

## Fijación de nitrógeno por valoración indirecta del ion amonio de bacterias aisladas de rizósfera y caulósfera de planta de maíz (*Zea mays* L.)

*Nitrogen fixation by indirect titration of ammonium ion of bacteria isolated from rhizosphere and caulosphere of maize plants (*Zea mays* L.)*

Reyes Nava L. A.<sup>1\*</sup>, Pliego Sandoval J. E.<sup>1</sup>, Reyes Bautista R.<sup>2</sup>, Iñiguez Muñoz L. E.<sup>1</sup>

 Reyes Nava L. A.  
luis.reyes@cusur.udg.mx.

 Pliego Sandoval J. E.  
jorge.pliego@cusur.udg.mx

 Reyes Bautista R.  
raul.rb@purisima.tecnm.mx

 Iñiguez Muñoz L. E.  
laural@cusur.udg.mx

Autor de correspondencia: [luis.reyes@cusur.udg.mx](mailto:luis.reyes@cusur.udg.mx)

<sup>1</sup> Universidad de Guadalajara, Centro Universitario del Sur, AV. Enrique Arreola Silva No 883, Colonia Centro. Ciudad Guzmán Jalisco. México. C.P.49000.

<sup>2</sup> Tecnológico Nacional de México/ITS de Purísima del Rincón. Blvd. Del Valle, No. 2301. Colonia Guardarrayas. Purísima del Rincón, Guanajuato. C.P. 36425.

Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático  
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua

ISSN-e: 2410-7980

Periodicidad: Semestral

vol.10, núm.19, 2024

[ribcc@ev.unanleon.edu.ni](mailto:ribcc@ev.unanleon.edu.ni)

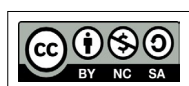
Recepción: 17 Agosto, 2024

Aprobación: 27 Noviembre, 2024

URL: [https://revistas.unanleon.edu.ni/index.php/REB\\_ICAMCLI/article/view/1075](https://revistas.unanleon.edu.ni/index.php/REB_ICAMCLI/article/view/1075)

DOI: <https://doi.org/10.5377/ribcc.v10i19.19988>

Copyright © 2024 Rev. iberoam. bioecon. cambio clim. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua León (UNAN-León), Area de Conocimiento de ciencias agrarias y veterinarias/ Area Especifica de Agroecología y agronegocios /Centro de Investigación Ciencias Agrarias y Veterinarias. Dirección Académica. Departamento de Investigación. Unidad de publicaciones y eventos científicos. Departamento de Investigación. Unidad de Publicaciones y Eventos Científicos.



Esta obra está bajo una licencia internacional  
[Creative Commons Atribución No Comercial Compartir Igual 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

### Resumen

**Antecedentes:** México es uno de los principales productores, exportadores y consumidores de maíz en el mundo. Para el máximo rendimiento del producto, se suministran fertilizantes nitrogenados como fuente principal de nutrientes. Sin embargo, su uso desmedido está creando una problemática de contaminación. **Objetivo:** El objetivo principal fue aislar y seleccionar bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de rizosfera y caulósfera de plantas de maíz. **Metodología:** Se eligieron plantas de maíz durante tres diferentes períodos: crecimiento vegetativo, floración y fecundación, llenado de grano y madurez. Se obtuvieron muestras de raíz y tallo de cada una de las plantas, se desinfectaron superficialmente, se hicieron diluciones seriadas y fueron sembradas en medio agar nutritivo para su aislamiento. La capacidad de fijación de nitrógeno se evaluó cualitativamente sobre un medio libre de nitrógeno y cuantitativamente a través del método de valoración indirecta del ion amonio. **Resultados:** Se obtuvieron 70 aislados bacterianos, de los cuales 14 presentaron actividad positiva de fijación de nitrógeno *in vitro*. Solo los aislados RB14, RC12, CB1 y CC3 presentaron concentraciones de ión amonio cuantificables, con valores de 1.081 mg/L, 0.546 mg/L, 0.54 mg/L y 0.163 mg/L de amonio liberado, respectivamente. De acuerdo con las características macroscópicas y microscópicas observadas, los microorganismos que presentaron capacidad fijadora de nitrógeno mostraron una similitud morfológica a los géneros *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp y *Azotobacter* sp. **Conclusiones:** Estos aislados pueden ser utilizados como una alternativa al uso de fertilizantes químicos ya que mostraron un alto potencial de fijación de nitrógeno *in vitro*.

