

Diagnosis about rhizospheric bacteria associated with the cultivation of sugarcane (*Saccharum* spp.)

Diagnóstico sobre las bacterias rizosféricas asociadas al cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.)

Hernández-Gómez, Leandro M.¹; Salgado-García, Sergio^{2*}; Gómez-Leyva, Juan F.³; Córdova-Sánchez, Samuel¹; Ramírez-May, Ana G.¹; Aranda-Ibañez, Emilio M.²; Ortiz-García, Carlos F.²

¹Universidad Popular de la Chontalpa, División de Académica de Ciencias Básicas e Ingeniería. CA-QVyDS. Carretera Cárdenas Huimanguillo km 2, Ranchería Paso y Playa, H. Cárdenas, Tabasco. México. ²Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, km 3.5 Periférico Carlos A. Molina S/N, H. Cárdenas, Tabasco. México Grupo MASCANA. ³Instituto Tecnológico de Tlajomulco TecNM, km 10 carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. México.

*Autor para correspondencia: salgados@colpos.mx

ABSTRACT

Objective: characterize the presence of rhizobacteria associated with three varieties of sugar cane (*Saccharum* spp.) 9640 ATMEX, MEX 69-290 and the MEX SFC 9546, cultivated in the area of supplying the Pdte. Benito Juárez sugar mills (PBJ).

Desing/methodology/approach: three sites were selected for sampling by variety where soil samples were collected from 0 to 30 cm depth. For the isolation of the bacteria are followed by the serial dilution technique by viable.

Results: the rhizosphere of the variety ATMEX-9640 presented the greatest number of CFU g⁻¹. Ten of the 26 strains demonstrated capabilities of biological nitrogen fixation (BNF) or solubization of phosphorus (SP). Eight of them carried FBN already that degrade the malic acid in the NFb. Five are considered within the group of phosphorus solubilizing bacteria (BSP), because they solubilize the calcium phosphate of Pikovskaya medium.

Limitations on study/implications: it was not possible to determine the production of AIA in the strains that grew in the Soya Tripticasa Broth medium.

Findings/conclusions: the molecular identification revealed that these bacteria belong to the group of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) belonging *Microbacterium*, *Bacillus* y *Paenibacillus* genera present in the soil Cambisol Fluvi Eútric of the PBJ sugar mills.

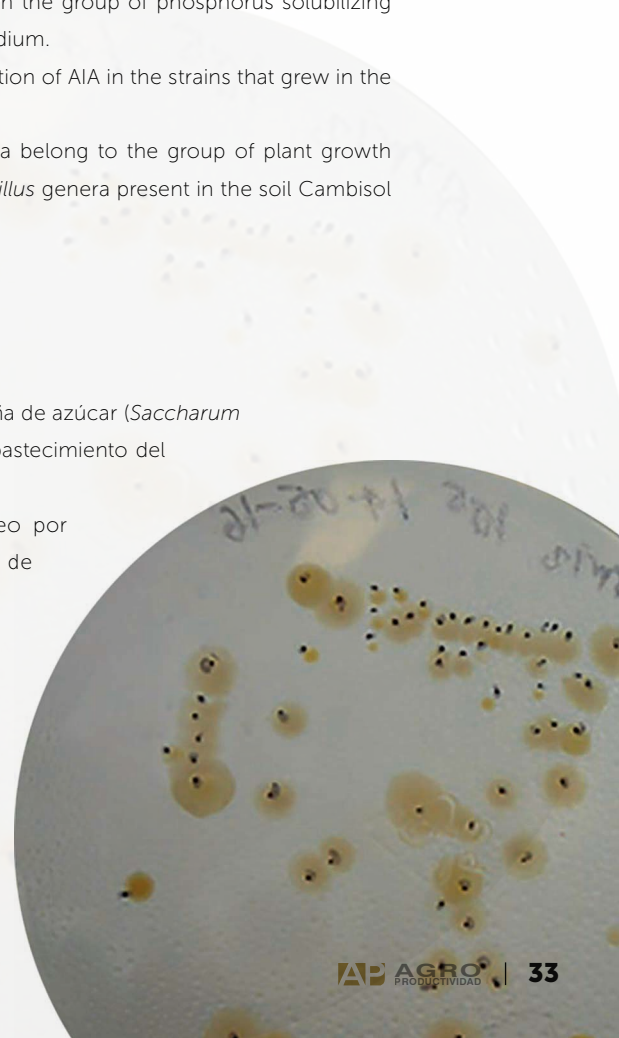
Keywords: BNF, Phosphorus Solubility, rhizospheric, PGRR.

