

Biofertilizer formulation from *Azotobacter* and *Azospirillum* regional isolates and its effect on sugar cane (*Saccharum officinarum*) in greenhouse

Formulación de biofertilizantes a partir de aislados regionales de *Azotobacter* y *Azospirillum* y su efecto en cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en casa sombra

Luis Fernando Nava-López¹, Raquel Camacho-Millán¹, Elsa Maribel Aguilar-Medina¹, José Guillermo Romero-Navarro¹, Rogelio Sosa-Pérez², Aida Isamar Ruiz-Abitia¹, Héctor Manuel Cárdenas-Cota^{2,3}, Rosalío Ramos-Payán^{1*}

¹Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Josefa Ortiz de Domínguez S/N y Avenida de las Américas, Ciudad Universitaria. Culiacán, Sinaloa, México, CP 80010. ²Centro de Ciencias de Sinaloa. Av. de las Américas 2771 Nte., Culiacán, Sinaloa, México, CP 80010. ³Universidad Tecnológica de Culiacán, carretera Culiacán-Imala Km. 2, CP 80014.

*Corresponding author.

E-mail address: rosaliorp@uas.edu.mx (R. Ramos-Payán).

Article history:

Received: 2 April 2017 / Received in revised form: 1 June 2017 / Accepted: 19 June 2017 / Published online: 1 July 2017

ABSTRACT

The anthropogenic activity has damaged the ecological niches of all agricultural regions. Culiacan Valley in Sinaloa, México, is not an exception; it has more than one million agricultural hectares. This soil has a high salt index and is susceptible to erosion, which reduces the amount of the microbiota responsible for processes of oxidation-reduction and conversion of essential nutrients for plant nutrition. The global trend in agriculture is to develop alternatives of biological origin, for example plant growth promoting bacteria (PGPB), especially nitrogen-fixing and phytohormone producers genera. In this study, indigenous isolates of *Azotobacter* and *Azospirillum* from Sinaloa were characterized and compared against four nitrogen-fixing collection strains, in order to create a formulate that could prevent or decrease the need of mineral fertilizers applications, to enhance sustainable production of sugarcane (*Saccharum officinarum*). Ten isolates and four reference strains with biofertilization potential were evaluated, showing genotypic and phenotypic characteristics proper of their genera. The acetylene reduction assays showed that all strains and isolates reduce *in vitro* acetylene to ethylene by nitrogenase enzyme. Greenhouse tests with nitrogen fixing bacteria showed adaptation of bacteria to the sugar cane rhizosphere, suggesting that these isolates are eligible to develop biofertilizers.

Keywords: *Azospirillum*, *Azotobacter*, nitrogen fixation, sugarcane.

RESUMEN

La actividad antropogénica ha dejado un daño en los nichos ecológicos de todas las regiones agrícolas. El valle de Culiacán en Sinaloa, México no es la excepción, con una superficie de siembra mayor a un millón de hectáreas, en el cual, se observan tierras con altos índices de sales y propensas a erosión, disminuyendo la cantidad de microbiota encargada de proporcionar nutrientes esenciales para la nutrición vegetal. La tendencia mundial en la agricultura es desarrollar alternativas de origen biológico que permitan disminuir el uso de fertilizantes sintéticos y minerales, sin afectar la productividad, tal es el caso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), en especial con los géneros productores de fitohormonas, fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfato. En este trabajo se caracterizaron 10 aislados autóctonos de Sinaloa de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* y se compararon con 4 cepas de colección, con la finalidad de crear un biofertilizante para el cultivo sostenible de la caña de azúcar. Los ensayos de reducción de acetileno mostraron que todos los aislados reducen *in vitro* acetileno a etileno. La inoculación de plantas de caña con los aislados en condiciones de casa sombra, mostraron un efecto promotor del crecimiento significativo.

Palabras clave: *Azospirillum*, *Azotobacter*, caña de azúcar, fijación de nitrógeno.

1. INTRODUCCIÓN

El siglo XX terminó con la humanidad volteando la vista hacia su planeta para percatarse cómo había contaminado, destrozado su morada y alterado los ecosistemas, con lo que surgió la conciencia y la necesidad de mantener habitable el planeta. Esta necesidad ha propiciado la búsqueda de alternativas tecnológicas para limpiar de residuos químicos el planeta, así como de alternativas respetuosas con el medio ambiente para los procesos industriales y para los métodos de producción agropecuaria (Callisto *et al.* 2014; Erisman *et al.* 2008; Zapata & Ortiz 2007). La biotecnología ofrece estas alternativas y por eso se considera, en el siglo XXI, como fundamental para el desarrollo sostenible. Con respecto a la agricultura, la biotecnología ha contribuido al desarrollo de mejores variedades de plantas cultivables y formulación de microorganismos para controlar plagas agrícolas y para promover el crecimiento vegetal. Estos últimos, han ido cobrando más importancia con la demanda creciente de productos orgánicos certificados, por lo que se les ha denominado los Agrobiológicos del siglo XXI (Haneef *et al.* 2014; Nosheen *et al.* 2016; Zapata & Ortiz 2007).