**Palabras claves:** : *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Azotobacter* spp, amonio, nitrógeno.

### Abstract

**Background:** Mexico is one of the main producers, exporters and consumers of corn in the world. For maximum yield of the product, nitrogen fertilizers are supplied as the main source of nutrients. However, their excessive use is creating a contamination problem. **Objective:** The main objective was to isolate and select nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere and caulosphere of corn plants. **Methodology:** Corn plants were selected during three different periods: vegetative growth, flowering and fertilization, grain filling and maturity. Root and stem samples were obtained from each of the plants, they were superficially disinfected, serial dilutions were made and they were planted in nutrient agar medium for isolation. The nitrogen-fixing capacity was evaluated qualitatively on a nitrogen-free medium and quantitatively through the indirect ammonium ion titration method. **Results:** 70 bacterial isolates were obtained, of which 14 presented positive nitrogen-fixing activity *in vitro*. Only isolates RB14, RC12, CB1 and CC3 presented quantifiable ammonium ion concentrations, with values of 1.081 mg/L, 0.546 mg/L, 0.54 mg/L and 0.163 mg/L of released ammonium, respectively. According to the macroscopic and microscopic characteristics observed, the microorganisms that presented nitrogen fixing capacity showed a morphological similarity to the genera *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp and *Azotobacter* sp. **Conclusions:** These isolates can be used as an alternative to the use of chemical fertilizers since they showed a high nitrogen fixation potential *in vitro*.

**Keywords:** *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Azotobacter* spp, ammonium, nitrogen.

## Introducción

El maíz, es uno de los principales alimentos de consumo en el mundo, sobre todo en México que de forma tradicional se consume como tortilla, tamales, atole, entre otros usos ([Calleja-Pinedo y Valenzuela, 2016](#)). Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2023) en el ciclo otoño-invierno 2023 se plantaron 1,157,911 hectáreas, siendo un 12% más que las del ciclo otoño-invierno de 2022. Este cultivo depende en gran medida de una adecuada nutrición nitrogenada para alcanzar su máximo potencial de rendimiento ([Galeano-Lobos et al., 2022](#)).

La rizósfera y la caulósfera del maíz, zonas del suelo y del tejido de la planta adyacentes a las raíces y el tallo respectivamente, son hábitats ricos en microorganismos que pueden influir en la salud y productividad de la planta ([Dlamini et al., 2023](#); [Zhu et al., 2022](#)). Entre los microorganismos más conocidos, están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium* sp, *Azotobacter* sp, *Pseudomonas* sp, y *Azospirillum* sp. Estos pueden encargarse de la solubilización de fosfatos, producción de hormonas o fijación del nitrógeno, los cuales afectan positivamente el metabolismo de la planta incrementando la toma de agua y minerales ([González y Fuentes, 2017](#)). Algunas de las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum* o *Azotobacter*, establecen interacciones benéficas, ya que son capaces de obtener el nitrógeno atmosférico transformándolo en amonio (NH<sub>4</sub>) para que las plantas lo puedan utilizar ([Gastélum y Rocha, 2020](#)). Este proceso es llevado a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa el cual es propio de algunos tipos de bacterias, eso en conjunto con las relaciones simbióticas con las plantas, crean el proceso de fijación biológica del nitrógeno ([Guzmán-Duchen y Montero-Torres, 2021](#)). [Lara-Mantilla et al. \(2007\)](#) aislaron 21 microorganismos correspondientes al género *Azotobacter* y 15 al género *Azospirillum* a partir de rizósfera de cultivos de plátano, pastos, maíz y de rastros.

Estos autores encontraron que, solo 8 aislados de *Azotobacter* sp y 6 de *Azospirillum* sp mostraron concentraciones de ión amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) cuantificables; y solo uno de los aislados de *Azotobacter* sp de la rizósfera de maíz mostró concentración de ión amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) cuantificable. Otros autores como [Richard et al. \(2018\)](#) aislaron 11 bacterias del género *Azospirillum* sp. a partir de la rizósfera de plantas de maíz (*Zea mays* L.) de las cuales solo 7 fueron capaces de fijar nitrógeno. Estos hallazgos indican que no todos los microorganismos tienen la habilidad de producir el complejo enzimático nitrogenasa, aunque se trate del mismo género y, de igual forma, no tienen la misma capacidad de fijación. Por todo lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue aislar y seleccionar bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de rizósfera y caulósfera de plantas de maíz.

## Materiales y métodos

### Ubicación del estudio

El estudio se realizó en 3 zonas de cultivo de maíz en el municipio de Gómez Farías en el estado de Jalisco. La primera zona de cultivo (I) se ubicó en el “Complejo Gómez Farías del Centro Universitario Del Sur” situado a 19°48'14" latitud N y 103°28'40" Longitud W a 1.80 km del municipio; la segunda zona (II) se ubicó a 19°47'55" latitud N y 103°28'41" Longitud W a 1.52 km del municipio; la tercera zona (III) se ubicó a 19°48'04" Latitud N y 103°28'42" longitud W. Estas zonas al encontrarse en el mismo municipio presentaron características similares las cuales son: superficies arcillosas, semipermeables y de alta retención de humedad.

