








Characterization of rhizospheric bacteria isolated from soil cultivated with sugarcane in Tamaulipas state, Mexico

Caracterización de bacterias rizosféricas aisladas de suelo cultivado con caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México

Caracterização de bactérias rizosféricas isoladas de solo cultivado com cana-de-açúcar no estado de Tamaulipas, México

Jesús Gerardo García Olivares¹, Martín Abraham Reyes Lara², Juan flores Gracia², Jesús Di Carlo Quiroz Velásquez¹, Israel García León¹, José Reyes Hernández³ y Homar Rene Gill Langerica^{1*}

¹Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México C.P. 88710. Correo electrónico: (JG) jggarcia@ipn.mx, ; (JQ) jquiroz@ipn.mx, ; (IG) igleon00@gmail.com, ; (HG) hgill@ipn.mx, . ²Instituto Tecnológico de Cd. Victoria Cd. Victoria, Tamaulipas, México C.P. 87010. Correo electrónico: (MR) tinorey_90@hotmail.com, ; (JG) jfloresgracia@yahoo.com.mx, . ³Universidad Autónoma de Tamaulipas Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Col. Jardín C.P. 89840, México. Correo electrónico: biologo.reyes@hotmail.com, .

Abstract

The state of Tamaulipas, Mexico, has two important sugar mills, with plantations of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) of more than 50 years, the objective of the study was the identification and bacterial characterization in the production of indole-3-acetic acid (IAA), the solubilization of phosphorus and plant growth of bacterial isolates from the rhizosphere of sugarcane. The isolation and morphological characterization were in 30 rhizosphere soil samples of the sugarcane variety CP 72-2086 using the Luria-Bertani media, Congo Red Agar and Potato Dextrose Agar. The molecular characterization was with the 16S rRNA gene

Received el 14-02-2021 • Accepted el 28-05-2021.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: hgill@ipn.mx; jggarcia@ipn.mx

and the bacterial inoculation consisted of seedlings of the variety CP 72-2086. 121 strains (38 species) were isolated, being *Bacillus* sp. most frequently, 14 species were positive for phosphorus solubilization: *Bacillus* sp. (6), *Pseudomonas* spp. (5), *Paenibacillus* (2) *Streptomyces venezuelae* (1) stand out. The greater phosphorus solubilization was *Pseudomonas mediterranea* (21.6 mm). Nine bacteria showed production close to 5 ppm IAA: *Bacillus aryabhattai* (6 ppm), *Bacillus pumilus* (5.8 ppm) and *Ensifer adhaerens* (5.6 ppm). *Bacillus megaterium* showed a higher percentage of chlorophyll and foliar nitrogen. In the present analysis, 38 bacterial species associated with the rhizosphere of the sugarcane variety CP 72-2086 were identified, so these results showed the potential to select native bacteria that have the ability to stimulate plant growth of the variety CP 72-2086.

Key words: *Saccharum officinarum* L., *Bacillus* spp., indole-3-acetic acid (IAA), phosphorus.

Resumen

El estado de Tamaulipas, México, cuenta con dos ingenios azucareros importantes, con plantaciones de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) de más de 50 años, el objetivo del estudio fue la identificación y la caracterización bacteriana en la producción de ácido indol-3-acético (IAA), la solubilización de fósforo y crecimiento vegetal de aislados bacterianos de la rizosfera de caña de azúcar. El aislamiento y la caracterización morfológica fue en 30 muestras de suelo de la rizosfera de la variedad de caña de azúcar CP 72-2086 usando los medios Luria-Bertani, agar rojo congo y agar papa dextrosa. La caracterización molecular fue con el gen 16S rRNA y la inoculación bacteriana consistió en plántulas de la variedad CP 72-2086. Se aislaron 121 cepas, *Bacillus* sp. fue la bacteria más frecuente, 14 especies fueron positivos a fósforo, *Bacillus* sp. (6), *Pseudomonas* spp. (5), *Paenibacillus* (2) *Streptomyces venezuelae* (1). La mayor solubilización de fósforo fue para *Pseudomonas mediterranea* (21,6 mm). Nueve bacterias presentaron una producción cercana a 5 ppm de IAA, sobresalen *Bacillus aryabhattai* (6 ppm), *Bacillus pumilus* (5,8 ppm) y *Ensifer adhaerens* (5,6 ppm). *Bacillus megaterium* mostró mayor porcentaje de clorofila y nitrógeno foliar. En el presente análisis se lograron identificar 38 especies bacterianas asociadas a la rizosfera de la variedad de caña de azúcar CP 72-2086, por lo que estos resultados mostraron el potencial para seleccionar bacterias nativas que tienen la capacidad de estimular el crecimiento vegetal de la variedad CP 72-2086.