Por regla general podemos decir que cuanto más fértil es un suelo, mayor es la actividad biológica del mismo y la microbiota asociada (Dittmar *et al.* 2000). Recuperar los suelos significa restituirles la materia orgánica y microorganismos perdidos a causa de una explotación agrícola mal dirigida, para esto es necesario comenzar a formar nuevamente la capa agrícola, mediante procesos adecuados, imitando en lo posible a la naturaleza y con ayuda de prácticas modernas. Holanda ha recuperado suelos netamente marinos, transformando, a corto plazo el lodo marino en suelo fértil y productivo, y en Argentina han demostrado que es posible recuperar suelos arenosos y erosionados utilizando la microbiota

específica del suelo como factor activo, mediante la incorporación por varios años, de material celulósico o paja que obtuvieron sembrando maíz, en el mismo suelo erosionado (Garassini 1967).

De los nutrientes fundamentales para el desarrollo de los vegetales, el nitrógeno constituye uno de los elementos más importantes (Gruber & Galloway 2008). La fuente primaria de nitrógeno para el suelo lo constituye la atmósfera, en donde el dinitrógeno (N_2) representa un 79% (Ragsdale 2014). Sin embargo, debido a la estabilidad química del N_2 , su reducción para formar NH_3 (fijación de nitrógeno) requiere un gran aporte de energía, por ejemplo, para reducir N_2 a dos NH_3 se requiere al menos la hidrólisis de 16 moléculas de adenosin trifosfato (ATP). Solo unos pocos géneros de procariontes tienen la capacidad de fijar nitrógeno, a través del complejo nitrogenasa, cuya estructura consta de dos proteínas que se denominan dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa (Igarashi & Seefeldt 2003). La dinitrogenasa o proteína Fe-Mo (240 kD), es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ (codificado por *nifD* y *nifK*) que contiene 2 átomos de molibdeno (Mo) y 30 átomos de hierro. Cataliza la reacción $N_2 + 8 H^+ + 8 e^- + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$. La dinitrogenasa reductasa (60 kD, codificada por *nifH*), es un homodímero. Las moléculas de coenzimas reducidas ceden los electrones a la proteína hierro-azufre ferredoxina, que posteriormente la trasfiere a la dinitrogenasa reductasa (Burgess & Lowe 1996).

El gen *nifH* es un biomarcador ampliamente usado para estudiar la ecología y evolución de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Estudios de la diversidad de *nifH* han sido conducidos en un amplio rango de ambientes, incluyendo varios sitios marinos, terrestres e hidrotermales, entre otros. La diversidad de los organismos fijadores de nitrógeno varía drásticamente de un hábitat a otro (Gaby & Buckley 2014). Las especies de *Azospirillum* y *Azotobacter*, son bacterias fijadoras de nitrógeno y productoras de fitohormonas (Caballero-Mellado 2002; Narula 2000), por lo que han llamado la atención para formular biofertilizantes. *Azospirillum* incluye bacterias heterótrofas Gram negativas o variable, que se asocian en la rizosfera de las plantas lo que ayuda al intercambio de nutrientes, están ampliamente distribuidas en todos los ecosistemas (Hoppe *et al.* 2014) y hasta el momento se tienen registradas en el GenBank 16 especies con diferencias filogenéticas (Boone *et al.* 2005; Dobereiner & Day 1975; Gamo & Ahn 1991; Tarrand *et al.* 1978). *Azotobacter* es el género de fijadoras de nitrógeno más abundante en el suelo, su ciclo vegetativo presenta tres formas diferenciales células jóvenes, bacilos móviles y células adultas esféricas grandes o pequeñas. Las células envejecidas se presentan enquistadas formando células cocoideas de tamaño mayor (Lewis 1937; Socolofsky & Wyss 1962; Vela & Rosenthal 1972).

Aunado a la fijación de nitrógeno, se tiene conocimiento de que algunos géneros de bacterias diazotróficas, como *Azospirillum*, a través de la producción de ácidos facilitan la solubilización de minerales del suelo, en especial del fósforo, lo que lo hace más biodisponible para la planta (Tahir *et al.* 2013). En este estudio se caracterizaron, aislados autóctonos de Sinaloa de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* y se compararon con cuatro cepas de colección, con la finalidad de crear un biofertilizante para el desarrollo sostenible en caña de azúcar.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno

2.1.1. Ubicación geográfica del muestreo y medios de aislamiento.

En este estudio se aislaron y caracterizaron bacterias diazotróficas de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* a partir de la rizosfera de cultivos de gramíneas (maíz, sorgo, zacate Johnson). Los criterios utilizados para elegir el sitio de muestreo fueron verdor y vigor de las plantas seleccionadas. La ubicación fue el campo experimental del INIFAP (latitud norte 24°, 37'.49" longitud Oeste 107°, 26', 17", clima cálido semiárido). El muestreo se realizó en los meses de febrero y abril del 2015. Las bacterias presuntivas *Azospirillum* se recuperaron en medio NFb (nitrogen-free malate medium) incubándose a 30°C por 5 días y para *Azotobacter* se usó medio ANFm (Ashby's Mannitol Nitrogen-Free) a 30°C por 3 días (Winogradsky & Winogradsky 1925).

2.1.2. Aislamiento *Azospirillum*

Las raíces fueron removidas y trasladadas al laboratorio en condiciones de esterilidad para obtener el suelo adherido a éstas. Se tomó una muestra de 10 g de suelo, se diluyó en 90 mL de solución salina estéril (NaCl 0.85%), se homogenizó fuertemente por 3 min y se dejaron sedimentar los sólidos para recuperar el sobrenadante, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas para su cultivo (Tejera *et al.* 2005). Se observaron colonias blanquecinas de las cuales se realizó dilución por siembra hasta obtener colonias en cultivos puros.

