

## BACTERIAS RIZOSFÉRICAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR EN EL INGENIO PRESIDENTE BENITO JUÁREZ

### RHIZOSPHERIC BACTERIA ASSOCIATED WITH THE CULTIVATION OF SUGARCANE IN PDTE BENITO JUAREZ SUGAR MILLS

Leandro Manuel Hernández Gómez<sup>1</sup>, Sergio Salgado García<sup>2\*</sup>, Samuel Córdova Sánchez<sup>1</sup>, Ana Guadalupe Ramírez May<sup>1</sup>, Emilio M. Aranda Ibañez<sup>2</sup>, Carlos F. Ortiz García<sup>2</sup>, Juan Florencio Gómez Leyva<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> División de Académica de Ciencias Básicas e Ingeniería-Universidad Popular de la Chontalpa. Carretera Cárdenas Huimanguillo km 2, Ranchería Paso y Playa, C.P. 86529, H. Cárdenas, Tabasco.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, km 3.5 Periférico Carlos A. Molina S/N, C.P.86500, H. Cárdenas, Tabasco. Grupo MASCANA: salgados@colpos.mx

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco, km 10 carr Tlajomulco - San Miguel Cuyutlán, C.P. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

#### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de rizobacterias asociadas a tres variedades de caña de azúcar: ATMEX 9640, MEX 69-290 y MEX SFC 9546, cultivadas en la zona de abastecimiento del Ingenio Pdte. Benito Juárez (IPBJ). Se seleccionaron tres sitios de muestreo por variedad donde se colectaron muestras de suelo de 0 a 30 cm de profundidad. Para el aislamiento de las bacterias se siguió la técnica de dilución seriada por cuenta viable. La rizósfera de la variedad ATMEX 9640 presentó el mayor número de UFC g<sup>-1</sup>. 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 degradan el fosfato de calcio del medio Pikovskaya. La identificación molecular reveló que estas bacterias corresponden al grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal presentes en el suelo Cambisol Fluvico Éutrico del IPBJ. Se recomienda llevar a cabo un estudio que considere la preparación de inóculos con dichas bacterias y evaluar la respuesta en plantas de caña de azúcar.

**Palabras Claves:** FBN, Solubilización de Fosforo, rizosféricas, PGRR

#### ABSTRACT

The objective of this work was to characterize the presence of rhizobacteria associated with three varieties of sugar cane: 9640 ATMEX, MEX 69-290 and the MEX SFC 9546, cultivated in the area of supplying the Pdte. Benito Juarez sugar mills(PBJ). 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 were followed by the serial dilution technique by viable. The rhizosphere of the variety ATMEX-9640 presented the greatest number of CFU g<sup>-1</sup>. Ten of the 26 strains demonstrated capabilities of biological nitrogen fixation (BNF) or solubilization 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 decrease the calcium phosphate of Pikovskaya. The molecular identification revealed that these bacteria belong to the group of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) present in the soil Cambisol Fluvic Éutric of the PBJ sugar mills. It is recommended to carry out a study to consider the preparation of inocula with these bacteria and to evaluate the response in plants of sugar cane.

**Keywords:** BNF, Phosphorus Solubility, rhizospheric, PGRR

## INTRODUCCIÓN

En México la de caña de azúcar se cultiva en 15 estados, la producción de azúcar correspondiente a la zafra 2016/17 cerró en 5.9 millones de toneladas. En el estado de Tabasco el Ingenio Pdte. Benito Juárez (IPBJ) es el de mayor importancia, en la zafra 2016/17 el IPBJ se cosecharon 23800 ha, con un rendimiento promedio de 59.1 tha y con un precio de \$ 802.00 por tonelada de caña (CAÑEROS, 2018).

Si bien es cierto que la fertilización nitrogenada es una práctica que permite incrementar el rendimiento de 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 a la carencia de crédito para adquirir el fertilizante, lo cual favorece los bajos rendimientos observados en el IPBJ en comparación con la media nacional de 68.6 tha, 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 ingles. Las PGPR favorecen a las plantas a través de diferentes mecanismos que se pueden resumir en: la fijación biológica del nitrógeno, síntesis de fitohormonas como las auxinas fundamentalmente el ácido indolacético (AIA), promoción del crecimiento de la raíz y proliferación de pelos radicales, mejora de la absorción de agua y nutrientes, solubilizan los fosfatos di y tricálcicos y otros minerales, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y producen sideróforos, que son los iniciadores de la resistencia sistémica inducida (ISR) (Badillo, 2011; Boddey et al., 2003; Loiret et al., 2004; Padron et al., 2012; Taule et al., 2014; Torriente, 2010). En México se han ofertado algunas alternativas de biofertilizantes como los combos de HMA del genero *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 (Arteaga, 1977; Córdova 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 de forma sólida (Morgado et al., 2015). Por estas razones, surgió la necesidad de generar información sobre la presencia de bacterias rizosfericas asociadas al cultivo de caña de azúcar en el ingenio Pdte. Benito Juárez.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio experimental