### Muestreo

Se eligieron plantas de maíz en tres diferentes periodos: crecimiento vegetativo (A), floración y fecundación (B) y llenado de grano y madurez (C) ([Pedraza-Guevara et al., 2017](#)). Dado que este estudio forma parte de una investigación piloto, para obtener una visión general, se colectaron 5 plantas completas de forma aleatoria incluyendo raíces para cada uno de los diferentes periodos en cada zona de cultivo. Aislamiento de bacterias endófitas.

El procesamiento de las muestras se realizó mediante la metodología descrita por [Mascarua-Esparza et al. \(1988\)](#). De cada planta se separaron raíz y tallo, fueron lavados con agua de la llave; luego se esterilizaron de forma superficial mediante la inmersión en cloramina T al 1% durante 5 minutos. A continuación, las raíces se enjuagaron con solución estéril reguladora de fosfatos 0.025 M, pH 6.8 y cinco lavados con agua estéril. Una vez terminado este proceso se procedió a realizar cortes de 3-6 cm a la raíz de cada planta, en el caso del tallo primero se retiró la capa que recubre su interior, ya teniendo el interior del tallo expuesto se realizaron cortes de 3 cm de ancho. Ambos tipos de muestras fueron trituradas en una licuadora con agua estéril hasta formar una suspensión ([Pérez et al., 2010](#)). Las muestras procesadas fueron colocadas en tubos Falcon rotulados. El aislamiento de las bacterias endófitas se llevó a cabo de la siguiente forma: se hicieron diluciones seriadas de cada uno de los tubos, se sembraron sobre caja petri con agar nutritivo y fueron incubadas a 30°C por un periodo de 3 días. Se seleccionaron colonias que se distinguían en cuanto a forma, aspecto de la superficie, color y tamaño ([Corral-Lugo et al., 2012](#)). La morfología microscópica de las bacterias fue determinada por tinción de Gram. Los aislados seleccionados fueron propagados y conservados en caldo nutritivo con glicerol al 50% a -20°C para su uso posterior en las pruebas cualitativa y cuantitativa de fijación de nitrógeno.

## Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno

La capacidad de fijación de nitrógeno se evaluó cualitativamente utilizando la metodología descrita por [Stella y Suhaimi, \(2010\)](#) sobre medio agar libre de nitrógeno (20 g/L de manitol, 0.2 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g/L de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L de NaCl, 0.1 g/L de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g/L de CaCO<sub>3</sub> y 15 g/L de agar). Cada uno de los aislados fue sembrado por microgota de 5 µL de forma directa sobre la superficie del medio e incubados a 30°C por 3 días. Después de este periodo, se seleccionaron aquellos aislados que fueron capaces de crecer en el medio, lo cual es un indicativo de la presencia de bacterias con capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico y metabolizarlo.

## Determinación de la concentración de ion amonio

La capacidad fijadora de nitrógeno cuantitativa se evaluó para cada uno de los aislados que fueron capaces de crecer en el medio libre de nitrógeno. Para esto, se utilizó el método indirecto de valoración del ión amonio mediante la técnica colorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito) con algunas modificaciones ([Lara-Mantilla et al., 2007](#); [Weatherburn, 1967](#)). El procedimiento consistió en inocular cada aislado en un medio de suelo al 10% (suelo extraídas a 10 cm de profundidad de la superficie) para posteriormente incubarlo a 29°C por 3 días con agitación constante a 100 rpm. Pasado dicho tiempo, se agregaron 25 ml de KCl 2M y se mantuvo una hora más en agitación, se dejó reposar por 1 hora; se tomaron 10 mL del sobrenadante y se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos. Después del proceso anterior, se pasaron 2.5 ml de muestra a un tubo de ensayo y se agregó 0.1 ml de solución fenólica al 10%, 0.1ml de nitroprusiato de sodio al 0.5% y 0.25 ml de solución oxidante (preparada con: 2g de citrato de sodio, 0.1g NaOH y 1.25ml de hipoclorito al 10% en 10 mL de agua destilada) pasando el tubo de ensayo por el vortex al menos 6 segundos cada que se agregaba un componente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Finalmente, las muestras se dejaron en reposo en un espacio sin luz (ya que esta es una reacción fotosensible) durante 1 hora. Posteriormente, las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 640 nm. Como blanco se utilizó el medio de suelo al 10% estéril pasando por los mismos procesos de la muestra, pero sin inocular.

Para la elaboración de la curva tipo, se realizó el procedimiento descrito anteriormente, añadiendo las mismas cantidades de solución fenol, nitroprusiato de sodio y solución oxidante sustituyendo la muestra de suelo al 10% por concentraciones variadas de NH<sub>4</sub>Cl preparado a 1 mg/L ([Tabla 1](#)).

