L^{-1} de medio: Manitol 5.0; KH_2PO_4 0.6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; NaCl 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2; solución de micronutrientes 2 mL (g L^{-1} : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.20; H_3BO_3 1.40; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.00; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.18); azul de bromotimol 2 mL (solución 0.5 % en 0.2N KOH); FeEDTA 4 mL (solución 1.64 %); solución de vitaminas 1 mL (biotina 10 mg y piridoxol- HCl 20 mg en 100 mL); pH 4.0-4.5; agar 2.5) para *Pseudomonas* sp. y medio semisólido Ashby para *Azotobacter* sp. Este procedimiento se realizó por triplicado. Después del crecimiento bacteriano se realizó lisis celular colocando los viales en autoclave por 1 min a 15 libras de presión. De la suspensión resultante se adicionaron 5 mL en un tubo para la digestión de toda la muestra para transformar todo el N orgánico a una forma mineral (NH_3^+). La digestión se realizó con la adición de 4 mL de ácido sulfúrico concentrado y 10 mL de peróxido de hidrógeno 30 % (V/V) al tubo que contenía la muestra. Los tubos se colocaron en el equipo de digestión a una temperatura inicial de 180 °C por 120 min y luego 60 min a 375 °C. Después, los tubos del digestor se retiraron y se aforó su contenido a 50 mL con agua destilada. Luego se leyeron las muestras en el espectrofotómetro HACH DR/2000 para cuantificar el N total (Nt) transformado a NH_3^+ . La cuantificación del N_{total} se realizó en 1 mL del producto de la digestión al cual se adicionaron 2 mL del reactivo de Nessler en presencia de una gota de catalizador y una gota de alcohol polivinílico; se obtuvieron coloraciones amarillas que se compararon con la curva de ca-

of the calibration curve constructed from concentrations of KH_2PO_4 : 5, 10, 20, 30, 40. and 50 μg mL^{-1} .

Evaluation of biological nitrogen fixation

Nitrogen (N) fixation by rhizobacteria isolated strains was determined according to a modified version of the micro-Kjeldahl method (Kuss *et al.*, 2007). From the adjusted cell suspension to a $\text{O.D.}_{605\text{nm}}=0.5$ (from each isolation, as described above), 1000 μL were inoculated into vials with 10 mL of a semi-solid Ashby medium for *Azotobacter* sp. and semi-solid JMV medium for *Pseudomonas* sp. The JMV medium had the following composition (g L^{-1}): Mannitol 5.0; KH_2PO_4 0.6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; NaCl 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2; micronutrient solution 2 mL (g L^{-1} : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.20; H_3BO_3 1.40; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.00; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.18); 2 mL of Bromothymol blue (0.5 % solution in 0.2N KOH); 4 mL of FeEDTA (1.64 % solution); 1 mL of vitamin solution (10 mg of biotin and 20 mg of pyridoxol- HCl in 100 mL); pH 4.0-4.5, agar 2.5. This procedure was performed in triplicate. After bacterial growth, cell lysis was carried out placing the vials in an autoclave for 1 min at 15 pounds of pressure. From the resulting suspension, 5 mL were added to a tube where the whole sample was digested, in order to transform all the organic N into a mineral form (NH_3^+). The digestion was induced by adding 4 mL of concentrated sulfuric acid and 10 mL of 30 % hydrogen peroxide (V/V) to the tube containing the sample. The tubes were placed in the digestion equipment at an initial temperature of 180 °C for 120 min, and then, for 60 min at 375 °C. Subsequently, the tubes were removed from digester, and the content was gauged with distilled water into 50 mL. Samples were then recorded on the HACH DR/2000 spectrophotometer in order to quantify the total N (Nt) transformed into NH_3^+ . The quantizing of Ntotal was completed in: 1 mL of the digestion product, plus 2 mL of the Nessler reagent, 1 drop of catalyst, and 1 drop of polyvinyl alcohol. Yellow colorations were obtained, which were compared with the standard calibration curve of the equipment. The calculation of fixed Nt was showed in μg mL^{-1} .

Determination of the siderophore synthesis

From the cell suspension adjusted to an $\text{O.D.}_{605\text{nm}}=0.5$ (from each isolation, as described above), 2.5 mL were taken and inoculated into 50 mL of Simon and Tesmann Broth (g L^{-1} broth: malic acid 10; NaCl 5.8; KCl 3.7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15; Tris 12.1; magnesium chloride 0.1; ammonium chloride 1.1; Na_2SO_4 0.142; K_2HPO_4 0.272; pH 6.8). The bacterial cultures were incubated at 120 rpm at 32 °C during 5 d. Each isolate was inoculated in three replicates and an uninoculated control was set

libración estándar del equipo. El cálculo de Nt fijado se presentó en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Determinación de la síntesis de sideróforos

De la suspensión celular ajustada a una $\text{D.O.}_{605\text{nm}}=0.5$, de cada aislamiento como ya se describió, se tomaron 2.5 mL y se inocularon en 50 mL de Caldo Simon y Tesmann (g L^{-1} de caldo: ácido málico 10; NaCl 5.8; KCl 3.7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15; Tris 12.1; cloruro de magnesio 0.1; cloruro de amonio 1.1; Na_2SO_4 0.142; K_2HPO_4 0.272; pH 6.8). Los cultivos bacterianos se incubaron a 120 rpm a 32 °C por 5 d. Cada aislamiento se inoculó en tres réplicas y se instaló un testigo sin inocular bajo las mismas condiciones. De los cultivos se tomaron 10 mL de caldo y se llevaron a tubos de centrifuga para realizar la determinación de sideróforos producidos. La centrifugación se realizó a 4124 g por 10 min. La cuantificación de los sideróforos se realizó en 1 mL del sobrenadante con la adición de 1 mL de una solución de 5 mM de perclorato férrico en 0.14 M de ácido perclórico. Una vez obtenida la reacción, se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 525 nm. La concentración de sideróforos se calculó usando la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración construida con cinco concentraciones (5, 20, 50, 80, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de un sideróforo tipo hidroxamato (mesilato de deferroxiamina, SIGMA) con la solución de perclorato férrico y leídas en el mismo espectrofotómetro.

Análisis estadístico

Para cada variable de promoción del crecimiento vegetal se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa IBM SPSS Statistics 19. Los valores obtenidos de la media de tres repeticiones de las características promotoras del crecimiento vegetal para cada aislamiento, se compararon entre sí y con nueve controles diseñados: 1) con el valor superior en la producción de ácido indolacético (Ctrl AIA), 2) el valor superior en solubilización de fosfatos (Ctrl SP), 3) en síntesis de sideróforos (Ctrl Sider) y, 4) en fijación biológica de N (Ctrl FBN). También se diseñaron tres controles con niveles intermedios en todas las actividades promotoras del crecimiento vegetal evaluadas (Ctrl Medio_1, Ctrl Medio_2, Ctrl Medio_3), y dos con los mayores y menores valores obtenidos en todas las actividades (Ctrl+ y Ctrl-). Las similitudes entre estos valores se estimaron según la Distancia Euclídea, se agruparon por el método de las medias entre grupos y se representaron gráficamente en un dendrograma con el programa IBM SPSS Statistics 19 (Hernández *et al.*, 2004). Esta metodología permite clasificar los aislamientos según sus valores en cada una de las actividades promotoras del crecimiento vegetal

up under the same conditions. From the cultures, 10 mL of broth were taken and carried to centrifuge tubes in order to determine the siderophores produced. Centrifugation was performed at 4124 g for 10 min. Siderophores quantizing was completed in 1 mL of the supernatant, plus 1 mL of a ferric perchlorate and perchloric acid solution (5 mM and 0.14 M, respectively). After the reaction was obtained, a 525-nm absorbance was recorded in the spectrophotometer. The siderophore concentration was calculated using the linear regression equation of the calibration curve constructed with five concentrations (5, 20, 50, 80, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of a hydroxamate siderophore (deferroxamine mesylate, SIGMA) with the ferric perchlorate solution, and recorded with the same spectrophotometer.