2.1.3. Aislamiento *Azotobacter*

Para el caso del género *Azotobacter* las muestras fueron recolectadas de tierra tipo barrial con un pH aproximadamente de 6.0. Las placas de agar manita se inocularon con porciones de tierra rizosférica y se incubaron a 30°C durante 72 h, las cuales posteriormente rodearon en forma de mucus los granos de tierra, de ahí se aislaron en medio ANFm (Tejera *et al.* 2005) presentando células bacilares cromogénicas Gram negativas, después de varios pases se lograron obtener los aislados

2.1.4. Obtención de cepas tipo de colección

Se adquirieron cepas de *Azospirillum* y *Azotobacter* (tabla 1) de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Tabla 1. Cepas de bacterias diazotróficas de referencia.

Cepa tipificada	Clasificación en la colección	Medio	Temperatura (°C)
<i>Azospirillum brasilense</i>	CDBB-B-1229	NFb	30
<i>Azospirillum lipoferum</i>	CDBB-B-1495	NFb	28
<i>Azotobacter chroococcum</i>	CDBB-B-1884	Burk	29
<i>Azotobacter vinelandii</i>	CDBB-B-992	Burk	28

2.1.5. Cinéticas de crecimiento bacteriano

Las cepas se inocularon en matraces con 100 mL de caldo ANFm y se incubaron a 37°C durante 120 h, muestreando cada 24 h. La determinación de la cantidad de bacterias se realizó por espectrofotometría con lecturas a 490 nm de absorbancia.

2.2. Extracción de DNA bacteriano

4.5 mL del cultivo se centrifugaron a 10,000 rpm durante 3 min y la pastilla se resuspendió en 400 µL de Buffer de Extracción a 80°C (Tris-HCl 100 mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0; SDS 1% y LiCl 100 mM) y 400 µL de cloroformo, se homogenizó rápidamente por inversión, se incubó 1 min a 80°C. Posteriormente se centrifugó y se tomó la fase superior acuosa y se trasvasó a un tubo estéril nuevo, se adicionó 1 volumen de LiCl 4 M. Se incubó 12 h a 4°C y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 volumen de isopropanol, se centrifugó, y se lavó la pastilla de DNA con 500 µL de etanol 70%. Finalmente, el DNA se resuspendió en 50 µL de agua bidestilada estéril para posteriores análisis. La integridad del DNA se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y la pureza se midió por espectrofotometría a 260 y 280 nm.

2.3. Amplificación de genes *nifH* y *nifD*

Los genes de nitrogenasa se amplificaron por PCR, con los iniciadores NifD (5'-TCRTTYGCYATRTGRTGNCC-3' y 5'-TGGGGYCCYRTYAARGAYATG-3') y NifH (5'-GGHAARGGHGGHATHGGNAART-3' y 5'-GGCATNGCRAANCCVCCRCANAC-3') bajo las condiciones estándar, en un termociclador con módulo de reacción de 96 pozos Bio-rad T-100 (Gaby & Buckley 2014).

2.4. Ensayo de reducción de acetileno

Se empleó el ensayo de reducción de acetileno (ARA) para cuantificar la actividad de la enzima nitrogenasa *in vitro* (Dilworth 1966), los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a detector de masas (Agilent 5973), con una columna capilar (Agilent J&W HP-PLOT Al₂O₃) de 30 m X 0.25 mm, para detectar hidrocarburos, el gas acarreador fue helio, con un flujo de la fase eluyente de 1 mL*min a una presión de 7.8 atm y temperatura de 30°C en el horno. Se preparó una curva de cuantificación usando un estándar de etileno puro (Fluka, Sigma Aldrich). Se prepararon 5 viales de 14 mL con vacío y, al frasco número 1 se le inyectó 0.1 mL de etileno. Se realizó trasiego diluyendo la muestra original e inyectándose al cromatógrafo, siguiendo la metodología de cuantificación de los gases ideales $PV = nRT$, se corrieron las diluciones, observándose que el estándar de etileno tiene un tiempo de retención (RT) de 2.03 min en las condiciones estandarizadas del método aplicado. Se calculó la ecuación de la línea recta, con un valor de r^2 superior a 0.99, adecuado para el análisis de las muestras.

Las muestras fueron inoculadas en caldo ANFm e incubados por 72 horas a 175 rpm, posteriormente sellados por septos, se tomó el 10% de la atmosfera gaseosa remplazándose por acetileno equivalente a 3.6 mL y se incubaron a 30°C por 24 h, transcurrido el tiempo de

incubación se tomó 1 mL de la atmosfera gaseosa y se inyectó en el cromatógrafo de forma manual (Hardy *et al.* 1968).

2.5. Pruebas de efectividad sobre el crecimiento de la caña en casa sombra

El modelo experimental consintió en 10 tratamientos (grupos), con 10 repeticiones por tratamiento. Como tratamientos de prueba se utilizaron inóculos de las 4 cepas de referencia y 5 aislados regionales (IAP-01, IAP-05, IAZ-06 y IAZ-10), como control positivo se usó un fertilizante mineral. El diseño experimental empleado fue de bloques. Brevemente se describe el procedimiento, se utilizaron VitroPlantas de la variedad Mex-69290 caña de azúcar de aproximadamente 25 cm de altura, obtenidas de la Universidad Tecnológica de Culiacán. Las raíces fueron inoculadas con 100 mL de caldo Burk con un tiempo de fermentación de 72 h a 175 rpm a 30°C y posteriormente fueron trasplantadas en bolsas con 80% de tierra y 20% de sustrato (vermiculita y turba). Se tomó la medida de grosor de tallo, altura y contenido de clorofila por lectura de grados en medidor SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development, Minolta) a diferentes tiempos del cultivo (1, 2, 4 y 5 meses).