Palabras clave: *Saccharum officinarum* L., *Bacillus* spp., ácido indol-3-acético (IAA), fósforo.

Resumo

O estado de Tamaulipas, no México, possui duas importantes usinas açucareiras, com plantações de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) de mais de 50 anos,

o objetivo do estudo foi a identificação e caracterização bacteriana na produção de ácido indol- 3- ácido acético (IAA), solubilização de fósforo e crescimento de plantas de isolados bacterianos da rizosfera da cana-de-açúcar. O isolamento e a caracterização morfológica foram realizados em 30 amostras de solo da rizosfera da variedade de cana-de-açúcar CP 72-2086 utilizando os meios Luria-Bertani, ágar vermelho do Congo e ágar batata dextrose. A caracterização molecular foi com o gene 16S rRNA e a inoculação bacteriana consistiu em mudas da variedade CP 72-2086. 121 cepas, *Bacillus* sp. foi a bactéria mais frequente, 14 espécies foram positivas para fósforo, *Bacillus* sp. (6), *Pseudomonas* spp. (5), *Paenibacillus* (2) *Streptomyces venezuelae* (1). A maior solubilização de fósforo foi para *Pseudomonas mediterranea* (21,6 mm). Nove bactérias apresentaram produção próxima a 5 ppm de IAA, destacando-se *Bacillus aryabhattai* (6 ppm), *Bacillus pumilus* (5,8 ppm) e *Ensifer adhaerens* (5,6 ppm). *Bacillus megaterium* apresentou maior porcentagem de clorofila e nitrogênio foliar. Na presente análise, foram identificadas 38 espécies bacterianas associadas à rizosfera da variedade de cana-de-açúcar CP 72-2086, portanto esses resultados mostraram o potencial para selecionar bactérias nativas que têm a capacidade de estimular o crescimento de plantas da variedade CP 72-2086.

Palabras-chave: *Saccharum officinarum* L., *Bacillus* spp., ácido indol-3-acético (IAA), fósforo.

Introduction

The sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivation in Mexico is one activity of major importance in the national economy, it is a crop that allows a wide production diversity, an example in Tamaulipas sugar mills “Aarón Sáenz Garza” and “El Mante” generate a great economic spill (Castro-Nava *et al.*, 2010). The activity derived from sugarcane cultivation in Mexico producing areas is not only affected productively and economically by biotic and abiotic factors also is cultivated under the monoculture system, a practice that has impoverished and degraded soil (Solanki *et al.*, 2017). Conditions that have been aggravated by practices applying high agrochemicals amounts and chemical fertilizers (Torriente,

Introducción

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en México es una actividad de gran importancia en la economía nacional, es un cultivo que permite una amplia diversidad productiva, ejemplo en Tamaulipas los ingenios azucareros “Aarón Sáenz Garza” y “El Mante” generan un gran derrame económico (Castro-Nava *et al.*, 2010). La actividad derivada del cultivo de la caña de azúcar en las zonas productoras de México no solo se ve afectada productiva y económicamente por factores bióticos y abióticos también se cultiva bajo el sistema de monocultivo, práctica que ha empobrecido y degradado los suelos (Solanki *et al.*, 2017). Estas condiciones se han visto agravadas por prácticas que aplican altas cantidades de

2010). Therefore, it is necessary to investigate cultivation technologies are profitable and do not affect environment with more sustainable cultivation practices.