Statistical analysis

An ANOVA was performed for each variable of plant growth promotion. The means of the treatments were compared with Tukey's multiple comparison test ($p \leq 0.05$), using the IBM SPSS Statistics 19 software. For each isolate, the values obtained from the mean of three replicates of plant growth promoting features were compared with each other and with nine designed controls: 1) with the highest value in the indoleacetic acid production (Ctrl AIA); 2) with the highest value in the solubilization of phosphates (Ctrl SP); 3) with the highest value in siderophore synthesis (Ctrl Sider); and 4) with the highest value in biological nitrogen fixation (Ctrl FBN). In addition, three intermediate-level controls were designed for all plant growth promoting activities evaluated (Ctrl Medio_1, Ctrl Medio_2, Ctrl Medio_3), as well as two controls with the highest and lowest values obtained in all activities (Ctrl+ y Ctrl-). The similarities between these values were estimated based on the Euclidean Distance, were assembled using the means between groups comparison and were graphically represented in a dendrogram using the IBM SPSS Statistics 19 software (Hernández *et al.*, 2004). This methodology enables the classification of the isolates according to their values in each plant growth promoting activities evaluated in order to select the means that are closer to the designed controls. The selected isolates continued with the molecular identification process.

Rhizobacteria molecular identification by the 16S rDNA gene

The selected *Pseudomonas* isolates were cultured in a Luria Bertani broth, at 150 rpm, at 30 °C, for 18 h and those of the *Azotobacter* genus were cultured in a DYGS broth, at 150 rpm for 30 h. DNA extraction was performed on 1 mL of the culture, using Bioline's ISOLATE II Genomic DNA kit. The quality of the extracted DNA was verified using a horizontal electrophoresis

evaluadas para seleccionar aquellos que presenten las medias más cercanas a los controles diseñados. Los aislamientos seleccionados continuaron con el proceso de identificación molecular.

Identificación molecular de las rizobacterias por el gen 16S ADN

Los aislamientos seleccionados de *Pseudomonas* fueron cultivados en caldo Luria Bertani a 150 rpm a 30 °C por 18 h y los del género *Azotobacter* se cultivaron en caldo DYGS a 150 rpm por 30 h. La extracción del ADN se realizó a 1 mL del cultivo, utilizando el KIT Isolated II Genomic DNA de Bioline. La verificación de la calidad del ADN extraído se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % (P/V) a 120 V por 90 min, empleando TBE 0.5 X como amortiguador de corrimiento. La amplificación del gen 16S ADN se realizó en 50 µL de una mezcla de reacción compuesta por 5 µL de amortiguador (1x), MgCl₂ (2 mM), dNTP (200 µM), iniciadores 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') (1 µM) y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') (1 µM) (Rohwer *et al.*, 2002); 1.25 U de Taq DNA polimerasa y 1 µL de ADN molde (muestra del aislamiento). Las condiciones del termociclador fueron: un ciclo inicial de denaturación (94 °C por 5 min), 30 ciclos de denaturación (94 °C por 30 s), anillaje (57 °C por 45 s) y extensión (72 °C por 90 s) y extensión final (72 °C por 7 min). Los fragmentos amplificados se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en TAE acondicionado con 0.5 µg mL⁻¹ de bromuro de etidio. El producto amplificado se envió a secuenciación a Corpogen y el resultado se analizó con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y EMBL (European Molecular Biology Laboratory).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de rizobacterias pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*

Diez aislamientos presuntivos del género *Azotobacter* y 32 de *Pseudomonas* según sus características fenotípicas, se obtuvieron a partir de las muestras de suelo rizosférico. Las colonias de *Azotobacter* fueron seleccionadas por presentar crecimiento viscoso y abundante, con pigmentación amarillenta y café y presencia de células Gram negativas con formación de quistes. Este crecimiento viscoso de *Azotobacter* está asociado con su producción de exopolisacáridos (EPS), como el alginato el cual participa en el enquistamiento de las células como mecanismo de protección y de polihidroxibutirato

system, in a 1 % (P/V) agarose gel at 120 V for 90 min, using TBE 0.5 X as the running buffer. The 16S rDNA gene was amplified in 50 µL of a reaction mixture composed of: 5 µL of buffer (1x); MgCl₂ (2 mM); dNTP (200 µM); initiators 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') (1 µM) and 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') (1 µM) (Rohwer *et al.*, 2002); 1.25 U of Taq DNA polymerase, and 1 µL of template DNA (isolation sample). The thermal cyclers conditions were: an initial denaturing cycle (94 °C for 5 min), 30 denaturing cycles (94 °C for 30 s), annealing (57 °C for 45 s), an extension (72 °C for 90 s), and a final extension (72 °C for 7 min). Amplified fragments were observed by a 2 % agarose gel electrophoresis in TAE prepared with 0.5 µg mL⁻¹ of ethidium bromide. The amplified product was sequenced at Corpogen. The result was analyzed using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) and at EMBL (European Molecular Biology Laboratory).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of *Azotobacter* and *Pseudomonas* genera rhizobacterium

Ten presumptive isolates of the *Azotobacter* genus and 32 of *Pseudomonas* genus were obtained from the rhizospheric soil samples —per their phenotypic characteristics. The *Azotobacter* colonies were selected because they presented viscous and abundant growth, with yellowish and brown pigmentation, and the presence of Gram-negative cells with cyst formation. This *Azotobacter* viscous growth has been associated with its production of exopolysaccharides (EPS) and polyhydroxybutyrate (PHB). An EPS is the alginate that participates in the formation of cysts in cells as a protection mechanism. The PHB is the main component of the carbon and energy stock of these bacterial cells, and is related to the biological nitrogen fixation, because it protects the nitrogenase against high oxygen concentration (Gauri *et al.*, 2012).

The fluorescent isolates of the *Pseudomonas* genus sp. were selected based on the formation of a yellow-greenish pigment diffused on King B agar, and the presence of Gram-negative bacilli. Pigments are siderophore-type molecules with low relative molecular mass that act as Fe-chelating agents (considered very important for plant nutrition) (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). *Pseudomonas* genus bacteria are found in the rice soils rhizosphere, and colonize the tissues of rice plants, which indicates their associative and endophytic behavior

(PHB) que es el principal material que constituye la reserva de carbono y energía de estas células bacterianas y está relacionado con la fijación biológica de nitrógeno, debido a que protege a la enzima nitrógenasa contra la alta concentración de oxígeno (Gauri *et al.*, 2012).

Los aislamientos del género *Pseudomonas* sp. fluorescentes se seleccionaron por la formación de un pigmento amarillo-verdoso difusible en agar King B y presencia de bacilos Gram negativos. Los pigmentos son moléculas tipo sideróforos de bajo peso molecular que actúan como agentes quelantes de Fe, considerados muy importantes en la nutrición vegetal (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Bacterias del género *Pseudomonas* están en la rizósfera de suelos arroceros y colonizan los tejidos de las plantas de arroz, lo cual indica su comportamiento asociativo y endófito (Sivakamasundari y Usharani, 2012). Phetcharat y Duangpaeng (2012) obtuvieron desde varios tejidos de plantas de arroz, 34 aislados identificados como *Pseudomonas* sp. y en menor cantidad, rizobacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Azotobacter* y *Enterobacter*. Habibi *et al.* (2014) reportan las especies *Pseudomonas veronii*, *P. putida*, *P. monteilii* y *P. mandelii* como endófitas del arroz, y Souza *et al.* (2015) encontraron asociados a este cultivo, aislamientos pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. Estos resultados se relacionan con los obtenidos en nuestro estudio y muestran una marcada ocurrencia de *Pseudomonas* en suelos arroceros. Pero Chennappa *et al.* (2014) y Sahoo *et al.* (2013) también reportan el aislamiento de especies de *Azotobacter*, sobre todo en suelos con pH más cercano a la neutralidad. Esto permite inferir que existen varios factores que influyen en la diversidad microbiana de estos suelos y que la obtención de pocos aislados del género *Azotobacter* se puede relacionar con la naturaleza ácida de los suelos de donde fueron tomadas las muestras, los cuales se caracterizaron por ser de fuerte (4.23) a moderadamente (5.60) ácidos.