2.6. Análisis estadístico

Se obtuvieron las medias de las cuantificaciones (una medición en las 10 repeticiones) y las diferencias se evaluaron por ANOVA y comparaciones múltiples de Tukey con el software IBM SPSS v.20 tomando como significativos los valores con una $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de *Azospirillum* y *Azotobacter*

Se logró aislar 5 cepas de *Azospirillum*, recuperadas a partir de suelo de rizósfera de maíz (IAP-01 y 04), zacate Johnson (IAP-02 y 05) y sorgo (IAP-03). En el caso de *Azotobacter*, se obtuvieron 3 aislados, registrados como IAZ-01 al 03, provenientes de rizósfera de sorgo, zacate Johnson y maíz respectivamente.

Las cepas de *Azospirillum* IAP-01 al 05, mostraron las características descritas por el manual de Bergey en medio específico NFb, las cuales a la tinción mostraron ser bacilos Gram negativos pequeños, regordetes, con extremos puntiagudos. La morfología de las colonias jóvenes mostró color blanquecino, brillantes, elevación ligeramente convexa y baja, superficie lisa, bordes oscilando entre enteras y ondulada, forma circular, consistencia húmeda butirosa, y en medio líquido se observa la formación de película o velo.

En el caso de *Azotobacter*, los 3 aislados, IAZ-01 al 03, mostraron ser bacilos Gram negativos y con morfología colonial color blanquecino (oscuras en células con más de 72 horas), olor a pasto y tierra mojada, brillantes y algodonosas, elevación ligeramente convexa e irregulares, superficie radiadas, estructura interna filamentosa, bordes enrulados, colonial circular, consistencia butirosa, presenta cromogénesis, y en medio líquido formación de precipitado floculoso.

3.2. Cinética de crecimiento

En general las cepas aisladas mostraron un crecimiento menor en comparación con las de referencia, a excepción del aislado IAZ-02 y 03 de *Azotobacter* (Figura 1). En el caso de las cepas de referencia *A. brasilense*, *A. chroococcum* y *A. vinelandii* mostraron un comportamiento similar hasta las 120 h de incubación, *A. lipoferum* mostró un menor crecimiento.

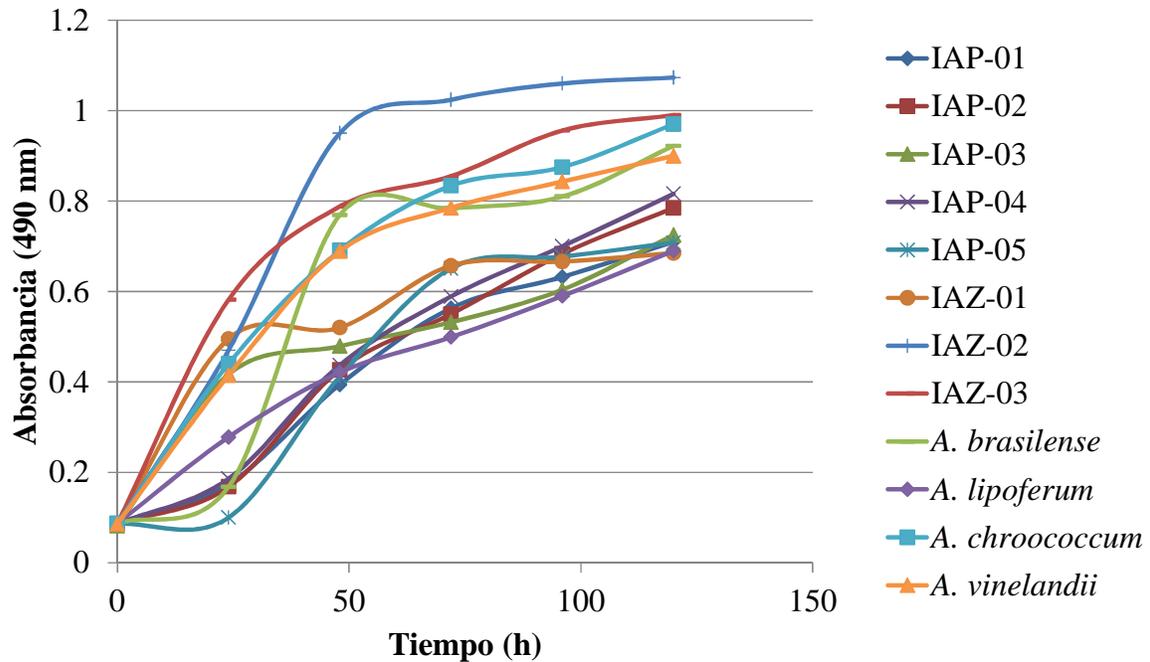
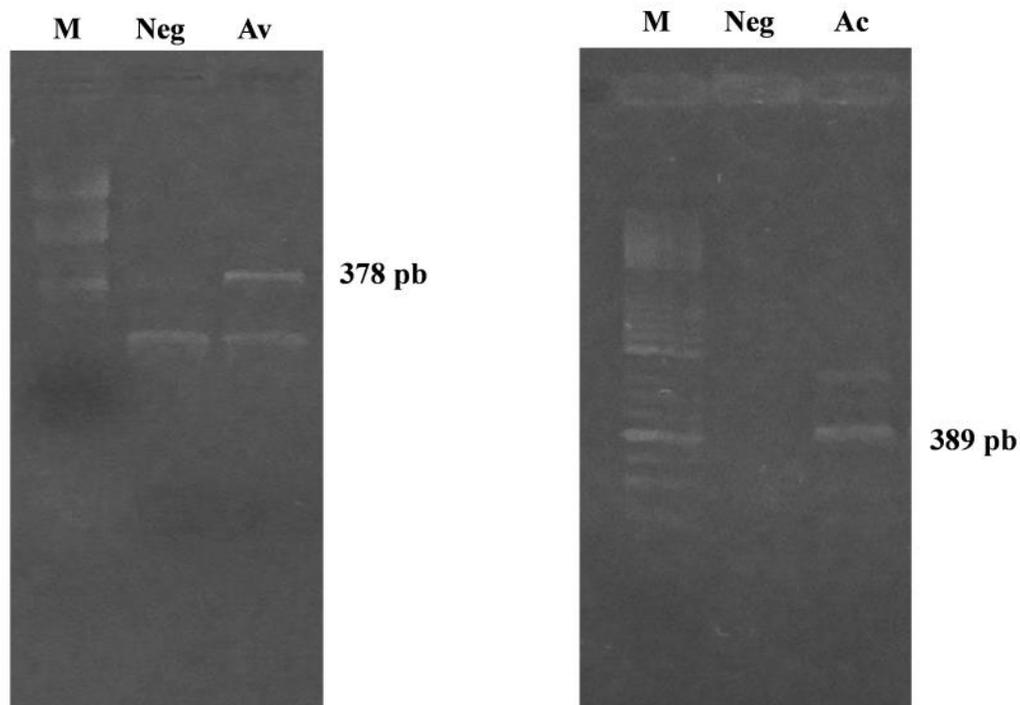