Las muestras de suelo rizosferico se obtuvieron del experimento: Validación de variedades de caña de azúcar en ciclo plantilla en la MAP del Campus Tabasco ubicado en el poblado C-31 que abastece de caña de azúcar al IPBJ. Establecido en un suelo es Cambisol Éutrico Arcílico de mediana fertilidad (Salgado et al., 2011). Las muestras de suelo se colectaron en las parcelas cultivadas con las variedades ATMEX 9640, MEX 69-290 y MEXSFC 9546, con tres repeticiones.

Con un machete desinfectado se limpió la zona cercana a la cepa, para eliminar las malezas. Con una pala recta desinfectada se extrajo una muestra de suelo y raíces, del ancho de la pala, de 5 cm de grosor y 30 cm de profundidad. Cada muestra se colocó en bolsas de nylon previamente identificadas. La herramienta fue limpiada y desinfectada en cada sitio de muestreo siguiendo la misma técnica. Las muestras colectadas se preservaron a una temperatura de  $\pm 4$  °C dentro de una hielera, hasta su traslado al laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

### Aislamiento de bacterias

Se separó el suelo rizosferico 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 (Koneman, 2001). Para ello, se pesó 10g de suelo, se adiciono en 90mL de agua destilada y se agitó por 30 minutos. Se dejaron sedimentar las partículas de suelo y con la suspensión se prepararon diluciones seriadas desde  $10^1$  a  $10^7$ . Se hicieron 3 réplicas en placa solamente de las diluciones  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  en agar nutritivo y se incubaron a 30 °C (temperatura del lugar de muestreo) por 48 h. En total se prepararon 81 cajas.

### **Variables de estudio**

Diversidad de bacterias rizosféricas: A las 48h de incubación, se seleccionaron las colonias con características visibles diferentes de cada muestra, se aislaron y se conservaron en agar nutritivo.

Unidades formadoras de colonia. Se realizó el conteo de colonias por caja, el resultado se obtuvo multiplicando el número de colonias por placa por el inverso de la dilución de la muestra. Las UFC/g<sup>-1</sup> se reportan por gramo de rizósfera.

Determinación de FBN. Una vez obtenidos los cultivos puros, se prosiguió a obtener una cepa y a sembrarla en caldo NFb que carece de nitrógeno. Posteriormente se incubaron durante 14 días a 30 °C para 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 fosforo inorgánico: De cada una de las cepas ya aisladas e identificadas se llevó a cabo una siembra en cajas petri conteniendo medio de cultivo Pikovskaya ([Patiño, 2012](#)), y se incubaron durante 5 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 ([García y Muñoz 2010](#)). Cada cepa fue cultivada en 5mL de caldo nutritivo por 24h, de donde se tomaron 0,6mL para inocularlos en 5mL de caldo Trypticase de Soya suplementado con triptófano (1g por cada 100mL). Después se incubaron a 30°C, por 72h, en agitación constante a 150rpm. Finalmente, las cepas fueron centrifugadas a 3000rpm, durante 5min. A continuación 0,4mL de cada uno de los sobrenadantes se depositaron en tubos, se agregaron 1,6mL del reactivo de Salkowski modificado en una relación 1:4, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30min, en oscuridad. La positividad a la producción de ácido indolacético estuvo dada por una coloración grosella ([León y Rojas, 2015](#)).

Tinción de Gram. Esta técnica permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos (Gram + y Gram -) con respecto a la composición y grosor de la pared bacteriana. El frotis se prepara colocando una gota de agua estéril sobre un portaobjeto y posteriormente se le coloca con un asa bacteriológica la muestra y se deja secar la preparación ([López et al., 2014](#)). Posteriormente se agregan los colorantes en el siguiente orden.