RESUMEN

Objetivo: evaluar la presencia de rizobacterias asociadas a tres cultivares de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) ATMEX 9640, MEX 69-290 y MEX SFC 9546, cultivados en la zona de abastecimiento del Ingenio Pdte. Benito Juárez (IPBJ).

Diseño/ Metodología/Aproximación: se seleccionaron tres sitios de muestreo por cultivar donde se colectaron muestras de suelo 0-30 cm. Para el aislamiento de bacterias se siguió la técnica de dilución seriada por cuenta viable.

Resultados: la rizósfera del cultivar ATMEX 9640 presento el mayor número de UFC g⁻¹. 10 de las 26 cepas manifestaron capacidades de fijación biológica de nitrógeno (FBN) o solubilización de fósforo (SP). Ocho de ellas llevaron a cabo FBN ya que degradan el ácido málico en el medio NFb. Cinco se consideran



dentro del grupo de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF), ya que solubiliza el fosfato de calcio del medio Pikovskaya.

Limitaciones del estudio/implicaciones: no fue posible determinar la producción del AIA en las cepas que crecieron en el medio Caldo Tripticasa de Soya.

Hallazgos/conclusiones: la identificación molecular reveló que estas bacterias corresponden al grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Microbacterium*, *Bacillus* y *Paenibacillus* sp. presentes en el suelo Cambisol Fluvico Étrico del IPBJ.

Palabras claves: FBN, Solubilización de Fosforo, rizosféricas, PGRR.

INTRODUCCIÓN

En Tabasco, México, el Ingenio Pdte. Benito Juárez (IPBJ) es el de mayor importancia. Durante la cosecha 2017/18 registró 25 000 ha, con un rendimiento promedio de 63 t ha⁻¹ (CAÑEROS, 2019). Si bien es cierto que la fertilización nitrogenada es una práctica que permite incrementar el rendimiento del cultivo de la caña de azúcar de forma rápida y segura (Salgado *et al.*, 2003; Salgado *et al.*, 2011), no es tan factible emplear esta alternativa debido a los costos elevados y falta de crédito para adquirir todo el fertilizante, lo cual favorece los bajos rendimientos observados en el IPBJ en comparación con la media nacional de 68 t ha⁻¹, lo que indica que se está perdiendo potencial de producción.

A nivel internacional existe evidencia del potencial de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPR por sus siglas en inglés. Las PGPR favorecen a las plantas a través de diferentes mecanismos que se pueden resumir en la fijación biológica del nitrógeno (FBN), síntesis de fitohormonas, tales como las auxinas fundamentalmente y el ácido indolacético (AIA), que promueven el crecimiento de la raíz y proliferación de pelos radicales, lo que mejora la absorción de agua, nutrientes, solubilización de fosfatos di y tricálcicos y otros minerales, además de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, producir sideróforos, que son iniciadores de resistencia sistémica inducida, entre otros principales (Salazar, 2011; Córdova-Gamas *et al.*, 2016; Loiret *et al.*, 2004; Padron *et al.*, 2012; Taulé *et al.*, 2014; Torriente, 2010).