Caracterización de actividades asociadas a la promoción de crecimiento vegetal

Los 42 aislamientos bacterianos obtenidos presentaron todas las actividades de promoción de crecimiento vegetal evaluadas, aunque algunos se destacan en unas de estas características (Cuadro 1).

(Sivakamasundari and Usharani, 2012). From several tissues of rice plants, Phetcharat and Duangpaeng (2012) obtained 34 isolates identified as *Pseudomonas* sp. and a lower amount of rhizobacterium belonging to the *Bacillus*, *Azotobacter*, and *Enterobacter* genera. Habibi *et al.* (2014) reported that the *Pseudomonas veronii*, *P. putida*, *P. monteilii*, and *P. mandelii* species as rice endophytes. Souza *et al.* (2015) found isolates belonging to the *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* genera associated with this culture. These results are related to those obtained in our study and show a strong occurrence of *Pseudomonas* in rice soils. However, Chennappa *et al.* (2014) and Sahoo *et al.* (2013) also report the isolation of *Azotobacter* species, especially in soils with pH closer to neutrality. Therefore, we can infer that there are several factors that influence the microbial diversity of these soils, and that the few *Azotobacter* genus isolates obtained can be related to the acidic nature of the soil where the samples were taken from—which are set apart by their strong (4.23) to moderate (5.60) acidity.

Description of plant growth promoting activities

The 42 bacteria isolates obtained showed all the plant growth promoting activities evaluated, although some of these features stand out more in some isolates than in others (Table 1).

Production of indoleacetic acid (AIA)

Synthesis of AIA in *Azotobacter* isolates ranged from 6.34 to 158.27 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The values had great variability, but they showed this bacteria genus' capacity to produce indolic compounds. The maximum value was obtained by the *Azotobacter* RZA044 isolate (158.27 $\mu\text{g mL}^{-1}$)—which only showed similarity to the *Azotobacter* strain RZA042 (145.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$)—and was close to the maximum value recorded by Sahoo *et al.* (2013), who report a production close to 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$ —from *A. vinelandii* strain isolated from Indian rice soil. The other isolates were similar to each other, forming groups where the *Azotobacter* RZA040 and *Azotobacter* RZA041 isolates stood out. Hussein and Joo (2015) also reported—in *Azotobacter* strains isolated from *Panax ginseng*—a 32.29 and 46.68 $\mu\text{g mL}^{-1}$ production, which are

Cuadro 1. Características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal en las bacterias aisladas.
Table 1. Characteristics related to the promotion of plant growth in isolated bacteria.

CEPA	Solubilización de P ($\mu\text{g P soluble mL}^{-1}$)	FBN ($\mu\text{g N-NH}_3 \text{ mL}^{-1}$)	Sideróforos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Pseudomonas</i> RZA005	28.52 bcde	6.10 abcde	138.84 a	17.12 defg
<i>Pseudomonas</i> RZA006	19.77 bcdefghij	0.54 de	298.33 a	16.64 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA007	25.44 bcdefg	0.92 cde	384.44 a	15.6 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA008	26.27 bcdef	3.48 abcde	386.21 a	7.63 fg
<i>Pseudomonas</i> RZA009	27.86 bcdef	5.74 abcde	285.96 a	13.13 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA010	24.89 bcdefgh	1.26 bcde	292.27 a	17.28 defg
<i>Pseudomonas</i> RZA011	23.45 bcdefghi	1.20 bcde	596.31 a	14.08 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA012	33.46 ab	1.18 cde	323.33 a	10.45 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA013	24.49 bcdefgh	4.00 abcde	160.71 a	14.94 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA014	13.75 efghij	1.77 abcde	160.70 a	23.51 def
<i>Pseudomonas</i> RZA015	23.41 bcdefgh	1.52 bcde	133.94 a	8.17 fg
<i>Pseudomonas</i> RZA016	18.70 bcdefghij	1.55 bcde	591.77 a	9.81 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA017	15.87 defghij	1.49 bcde	291.52 a	16.27 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA018	17.25 cdefghij	3.18 abcde	145.05 a	16.05 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA019	6.32 ghij	6.93 abcde	213.74 a	19.07 defg
<i>Pseudomonas</i> RZA020	5.97 j	9.11 abcde	212.47 a	17.63 defg
<i>Pseudomonas</i> RZA021	20.42 bcdefghij	0.46 e	554.14 a	10.86 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA022	12.33 fghij	9.28 abcde	481.16 a	18.32 defg
<i>Pseudomonas</i> RZA023	27.76 bcdef	8.05 abcde	489.24 a	18.99 defg
<i>Pseudomonas</i> RZA024	26.46 bcdef	4.46 abcde	199.34 a	16.98 defg
<i>Pseudomonas</i> RZA025	29.18 bcde	4.39 abcde	390.00 a	12.46 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA026	26.82 bcdef	2.08 abcde	281.92 a	9.00 fg
<i>Pseudomonas</i> RZA027	26.65 bcdef	4.87 abcde	286.21 a	25.6 de
<i>Pseudomonas</i> RZA028	32.13 abc	2.18 abcde	556.84 a	7.62 fg
<i>Pseudomonas</i> RZA029	24.25 bcdefgh	2.03 abcde	628.38 a	16.36 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA030	19.30 bcdefghij	1.50 bcde	452.88 a	14.06 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA031	20.00 bcdefghij	4.87 abcde	302.88 a	13.28 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA032	27.60 bcdef	3.23 abcde	187.73 a	9.50 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA033	27.01 bcdef	0.98 cde	404.65 a	9.63 efg
<i>Pseudomonas</i> RZA034	27.98 bcdef	1.63 abcde	685.96 a	9.17 fg
<i>Pseudomonas</i> RZA035	46.43 a	1.60 abcde	670.23 a	22.05 defg
<i>Pseudomonas</i> RZA036	29.81 bcd	0.76 de	400.86 a	11.90 efg
<i>Azotobacter</i> RZA037	14.50 defghij	10.58 abcde	198.59 a	16.21 efg
<i>Azotobacter</i> RZA038	20.32 bcdefghij	10.72 abcd	223.33 a	33.20 d
<i>Azotobacter</i> RZA039	21.38 bcdefghij	10.33 abcde	248.84 a	6.34 g
<i>Azotobacter</i> RZA040	14.65 defghij	9.54 abcde	315.00 a	129.40 b
<i>Azotobacter</i> RZA041	15.95 defghij	10.69 abcd	174.09 a	68.99 c
<i>Azotobacter</i> RZA042	15.95 defghij	11.79 a	469.8 a	145.30 ab
<i>Azotobacter</i> RZA043	7.64 ij	11.00 abc	369.04 a	19.78 defg
<i>Azotobacter</i> RZA044	9.56 hij	11.42 ab	324.34 a	158.27 a
<i>Azotobacter</i> RZA045	13.63 efghij	10.17 abcde	339.24 a	60.01 c
<i>Azotobacter</i> RZA046	23.38 bcdefghi	9.83 abcde	304.39 a	22.90 def

Media de tres repeticiones. Medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$) ❖
Mean of three replicates. Mean with different letters in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

Producción de ácido indolacético (AIA)

La síntesis de AIA de los aislamientos de *Azotobacter* varió de 6.34 a 158.27 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los valores tuvieron gran variabilidad, pero muestran la capacidad productora de compuestos indólicos

close to those obtained by *Azotobacter* RZA038 and RZA045 isolates. Barua *et al.* (2012) report a 23.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of indole compound production from an *Azotobacter vinelandii* strain (isolated from forest soils in India), which is similar to the values obtained by *Azotobacter* RZA043 and RZA046 strains.

por este género bacteriano. El valor máximo fue obtenido por el aislamiento *Azotobacter* RZA044 ($158.27 \mu\text{g mL}^{-1}$), el cual sólo presentó similitud con la cepa *Azotobacter* RZA042 ($145.30 \mu\text{g mL}^{-1}$) y fue cercano al valor máximo registrado por Sahoo *et al.* (2013) con una producción cercana a $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ de una cepa de *A. vinelandii* aislada de un suelo arrocero de la India. Los demás aislamientos fueron similares entre sí, conformando grupos donde destacaron los aislamientos *Azotobacter* RZA040 y *Azotobacter* RZA041. Hussein y Joo (2015) también registraron en cepas de *Azotobacter* aisladas de *Panax ginseng* una producción de 32.29 y $46.68 \mu\text{g mL}^{-1}$, los cuales son cercanos a los obtenidos por los aislamientos *Azobacter* RZA038 y RZA045. Barua *et al.* (2012) reportan una producción de $23.16 \mu\text{g mL}^{-1}$ de compuestos indólicos de una cepa de *Azotobacter vinelandii* aislada de suelos forestales de la India, lo cual es similar a los obtenidos por las cepas *Azobacter* RZA043 y RZA046.