One way to temper bad practices is through soil microflora study, coupled with implementation agricultural practices that stimulate native populations of microorganisms in sugarcane rhizosphere cultivation, growth and health of plants (Momose *et al.*, 2009; Ashraf *et al.*, 2011; Saharan and Nehra, 2011), since we must take advantage of fact soil microorganisms are associated with crops, based on those interact positively with plants (Morgan *et al.*, 2005; Bhattacharyya and Jha, 2012; Quecine *et al.*, 2012), and also from adaptive point view, plants select microorganisms that contribute most its development, for example, bacteria of genus *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* and *Serratia*, among others can colonize plant tissue (Saharan and Nehra, 2011; Criollo *et al.*, 2012), as well as fungi that have been proven to promote plant growth such as those of genus *Trichoderma*, which has been reported that stimulate growth grasses such as sorghum and maize among others plants (Hernández-Mendoza *et al.*, 2018).

Investigations show potential to select *in situ* microorganisms with potential to optimize assimilate nutrients and possess substances stimulate plant growth or act as bioinsecticides or biofungicides,

agroquímicos y fertilizantes químicos (Torriente, 2010). Por lo tanto, es necesario investigar las tecnologías de cultivo que sean rentables y no afecten el medio ambiente con prácticas de cultivo más sostenibles.

Una forma de moderar las malas prácticas es mediante el estudio de la microflora del suelo, junto con la implementación de prácticas agrícolas que estimulen las poblaciones nativas de microorganismos en el cultivo, el crecimiento y la salud de las plantas en la rizosfera de la caña de azúcar (Momose *et al.*, 2009; Ashraf *et al.*, 2011; Saharan y Nehra, 2011), ya que debemos aprovechar el hecho de que los microorganismos del suelo están asociados con los cultivos, en base a que estos interactúan positivamente con las plantas (Morgan *et al.*, 2005; Bhattacharyya y Jha, 2012; Quecine *et al.*, 2012), y también desde el punto de vista adaptativo, las plantas seleccionan los microorganismos que más contribuyen a su desarrollo, por ejemplo, bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia*, entre otros pueden colonizar tejido vegetal (Saharan y Nehra, 2011; Criollo *et al.*, 2012), así como hongos que han demostrado promover el crecimiento de las plantas como los del género *Trichoderma*, que se ha reportado que estimulan el crecimiento de gramíneas como sorgo y maíz entre otras plantas (Hernández-Mendoza *et al.*, 2018).

Las investigaciones muestran potencial para seleccionar microorganismos *in situ* con potencial

because they are native microbiota and have a high degree adaptation. Therefore, to know the bacterial diversity associated with the cultivation of sugarcane and its potential as biofertilizers, is a first step to take advantage of the benefits that lead to the association of the sugarcane plant and rhizobacteria in the productive system of sugar mills “Aarón Sáenz Garza” and “El Mante” in Tamaulipas Mexico, for these reasons, the main objective of the study was to evaluate the production of indole-3-acetic acid, the solubilization of mineral phosphorus and the production of shoots in the greenhouse from bacteria isolated from the rhizosphere of sugarcane cultivated in calcareous soils from the state of Tamaulipas, Mexico.

Materials and methods

Location. For this study, soils of sugarcane mills in the municipalities El Mante (latitude N 22°74'78.30" and length E 98°98'27.99"), Gómez Farías (latitude N 22°42'32" and length E 0°30'43") and Xicoténcatl (latitude N 22°59'00" and length E 98°57'00") from Tamaulipas state, Mexico, were selected. The microbiology study was carried out in soil grow with sugarcane variety CP 72-2086.