En México se han ofertado algunas alternativas de biofertilizantes como los combos de HMA del género *Glomus* y las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum* brasilense sin que exista evidencia científica de efecto favorable en el rendimiento del cultivo de caña de azúcar (Taulé *et al.*, 2014; Córdova-Gamas *et al.*, 2016). Aunado a lo anterior tampoco se han realizado los estudios que muestren la diversidad de microorganismos benéficos asociados a este cultivo en las diversas regiones edafoclimáticas, que permitan sentar las bases para una industria de biofertilizantes por zonas cañeras de forma segura (Morgado *et al.*, 2015). Por ello, surgió la necesidad de generar información sobre la presencia de bacterias rizosféricas asociadas a *Saccharum* spp., que favorezcan el crecimiento vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de suelo rizosférico se obtuvieron de cultivos de caña de azúcar en ciclo plantilla en la Micro Región de Atención Prioritaria del Campus Tabasco ubicado en el poblado C-31 que abastece de caña de azúcar al IPBJ. El suelo es un Cambisol Étrico Arcílico de mediana fertilidad (Salgado *et al.*, 2011). Las muestras de suelo se recolectaron de los cultivos ATMEX 9640, MEX 69-290 y MEXSFC 9546, con tres repeticiones. Se eliminó la maleza cercana a la zona de la cepa (área de raíces), posteriormente con una pala recta desinfectada se extrajo una muestra de suelo con raíces, de cinco centímetros de grosor y 30 cm de profundidad. Cada muestra se colocó en bolsas de nylon previamente identificadas. Las herramientas fueron limpiadas y desinfectadas en entre cada sitio de muestreo. Al terminar de tomar la muestra de cada sitio, se introdujeron en una nevera y se preservaron a una temperatura de 4 °C hasta su traslado al laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados - Campus Tabasco.

Aislamiento de bacterias. Se separó el suelo rizosférico de las raíces del cultivo de caña de azúcar. Para el aislamiento de las bacterias se siguió la técnica de dilución seriada por cuenta viable (Winn *et al.*, 2006). Para ello, se pesó 10 g de suelo, se le adicionó 90 mL de agua destilada y se agitó por 30 min. Se dejaron sedimentar las partículas de suelo y con la suspensión se prepararon diluciones seriadas desde 10¹ a 10⁷. Se hicieron tres réplicas en placa, sólo de las diluciones 10³, 10⁴ y 10⁵ en agar nutritivo y se incubaron a 30 °C (temperatura del lugar de muestreo) por 48 h. En total se prepararon 81 cajas de petri (vidrio) debidamente esterilizadas.

Caracterización de los aislados

Diversidad de bacterias rizosféricas: a las 48 h de incubación, se seleccionaron las colonias con características visibles y diferentes de cada muestra, se aislaron y se conservaron en agar nutritivo. A través de la Tinción de Gram se clasificaron a las bacterias con respecto a la composición y grosor de la pared bacteriana (López et al., 2014). Unidades formadoras de colonia. Se realizó el conteo de colonias por cada caja de petri, el resultado se obtuvo multiplicando el número de colonias por placa por el inverso de la dilución de la muestra. Las UFC/g⁻¹ se reportan por gramo de suelo rizosférico.

Determinación de FBN: una vez obtenidos los cultivos puros, se prosiguió a obtener una cepa y se sembró en un caldo NFb que carecía de nitrógeno. Posteriormente, se incubaron durante 14 d a 30 °C lo que permitió determinar en forma cualitativa la capacidad fijadora de N. Originalmente, este caldo es de color amarillo, una vez que el microorganismo es capaz de crecer en él, cambia a azul, debido a la oxidación del malato, indicando que el microorganismo es capaz de fijar el nitrógeno.

Solubilidad de fósforo inorgánico: de cada una de las cepas ya aisladas e identificadas se llevó a cabo una siembra en cajas petri que contenían el medio de cultivo Pikovskaya (Patiño y Sánchez, 2012), y se incubaron durante cinco días, posteriormente se aislaron las cepas que formaron un halo transparente como indicador de capacidad de solubilizar fósforo.

Determinación de compuestos indólicos: para la detección y cuantificación de ácido indolacético según la reacción colorimétrica de Salkowski, cada cepa fue cultivada en 5 mL de caldo nutritivo por 24 h, de donde se tomaron 0.6 mL para inocularlos en 5 mL de caldo Tripticasa de Soya suplementado con triptófano (1 g por cada 100 mL). Después se incubaron a 30 °C, por 72 h, en agitación constante a 150 rpm. Finalmente, las cepas fueron centrifugadas a 3000 rpm, durante 5 min. A continuación 0.4 mL de cada uno de los sobrenadantes se depositaron en tubos, se agregaron 1.6 mL del reactivo de Salkowski modificado en una relación 1:4, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 min en oscuridad. La positividad a la producción de ácido indolacético estuvo dada por una coloración roja (Léon y Rojas, 2015).