**Tabla 1.** Concentraciones de amonio para curva tipo.

Tubo	NH <sub>4</sub> Cl (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	mg/L de NH <sub>4</sub> Cl
0	0	2.5	0
1	0.5	2	0.2
2	1	1.5	0.4
3	1.5	1	0.6
4	2	0.5	0.8
5	2.5	0	1

## Análisis estadístico

Se empleó la prueba exacta de Fisher para evaluar la independencia del tipo de tejido y periodo de aislamiento con respecto a la actividad fijadora de nitrógeno en función de ausencia y presencia con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I. El análisis de varianza se realizó por ANOVA simple, para determinar diferencias entre las concentraciones de amonio liberado (mg/L) en función de los tipos de aislados bacterianos. Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias Tukey para determinar las diferencias significativas entre las concentraciones de amonio liberado en mg/L con respecto al tipo de aislados. Los datos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism, versión 9.3. La diferencia entre datos fue considerada estadísticamente significativa al 95% de confiabilidad o P<0.05.

## Resultados y Discusión

### Aislamiento y selección de bacterias de rizósfera y caulósfera

Se aislaron un total de 70 bacterias, de las cuales 29 procedieron de la zona agrícola II, 22 de la zona agrícola III y 19 de la zona agrícola I ([Tabla 2](#)). La mayoría de los aislados fueron obtenidos de la zona agrícola II con un 42%, mientras que de las zonas III y I, se aislaron el 31% y 27%, respectivamente. Aunado a esto, el mayor porcentaje de aislamientos se obtuvo en la rizósfera, con un 79%, mientras que de caulósfera solo se aisló el 21%.

Por otro lado, se observó que para las zonas agrícolas II y III, la cantidad de aislados fue mayor en el periodo B, y no así para el caso de la zona I, donde se observó ligeramente que la mayor cantidad de aislados se obtuvo en el periodo C.

De acuerdo con [Fisher et al. \(1992\)](#) las bacterias endofíticas parecen localizarse preferentemente en la parte inferior del tallo, con un gradiente decreciente que va desde la base hasta la parte superior. Esto sugiere que las bacterias se concentran en las raíces y que desde ahí pueden desplazarse hacia el tallo durante el desarrollo de la planta y que alternativamente, los microorganismos pueden entrar en los tallos de las plantas de maíz con más frecuencia en la base que en la punta. Además, [McInroy y Kloepper \(1995\)](#) observaron que el número de géneros bacterianos encontrados en los tallos de maíz disminuía con la edad de la planta y que, en la madurez de la planta, los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* eran dominantes.



Por otro lado, [Mandic et al. \(2018\)](#) mencionan que el número microbiano y su diversidad en la rizósfera y filosfera de plantas de maíz dependen de los factores climáticos, de las fases fenológicas, entre otros. Las condiciones climáticas afectan a la población microbiana, mientras que las temperaturas bajas y la mayor disponibilidad de agua influyen en el mayor número de microorganismos. Por su lado, [Emmett et al. \(2020\)](#) sugieren que la variación en la comunidad microbiana se correlaciona con la especie vegetal y la variación temporal de la tasa de crecimiento relativo. Además, [Kaštovská et al. \(2015\)](#) encontraron que la tasa de crecimiento relativo disminuye con el crecimiento y desarrollo de la planta y coincide con la disminución de la respiración de la raíz y la rizósfera por unidad de biomasa en muchas especies anuales. [Li et al. \(2023\)](#) mencionan que la mayoría de las interacciones suelo-planta-microorganismo se producen en el suelo de la rizósfera a menos de un milímetro de la superficie de la raíz y que mediante la deposición en la rizósfera, las plantas influyen en las especies de la comunidad microbiana de la rizósfera, proporcionando así compuestos de carbono y nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos.

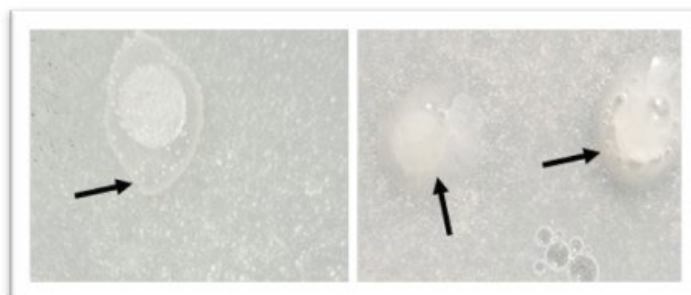
**Tabla 2.** Bacterias aisladas de caulósfera y rizósfera de plantas de maíz en tres diferentes periodos de crecimiento vegetal.