Soil samples collection and samples preparation. In 30 randomly chosen plots, five soil samples were collected from the rhizosphere of the sugarcane plant. Samples were collected at a depth 30 cm composed of five points in each lot and subsequently homogenized and dried

para optimizar la asimilación de nutrientes y poseer sustancias que estimulen el crecimiento de las plantas o actúen como bioinsecticidas o biofungicidas, debido a que son microbiota nativa y tienen un alto grado de adaptación. Por tanto, conocer la diversidad bacteriana asociada al cultivo de la caña de azúcar y su potencial como biofertilizantes, es el primer paso para aprovechar los beneficios que conllevan la asociación de la planta de caña de azúcar y rizobacterias en el sistema productivo de los ingenios azucareros “Aarón Sáenz Garza “y” El Mante “en Tamaulipas México, por estas razones, el objetivo principal del estudio fue evaluar la producción de ácido indol-3-acético, la solubilización de fósforo mineral y la producción de brotes en invernadero a partir de bacterias aisladas de la rizosfera de caña de azúcar cultivada en suelos calcáreos del estado de Tamaulipas, México.

Materiales y métodos

Localización. Para este estudio, fueron seleccionados suelos de ingenios de caña de azúcar en los municipios El Mante (latitud N 22°74'78.30" y longitud E 98°98'27.99"), Gómez Farías (latitud N 22°42'32" y longitud E 0°30'43") y Xicoténcatl (latitud N 22°59'00" y longitud E 98°57'00") del estado de Tamaulipas, México. El estudio de microbiología se realizó en suelo de cultivo con caña de azúcar variedad CP 72-2086.

Toma de muestras de suelo y preparación de muestras. En 30 parcelas elegidas al azar, se

in shade. Bacterial isolation consisted of using 1 g of soil diluted in sterile isotonic saline, 100 µL of the dilution in triplicate was placed in sterile Petri dishes with growth medium and incubated at 30 °C for 48 hours. The selection of the colonies was carried out by morphology and the counting of the colonies was done by the method of Swanson *et al.* (2001), three culture media, Luria-Bertani (LB), congo red agar and potato dextrose agar (PDA) were used for bacterial isolation (Berkhoff and Vinal, 1986).

Molecular identification. The protocol PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent of Applied Biosystems for DNA was used (Mullis and Faloona, 1987), the protocol allowed to perform a PCR directly. The 16S rRNA gene was amplified using universal primer Sx-(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) and Ay-(ACCTTGTTACGACTT) (Naveed *et al.*, 2014). Amplification cycle was included an initial denaturation (94 °C, 5 min), 30 cycles consisted of 1 min at 94 °C for denaturation, 40 s at 58 °C for annealing and 150 s at 72 °C for elongation, followed 10 min at 72 °C final extension. Target amplification was confirmed by electrophoresis in 1 % agarose. The PCR products were sequenced and compared with 16S rRNA gene sequences present in the NCBI GenBank.

Based on a literature review, a percentage of the bacterial isolates were selected to produce IAA, mineral phosphorus solubilization, and greenhouse plant inoculation tests. For phosphorus solubilization, Pikovskaya agar medium (PVK) with

recolectaron cinco muestras de suelo de la rizósfera de la planta de caña de azúcar. Las muestras se recolectaron a una profundidad de 30 cm, estuvo compuesta por cinco puntos en cada lote, posteriormente se homogeneizaron y secaron a la sombra. El aislamiento bacteriano consistió en utilizar 1 g de suelo diluido en solución salina isotónica estéril, se colocaron 100 µL de la dilución por triplicado en placas de Petri estériles con medio de cultivo y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. La selección de las colonias se realizó por morfología y el recuento de las colonias se realizó por el método de Swanson *et al.* (2001), se utilizaron tres medios de cultivo, Luria-Bertani (LB), agar rojo congo y agar papa dextrosa (PDA) para el aislamiento bacteriano (Berkhoff y Vinal, 1986).