Caracterización Molecular

Se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Para la extracción

de DNA, se inocularon las bacterias en 3 mL de caldo KB y se incubaron a 28 °C en agitación durante 24 h. Se centrifugaron 3 mL del cultivo a 6000 rpm por 5 min y se resuspendió el paquete celular en 200 μ l de buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8.0). Se agregaron 300 μ l de buffer TE 1X con SDS 1% (p/v) y 1.5 μ l de proteinasa K (20 mg mL⁻¹), se mezclaron e incubaron a 65 °C por una hora. Luego se adicionaron 84 μ l de NaCl 5 M más 60 μ l de solución CTAB (10% p/v) disuelto en NaCl 0.7 M a 65 °C durante 20 min. Se adicionó un volumen de fenol y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se transfirió el sobrenadante en un tubo nuevo. Se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 14000 rpm durante cinco minutos. Se tomó la fase acuosa y se adicionó un volumen de isopropanol frío e incubó durante 5 min a -20 °C. Luego se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó un volumen de etanol al 70%, se centrifugó 14000 rpm por 2 min. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de DNA a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 100 μ l de H₂O inyectable (Dineen et al., 2010).

La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en SB (Borato de sodio 10 mM). La cuantificación de DNA se realizó mediante lectura de la absorbancia a 260 nm. Se amplificó una región del 16S del RNAr mediante PCR empleando los oligos 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Huws, 2007). Una vez obtenido los productos de PCR, fueron purificados y secuenciados en ambos sentidos en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad de bacterias rizosféricas

Se encontró una diversidad de 26 cepas de bacterias rizosféricas (Figura 1A). Las poblaciones de bacterias obtenidas de los tres cultivares de caña de azúcar generaron una abundancia total de 4 479 colonias. La diversidad de bacterias fue de 12 cepas para el cultivar MEX 69-290, nueve en el ATMEX 9640 y 10 en el MEX SFC 9546. Se observa que las cepas 1, 11 y 12 fueron muy abundantes. Las características descritas corresponden a las observadas macroscópicamente en el medio sólido. El cultivar ATMEX 9640 presentó la abundancia mayor con 1 749 cepas en las tres repeticiones. Lo que indica alta población respecto a los otros dos cultivares.