Se aplica el cristal violeta sobre el frotis y se espera un minuto. Seguido se lava con abundante agua destilada. Añadir lugol por 1 minuto y lavar nuevamente con abundante agua destilada. Decolorar con alcohol a 96° durante 20 segundos y lavar con agua destilada. Finalmente aplicar colorante de contraste safranina por 1 minuto y lavar con abundante agua destilada, dejar secar. Observar en objetivo 100X con aceite de inmersión.

Caracterización Molecular. Esta actividad se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco y consistió en ([Huws et al., 2007](#); [Dineen y Muñoz, 2010](#)):

Extracción de DNA Bacteriano. Se inocularon las bacterias en 3ml de caldo KB y se incubaron a 28°C en agitación durante 24h. Se centrifugaron 3ml del cultivo a 6000rpm por 5min y se resuspendió el paquete celular en 200µl de buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8.0). Se agregaron 300µl de buffer TE 1X con SDS 1% (p/v) y 1.5µl de proteinasa K (20 mg/ml), se mezclaron e incubaron a 65°C por 1h. Luego se adicionaron 84µl de NaCl 5M más 60µl de solución CTAB (10 % p/v) disuelto en NaCl 0.7M a 65°C durante 20min. Se adicionó un volumen de fenol y se centrifugó a 14000rpm por 5min. Se transfirió el sobrenadante en un tubo nuevo. Se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 14000rpm durante 5min. Se tomó la fase acuosa y se adicionó un volumen de isopropanol frío y se incubó durante 5min a -20 °C. Luego se centrifugó a 14000rpm

durante 5min y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó un volumen de etanol al 70%, se centrifugó 14000rpm por 2min. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de DNA a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 100µl de H<sub>2</sub>O inyectable.

Con gel de agarosa se llenó la cámara para electroforesis y se disolvió la agarosa al 1%. Las cantidades de agarosa y bromuro varían en función del tamaño del gel y la cámara de electroforesis que se necesita. Para esta investigación se usó la Mini Cámara de Electroforesis con Generador Integrado, modelo LN1300, misma que permite la preparación de dos geles diferentes, uno con un volumen de 15ml, 0.6µl de bromuro y 0.15g de agarosa (1%), y otro gel de 30ml de volumen, 1.25µl de bromuro y 0.3g de agarosa.

Una vez obtenido el ADN purificado de las muestras procesadas se enviaron para su secuenciación a 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 las tres variedades de caña de azúcar generaron una abundancia total de 4,479 colonias. La diversidad de bacterias fue de 12 cepas para la variedad MEX 69-290, nueve en la ATMEX 9640 y 10 en la 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. La variedad ATMEX 9640 presento la abundancia mayor con 1,749 cepas en las tres repeticiones. Lo que indica una población alta con respecto a las demás variedades.

### Unidades formadoras de colonias

La técnica de dilución seriada por cuenta viable mostro que la variedad ATMEX 9640 presento un número mayor de UFC/g<sup>-1</sup> en comparación con el resto de las variedades (Cuadro 1). Por otro lado, las variedades MEXSFC 9546 y MEX 69-290, mostraron una reducción en UFC/g<sup>-1</sup> con respecto a la dilución, siendo mayor la reducción en MEXSFC 9546. Estas presencias de bacterias superan 2.5X10<sup>4</sup> UFC/g<sup>-1</sup> reportadas para un suelo ferralítico rojo de Cuba (Pérez y Casas, 2005) y 140X10<sup>3</sup> UFC/g<sup>-1</sup> en la rizósfera del pasto *Leersia hexandra*, reportada por Rodríguez et al. (2016).

Cuadro 1. UFC/g<sup>-1</sup> por variedad y por dilución

Variedad	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
ATMEX 9640	199 UFC/g <sup>-1</sup>	198 UFC/g <sup>-1</sup>	186 UFC/g <sup>-1</sup>
MEX 69-290	167 UFC/g <sup>-1</sup>	148 UFC/g <sup>-1</sup>	129 UFC/g <sup>-1</sup>
MEXSFC 9546	198 UFC/g <sup>-1</sup>	158 UFC/g <sup>-1</sup>	110 UFC/g <sup>-1</sup>

### Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN)

De las 31 cepas de bacterias rizosféricas asociadas a las tres variedades 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 subsuperficial en el tubo. La variedad MEXSFC 9546, presento mayor número de cepas en comparación del resto de las variedades, siendo consistente con el medio de BFN. Estas cepas difieren de las reportadas previamente para México por otros autores, lo que indica una gran diversidad (Morgado et al., 2015) y la ausencia de la bacteria *Azospirillum brasilense* en este suelo de origen aluvial.