Identificación molecular. Se utilizó el protocolo PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent de Applied Biosystems para ADN (Mullis y Faloona, 1987), el protocolo permitió realizar una PCR directamente. El gen de ARNr 16S se amplificó utilizando el cebador universal Sx-(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y Ay-(ACCTTGTTACGACTT) (Naveed *et al.*, 2014). El ciclo de amplificación incluyó una desnaturalización inicial (94 °C, 5 min), 30 ciclos consistieron en 1 min a 94 °C para la desnaturalización, 40 s a 58 °C para el recocido y 150 s a 72 °C para el alargamiento, seguidos de 10 min a Extensión final 72 °C. La amplificación diana se confirmó mediante electroforesis en agarosa al 1 %. Los productos de la PCR se secuenciaron y compararon con las

purple bromocresol solution was used as culture pH indicator (changes from violet to yellow), which indicates the medium acidification. 10 μ L of each strain were cultured in PVK medium plates and incubated for 7 days at 30 °C. The appearance of a clear zone around the colony was considered as its phosphate solubility capacity. The phosphorus solubility index (SI) was calculated from relationship between the diameter of colony and halo zone (Nopparat *et al.*, 2009).

Biochemical characterization.

In IAA analysis, the strains were grown in LB liquid medium for 24 and 48 h and filtered with 0.45 μ m nylon membranes (Millipore), each sample was composed of 3 mL deionized water and 3 mL of a suspension 1.10^6 cells.mL⁻¹. HPLC analysis was performed by injecting 20 μ L of each filtered sample and as a standard IAA solution. All sample analysis was transformed in mobile phase 70/30 (700 mL of phosphate solution and 300 mL of acetonitrile) with pH 3.2, a flow rate 1 mL.min⁻¹ for 25 min at 30 °C, UV light detector at 220 nm and column ultra-pore of 150*4.6mm (Arora and Bae, 2014).

Greenhouse test. The effect as bio stimulators of plant growth of nine isolated bacteria selected for their production of IAA a phosphorus solubilization was evaluated in a greenhouse in 20 seedlings sugarcane variety CP 72-2086 (*Bacillus aryabhatai*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Ensifer adhaerens*, *Pseudomonas* sp. and control). The analysis was

secuencias del gen del ARNr 16S presentes en el NCBI GenBank.

En base a una revisión de la literatura, se seleccionó un porcentaje de los aislados bacterianos para producir IAA, solubilización de fósforo mineral e inoculación de plantas de invernadero. Para la solubilización del fósforo se utilizó medio de agar Pikovskaya (PVK) con solución de bromocresol púrpura como indicador del pH del cultivo (cambios de violeta a amarillo), lo que indica la acidificación del medio. Se cultivaron 10 μ L de cada cepa en placas de medio PVK y se incubaron durante 7 días a 30 °C. La aparición de una zona clara alrededor de la colonia se consideró como su capacidad de solubilidad de fosfato. El índice de solubilidad del fósforo (SI) se calculó a partir de la relación entre el diámetro de la colonia y la zona del halo (Nopparat *et al.*, 2009).

Caracterización bioquímica.

En el análisis IAA, las cepas se cultivaron en medio líquido LB durante 24 y 48 h y se filtraron con membranas de nylon de 0,45 μ m (Millipore), cada muestra estuvo compuesta por 3 mL de agua desionizada y 3 mL de una suspensión de 1.10^6 células.mL⁻¹. El análisis por HPLC se realizó inyectando 20 μ L de cada muestra filtrada y como una solución estándar de IAA. Todo el análisis de la muestra se transformó en fase móvil 70/30 (700 mL de solución de fosfato y 300 mL de acetonitrilo) con pH 3,2, un caudal de 1 mL.min⁻¹ durante 25 min a 30 °C, detector de luz UV a 220 nm y columna ultra-pore de 150*4,6 mm (Arora y Bae, 2014).

Prueba de invernadero. Se evaluó el efecto como bioestimuladores

carried in El Mante municipality in Tamaulipas state, Mexico (latitude N 22°74'78.30" and length E 98°98'27.99"). Each sugarcane seedling of cultivar CP 72-2086 was transplanted in bags with substrate composted cachaza (six kilograms) 10 cm to depth. One milliliter each strain bacterial was applied to root. The Chlorophyll and nitrogen content and shoots number were evaluated.