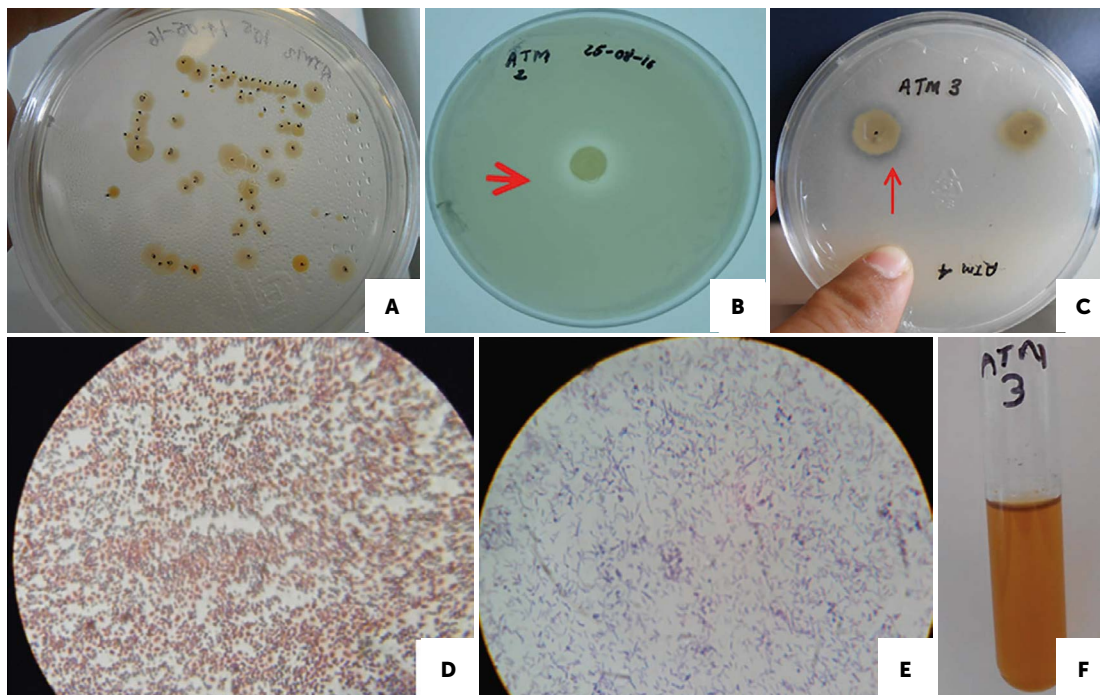


Figura 1. Características de las cepas rizosféricas asociadas al cultivo de *Saccharum* spp. a) Diversidad, b y c) las bacterias rizosféricas que solubilizan fósforo, d) Cocos Gram -, e) *B. Bacilos largos* Gram +, y f) *B. pumilus* creciendo en el medio CTS.

Unidades formadoras de colonias

El cultivar ATMEX 9640 presento un número mayor de UFC/g⁻¹ en comparación con el resto de los cultivares (Cuadro 1), mientras que los cultivares MEXSFC 9546 y MEX 69-290, mostraron una reducción en UFC/g⁻¹ respecto a la dilución, encontrándose mayor reducción en MEXSFC 9546. La presencia de bacterias supera los valores de 2.5×10⁴ UFC/g⁻¹ reportadas para un suelo ferralítico rojo de Cuba (Pérez y Casas, 2005) y 140×10³ UFC/g⁻¹ en la rizósfera del pasto *Leersia hexandra* (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016). Esto expresa que las bacterias toleran estrés a altas temperaturas ocasionas por las quemas de los cañaverales.

Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN)

De las 31 cepas de bacterias rizosféricas asociadas a los tres cultivares de caña de azúcar, únicamente se obtuvieron seis colonias que dieron positivo en el medio Nfb para fijación de N (Cuadro 2), donde se observó un vire de color donde el medio originalmente era amarillo y al llevarse a cabo la oxidación del malato presente en el medio este cambió a azul (Figura 2), indicando la capacidad del microorganismo de fijar N y formándose una película sub superficial en el tubo. El cultivar MEXSFC 9546, presento mayor número de cepas en comparación del resto de los cultivares, siendo

consistente con el medio de BFN. Estas cepas difieren de las reportadas previamente para México por otros autores, lo que indica gran diversidad (Morgado *et al.*, 2015) y la ausencia de la bacteria *Azospirillum brasilense* en este suelo de origen aluvial.

Al Comparar las cepas A y B con C (Figura 2), se observó que el color azul es más intenso en A y B en comparación a la cepa C. Lo anterior, indica dos posibles causas, la primera es que la cantidad de microorganismos puede ser considerablemente menor en la cepa C, la segunda es que la oxidación de malato presente en el medio la lleva a cabo con mayor eficacia las bacterias de las cepas A y B obtenidas en suelos rizosféricos cultivados con el cultivar MEX 69-290.

Bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico (BSP). Se obtuvieron cinco cepas de los tres cultivares

Cuadro 1. Cantidad de bacterias aisladas, variedades de *Saccharum* spp., y dilución.

Cultivar/Dilución	10 ³ UFC/g ⁻¹	10 ⁴ UFC/g ⁻¹	10 ⁵ UFC/g ⁻¹	Promedio UFC/g ⁻¹
ATMEX 9640	199	198	186	194.3±7.2
MEX 69-290	167	148	129	148.0±19
MEXSFC 9546	198	158	110	155.3±44

Cuadro 2. Características de las bacterias aisladas de la rizosfera de *Saccharum* spp.