Fig. 1. Cinética de crecimiento en medio ANFm de cepas aisladas regionales y de referencia.

3.3. Caracterización molecular

Se logró estandarizar (Figura 2) la extracción de DNA bacteriano y amplificación de los genes codificantes de la enzima nitrogenasa (*nifH* y *D*). Con esta metodología se procedió a analizar todas las cepas de estudio. Así mismo se desarrolló la amplificación de DNA del regiones ribosomales 16S para su posterior secuenciación y se realizó su máxima parsimonia, en árbol filogenético.



Amplicón de *nifD* en *A. vinelandii*

Amplicón de *nifH* de *A. chroococcum*

Fig. 2. Estandarización de PCR para los genes *nifD* y *H* en DNA de cepas de referencia. M, marcador tamaño molecular 100pb, Neg, negativo; Av, *Azotobacter vinelandii*; Ac, *Azotobacter chroococcum*.

3.4. Reducción de acetileno

Se logró la detección de etileno de las muestras tanto aisladas (8 cepas) como de referencia (4 cepas), lo que demuestra que hay actividad de nitrogenasa. En el medio sin bacteria y cultivo de *Salmonella thypi* no se detectó actividad significativa de nitrogenasa confirmando la especificidad del método (Figura 3).

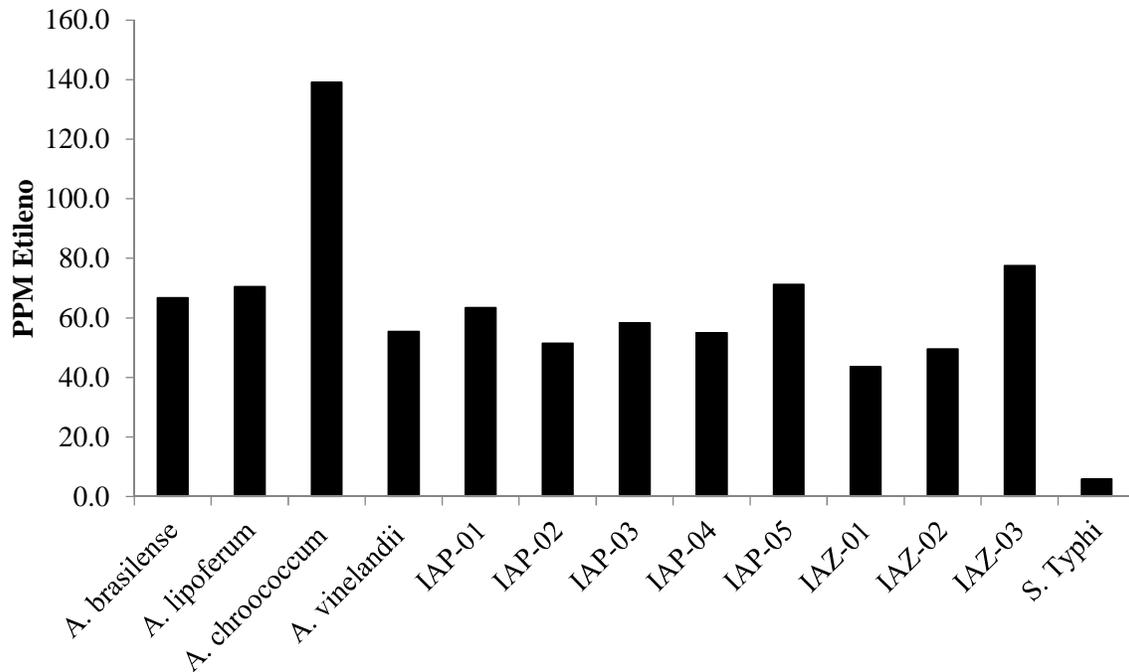


Fig. 3. Determinación de la actividad de la nitrogenasa en las cepas de estudio y el control negativo de *S. typhi*.