Statistical analysis and experimental design. For the bacterial evaluation in production phosphorus solubilization and greenhouse test, a completely randomized block experimental design was used with three repetitions for phosphorus solubilization and 20 repetitions (plants) for the greenhouse test. For the two evaluations an ANOVA and Tukey's means test were applicate ($P = 0.05$) in the software InfoStat v2019 (Di Rienzo *et al.*, 2019). For the phylogenetic tree was constructed with the Kimura 2-parameters method (Kimura, 1980) and the maximum probability with a resampling of 10,000 repetitions (Felsenstein, 1985) and the MEGA V6.0 software was used.

Results and discussion

Bacterial diversity. Morphology isolation allowed identification of 121 pure isolates from sugarcane rhizosphere, identification based on 16S rRNA gene allowed identification of 38 species grouped in nine genera and three phyla, Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes. Of total species identified, the

del crecimiento vegetal de nueve bacterias aisladas seleccionadas para su producción de IAA a solubilización de fósforo en invernadero en 20 plántulas de caña de azúcar variedad CP 72-2086 (*Bacillus aryabhattai*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Ensifer adhaerens*, *Pseudomonas* sp. y control). El análisis se realizó en el municipio El Mante en el estado de Tamaulipas, México (latitud N 22°74'78,30" y longitud E 98°98'27,99"). Cada plántula de caña de azúcar del cultivar CP 72-2086 se transplantó en bolsas con sustrato compostado de cachaza (seis kilogramos) a 10 cm de profundidad. Se aplicó a la raíz un mililitro de cada cepa bacteriana. Se evaluó el contenido de clorofila y nitrógeno y el número de brotes.

Análisis estadístico y diseño experimental. Para la evaluación bacteriana en producción de solubilización de fósforo y prueba de invernadero, se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con tres repeticiones para la solubilización de fósforo y 20 repeticiones (plantas) para la prueba de invernadero. Para las dos evaluaciones se aplicaron ANAVAR y prueba de medias de Tukey ($P = 0,05$) en el software InfoStat v2019 (Di Rienzo *et al.*, 2019). Para el árbol filogenético se construyó con el método de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y máxima probabilidad con un remuestreo de 10.000 repeticiones (Felsenstein, 1985) y el software MEGA V6.0.

genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Arthrobacter* grouped largest number of species. At phylum level, the phylum Firmicutes grouped largest number of species (26), Proteobacteria eight and Actinobacteria four species (figure 1).

Resultados y discusión

Diversidad bacteriana. El aislamiento morfológico permitió identificar 121 aislados puros de la rizósfera de la caña de azúcar, la

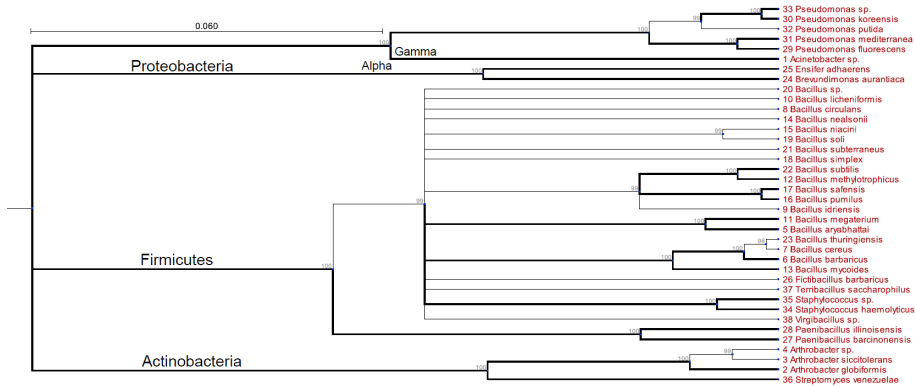


Figure 1. Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene in bacteria isolated from sugarcane rhizosphere grown in southern Tamaulipas state, Mexico.