Zona agrícola	Período	Aislados en caulósfera (UFC)*	Aislados en rizósfera (UFC)	Aislados totales (UFC)
I	A	1	5	6
	B	2	4	6
	C	1	6	7
II	A	2	3	5
	B	3	15	18
	C	1	5	6
III	A	1	3	4
	B	2	9	11
	C	2	5	7

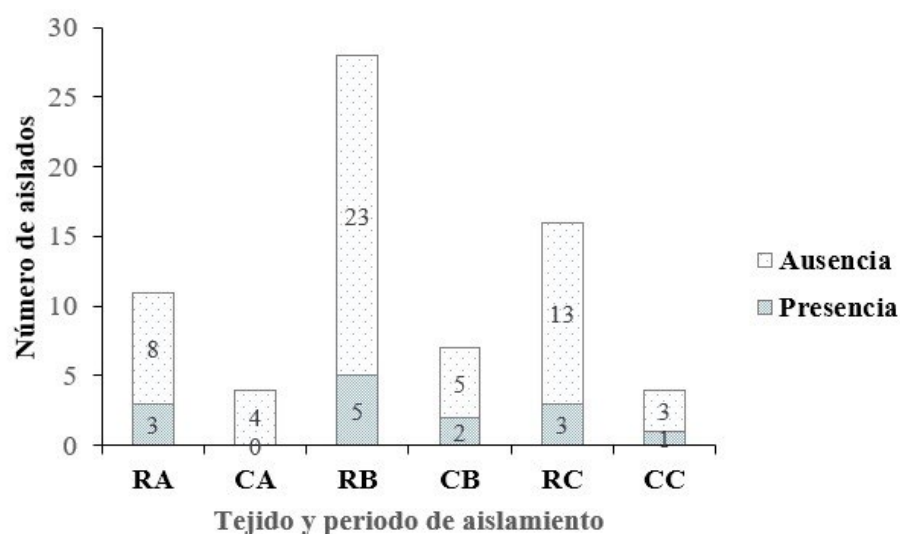
\*Unidades formadoras de colonias

### Capacidad de fijación de nitrógeno

De los 70 aislados bacterianos, 14 presentaron actividad positiva de fijación biológica de nitrógeno *in vitro* ([Figura 1](#)). De acuerdo con los resultados de la prueba exacta de Fisher, la presencia o ausencia de la capacidad fijadora de nitrógeno no tiene dependencia con el tipo de tejido ( $P\text{-bilateral} = 1$ ) y periodos de crecimiento vegetal ( $P\text{-bilateral} = 1$ ). El 79% de las bacterias que presentaron capacidad de fijación biológica de nitrógeno correspondió a las aisladas a partir de la rizósfera y el 21% a las bacterias aisladas a partir de la caulósfera. Mientras que, el 50% de las bacterias que presentaron capacidad de fijación biológica de nitrógeno fueron las aisladas a partir de las plantas de maíz en su segundo periodo de crecimiento vegetal, floración y fecundación ([Figura 2](#)).



**Figura 1.** Capacidad de fijación biológica de nitrógeno *in vitro* de bacterias aisladas de rizósfera y caulósfera de plantas de maíz (*Zea mays* L.).



**Figura 2.** Presencia y ausencia de actividad fijadora de nitrógeno de bacterias aisladas de rizósfera y caulósfera de plantas de maíz con respecto a periodos de crecimiento mediante prueba exacta de Fisher. Tejidos: R, rizósfera; C, caulósfera. Periodos de crecimiento vegetal: A, B y C.

Como se puede observar en la Figura 2, solo el 20% de las bacterias aisladas presentaron la capacidad de fijar nitrógeno *in vitro*. [Lara-Mantilla et al. \(2007\)](#) utilizaron medios selectivos libres de nitrógeno, para aislar microorganismos fijadores de nitrógeno a partir de plantas de plátano, pasto y maíz. Estos autores aislaron un total de 55 bacterias con características macroscópicas y microscópicas que pertenecen a los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*. Además, [Ariza-Rodríguez et al. \(2020\)](#) aislaron 23 bacterias fijadoras de nitrógeno con características morfológicas a los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* a partir de granos y raíces de frijol, maíz, lechuga y tomate, utilizando medios libres de nitrógeno. Algunos autores mencionan que la habilidad de los microorganismos de crecer en un medio libre de nitrógeno es indicativo cualitativo de actividad nitrogenasa, ya que este medio es libre de nitrógeno y el hecho de que crezcan en él, significa que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico para su desarrollo y multiplicación ([Stella y Suhaimi, 2010](#)).