La variabilidad de producción de AIA entre bacterias del mismo género también es reportada en otras investigaciones. Escobar *et al.* (2011) registraron un rango de producción de ácido indolacético de 11.99 a $57.99 \mu\text{g mL}^{-1}$ por cepas de *Azotobacter* aisladas de raíces y suelo rizosférico de hortalizas.

La síntesis de AIA de los aislamientos de *Pseudomonas* osciló de 7.62 a $25.6 \mu\text{g mL}^{-1}$, y las cepas RZA014, RZA027 y RZA035 sobresalieron, pero varios aislamientos no fueron diferentes ($p > 0.05$). Estos valores son cercanos a los reportados por Malik y Sindhu (2011) con un rango de producción de ácido indolacético de 10.2 y $31.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ en especies de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de cultivos de garbanzo. Lavakush *et al.* (2014) reportan 10 a $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA por cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas de suelos arroceros. En otras investigaciones la producción de AIA es superior a la obtenida en nuestro estudio ($37 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$) de un aislamiento de *P. mandelii* obtenido de suelo cultivado con arroz (Habibi *et al.*, 2014), y 35.9 a $47.54 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$ de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de *Panax ginseng* (Hussein y Joo, 2015).

Los amplios rangos de producción de compuestos indólicos reportados muestran la importancia de cuantificar esta actividad PGPR en los aislamientos obtenidos, porque su capacidad de síntesis puede variar debido a su diversidad genética y a las condiciones

The AIA production variability among same genus bacteria is also reported in other researches. Escobar *et al.* (2011) reported an 11.99 to $57.99 \mu\text{g mL}^{-1}$ range for indoleacetic acid production in *Azotobacter* strains isolated from vegetables roots and rhizospheric soil.

The AIA synthesis of *Pseudomonas* isolates ranged from 7.62 to $25.6 \mu\text{g mL}^{-1}$; RZA014, RZA027, and RZA035 strains stood out, but several isolates were not different ($p > 0.05$). These values are close to those reported by Malik and Sindhu (2011) with a indoleacetic acid production range of 10.2 and $31.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ in fluorescent *Pseudomonas* species isolated from chickpea crops. Lavakush *et al.* (2014) also report 10 to $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ of AIA in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from rice soils. In other researches, the AIA production is higher than the one obtained in our study: Habibi *et al.* (2014) reported $37 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$ in a *P. mandelii* isolate obtained from soil cultivated with rice, while Hussein and Joo, (2015) reported 35.9 to $47.54 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$ of fluorescent *Pseudomonas* isolated from *Panax ginseng*.

The wide ranges of indole compounds production reported show the importance of quantifying this PGPR activity in the isolates obtained because their synthesis capacity may vary due to their genetic diversity and their environmental conditions (Karagöz *et al.*, 2012).

Solubilization of phosphates

The isolates with the highest available P values in the SRS culture broth were those of the *Pseudomonas* genus, with 5.97 to $46.43 \mu\text{g mL}^{-1}$ values of available P; the RZA028 ($33.13 \mu\text{g mL}^{-1}$), RZA012 ($33.46 \mu\text{g mL}^{-1}$), and RZA035 ($46.43 \mu\text{g mL}^{-1}$) isolates—which were statistically similar (Table 1)—stood out. The results recorded for all *Pseudomonas* isolates were similar to those reported for: *P. putida* ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$ available P) and *P. pseudoalcaligenes* ($45 \mu\text{g mL}^{-1}$ available P) isolated from marginal soils in India with scarce vegetation (Patel *et al.*, 2012); *Pseudomonas* sp. strains isolated from cotton crops with less than $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of available P; *P. otitidis* isolated from olive ($6.55 \mu\text{g mL}^{-1}$) and sesame plants ($7.63 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Saber *et al.*, 2015). However, these values are lower than other rhizospheric *Pseudomonas* species' such as: *P. chlororaphis* with $154.1 \mu\text{g mL}^{-1}$

ambientales que encuentran para llevarla a cabo (Karagöz *et al.*, 2012).

Solubilización de fosfatos

Los aislamientos que registraron mayores valores de P disponible en el caldo de cultivo SRS, fueron los del género *Pseudomonas* con valores entre 5.97 y 46.43 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P disponible, destacándose los aislamientos RZA028 (33.13 $\mu\text{g mL}^{-1}$), RZA012 (33.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y RZA035 (46.43 $\mu\text{g mL}^{-1}$), los cuales fueron similares estadísticamente (Cuadro 1). Los resultados registrados en todos los aislamiento de *Pseudomonas* fueron similares a los reportados en *P. putida* (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P disponible) y *P. pseudoalcaligenes* (45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P disponible) aisladas de suelos marginales de la India con escasa vegetación (Patel *et al.*, 2012), así como por cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de cultivo de algodón con menos de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P disponible; por *P. otitidis* aisladas de planta de olivo (6.55 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y *P. otitidis* de planta de sésamo (7.63 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Saber *et al.*, 2015). Pero son valores inferiores con respecto a otras especies de *Pseudomonas* rizosféricas, como *P. chlororaphis* con 154.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Yu *et al.*, 2012) y *P. putida* con 140 y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Lavakush *et al.*, 2014).

Los aislados del género *Azotobacter* presentaron una producción de P soluble entre 7.64 y 23.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el medio de cultivo líquido. Los valores obtenidos por los aislamientos de *Azotobacter* fueron similares a los registrados en el medio cultivado con 13 de los 32 aislamientos de las rizobacterias del género *Pseudomonas* fluorescentes. También coincidieron con la disponibilidad de P en el medio de cultivo registrada por la actividad fosfatodisolvente de cepas de *A. chroococcum* (18.63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ P disponible) (Abd El-Fattah *et al.*, 2013) y superiores a los reportados por Escobar *et al.* (2011) en cepas de *Azotobacter* aisladas de tomate (0.46–2.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P disponible).

El género *Pseudomonas* se caracteriza por presentar alta capacidad fosfatodisolubilizadora, aunque también hay valores significativos en esta actividad biofertilizante en aislamientos de *Azotobacter* (161.11 y 151.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Rojas-Tapias *et al.*, 2012), y de *A. chroococcum* (41.3 y 93.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$; López-Ortega *et al.*, 2013). Por lo anterior, estas rizobacterias son microorganismos muy importantes para la planta porque pueden aumentar directamente la disponibilidad

(Yu *et al.*, 2012) and *P. putida* with 140 and 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Lavakush *et al.*, 2014).

The *Azotobacter* genus isolates presented a 7.64 to 23.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ soluble P production in the liquid culture medium. The values obtained by the *Azotobacter* isolates were similar to those recorded in the cultured medium with 13 of the 32 *Pseudomonas* genus fluorescent rhizobacteria isolates. They also matched the P availability in the culture medium recorded by the phosphatesolvent activity of *A. chroococcum* strains (18.63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ available P) (Abd El-Fattah *et al.*, 2013), and were higher than those reported by Escobar *et al.* (2011) in *Azotobacter* strains isolated from tomato (0.46–2.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ available P).