Cuadro 2. Colonias que presentaron FBN

Variedad	Vire de color en el medio
ATMEX 9640 9 cepas	No. 7 ND
MEX 69-290 12 cepas	No.4 ND, 9. <i>Bacillus sp</i> y 10. <i>Paenibacillus sp</i>
MEXSFC 9546 10 cepas	3. <i>Bacillus pumilus</i> , 4. <i>Bacillus stratosphericus</i> y No.7 ND

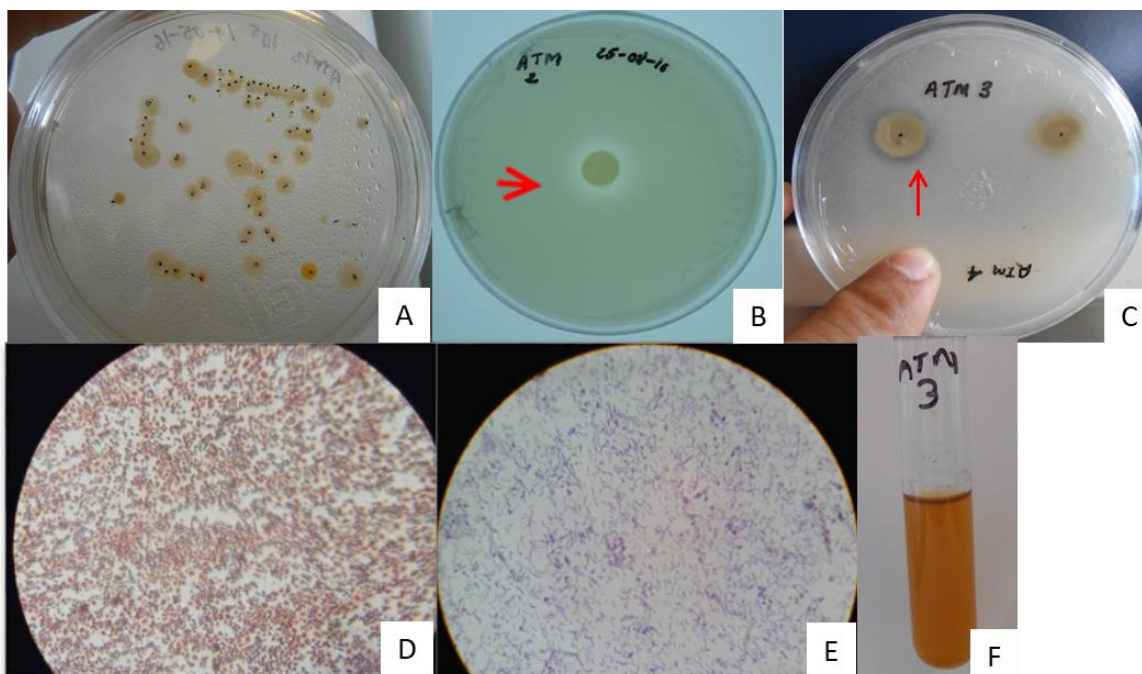


Figura 1. Características de las cepas rizosfericas asociadas al cultivo de caña de azúcar: a) Diversidad, b y c) las bacterias rizosfericas que solubilizan fósforo, d) Cocos Gram -, e) *B. Bacilos* largos Gram +, y f) *B. pumilus* creciendo en el medio CTS.

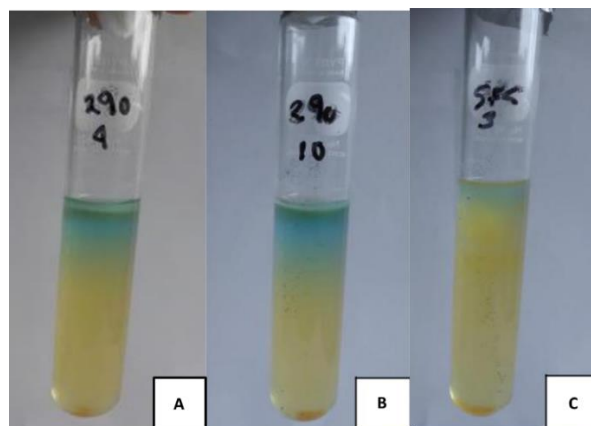


Figura 2. Bacterias que dieron positivo como fijadoras de nitrógeno: a) No. 4 ND de la variedad MEX 69-290, b) *Paenibacillus sp.* en la variedad MEX 69-290 y c) *B. pumilus* en la variedad MEXSFC 9546.