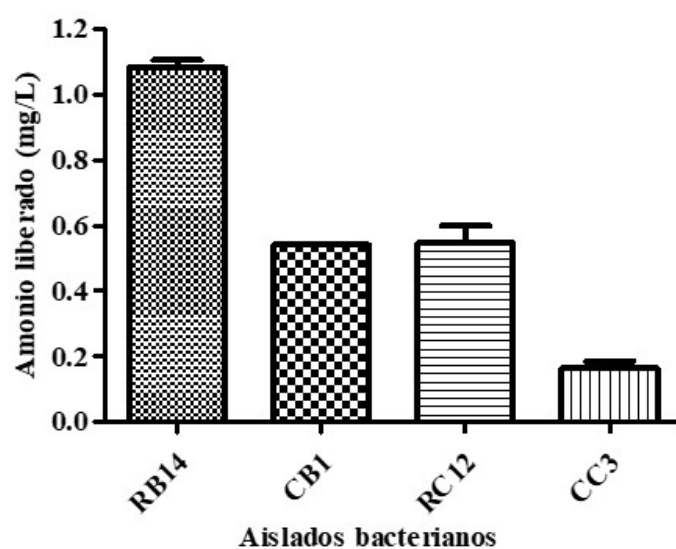
#### Determinación del ion amonio

Los resultados del análisis de varianza entre las concentraciones de amonio liberado en función de los tipos de aislados bacterianos mostraron diferencias significativas ([Tabla 3](#)). De los 14 aislados bacterianos que presentaron capacidad de fijación de nitrógeno positiva en medio libre de nitrógeno, solo 4 presentaron concentraciones de ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) cuantificables. De acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples para la concentración de amonio liberado, el aislado RB14 presentó la mayor concentración de amonio liberado (1.081 mg/L) con respecto a los aislados RC12, CB1 y CC3, los cuales presentaron concentraciones de 0.546 mg/L, 0.54 mg/L y 0.163 mg/L de amonio liberado, respectivamente ([Figura 3](#)). De acuerdo con las características macroscópicas y microscópicas observadas, los microorganismos que mostraron concentraciones de ion amonio cuantificables presentaron una similitud morfológica a los géneros *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp y *Azotobacter* spp. [Bellenger et al. \(2020\)](#) y [Sun et al. \(2021\)](#) mencionan que la fijación biológica del nitrógeno es llevada a cabo por los microorganismos, gracias al complejo de nitrogenasas (V-nitrogenasa, Mo-nitrogenasa y Fe-nitrogenasa), sistema enzimático que cataliza la reducción de nitrógeno a amonio y que reacciona con iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) para producir  $\text{H}_2$ . Algunos autores mencionan que un grupo reducido de bacterias conocido como diazótrofos son capaces de reducir el nitrógeno a amonio utilizando las enzimas nitrogenasas y que dentro de este grupo se encuentran los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter* y *Serratia* ([Bloch et al., 2020](#); [Hernández-Rodríguez et al., 2014](#)). Estos microorganismos usualmente son encontrados en la rizósfera, ya que existe una mayor concentración disponible de nutrientes en forma de compuestos orgánicos, estableciendo numerosas interacciones con la planta hospedera ([Sun et al., 2021](#)).

**Tabla 3.** Análisis de varianza por ANOVA simple de las concentraciones de amonio liberado (mg/L) en función de los tipos de aislados bacterianos obtenidos a partir de rizósfera y caulósfera de plantas de maíz.

Fuente	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P*
Aislados	1.281	3	0.4271	148.5	0.0001
Residuos	0.02301	8	0.002876		
Total	1.304	11			

\*Diferencias significativas con un 95% de nivel de confianza.



**Figura 3.** Producción de amonio por aislados bacterianos de rizósfera y caulósfera de plantas de maíz en tres diferentes periodos de crecimiento vegetal.

[Alcarraz-Curi et al. \(2019\)](#) aislaron 12 cepas bacterianas de *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* de la rizosfera de plantas de café, que registraron concentraciones de amonio valorado por el método de Berthelot, entre 0.9-2.75 mg/L. Estos valores son similares con el obtenido por el aislado RB14 que presentó una concentración dentro de ese intervalo. Otros autores, utilizando el mismo método de valoración indirecta del ión amonio, aislaron 8 cepas del género *Azotobacter* y 6 del género *Azospirillum* a partir de la rizósfera de plantas de plátano, pasto y maíz con concentraciones liberadas de amonio de 0.9 a 5.1 mg/L ([Lara-Mantilla et al., 2007](#)). Cabe mencionar que la diferencia en la concentración de amonio liberado de cada microorganismo depende de varios factores, entre estos, de la cepa, la concentración celular utilizada, la temperatura a la cual se llevó el proceso de producción de amonio, entre otros. [Valdovinos et al. \(2017\)](#) y [Oliveira y González-Molero, \(2016\)](#) mencionan que los beneficios que imparten algunas bacterias son específicos de cada cepa y no de la especie o el género; y que ninguna cepa proporcionará todos los beneficios propuestos, ni siquiera cepas de la misma especie, y no todas las cepas de la misma especie serán eficaces de la misma forma.