The *Pseudomonas* genus is set apart by its high phosphate-solubilizing capacity, although there are significant values in this biofertilization activity in *Azotobacter* (161.11 and 151.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Rojas-Tapias *et al.*, 2012), and *A. chroococcum* isolates (41.3 and 93.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$, López-Ortega *et al.*, 2013). Therefore, rhizobacterium are very important microorganisms for the plant, because they can directly increase P availability by solubilization, mineralization mechanisms, and, in alkaline soils, the reduction of pH, caused by the production of the following acids: lactic, acetic, oxalic, malonic, maleic, pyruvic, propionic, gluconic, citric, succinic, tartaric, fumaric, and trans-aconitic (Park *et al.*, 2011; Marschner *et al.*, 2011).

Biological nitrogen fixation

The isolates evaluated presented a variation in the amount of N_{total} from 0.46 to 11.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ N-NH₃. The isolate with the highest biological nitrogen fixation value was *Azotobacter* RZA042. Higher values were recorded for other *Azotobacter* isolates (9.54–11.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ N-NH₃) regarding *Pseudomonas* (0.46–9.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ N-NH₃). Abdel-Aziez *et al.* (2014) reported a biological nitrogen fixation of 11.11–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ N-NH₃ by *Azotobacter* genus bacterium. The *Pseudomonas* genus also fixes nitrogen, especially the species *P. putida* PS9 (Ahemad and Khan, 2012), *P. fluorescens* and *P. mendocina* (Karagöz *et al.*, 2012).

Azotobacter is the main group of heterotrophic free-living nitrogen-fixing bacterium associated with plants. The species of this genus can fix, at

de P por mecanismos de solubilización y mineralización y en suelos alcalinos, mediante la disminución del pH, ocasionada por la producción de ácido láctico, acético, oxálico, malónico, maléico, pirúvico, propiónico, glucónico, cítrico, succínico, tartárico, fumárico y trans-aconítico (Park *et al.*, 2011; Marschner *et al.*, 2011).

Fijación biológica de nitrógeno

Los aislamientos evaluados presentaron una variación en la cantidad de N_{total} de 0.46 a 11.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $N\text{-NH}_3$. El aislado con el valor mayor de fijación biológica de N fue *Azotobacter* RZA042, pero los demás aislamientos de *Azotobacter* registraron valores superiores (9.54–11.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $N\text{-NH}_3$) con respecto a *Pseudomonas* (0.46–9.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $N\text{-NH}_3$). Abdel-Aziez *et al.* (2014) reportaron una fijación biológica de N de 11.11–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $N\text{-NH}_3$ por bacterias del género *Azotobacter*. El género *Pseudomonas* es también fijador de N, en especial las especies *P. putida* PS9 (Ahemad y Khan, 2012), *P. fluorescens* y *P. mendocina* (Karagöz *et al.*, 2012).

Azotobacter es el principal grupo de bacterias heterotróficas fijadoras de N de vida libre asociadas con las plantas, las especies de este género pueden fijar al menos 10 mg N g^{-1} de carbohidrato, y la actividad fijadora de N es mayor en cepas asociadas con arroz que con otros cultivos similares (Sahoo *et al.*, 2013), por lo cual se infiere que este género tiene un gran potencial biofertilizante a cultivos de arroz. En nuestro estudio, aunque los valores de N_{total} variaron entre los aislados, todos presentaron actividad fijadora de N, la cual es una de las características principales de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Producción de sideróforos

No hubo diferencias significativas, aunque los aislamientos con mayor producción numérica de sideróforos fueron *Pseudomonas* sp. RZA034 y RZA035 desde 685.96 a 670.23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y los aislados del género *Azotobacter* produjeron valores menores de 174.09 a 469.80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Especies del género *Pseudomonas* producen sideróforos del tipo hidroxamato, como ferribactina, pseudobactina y otros de tipo catecol como la pioverdina, para secuestrar el Fe III de su entorno cuando está en condiciones

least, 10 mg N g^{-1} of carbohydrate, and N-fixing activity is higher in strains associated with rice than with other similar crops (Sahoo *et al.*, 2013). Therefore, we can infer that this genus has a great biofertilizer potential in rice crops. In our study, although N_{total} values varied among the isolate, all showed N-fixing activity, which is one of the main characteristics of plant growth promoting rhizobacteria.

Siderophore production

There were no significant differences in siderophore production. The isolates with higher numerical production were *Pseudomonas* sp. RZA034 and RZA035 (685.96 and 670.23 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively), while the values of *Azotobacter* genus isolates were lower than 174.09 to 469.80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. *Pseudomonas* genus species produce hydroxamate-type siderophores (ferribactin, pseudobactin) and catechol-type siderophores (pioverdine) that sequester Fe III from their environment, when its conditions are deficient; in this way, they limit the phytopathogens' growth, acting as a biocontrol mechanism (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Therefore, selecting isolates with this physiological feature is important in order to obtain an indirect benefit from plant growth promoting rhizobacteria. Abdel-Aziez *et al.* (2014) report a production of 11.3–59 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of siderophores per *Azotobacter* strain. Even though quantitative evaluations of siderophores synthesis by this genus are not frequent, the production of several biscatechol-type siderophores were reported: azotoquelin (with a high affinity for Mo, V, Cu, Zn) (Bellenger *et al.*,) and protoquelin triscatecholato (with affinity for Fe III, Mn II, and Cu II) (Harrington *et al.*, 2012). These authors indicate that the said siderophores are associated with the capture of Mo and V ions, which are required by the nitrogenase enzymatic complex in the atmospheric nitrogen fixation process.

Selection of rhizobacterium according to their plant growth promoting activities

The 42 isolates obtained were classified according to their PGPR activities comparing the nine controls designed with the values obtained. The dendrogram resulting from the grouping

deficientes y con esto limitan el crecimiento de fitopatógenos, actuando como un mecanismo de biocontrol (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Por esto es importante seleccionar los aislados con esta característica fisiológica para obtener un beneficio indirecto de la actividad de promoción de crecimiento vegetal por estas rizobacterias. Abdel-Aziez *et al.* (2014) reportan una producción de $11.3\text{--}59\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de sideróforos por cepa de *Azotobacter*. Aunque no es frecuente encontrar evaluaciones cuantitativas de la síntesis de sideróforos por este género, se ha reportado la producción de varios sideróforos tipo biscatecolato denominado azotoquelín, con una gran afinidad por el Mo, V, Cu, Zn (Bellenger *et al.*, 2007), y triscatecolato protoquelín con afinidad por el Fe III, Mn II y Cu II (Harrington *et al.*, 2012). Estos autores indican que los sideróforos mencionados están asociados a la captura de iones Mo y V requeridos por el complejo enzimático de la nitrogenasa en el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico.

Selección de rizobacterias por sus actividades promotoras de crecimiento vegetal

Los 42 aislamientos obtenidos se clasificaron según sus actividades PGPR con la comparación de los nueve controles diseñados a partir de los valores obtenidos. El dendrograma construido por el agrupamiento según resultados de las medias, presentó la conformación de dos grupos (I y II) (Figura 1). En el grupo I se obtuvo un subgrupo IA conformado por dos subgrupos (IA₁ y IA₂). El IA₁ incluyó dos grandes subgrupos, el IA_{1a} y IA_{1b} con 7 y 9 aislamientos, respectivamente. El IA_{1b} incluyó los controles de solubilización de fosfatos (Ctrl SP), fijación biológica de N (Ctrl FBN) y el testigo negativo (Ctrl-), lo cual indica que los nueve aislamientos vinculados a este subgrupo registraron valores superiores solo en la actividad de FBN o solubilización de fosfatos, pero muy bajos en la actividades de producción de AIA y sideróforos, similar a Ctrl-.