Al Comparar las cepas A y B con C (Figura 2), se observa que el color azul es más intenso en Ay B en comparación de 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 la variedad MEX 69-290.

### Bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico (BSP)

Se obtuvieron cinco cepas de las tres variedades 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 3). En la Figura 1a y b, se presentan detalles de los halos observados.

Cuadro 3. BSP e índice de solubilización de fósforo (ISF)

Variedad	BSF	DC	DH	ISF
ATMEX 9640	2. <i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	6mm	2mm	1.3
9 cepas	3. <i>Bacillus pumilus</i>	6mm	4mm	1.6
MEX 69-290	No. 3 ND	5mm	2mm	1.4
12 cepas				
MEX SFC 9546	3. <i>Bacillus pumilus</i>	6mm	3mm	1.5
10 cepas	4. <i>Bacillus stratosphericus</i>	6mm	3mm	1.5

DC=Diámetro de la Colonia, DH=Diámetro del Halo

Los índices de solubilidad de fósforo reflejados en Cuadro 3, son considerablemente bajos en comparación con los valores reportados por [Arévalo y Moreno \(2013\)](#), ellos mencionan que *B. pumilus* en el medio de cultivo Pikovskaya presenta un ISF de 8.5 a las 48h. 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 Trypticasa de Soya son las que se indican en el Cuadro 4. Aunque dichas colonias solo lograron crecer en el medio, estas 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 índoles 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.

### Tinción de Gram

Los resultados obtenidos de la tinción de Gram (Cuadro 4), en su mayoría corresponden a Bacilos Gram (+), estas características corresponden a las señaladas por [Holt et al. \(2000\)](#), quienes reportaron

que las características más importantes de las bacterias del género *Bacillus* son: aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, Gram positivas, quimiorganótrofas de metabolismo fermentativo o realizan una respiración aerobia. De las 10 cepas aisladas solo una mostró afinidad por retener el colorante safranina y teñirse como Gram (–), sin embargo, en la identificación molecular no se logró saber de qué bacteria se trataba (Figura 1d y e).

Cuadro 4. Características de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Variedad	No. De Cepa	Bacteria	Tinción de Gram	Forma	FBN	SP	Crec. En CTS	AIA
ATMEX 96-40	2	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	+	Bacilos medianos	✗	✓	✗	✗
	3	<i>Basilus pumilus</i>	+	Bacilos medianos	✓	✓	✓	✗
	7	ND†	+	Bacilos medianos	✓	✗	✗	✗
MEX 69-290	3	ND	+	Cocos	✗	✓	✗	✗
	4	ND	+	Bacilus pequeños	✓	✗	✗	✗
	9	<i>Basilus sp</i>	+	Bacilus largos	✓	✗	✗	✗
	10	<i>Paenibasilus sp</i>	+	Bacilus medianos	✓	✗	✗	✗
MEXSFC 9546	3	<i>Basilus pumilus</i>	+	Bacilus medianos	✓	✓	✓	✗
	4	<i>Bacilus stratosphericus</i>	+	Bacilus medianos	✓	✓	✗	✗
	7	ND	-	Cocos	✓	✗	✗	✗