Figura 1. Relación filogenética del gen 16S rRNA en bacterias aisladas de la rizosfera de caña de azúcar cultivada en el sur del estado de Tamaulipas, México.

The results in bacterial diversity found in this work coincide with that reported by Dhanraj (2013), who found a similar number of phyla and bacterial genera in the rhizosphere of sugarcane and that reported by Cordero *et al.* (2020) in the rhizosphere of the other crops as canola, wheat, field pea and lentil. In this work, 38 species located in three phyla were identified, Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes, 50 % of the bacteria belonged to the genus *Bacillus* within the phylum Firmicutes. Pisa *et al.* (2011), found in their investigation

identificación basada en el gen 16S rRNA permitió identificar 38 especies agrupadas en nueve géneros y tres filos, Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes. Del total de especies identificadas, los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter* agruparon el mayor número de especies. A nivel de filo, el filo Firmicutes agrupó el mayor número de especies (26), Proteobacteria ocho y Actinobacteria cuatro especies (figura 1).

Los resultados en diversidad bacteriana encontrados en este trabajo coinciden con lo reportado por Dhanraj

of sugarcane rhizosphere that genus *Bacillus* is present in 19.7 % more than other genera found and as well as Männistö *et al.* (2013), who reported that *Bacillus* genus had a greater presence in soils cultivated with crops of commercial interest (Cordero *et al.*, 2020).

The wide presence of genus *Bacillus* in soils cultivated with sugarcane, may be related to fact that genus *Bacillus* species could produce spores, which allows each species to tolerate unfavorable environmental conditions compared to other genera (Galperin, 2013). Furthermore, it is known that *Bacillus* strains are producers lipopeptide biosurfactants of surfactin, iturin and fengycin families that demonstrate biological activity with a synergistic mode of action (Heryania and Dharma Putrab, 2017).

In addition, surfactin shows antibacterial, antiviral, antiparasitic properties and triggers formation of biofilms, which are essential for root colonization, Iturin and fengycin exhibit antifungal activity against a wide range of yeast and filamentous fungi, together stimulate an induced systemic response (ISR) in host plants, for what are considered microorganisms with industrial and agricultural potential (Lim *et al.*, 2017).

Phosphorus solubilization. Of 38 species of detected bacteria, only one isolate per species was analyzed for phosphorus solubilization, the result showed that less than 50 % of the strains can solubilize insoluble phosphorus, the same result was

(2013), quien encontró un número similar de phyla y géneros bacterianos en la rizosfera de la caña de azúcar y al reportado por Cordero *et al.* (2020) en la rizósfera de los otros cultivos como canola, trigo, guisante y lentejas. En este trabajo se identificaron 38 especies ubicadas en tres phyla, Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes, el 50 % de las bacterias pertenecían al género *Bacillus* dentro del Phylum Firmicutes. Pisa *et al.* (2011), encontraron en su investigación de la rizósfera de la caña de azúcar que el género *Bacillus* está presente en un 19,7 % más que otros géneros encontrados y al igual que Männistö *et al.* (2013), quienes reportaron que el género *Bacillus* tuvo una mayor presencia en suelos cultivados con cultivos de interés comercial (Cordero *et al.*, 2020).

La amplia presencia del género *Bacillus* en suelos cultivados con caña de azúcar, puede estar relacionada con el hecho de que las especies del género *Bacillus* podrían producir esporas, lo que permite que cada especie tolere condiciones ambientales desfavorables en comparación con otros géneros (Galperin, 2013). Además, se sabe que las cepas de *Bacillus* son productoras de biosurfactantes lipopéptidos de las familias de surfactina, iturina y fengycina que demuestran actividad biológica con un modo de acción sinérgico (Heryania y Dharma Putrab, 2017).

Además, la surfactina muestra propiedades antibacterianas, antivirales, antiparasitarias y desencadena la formación de biopelículas, que son esenciales para

reported by Mohammadi (2012), who observed a lower efficacy than 50 % in solubilization insoluble phosphorus. The variance analysis was highly significant for phosphorus solubilization time (24, 48 and 72 h) and treatments (bacterial) (table 1).