3.5. Ensayos de invernadero inoculación en caña de azúcar

Las mediciones del diámetro del tronco de la caña a un mes del cultivo, mostraron que el suelo inoculado con *A. lipoferum* resultó ser el mejor tratamiento al alcanzar un grosor de 0.94 ± 0.05 cm en comparación ($p=0.000$) con los grupos de estudio pero ligeramente por debajo del control con Triple 17 (0.94 ± 0.08 cm), tal como se muestra en la Tabla 2. Con respecto a la altura, *A. lipoferum* demuestra ser el más eficiente con 51.90 ± 7.71 cm ($p=0.002$) en comparación con el testigo (51.80 ± 8.42 cm), sin embargo, los demás grupo presentan valores por debajo del testigo pero similares entre los mismos. Los grados SPAD no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

A los 2 meses de cultivo se observó un incremento considerable en el grosor de tallo con el uso de *A. chroococcum*, 1.53 ± 2.20 ($p=0.447$) en comparación con el testigo 0.85 ± 0.40 , pero sin significancia estadística. El resto de los grupos presentaron una tendencia similar. La altura en comparación del testigo, 85.0 ± 6.72 cm, se ve rebasada por los aislados IAP-1 (90.0 ± 9.56 cm) y IAP-3 (86.8 ± 12.64 cm) ($p=0.000$) en la cual se nota diferencia estadísticamente significativa. Los grados SPAD no mostraron diferencias estadísticas significativas.

A los 3 meses de cultivo el grosor de tallo en comparación con el testigo (1.46 ± 0.32 cm) no muestra significancia estadística pero sí entre grupos ($p=0.001$). La altura se vio aumentada en el aislado IAP-1 (106.1 ± 8.80 cm, $p=0.001$) en comparación con el testigo (104 ± 15.76 cm) al igual que entre grupos. Los grados SPAD no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

A los 5 meses de cultivo en esta medición de grosor de tallo se vio un aumento significativo de la muestra inoculada IAP-1 (2.13 ± 0.29 cm, $p=0.009$) en comparación con el testigo (1.89 ± 0.12 cm), al igual que en las demás muestras.. En la medición de altura se observó

que las muestras IAP-1 (262.5 ± 55.2 cm, $p=0.05$) y IAZ-1 (258 ± 35.8 cm, $p=0.05$), en comparación al testigo (217.25 ± 25.3 cm), mostraron una diferencia estadísticamente significativa al igual de algunos de los demás tratamientos. Los grados SPAD no mostraron significancia estadística.

Tabla 2. Análisis estadístico de varianzas (ANOVA), y prueba de comparación múltiple de Tukey. Correspondiente a la primera medición, de altura, grosor de tallo, grados SPAD (clorofila), en caña de azúcar de invernadero. Letras diferentes (a, b, c) denotan diferencia estadística significativa IC 95%, $\alpha = 0.05$, IAP= *Azotobacter*, IAZ= *Azospirillum*, aislados indígenas del valle de Culiacán.