ND†= No Definida, ✗= No realiza función, ✓ = Realiza la función

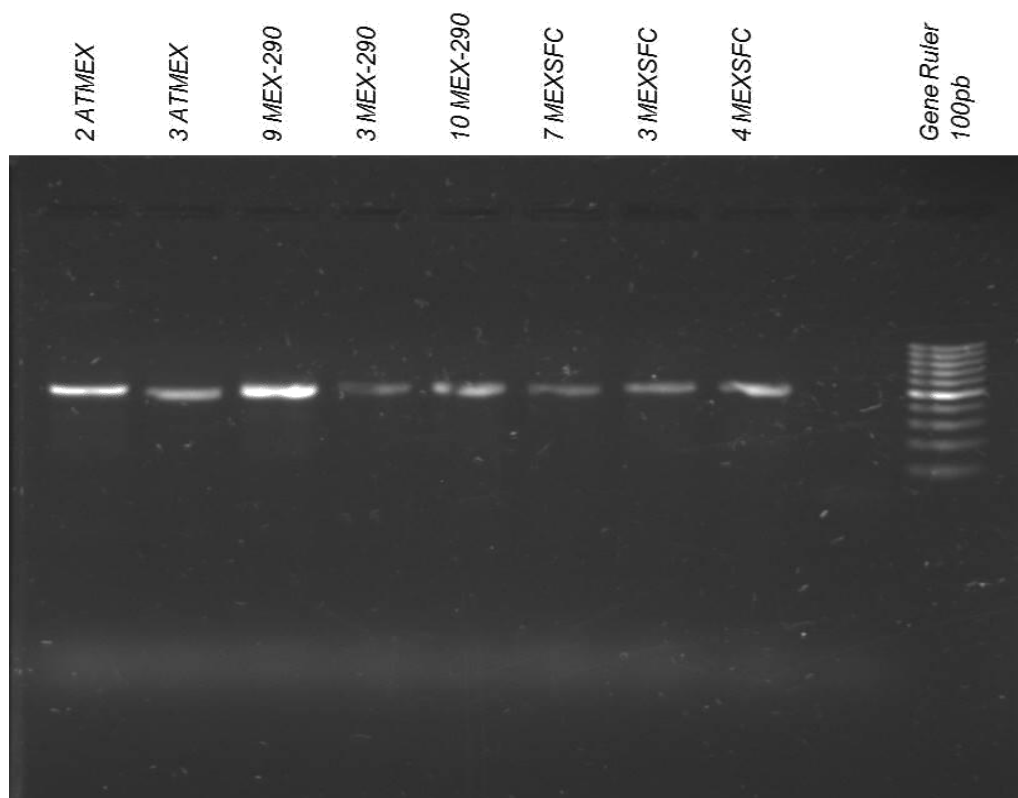


Figura 2. Gel de agarosa con el ADN de las bacterias (a la derecha el marcador molecular Gene Ruler 100pb)

### Caracterización molecular de las bacterias rizosféricas

En el gel de agarosa se observa 8 de las 10 cepas totales que se sometieron a la caracterización molecular (Figura 2), en la parte superior están las muestras por variedad de caña que se corrieron en el gel, y de estas 8 solo 6 lograron secuenciarse, debido a que en el proceso de purificación del ADN bacteriano no se obtuvo suficiente muestra para la identificación molecular. De las 10 cepas sobresalientes en las etapas posteriores, únicamente se clasificaron cuatro a nivel de especie, dos a nivel de género y cuatro no se lograron identificar (Cuadro 4). 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).

La variedad 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. La 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., 2012). La variedad MEXSFC 9546 presentó dos cepas que realizan ambas actividades benéficas FBN y la BSP, por ello, se considera la variedad más equilibrada (Cuadro 4).

*Microbacterium trichothecenolyticum*. Existen reportes que indican que 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 gramíneas (Gutiérrez et al., 1996). Se ha encontrado que cuando se asocia a la rizósfera puede modificar la actividad fisiológica de las plantas mejorando el crecimiento de éstas (Bashan et al., 1996). *Bacillus pumilus* corresponde a una bacteria promotora del crecimiento vegetal, pues posee la capacidad de fijar nitrógeno y producir compuestos indólicos.

Con respecto a las especies y géneros se tiene que:

El género *Bacillus*. Perteneció 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, quimiheterotrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos periticos. Son anaerobios o aerobios facultativos son 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 BFB y BSP (Koneman, 2001; Pedraza, 2008). Lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo.

El género *Paenibacillus* sp; Han sido desarrollados comercialmente como fungicidas biológicos, insecticidas, nematocidas y promotores del crecimiento vegetal, y su uso en la agricultura se ha incrementado (McSpadden y Fravel, 2002). Aquí se encontró que también puede fijar nitrógeno.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La diversidad, la abundancia y el número de UFCg<sup>-1</sup> encontradas en el suelo Cambisol Éutrico Arcílico, indica que la presencia de dichos microorganismos asociada a la rizósfera del cultivo de caña de azúcar es alta. La tinción de Gram indicó que la mayoría de las bacterias corresponden a Bacilos Gram +.