En el subgrupo IA₂ sólo se vinculó el testigo de producción de AIA (Ctrl AIA) porque ningún aislamiento presentó solo un valor superior en la actividad de síntesis de producción de AIA. En el subgrupo IB se conformaron tres subgrupos (IB₁, IB₂ y IB₃). En

—according to the similarities of the medians— showed the development of two clusters (I and II) (Figure 1). Cluster I had a subcluster (IA) made up by two subclusters (IA₁ and IA₂). IA₁ included two major subclusters: IA_{1a} and IA_{1b}, with 7 and 9 isolates, respectively. IA_{1b} included phosphate solubilization controls (Ctrl SP), biological nitrogen fixation (Ctrl FBN), and negative control (Ctrl-), which indicates that the nine isolates linked with this subcluster had higher values only in the FBN activity or the solubilization of phosphates, but very low values in the production of AIA and siderophores (similar to Ctrl-).

In the IA₂ subcluster, only the AIA production control (Ctrl AIA) was linked, because no isolate presented only a higher value in the AIA production synthesis activity. In the IB subcluster, three subclusters were formed (IB₁, IB₂ and IB₃). In the IB₁ subcluster, subclusters IB_{1a}, IB_{1b} and IB_{1c} were formed. Nine isolates were included in the first two groups, and in the IB_{1c} only the mean control 2 (CtrlMedio2) was linked. This mean control was designed with approximately 60 % of the highest available P values ($27.86\ \mu\text{g mL}^{-1}$), N_{total} ($7.07\ \mu\text{g mL}^{-1}\ \text{N-NH}_3$), indoleacetic acid ($94.96\ \text{mg L}^{-1}$), and siderophores ($402.14\ \text{mg L}^{-1}$). In subcluster IB₂, the RZA040 isolation was associated with the *Azotobacter* genus, which recorded a value close to the mean control 2 (CtrlMedio2); therefore, it was selected as promising for the plant growth promotion. Subcluster IB₃ linked 10 isolates and mean control 1, designed with approximately 50 % of the highest available P values ($18.57\ \text{mg L}^{-1}$), N_{total} ($4.72\ \mu\text{g mL}^{-1}\ \text{N-NH}_3$), indoleacetic acid ($63.31\ \text{mg L}^{-1}$), and siderophores ($670.23\ \text{mg L}^{-1}$). From this subcluster, the fluorescent *Pseudomonas* sp. RZA027 isolate was selected, because it presented similar values to mean control 1.

Group II was made up by two subclusters (IIA and IIB). In subcluster IIA, the *Azotobacter* RZA042 isolate and the mean control 3 (CtrlMedio3) were classified. Mean control 3 was designed with approximately 80 % of the highest available P values ($37.14\ \text{mg L}^{-1}$), N_{total} ($9.43\ \mu\text{g mL}^{-1}\ \text{N-NH}_3$), indoleacetic acid ($126.62\ \text{mg L}^{-1}$), and siderophores ($536.18\ \text{mg L}^{-1}$). From this subcluster, the *Azotobacter* RZA042 isolate was selected, because it presented similar values to mean control 3.

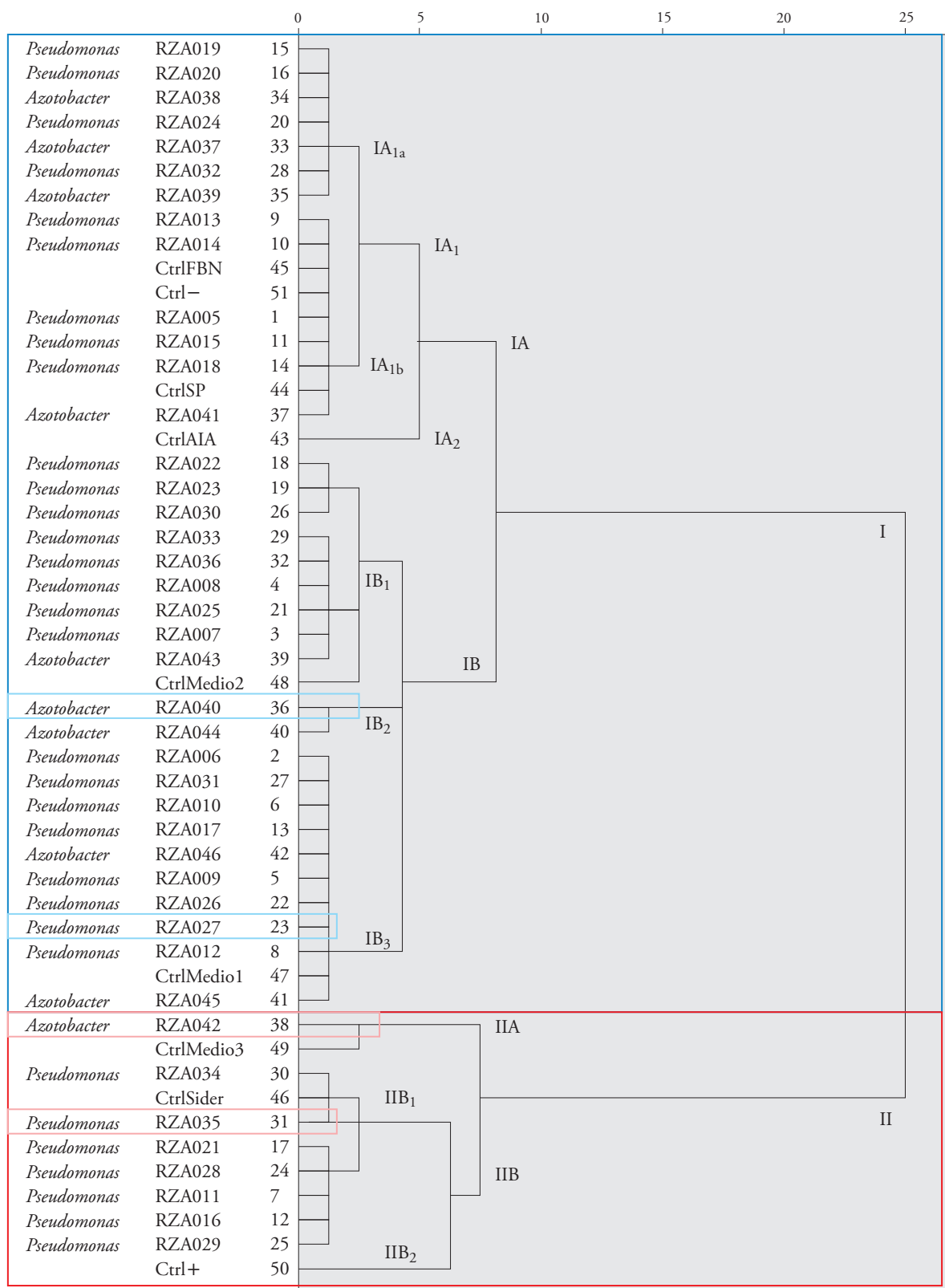


Figura 1. Dendrograma de similitudes en las actividades promotoras de crecimiento vegetal por los aislamientos de *Azotobacter* y *Pseudomonas*.

Figure 1. Similarity dendrogram in plant growth promoting activities by *Azotobacter* and *Pseudomonas* isolates.

el subgrupo IB₁ se conformaron los subgrupos IB_{1a}, IB_{1b} y IB_{1c}, en los dos primeros se incluyeron nueve aislamientos y en el último se vinculó solo el control medio 2 (CtrlMedio2) que se diseñó con los valores ubicados con un 60 % aproximado de los mayores valores en P disponible (27.86 mg L⁻¹), N_{total} (7.07 µg mL⁻¹ N-NH₃), ácido indolacético (94.96 mg L⁻¹) y sideróforos (402.14 mg L⁻¹). En el subgrupo IB₂ se asoció el aislamiento RZA040 del género *Azotobacter*, el cual registró un valor cercano al Control Medio 2 (CtrlMedio2), por lo cual se seleccionó como promisorio en la promoción del crecimiento vegetal. El subgrupo IB₃ vinculó 10 aislamientos y el Control Medio 1 que se diseñó con 50 %, aproximado, de los mayores valores en P disponible (18.57 mg L⁻¹), N_{total} (4.72 µg mL⁻¹ N-NH₃), ácido indolacético (63.31 mg L⁻¹) y sideróforos (670.23 mg L⁻¹). De este subgrupo se seleccionó el aislamiento RZA027 de *Pseudomonas* sp. fluorescentes por presentar valores similares al Control Medio 1.