Variedad	No. cepa	Bacteria 16S rRNA	Gram	Forma	FBN	ISP	CTS	AIA
ATEMEX 96-40	2	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	+	Bacilos medianos	×	1.3	×	×
	3	<i>Bacillus pumilus</i>	+	Bacilos medianos	✓	1.6	✓	×
	7	ND†	+	Bacilos medianos	✓	×	×	×
MEX 69-290	3	ND	+	Cocos	×	1.4	×	×
	4	ND	+	Bacilus pequeños	✓	×	×	×
	9	<i>Bacillus</i> sp.	+	Bacilus largos	✓	×	×	×
	10	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	Bacilus medianos	✓	×	×	×
MEXSFC 9546	3	<i>Bacillus pumilus</i>	+	Bacilus medianos	✓	1.5	✓	×
	4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	+	Bacilus medianos	✓	1.5	×	×
	7	ND	-	Cocos	✓	×	×	×

FBN: Fijación Biológica de nitrógeno, ISP: índice de solubilización de fosfatos, AIA: producción de auxina, CTS: Crecimiento en medio Caldo Tripticasa de Soya. ND†=No Definida, ×=No realiza función, ✓=Realiza la función.

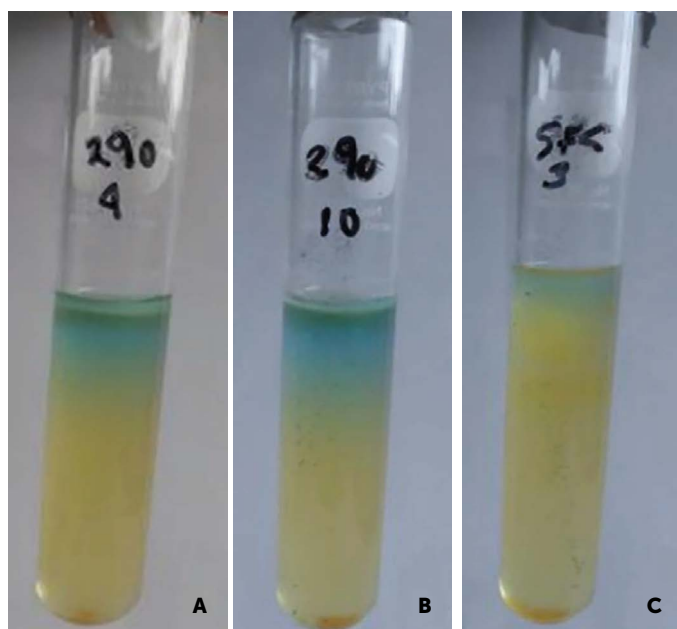


Figura 2. Bacterias que dieron positivo como fijadoras de nitrógeno: A) No. 4 ND del cultivar MEX 69-290, B) *Paenibacillus* sp. en el cultivar MEX 69-290 y C) *B. pumilus* en el cultivar MEXSFC 9546.

con la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico presente en el medio de cultivo Pikovskaya en forma de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Cuadro 2). En la Figura 1A y B, se presentan detalles de los halos observados. Los índices de solubilidad de fósforo reflejados en Cuadro 2, son considerablemente bajos en comparación con los valores reportados por Corrales et al. (2014), ellos mencionan que *B. pumilus* en el medio de cultivo Pikovskaya presenta un ISP de 8,5 a las 48 h. Por otro lado, Morgado et al. (2015) reportaron que *Stenotrophomonas maltophilia* CA158 y 79 presentaron los valores más altos de solubilización de fósforo con 222.43 y 216.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Determinación de compuestos indólicos. Las colonias que dieron positivas en los tubos y lograron crecer en el medio Caldo Tripticasa de Soya son las que se indican en el Cuadro 2. Aunque dichas colonias únicamente lograron crecer en el medio, no manifestaron producción de AIA mediante la técnica colorimétrica de Salkowski (Figura 1F). Contrariamente, Morgado et al. (2015) reportaron que la producción más alta de indoles totales la presentaron *Ochrobactrum anthropi* N208 y IMP311 y *Pseudomonas luteola* IMPCA244 con 116.69, 115.70 y 117.34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

En el gel de agarosa se observa un fragmento de 550 pb en ocho cepas que se sometieron a la caracterización molecular (Figura 3), el análisis Blastn de la secuencia con identidad mayor al 97% permitió clasificar cuatro a nivel de especie, dos a nivel de género y cuatro no se lograron identificar (Cuadro 2). Ocho cepas presentaron la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y cinco de ellas la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos. Es necesario resaltar que varias de estas bacterias están reportadas ya por otros autores como microorganismos que propician condiciones favorables a las plantas, que tienen la capacidad de SP o FBN y producir AIA (Tejera et al., 2011).