## Conclusiones

Los tipos de tejidos (rizósfera y caulósfera) y los tres períodos de crecimiento vegetal (crecimiento vegetativo, floración y fecundación y llenado de grano y madurez) de las plantas de maíz no presentaron relación con la capacidad fijadora de nitrógeno de los aislados obtenidos. La rizósfera de plantas de maíz (*Zea mays* L.) en los tres periodos de crecimiento vegetal es la que presentó el mayor número de aislados bacterianos. El método indirecto de valoración del ión amonio mediante la técnica colorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito) demostró que el aislado RB14 tiene mayor potencial de fijación de nitrógeno sobre los otros aislados. Esto es importante dada la problemática que se presenta actualmente sobre el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados que afectan al medio ambiente. Por lo que, estos aislados podrían ser utilizados como una alternativa al uso de fertilizantes químicos, minimizando así, el impacto en el ambiente.

## Declaraciones

**Fondos:** Este estudio fue realizado dentro del marco del proyecto con financiamiento “Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos de origen agrícola productores de enzimas hidrolíticas con potencial de aplicación biotecnológica en la región sur de Jalisco” con número de registro: SAC/CIP/D/11/21, dentro de las instalaciones del Centro Universitario del Sur de la Universidad de Guadalajara.

**Conflicto de intereses:** Los autores no tienen intereses financieros o no financieros relevantes que revelar. No revelaron conflictos de intereses.

**Cumplimiento de estándares éticos:** No se realizó ningún experimento con animales o personas. El proyecto fue aprobado por el Comité Técnico de Investigación del Centro Universitario del Sur de la Universidad de Guadalajara.

**Contribuciones de autor:** L.A.R.N: Conceptualización, Metodología, Borrador Original, Revisión y Edición, Supervisión. J.E.P.S: Conceptualización, Metodología, Borrador Original, Revisión y Edición. L. E. I. M: Metodología, Borrador Original, Revisión y Edición. R.R. B: Metodología, Borrador Original, Revisión y Edición

**Disponibilidad de datos:** Los conjuntos de datos analizados en el presente estudio pertenecen a la Universidad de Guadalajara y no son de acceso público, pero están disponibles a través del autor correspondiente, previa solicitud razonable.

**Agradecimientos:** A la Universidad de Guadalajara por el financiamiento de la presente investigación.



## Referencias bibliográficas

- Alcarraz-Curi, M., Heredia-Jiménez, V. y Julián-Ibarra, J.P. (2019). Cepas bacterianas nativas con actividades promotoras del crecimiento vegetal aisladas de la rizósfera de *Coffea* spp. en Pichanaqui, Perú. *Biotechnología Vegetal*, 19 (4), 285-295.
- Ariza-Rodríguez, S., González-Murillo, O. y López-Sánchez, J. (2020). Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en suelo degradado. *Rev. Colomb. Biotechnol.*, 22(1), 87-97. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.78019>.
- Bellenger, J.P., Darnajoux, R., Zhang, X., & Kraepiel, A.M.L. (2020). Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: A review. *Biogeochemistry*, 149 (1), 53-73. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00666-7>
- Bloch, S.E., Clark, R., Gottlieb, S.S., Wood, L.K., Shah, N., Mak, S.M., Lorigan, J.G., Johnson, J., Davis-Richardson, A.G., Williams, L., McKellar, M., Soriano, D., Petersen, M., Horton, A., Smith, O., Wu, L., Tung, E., Broglie, R., Tamsir, A., & Temme, K. (2020). Biological nitrogen fixation in maize: optimizing nitrogenase expression in a root-associated diazotroph. *Journal of Experimental Botany*, 71(15), 4591–4603. <https://doi.org/10.1093/jxb/era176>
- Calleja-Pinedo, M. y Valenzuela, M.B. (2016). La tortilla como identidad culinaria y producto de consumo global. *Región y sociedad*, 28(66), 161-194. <https://doi.org/10.22198/rys.2016.66.a404>
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y.E., Pazos-Rojas, L.A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R.D. y Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147-156.
- Dlamini, S.P., Akanmu, A.O., Fadiji, A.E., & Babalola, O.O. (2023). Maize rhizosphere modulates the microbiome diversity and community structure to enhance plant health. *Saudi J Biol Sci.*,30(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103499>
- Emmett, B.D., Buckley, D.H., & Drinkwater, L.E. (2020). Plant growth rate and nitrogen uptake shape rhizosphere bacterial community composition and activity in an agricultural field. *New Phytol*, 225, 960-973. <https://doi.org/10.1111/nph.16171>
- Fisher, P.J., Petrini, O., & Scott, H.M.L. (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, 122, 299-305. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb04234.x>
- Galeano-Lobos, M., Retamozo-Giménez, G., Bottino-Fernández, J. y Galeano-Graupera, X. (2022). Rendimiento del cultivo de maíz (*Zea Mays*) variedad híbrida TNH 0032100 y TNH 0033100, con diferentes niveles de aplicación de nitrógeno. *Revista de Investigación en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural*, 1(1), 1-9.
- Gastélum, G. y Rocha, J. (2020). La milpa como modelo para el estudio de la biodiversidad e interacciones planta-bacteria. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23, 1-13. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.254>
- González, H. y Fuentes, N. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17-31. <https://doi.org/10.22267/rcia.173401.60>
- Guzmán-Duchen, D. y Montero-Torres, J. (2021). Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(2), 87-101. <https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99e>
- Hernández-Rodríguez, A., Rives-Rodríguez, N., Acebo-Guerrero, Y., Díaz-de la Osa, A., Heydrich-Pérez, M. y Divan-Baldani, V.L. (2014). Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 1-10.
- Kaštovská, E., Edwards, K., Pícek, T., & Santruckova, H. (2015). A larger investment into exudation by competitive versus conservative plants is connected to more coupled plant-microbe N cycling. *Biogeochemistry*, 122, 47-59. <https://doi.org/10.1007/s10533-014-0028-5>
- Lara-Mantilla, C., Villalba-Anaya, M. y Oviedo-Zumaqué, L.E. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6-14.
- Li, Y., Wang, C., Wu, J., Zhang, Y., Li, Q., Liu, S., & Gao, Y. (2023). The Effects of Localized Plant–Soil–Microbe Interactions on Soil Nitrogen Cycle in Maize Rhizosphere Soil under Long-Term Fertilizers. *Agronomy*, 13(8), 1-19. <https://doi.org/10.3390/agronomy13082114>