La FBN y la SP se da de forma diferenciada entre las variedades: ATEMEX 9640 presentó dos especies de BSP, MEX 69-290 presentó tres cepas asociadas a la FBN y una cepa de SP, y la variedad SFC 95-46 presentó dos cepas que realizan ambas actividades benéficas, por ello, se considera la



variedad más equilibrada. Los índices de solubilización de fosforo, aunque fueron bajos manifiestan que las bacterias tienen dicha capacidad.

Se tienen 10 cepas de bacterias con potencial benéfico como biofertilizantes. 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, por ello se sugiere llevar a cabo un estudio con microorganismos endófitos para conocer el potencial completo de estos microorganismos. Es necesario seguir investigando el potencial de las bacterias para producir AIA.

## REFERENCIAS

Arévalo G. Z. Y. y V. E. Moreno B. 2013. Bacillus: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. NOVA. 12 (21): 165– 178.

Arteaga L. C. 1997. Bacterias fijadoras de nitrógeno de la rizosfera, caulosfera y filosfera de la caña de azúcar. Tesis de maestría. COLPOS campus Montecillos. Edo. de México.

Badillo F. B. 2011. Identificación y caracterización de microorganismos benéficos aislados de caña de azúcar de la Huasteca Potosina y Tamaulipeca para el desarrollo de biofertilizantes. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí.

Bashan Y, H. Levanony y R. Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: II bacterias asociativas de la rizósfera. Terra 14(1): 159-183.

Boddey M. R., S. Urquiaga, A. J. R. Bruno, y V. Reis. 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. Plant and Soil. 252:139-149.

Cañeros. 2018. Estadísticas por ingenio. Unión Nacional de Cañeros, A.C: [http://www.caneros.org.mx/site\\_caneros/estadisticas/ingenios/0010.pdf](http://www.caneros.org.mx/site_caneros/estadisticas/ingenios/0010.pdf) (consultada el 16 marzo de 2018).

Córdova-Gamas G., S. Salgado-García, M. Castelán-Estrada, D.J. Palma-López, E. García-Moya, L.C. Lagunes-Espinoza, S. Córdova-Sánchez. 2016. Opciones de fertilización para el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en Tabasco, México. Agroproductividad 9(3):27-34.

Dineen A., S.M. Dineen, R.t. Aranda, D.L. Anders, J.M. Robertson 2010. An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. J. Appl. Microbiol., 109: 1886-1896

García, F. y H. Muñoz. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto como promotor del desarrollo vegetativo de arroz (*Oryzasativa*). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

Gutiérrez M. F, N. Acero, J. Lucas y A. Pobranza. 1996. The influence of native rhizobacteria on European older grownt. II. Characterization of grownt promoting and growth inhibiting strains. Plant and Soil. 192, 67-74.

Holt J., N. Krieg, P. Sneath, J. Staley y S. Williams. 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

Koneman E.W. 2001. Diagnostico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edicion. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Lau K. P., C. Y. Woo, K. S. Woo, y K.Y. Yuen. 2002. Catheterrelated *Microbacterium* bacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 40:2681–2685.

León H. y L. Rojas. 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., E. Ortega, D. Kleiner, P. O. Rode, R. Rode, and Z. Dong. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*, 504-511.

López J. L. E., M. Hernández, C. A. Colín, S. Ortega, G. Cerón y R. Franco. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. (CENIAQ). *Investigación en Discapacidad*. Vol. 3(1):10-18.

McSpadden G. B. B. and Fravel, D. R. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.

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.

Padron L., R. D. G. Torres, O. J. Contreras, M. López, y C. Colmenares. 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 y 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., y M. Casas. 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. y 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., R. Núñez E. y L. Bucio A. 2003. Determinación de la dosis óptima económica de fertilización en caña de azúcar. *TERRA* 21:267-272.

Taulé C., C. Mareque, C. Barlocco, F. Hackembruch, M. Sicardi, y F. Battistoni. 2014. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a caña de azúcar. *INAIA Uruguay*. 54:9-46.

Tejera H. B., M. Rojas y M. Heydrich. 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.

Yokota A., M. Takeuchi, T. Sakane, and N. Weiss. 1993. Proposal of six new species in the genus *Aureobacterium* and transfer of *Flavobacterium esteraromaticum* Omelianski to the genus *Aureobacterium* *Aureobacterium esteraromaticum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:555– 564.