Grupo	Tallo (cm)	Altura (cm)	Spad	Tallo (cm)	Altura (cm)	Spad
	<i>1 mes</i>			<i>2 meses</i>		
<i>A. lipoferum</i>	0.94 ± 0.05^c	51.90 ± 7.71^b	46.24 ± 4.10^a	0.89 ± 0.03^a	85.60 ± 6.11^a	41.20 ± 3.6^a
<i>A. chroococcum</i>	$0.30 \pm 0.09^{a,b}$	36.90 ± 10.26^a	47.03 ± 5.00^a	1.53 ± 2.28^a	76.60 ± 10.18^a	40.84 ± 3.8^a
<i>A. vinelandii</i>	$0.34 \pm 0.06^{a,b}$	$41.40 \pm 7.59^{a,b}$	46.24 ± 3.20^a	0.89 ± 0.13^a	81.00 ± 7.67^a	41.89 ± 2.5^a
<i>A. brasilense</i>	$0.32 \pm 0.08^{a,b}$	36.00 ± 12.10^a	43.76 ± 5.00^a	0.68 ± 0.22^a	74.50 ± 12.63^a	43.04 ± 2.7^a
IAP-1	0.42 ± 0.11^b	$43.30 \pm 4.95^{a,b}$	45.35 ± 3.80^a	1.14 ± 0.10^a	90.00 ± 9.56^a	42.70 ± 2.6^a
IAP-3	$0.41 \pm 0.11^{a,b}$	$45.30 \pm 9.12^{a,b}$	43.33 ± 3.30^a	0.95 ± 0.15^a	86.80 ± 12.64^a	41.70 ± 3.9^a
IAZ-1	$0.32 \pm 0.07^{a,b}$	$43.30 \pm 9.38^{a,b}$	45.37 ± 3.70^a	0.87 ± 0.10^a	78.20 ± 5.41^a	45.66 ± 4.7^a
IAZ-3	$0.31 \pm 0.02^{a,b}$	$41.90 \pm 7.62^{a,b}$	45.79 ± 3.10^a	0.89 ± 0.08^a	80.90 ± 6.66^a	41.12 ± 2.2^a
Triple 17	0.94 ± 0.08^c	51.80 ± 8.42^b	44.8 ± 4.90^a	0.85 ± 0.40^a	85.00 ± 6.72^b	43.02 ± 2.4^a
	<i>3 meses</i>			<i>5 meses</i>		
<i>A. lipoferum</i>	1.13 ± 0.24^a	$105.10 \pm 10.75^{b,c}$	42.70 ± 2.6^a	2.07 ± 0.18^a	200.00 ± 21.90^a	45.35 ± 3.80^a
<i>A. chroococcum</i>	$1.21 \pm 0.16^{a,b}$	$94.40 \pm 13.77^{a,b,c}$	41.70 ± 3.9^a	$1.96 \pm 0.09^{a,b}$	215.50 ± 17.00^a	43.33 ± 3.30^a
<i>A. vinelandii</i>	$1.35 \pm 0.16^{a,b}$	114.00 ± 15.32^c	45.66 ± 4.7^a	$2.07 \pm 0.18^{a,b}$	260.00 ± 31.90^b	45.37 ± 3.70^a
<i>A. brasilense</i>	1.07 ± 0.25^a	$85.00 \pm 9.51^{a,b}$	41.12 ± 2.2^a	1.93 ± 0.23^a	192.50 ± 25.10^a	45.79 ± 3.10^a
IAP-1	1.44 ± 0.17^b	$106.10 \pm 8.80^{b,c}$	43.02 ± 2.4^a	2.13 ± 0.29^b	$262.50 \pm 55.20^{a,b}$	44.80 ± 4.90^a
IAP-3	$1.44 \pm 0.16^{a,b}$	$99.90 \pm 16.88^{a,b,c}$	40.84 ± 3.8^a	$1.96 \pm 0.17^{a,b}$	$228.50 \pm 39.40^{a,b}$	47.03 ± 5.00^a
IAZ-1	$1.25 \pm 0.20^{a,b}$	$96.10 \pm 16.20^{a,b,c}$	41.20 ± 3.6^a	$1.94 \pm 0.17^{a,b}$	$258.00 \pm 35.80^{a,b}$	48.30 ± 4.10^a
IAZ-3	$1.07 \pm 0.25^{a,b}$	$91.00 \pm 13.81^{a,b,c}$	41.89 ± 2.5^a	$1.93 \pm 0.11^{a,b}$	$227.50 \pm 33.30^{a,b}$	46.24 ± 3.20^a
Triple 17	1.46 ± 0.32^b	$104.00 \pm 15.76^{a,b,c}$	43.04 ± 2.7^a	1.89 ± 0.12^a	$217.25 \pm 25.30^{a,b}$	43.76 ± 5.00^a

4. DISCUSIONES

Por largo tiempo el uso de bacterias diazotróficas se ha postulado como una alternativa a los fertilizantes minerales. Numerosos autores hablan de la necesidad de caracterización de cepas indígenas de la zona, ya que estas tienden adaptarse mejor a la rizosfera de diferentes cultivos, los cambios de humedad, pH, temperatura, presión, tipo de suelo entre otros factores, podrían ser limitar del crecimiento de la biota, incluso antagonismos y lucha por los sustratos debido a la variabilidad de los nichos ecológicos, es por eso que nuestro trabajo concuerda con dichos autores (Dobereiner & Day 1975; Gamo & Ahn 1991).

Los datos demuestran un significancia estadística en los ensayo de invernadero en donde la altura y grosor del tallo de caña de azúcar se ve aumentada en los tratamientos lo cual

concuenda hasta el momento con estudios realizado por Caballero Mellado en el 2002, en donde demuestra que en experimentos de invernadero se ha logrado incrementar significativamente, la biomasa de plantas de maíz mediante la inoculación con una cepa de *Azospirillum* (Caballero-Mellado 2002). A pesar de que la actividad de la enzima nitrogenasa es un factor determinante para que estas bacterias puedan ejercer su función de biofertilizantes, es importante considerar además la capacidad colonizadora de cada cepa. En los resultados obtenidos se pudo observar que a pesar de tener menos actividad de nitrogenasa que *A. chroococcum*, diversas cepas (entre ellas IAZ-01 y IAZ-03) tuvieron un mayor efecto sobre el alto y grosor del tallo de la caña, lo cual pudiera explicarse por la mayor velocidad de crecimiento que presentan, como se puede observar en las cinéticas de la Figura 1. Al haber una mayor cantidad de bacterias colonizando la rizósfera de la caña, compensan la menor actividad nitrogenasa e incluso superan en capacidad biofertilizante a las cepas de referencia. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo sobre el nivel de clorofila (Grados SPAD) en el follaje de la caña. En algunos cultivos, como es el caso de la calabaza, se ha detectado que los grados SPAD están directamente relacionados con el nitrógeno suministrado a la planta (Swiader & Moore 2002). En el caso de caña de azúcar, se ha reportado que con una tasa de fertilización con nitrógeno (en forma de urea) de alrededor de 100 kg/Ha, se puede tener un aumento significativo en la cantidad de clorofila en las hojas. Sin embargo, una vez alcanzado un nivel de saturación de nitrógeno, los grados SPAD tienden incluso a ser menores cuanto más nitrógeno se usa. Este efecto puede observarse cuando se alcanzan niveles de 200 kg/Ha (Glaz *et al.* 2008). Con base en lo anterior se podría inferir que los tratamientos usados en el presente estudio no lograron alcanzar esos niveles de nitrógeno por medio de la fijación bacteriana.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de la Secretaría de Relaciones Exteriores (SER-CONACYT, N°188060) y PROFAPI-UAS (PROFAPI2014/168) por el financiamiento del presente proyecto. A Agrobiológicos del Noroeste SA de CV por facilitar el uso de su infraestructura. Al Dr. Ignacio Contreras Andrade (FCQB-UAS) por el apoyo brindado para el ensayo ARA.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Bolívar Zapata, F.G. & Arias Ortiz C.F., Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. 2007: Fondo de Cultura Económica.