El grupo II se conformó por dos subgrupos (IIA y IIB). En el subgrupo IIA se clasificó el aislamiento RZA042 de *Azotobacter* y el Control Medio 3 (CtrlMedio3) que se diseñó con 80 %, aproximado, de los mayores valores en P disponible (37.14 mg L⁻¹), N_{total} (9.43 µg mL⁻¹ N-NH₃), ácido indolacético (126.62 mg L⁻¹) y sideróforos (536.18 mg L⁻¹). De este subgrupo se seleccionó el aislamiento RZA042 de *Azotobacter* por presentar valores similares al Control Medio 3.

En el subgrupo IIB se conformaron los subgrupos IIB₁ y IIB₂. En el IIB_{1a} se asociaron los aislamientos RZA034 y RZA035 de *Pseudomonas* así como, el control de producción de sideróforos (Ctrl Sider) donde se encuentra el mayor contenido de sideróforos (685.96 mg L⁻¹). De este grupo se seleccionó el aislamiento *Pseudomonas* RZA035 por representar los mayores valores de producción de sideróforos y solubilización de fosfatos e intermedios en fijación biológica de N y síntesis de AIA. En el subgrupo IIB₂ se vinculó solo el Control positivo (Ctrl+), lo cual indica que ningún aislamiento registró los valores mayores en las cuatro actividades promotoras de crecimiento vegetal evaluadas.

Los cuatro aislamientos seleccionados para la identificación molecular fueron las cepas *Pseudomonas* RZA027 y RZA035, *Azotobacter* RZA040 y RZA042, por presentar valores representativos en las cuatro características promotoras del crecimiento vegetal

En subcluster IIB, subclusters IIB1 and IIB2 were formed. In IIB1a, *Pseudomonas* RZA034 and RZA035 isolates were associated, as well as the siderophore production control (Ctrl Sider) —where the highest siderophore content is found (685.96 mg L⁻¹). The *Pseudomonas* RZA035 isolate was selected from this group, because it represented the highest values of siderophore production, solubilization of phosphates, intermediates in biological nitrogen fixation, and AIA synthesis. In subcluster IIB2, only the positive control (Ctrl+) was linked, which indicates that no isolate recorded the highest values in the four activities evaluated.

The four isolates selected for molecular identification were the *Pseudomonas* RZA027 and RZA035, *Azotobacter* RZA040 and RZA042 strains, because they had representative values in the four features evaluated. They are considered to be promising for the continuation of the biofertilizers development process for rice cultivation in the region.

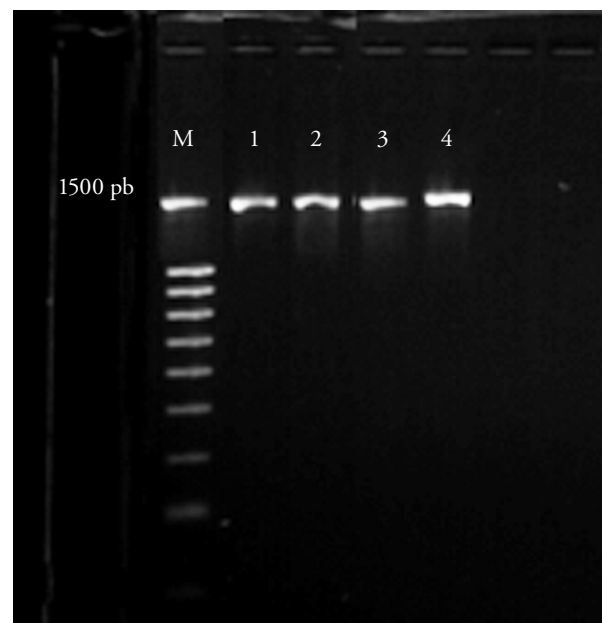


Figura 2. Amplificación del gen 16S ADNr. (M) 1500 pb DNA LADDER Biotium; (1) *Pseudomonas* RZA027; (2) *Pseudomonas* RZA035; (3) *Azotobacter* RZA040; (4) *Azotobacter* RZA042.

Figure 2. 16S rDNA gene amplification. (M) 1500 bp DNA LADDER Biotium; (1) *Pseudomonas* RZA027; (2) *Pseudomonas* RZA035; (3) *Azotobacter* RZA040; (4) *Azotobacter* RZA042.

evaluadas, y se considera que son promisorias para continuar con el proceso del desarrollo de biofertilizantes para el cultivo de arroz en la región.

Identificación molecular de los aislamientos de *Azotobacter* y *Pseudomonas* seleccionados

Las cuatro cepas presentaron una banda de 1500 pb en la amplificación de gen 16S ADN_r (Figura 2). El análisis de la similitud entre las secuencias de los nucleótidos obtenidos y los depositados en la base de datos del GenBank usando el análisis BLAST, mostró que los aislamientos pertenecen a la subclase Gamma Proteobacterias de la familia Pseudomonadaceae y están relacionados con los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Cuadro 2).

CONCLUSIONES

En el distrito de riego del río Zulia de Norte de Santander se aislaron rizobacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas* con características promotoras del crecimiento vegetal que se pueden utilizar en el desarrollo de biofertilizantes para su aplicación en los cultivos de arroz regionales. Los cuatro aislamientos seleccionados por presentar valores en las características promotoras de crecimiento vegetal similares a los controles diseñados, deberán ser evaluadas en campos cultivados con arroz para determinar su efecto en el crecimiento de las plantas y en el rendimiento del cultivo.

LITERATURA CITADA

Abd El-Fattah, D., W. Eweda, M. Zayed, and M. Hassanein. 2013. Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. Ann. Agric. Sci. 58: 111-118.

Molecular identification of selected *Azotobacter* and *Pseudomonas* isolates

The four strains showed a 1500 bp band in the 16S rDNA gene amplification (Figure 2). Analysis of the similarity between the nucleotide sequences obtained and those deposited in the GenBank database (using BLAST analysis) showed that the isolates belong to the Gamma Proteobacteria subclass of the Pseudomonadaceae family, and are related to the *Azotobacter* and *Pseudomonas* genera (Table 2).

CONCLUSIONS

In the Zulia River irrigation district of Norte de Santander, *Azotobacter* and *Pseudomonas* genera rhizobacterium were isolated. These bacterium have plant growth promoting features that can be used in the development of biofertilizers to be applied in regional rice crops. The four isolates selected —because they have similar values to the designed controls— should be evaluated in rice cultivated fields, to determine their effect on plant growth and crop yield.

—End of the English version—



- Abdel-Aziez, S., W. Eweda, M. G. Z. Girgis, and B. Abdel. 2014. Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using *Azotobacter* as N₂ biofertilizer. Ann. Agric. Sci. 59: 95-108.
- Aguado-Santacruz, G. A., B. Moreno-Gómez, B. Jiménez-Francisco, E. García-Moya E., y R. E. Preciado-Ortiz. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. Rev. Fitotec. Mex. 35: 9-21.

Cuadro 2. Identificación por el gen 16S ADN_r de las cuatro cepas seleccionadas con potencial biofertilizante.
Table 2. Identification of the four strains selected due to their biofertilizer potential (by the 16S rDNA gene).