El cultivar ATEMEX 9640 presentó dos especies de BSP, lo que se explica porque su selección se llevó a cabo en suelos calcáreos con bajo contenido de fósforo y hierro. El cultivar MEX 69-290 presentó tres cepas asociadas a la FBN y una cepa de BSP, ya que ha crecido en suelos pobres en este elemento (Salgado et al., 2011). El cultivar MEXSFC 9546 presentó dos cepas que realizan ambas actividades benéficas FBN y la BSP, por ello,

se considera el cultivar más equilibrado (Cuadro 2). Existen reportes que indican que *Microbacterium trichothecenolyticum* se ha aislado de muestras clínicas y muestra de suelo (Lau *et al.*, 2002; Yokota *et al.*, 1993). *Bacillus pumilus*, es considerada un organismo promotor del crecimiento, que produce hormonas en el medio de cultivo y tiene influencia en el desarrollo de diversas poáceas (Gutiérrez *et al.*, 1996). Se ha encontrado que cuando se asocia a la rizósfera puede modificar la actividad fisiológica de las plantas mejorando su crecimiento (Bashan *et al.*, 1996), y que puede solubilizar fósforo (Arevalo y Moreno, 2013). *Bacillus pumilus* es una bacteria promotora del crecimiento vegetal, pues posee la capacidad de fijar nitrógeno y producir compuestos indólicos.

El género *Bacillus*, pertenece a la familia Bacillaceae, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimiheterótrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos catalasa positivos. Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno, reportados como BFN y BSP (Winn *et al.*, 2006; Pedraza, 2008). Lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo. El género *Paenibacillus* sp.; ha sido desarrollado comercialmente como fungicida biológico, insecticida, nematocida y promotor del crecimiento vegetal, y su uso en la agricultura se ha incrementado (McSpadden y Fravel, 2002), aquí se encontró que también puede fijar nitrógeno.

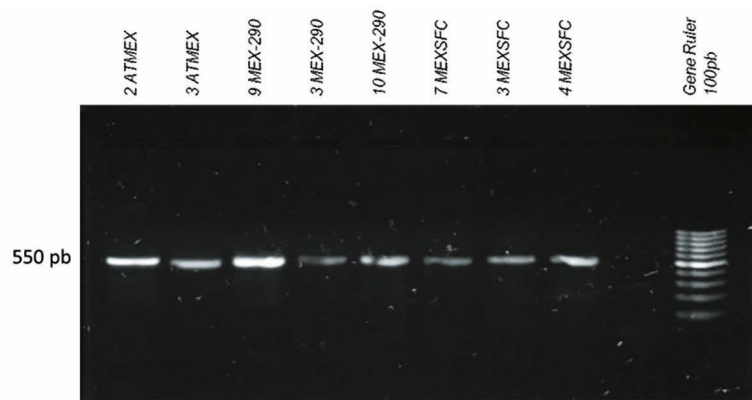


Figura 3. Gel de agarosa con el ADN de las bacterias (a la derecha el marcador molecular Gene Ruler 100pb).

CONCLUSIONES

La diversidad, la abundancia y el número de UFCg⁻¹ encontradas en el suelo Cambisol Eútrico Arcílico, indica que la presencia de dichos microorganismos asociada a la rizósfera del cultivo de caña de azúcar es alta. ATEMEX 9640 presentó dos especies de BSF, MEX 69-290 presentó tres cepas asociadas a la FBN y una cepa de SP, y el cultivar SFC 95-46 presentó dos cepas que realizan ambas actividades benéficas, por ello, se considera el cultivar más equilibrado. Los índices de solubilización de fósforo, aunque fueron bajos, las bacterias manifiestan que tienen dicha capacidad. Se encontraron que 10 cepas de bacterias tienen potencial benéfico como biofertilizante. Sin embargo, no fue posible determinar la producción del AIA en las cepas que crecieron en el CTS. Los resultados indican que hay actividad de BFN y BSP en las cepas mencionadas.