- Mandic, V., Krnjaja, V., Djordjevic, S., Djordjevic, N., Bijelic, Z., Simic, A., & Dragicevic, V. (2018). Effects of bacterial seed inoculation on microbiological soil status and maize grain yield. *Maydica*, 63(3), 1–8.
- Mascarua-Esparza, M.A., Villa-Gonzalez, R., & Caballero-Mellado, J. (1988). Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant Soil*, 106, 91–95. <https://doi.org/10.1007/BF02371199>
- McInroy, J.A., & Kloepper. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant soil*, 173, 337-342. <https://doi.org/10.1007/BF00011472>
- Olveira, G. y González-Molero, I. (2016). Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinol Nutr.*, 63(9), 482-494. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>
- Pedraza-Guevara, M., Idrogo-Vazquez, G. y Pedraza-Guevara, S. (2017). Densidad de siembra y comportamiento agronómico de tres variedades de maíz morado (*Zea mays* L.). *Revista ECI Perú*, 14(1), 20-40. <https://doi.org/10.33017/RevECIPeru2017.0003/>
- Pérez, C.A., Rojas, S.J. y Fuentes, C.J. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto Colosua (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 219-228.
- Richard, P.O., Adekanmbi, A.O., & Ogunjobi, A.A. (2018). Screening of bacteria isolated from the rhizosphere of maize plant (*Zea mays* L.) for ammonia production and nitrogen fixation. *African Journal of Microbiology Research*, 12(34), 829-834. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8957>
- Stella, M., & Suhaimi, M. (2010). Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.*, 38(2), 211-219.
- Sun, W., Shahrajabian, M.H., & Cheng, Q.I. (2021). Nitrogen Fixation and Diazotrophs – A Review. *Rom Biotechnol Lett*, 26(4), 2834-2845. <https://doi.org/10.25083/rbl/26.4/2834-2845>
- Valdovinos, M. A., Montijo, E., Abreu, A. T., Heller, S., González-Garay, A., Bacarreza, D., Bielsa-Fernández, M.C., Bojórquez-Ramos, F., Bosques-Padilla, A.I., Burguete-García, R., Carmona-Sánchez, A., Consuelo-Sánchez, E., Coss-Adame, J.A., Chávez-Barrera, M., de Ariño, J., Flores-Calderón, O., Gómez-Escudero, M.S., González-Huezo, M.E., Icaza-Chávez ... & Guarner, F. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de Gastroenterología de México*, 82(2), 156-178. <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2016.08.004>
- Weatherburn, M.W. (1967). Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Analytical chemistry*, 39(8), 971-974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>
- Zhu, Y.G., Xiong, C., Wei, Z., Chen, Q.L., Ma, B., Zhou, S.Y., Tan, J., Zhang, L.M., Cui, H-L., & Duan, G.L. (2022). Impacts of global change on the phyllosphere microbiome. *New Phytol*, 234, 1977-1986. <https://doi.org/10.1111/nph.17928>