Aislado	Iniciador	Genero/ Especie relacionada según 16s ADN _r	Relación Bases de datos NCBI/ EMBL	
			Número de acceso	Porcentaje de similitud
RzA042	27F / 1492R	<i>Azotobacter tropicalis</i>	AB236162	99 %
RzA040	27F / 1492R	<i>Azotobacter chroococcum</i>	NR_115210	98 %
RzA027	27F / 1492R	<i>Pseudomonas putida</i>	LC041153	99 %
RzA035	27F / 1492R	<i>Pseudomonas putida</i>	KM820291	100 %

- Ahemad, M., and M. S. Khan. 2012. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere* 86: 945-950.
- Andrade, L.vF., G.L. Oliveira, D. de Souza, S. Nietsche, A. vA. Xavier, M. vR. Costa, A. M. Santos, M. C. Toledo, and D. F. Gomes. 2014. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *J. Microbiol.* 52: 27-34.
- Aquilanti L., F. Favilli, and F. Clemeti. 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1475-1483.
- Arora, N. K., S. Tewari, and R. Singh. 2013. Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. Arora, N. K. (ed). *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. SPRINGER India. p. 39.
- Abdel-Aziez, S., S. W. Eweda, M. G. Z. Girgis, and B. Abdel. 2014. Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using *Azotobacter* as N₂ biofertilizer. *Ann. Agric. Sci.* 59: 95-108.
- Barua, S., S. Tripathi, A. Chakraborty, S. Ghosh, and K. Chakrabarti. 2012. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. *Microbiol. Res.* 167: 95-102.
- Bellenger, J-P., F. Arnaud-Neu, Z. Asfari, S. C. B. Myneni, E. I. Stiefel, and A. M. L. Kraepiel. 2007. Complexation of oxoanions and cationic metals by the biscatecholate siderophore azotochelin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12: 367-376.
- Cañón, R., V. Prato, M. A. Alterio, y D. Cárdenas. 2009. Efecto del uso del suelo sobre rizobacterias fosfatolubilizadoras y diazotróficas en el distrito de riego del río Zulia, Norte de Santander (Colombia). *Revista Respuestas* 14: 14-21.
- Cárdenas, D., M. F. Garrido, R. 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 y Forrajes* 33: 285-300.
- Cárdenas, D. M., L. T. Ramírez, y L. Y. Moreno. 2013. Caracterización de Actividades Promotoras del Crecimiento Vegetal por Rizobacterias y su Efecto en Cultivo de Cilantro (*Coriandrum sativum* L.). 1a. ed. Ecoe Ediciones. Colombia. 138 p.
- Chennappa, G., C. R. Adkar-Purushothama, U. Suraj, K. Tamilvendan, and M. Y. Sreenivasa. 2014. Pesticide tolerant *Azotobacter* isolates from paddy growing areas of northern Karnataka, India. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 1-7.
- Cuevas, A. 2012. El clima y el cultivo de arroz en Norte de Santander. *Revista Arroz* 60: 4-8.
- De Souza, R., A. Beneduzi, and A. Ambrosini. 2012. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil* 366: 585-603.
- 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. *Scientia Agropec.* 2: 39-49.
- García de Salamone, I. E., J. M. Funes, L. Di Salvo, J. Escobar-Ortega, F. D'Auria, L. Ferrando L., and A. Fernandez-Escavino. 2012. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Appl. Soil Ecol.* 61: 196-204.
- Gauri, S., S. Mandal, and B. Pati. 2012. Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 331-338.
- Habibi, S., S. Djedidi, Prongjunthueck, M. D. Firoz-Mortuza, N. Ohkama-Ohtsu, H. Sekimoto, and T. Yokoyoma. 2014. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant Soil* 379: 51-66.
- Halpern, M., A. Bar-Tal, M. Ofek, D. Minz, T. Muller, and U. Yermiyahu. 2014. The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. *Adv. Agron.* 130: 1-34.
- Harrington, J. M., J. R. Bargar, A. A. Jarzecki, J. G. Roberts, L. A. Sombers, and O. W. Duckworth. 2012. Trace metal complexation by the triscatecholate siderophore protochelin: structure and stability. *Biometals* 25: 393-412.
- Hernández, A., N. Rives, A. Caballero, A. Hernández, and M. Heydrich. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 6: 6-13.
- Hussein, K. A., and J. H. Joo. 2015. Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 23: 560-569.
- IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi). 2006. Estudio General de Suelos y Zonificación de Tierras del Departamento Norte de Santander. Imprenta Nacional de Colombia. 359 p.
- Karagöz, K., F. Ates, H. Karagöz, R. Kotan, and R. Çakmakç. 2012. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. *Eur. J. Soil Biol.* 50: 144-150.
- King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kuss A. V, V. V. Kuss, T. Lovato, e M. Lovato. 2007. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesq. Agropec. Bras.* 42: 1459-1465.
- Lavakush, J. Yadav, J.P. Verma, D. K. Jaiswal, and A. Kumar. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecol. Eng.* 62: 123-128.
- López-Ortega, M., P. Criollo-Campos, R. Gomez-Vargas, M. Camelo-Rusique, G. Estrada-Bonilla, G., M. F. Garrido-Rubiano, and R. R. Bonilla-Buitrago. 2013. Caracterización de bacterias diazotróficas solubilizadoras de fosfato como promotoras de crecimiento en plantas de maíz. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2: 115-123.
- Malik, D. K., and S. Sindhu. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17: 25-32.
- Marschner, P., D. Crowley, and Z. Rengel. 2011. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron

- and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods. *Soil Biol. Biochem.* 43: 883-894.
- Park, J. H., N. Bolana, M. Megharaja, and R. Naidua. 2011. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *J. Hazardous Mater.* 185: 829-836.
- Patel, D., C. Kumar, N. Tank, and M. Saraaf. 2012. Growth enhancement of chickpea in saline soils using plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Plant Growth Regul.* 31: 53-62.
- Phetcharat, P., and A. Duangpaeng. 2012. Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. *Procedia Eng.* 32: 177-183.
- Radwan, T. El-S. El-D., Z. K. Mohamed, and V. M. Reis. 2005. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. *Pesq. Agropec. Bras.* 40: 997-1004.
- Rohwer, F., V. Seguritan, F. Azam, and N. Knowlton. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243: 1-10.
- Rojas-Tapias, D., A. Moreno-Galván, A., S. Pardo-Díaz, M. Obando, D. Rivera, and R. Bonilla. 2012. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Appl. Soil Ecol.* 61: 264-27.
- Saber, F., A. Abdelhafez, E. Hassanand, and E. Ramadan. 2015. Characterization of fluorescent pseudomonads isolates and their efficiency on the growth promotion of tomato plant. *Ann. Agric. Sci.* 60: 131-140.
- Sahoo, R., M. Ansari, T. Dangar, S. Mohanty, and N. Tuteja. 2013. Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. *Protoplasma* 251: 511-523.
- Sarmiento, Y., A. H. Vergel, y D. M. Cárdenas. 2013. Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. conservados por diferentes métodos. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15: 150-158.
- Seck P. A., A. Diagne, S. Mohanty, and M. C. S. Wopereis. 2012. Crops that feed the world 7: Rice Food Security 4: 7-24.
- Sivakamasundari, R., and G. Usharani. 2012. Studies on the Influence of *Pseudomonas fluorescens* and Chemicals on the Biocontrol Sheath Blight Incidence in Rice. *Int. J. Pharmac. Biol.* 4: 973-977.
- Son, J. S., M. Sumayo, Y. J. Hwang, B. S. Kim, and S. Y. Ghim. 2014. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. *Appl. Soil Ecol.* 73: 1-8.
- Souza, R., J. Meyer, R. Schoenfeld, P. Beschoren da Costa, and L. Passaglia. 2015. Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. *Ann. Microbiol.* 65: 951-964.
- Sundara-Rao, W. V. B., and M. K. Sinha. 1963. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian J. Agric. Sci.* 33: 272-278.
- Uribe-Vélez, D. 2011. El componente microbiano del suelo como una herramienta para el desarrollo sostenible del cultivo del arroz. In: Uribe, D., y L. M. Melgarejo (eds). *Ecología de Microorganismos Rizosféricos Asociados a Cultivos de Arroz de Tolima y Meta*. Bogotá, D. C: Universidad Nacional de Colombia. pp: 19-21.
- Vanegas, J., N. Florez-Zapata, y D. Uribe-Vélez. 2011. Bioprospección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal para su aplicación en el cultivo de arroz. In: Uribe, D., y L. M. Melgarejo (eds). *Ecología de Microorganismos Rizosféricos Asociados a Cultivos de Arroz de Tolima y Meta*. Bogotá, D. C: Universidad Nacional de Colombia. pp: 151-178.
- Yu, X., X. Liu, T-H. Zhu, G-H. Liu, and C. Mao. 2012. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *Eur. J. Soil Biol.* 50: 112-117.