LITERATURA CITADA

- Arévalo, G. Z. Y., Moreno, B. V. E. (2013). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. NOVA, 12 (21): 165– 178.
- CAÑEROS. 2019. Estadísticas por ingenio. Unión Nacional de Cañeros, A.C: http://www.caneros.org.mx/site_caneros/estadisticas/ingenios/0010.pdf (consultada el 16 marzo de 2019).
- Córdova-Gamas, G., Salgado-García, S., Castelán-Estrada, M., Palma-López, D.J., García-Moya, E., Lagunes-Espinoza, L.C., Córdova-Sánchez, S. (2016). Opciones de fertilización para el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en Tabasco, México. Agroproductividad, 9(3):27-34.
- Dineen, A., Dineen, S.M., Aranda, R.T., Anders, D.L., Robertson, J.M. (2010). An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. J. Appl. Microbiol., 109: 1886-1896.
- Gutiérrez, M. F., Acero, N., Lucas, J., Pobranza, A. (1996). The influence of native rhizobacteria on European older grown. II.Characterization of grown promoting and growth inhibiting strains. Plant and Soil. 192, 67-74.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., Williams, S. (2000). Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 787.
- Huws, S.A., Edwards, J.E., Kim, E.J., Scollan, N.D. (2007). Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems, J. Microbiol. Methods, 70: 565-569.
- Lau, K. P., Woo, C. Y., Woo, K. S., Yuen, K.Y. (2002). Catheterrelated *Microbacterium* bacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing. J. Clin. Microbiol. 40:2681–2685.
- León, H., Rojas, L. (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter* spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). Scientia Agropecuaria, 6(4): 247 – 257.

- Loiret, F. G., Ortega, E., Kleiner, D., Rode, P. O., Rode, R., Dong, Z. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*, 504-511.
- López, J. L. E., Hernández, M., Colín, C. A., Ortega, S., Cerón, G., Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. (CENIAQ). *Investigación en Discapacidad*, 3(1):10-18.
- Morgado, G.A., Espinoza, V.D., Gómez, M. F. (2015). Eficiencia de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) en Caña de Azúcar. *Terra Latinoamericana*, 33(4): 321-330.
- Padrón, L., Torres, R. D. G., Contreras, O. J., López, M., Colmenares, C. (2012). Aislamientos de cepas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo en un suelo alfisol venezolano. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*, 3:285-297.
- Patiño, T. C., Sánchez, P. M. (2012). Aislamiento e Identificación de Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos, Habitantes de la Rizósfera de Chontaduro (*B. Gassipaes* Kunth). *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10 (2): 177-187.
- Pedraza, O. R. (2008). Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125:25-35.
- Pérez, J., Casas, M. (2005). Estudio de la interacción planta-azospirillum. *Cultivos Tropicales*, 26:13-19.
- Rodríguez-Rodríguez, N., Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A., Almaráz-Suárez, J.J., Salgado-García, S. (2016). Spatial Distribution of Oil and Biostimulation Through the Rhizosphere of *Leersia hexandra* in Degraded Soil. *Water Air Soil Pollut*, 227:319. DOI 10.1007/s11270-016-3030-9.
- Salgado-García, S., Palma-López, D. J., Zavala-Cruz, J., Lagunes-Espinoza, L. C., Castelán-Estrada, M., Ortiz-García, C. F., Juárez-López, J. F., Ruiz-Rosado, O., Armida-Alcudia, L., Rincón-Ramírez, J. A., Córdova-Sánchez, S. (2011). Un programa de fertilización sustentable para el Ingenio "Presidente Benito Juárez" en Tabasco, México. México. *REVAIA*, 15(3):45-65.
- Salgado, G. S., Núñez, E. R., Bucio, A. L. (2003). Determinación de la dosis óptima económica de fertilización en caña de azúcar. *TERRA*, 21:267-272.
- Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Sicardi, M., Battistoni, F. (2014). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a caña de azúcar. *INAIÁ, Uruguay*, 54:9-46.
- Tejera, H. B., Rojas, M., Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *CENIC. Cuba*, 42(3):131-138.
- Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos Tropicales*, 31:19-26.
- Winn, C. W., Allen, D. S., Janda, M. W., Koneman, W. E., Procop, W. G., Schreckenberger, C. P., Woods, L. G. (2006). *Koneman diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