Boone D. R., Castenholz R. W., Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R. & Staley J. T. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2: Springer Science & Business Media.

Burgess B. K. & Lowe D. J. 1996. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. Chemical reviews. 96 (7):2983-3012.

Caballero-Mellado J. 2002. El género *Azospirillum*. Microbios en Línea. Cap. 10. <http://biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>.

Callisto M., Molozzi J. & Barbosa E. J. L. 2014. Eutrophication of Lakes. In Eutrophication: Causes, Consequences and Control: Volume 2, edited by A. A. Ansari and S. S. Gill. Dordrecht: Springer Netherlands, 55-71.

Dilworth M. J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochimica et biophysica acta (BBA). 127 (2):285-294.

Dittmar H., Drach M., Vosskamp R., Trenkel M. E., Gutser R. & Steffens G. 2000. Fertilizers, 2. Types. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Dobereiner J. & Day J. 1975. Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms. Cambridge University Press, London.

Erismann J. W., Sutton M. A., Galloway J., Klimont Z. & Winiwarter W. 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. Nature Geosciences. 1 (10):636-639.

Gaby J. C. & Buckley D. H. 2014. A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. Database (Oxford). 2014:bau001.

Gamo T. & Ahn S. B. 1991. Growth-Promoting *Azospirillum* Spp Isolated from the Roots of Several Non-Gramineous Crops in Japan. Soil Science and Plant Nutrition. 37 (3):455-461.

Garassini L. A. 1967. Microbiología agraria: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía.

Glaz B., Reed S. T. & Albano J. P. 2008. Sugarcane response to nitrogen fertilization on a histosol with shallow water table and periodic flooding. Journal of Agronomy and Crop Science. 194 (5):369-379.

Gruber N. & Galloway J. N. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. Nature. 451 (7176):293-296.

Haneef I., Faizan S., Perveen R. & Kausar S. 2014. Impact of bio-fertilizers and different levels of cadmium on the growth, biochemical contents and lipid peroxidation of *Plantago ovata* Forsk. Saudi journal of biological sciences. 21 (4):305-310.

Hardy R. W., Holsten R., Jackson E. & Burns R. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. Plant physiology. 43 (8):1185-1207.

Hoppe B., Kahl T., Karasch P., Wubet T., Bauhus J., Buscot F. & Kruger D. 2014. Network analysis reveals ecological links between N-fixing bacteria and wood-decaying fungi. PLoS One. 9 (2):e88141.

Igarashi R. Y. & Seefeldt L. C. 2003. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 38 (4):351-384.

Lewis I. M. 1937. Cell Inclusions and the Life Cycle of *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology*. 34 (2):191-205.

Narula N. 2000. *Azotobacter* in Sustainable Agriculture. New Delhi.

Nosheen A., Bano A. & Ullah F. 2016. Bioinoculants: A sustainable approach to maximize the yield of Ethiopian mustard (*Brassica carinata* L.) under low input of chemical fertilizers. *Toxicology and industrial health*. 32 (2):270-277.

Ragsdale S. W. 2014. Biochemistry of Methyl-Coenzyme M Reductase: The Nickel Metalloenzyme that Catalyzes the Final Step in Synthesis and the First Step in Anaerobic Oxidation of the Greenhouse Gas Methane. In *The Metal-Driven Biogeochemistry of Gaseous Compounds in the Environment*, edited by M. H. P. Kroneck and S. M. E. Torres. Dordrecht: Springer Netherlands, 125-145.

Socolofsky M. D. & Wyss O. 1962. Resistance of the *Azotobacter* cyst. *Journal of bacteriology*. 84:119-124.

Swiader J. M. & Moore A. 2002. SPAD-chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. *Journal of Plant Nutrition*. 25 (5):1089-1100.

Tahir M., Mirza M. S., Zaheer A., Rocha Dimitrov M., Smidt H. & Hameed S. 2013. Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus* and *Enterobacter* strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*. 7 (9):1284-1292.

Tarrand J. J., Krieg N. R. & Dobereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum* lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum* lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian journal of microbiology*. 24 (8):967-980.

Tejera N., Lluch C., Martinez-Toledo M. V. & Gonzalez-Lopez J. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*. 270 (1-2):223-232.

Vela G. R. & Rosenthal R. S. 1972. Effect of peptone on *Azotobacter* morphology. *Journal of bacteriology*. 111 (1):260-266.

Winogradsky S. & Winogradsky H. 1925. Etudes sur la microbiologie du sol. *Annales de l'Institut Pasteur*. 34:1-299.