Tukey's test ($P = 0.05$) showed that *Pseudomonas mediterranea* (21.6 mm) had highest phosphorus solubilization, followed by *Bacillus aryabhattai* (14.4 mm) (table 2).

la colonización de raíces, Iturin y fengycin exhiben actividad antifúngica contra una amplia gama de levaduras y hongos filamentosos, juntos estimulan una respuesta sistémica inducida (ISR) en plantas hospedantes, por lo que se consideran microorganismos con potencial industrial y agrícola (Lim *et al.*, 2017).

Solubilización de fósforo. De 38 especies de bacterias detectadas, solo se analizó un aislado por

Table 1. Analysis of variance of phosphorus solubilization test in bacteria isolated from sugarcane rhizosphere in Tamaulipas state, Mexico.

Cuadro 1. Análisis de varianza de la prueba de solubilización de fósforo en bacterias aisladas de la rizósfera de la caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México.

Variationsource	Freedom degrees	Squares sum	Middle squares	f calc.	prob.
Treatments	125	134.75	8.93	5.84	0.0001**
Repetitions	3	2.71	0.90	0.59	0.624 ns
Time	1	1915.15	1915.15	1244.6	0.001**
Treat*Rep	45	668.38	14.85	9.65	0.001**
Time*Rep	15	1235.84	82.38	53.55	0.001**
Error	112	172.33	1.53		
CV	12 %				

CV= Coefficient of variation, ns= no significance ($P = 0.01$).

CV = Coeficiente de variación, ns = sin significancia ($P = 0,01$).

This is important since phosphorus is one of the essential macroelements necessary for plant growth and development, however, there is only a small fraction of phosphorus in the soil solution (1 ppm or 0.1 %) (Awais *et al.*, 2017). The phosphate-solubilizing bacteria (PSB) have ability to solubilize insoluble phosphorus and make it available to plant roots for

especie para la solubilización de fósforo, el resultado mostró que menos del 50 % de las cepas pueden solubilizar fósforo insoluble, el mismo resultado fue reportado por Mohammadi (2012), quien observó una eficacia menor al 50 % en la solubilización del fósforo insoluble. El análisis de varianza fue altamente significativo para el

absorption (Awais *et al.*, 2017), they are predominately concentrated in rhizosphere (Chen *et al.*, 2006).

tiempo de solubilización del fósforo (24, 48 y 72 h) y los tratamientos (bacterianos) (cuadro 1).

Table 2. Tukey’s means comparison (P = 0.05) of phosphorus solubilization bacterial isolated from sugarcane rhizosphere.

Cuadro 2. Comparación de medias de Tukey (P = 0,05) de bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas de la rizosfera de la caña de azúcar.

Number	Treatments	Average
T12	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	21.6 ^a ± 1.38
T1	<i>Bacillus aryabhattai</i>	14.4 ^b ± 1.38
T2	<i>Bacillus megaterium</i>	14.1 ^b ± 1.38
T11	<i>Pseudomonas koreensis</i>	13.7 ^b ± 1.38
T14	<i>Pseudomonas</i> sp.	11.5 ^c ± 1.38
T13	<i>Pseudomonas putida</i>	11.1 ^c ± 1.38
T3	<i>Bacillus mycoides</i>	09.6 ^d ± 1.38
T7	<i>Ensifer adhaerens</i>	09.5 ^d ± 1.38
T4	<i>Bacillus pumilus</i>	09.0 ^e ± 1.38
T10	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	08.8 ^e ± 1.38
T6	<i>Bacillus thuringensis</i>	08.3 ^f ± 1.38
T5	<i>Bacillus safensis</i>	07.3 ^f ± 1.38
T9	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	07.3 ^f ± 1.38
T8	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	05.0 ^f ± 1.38
T15	<i>Streptomyces venezuelae</i>	03.8 ^h ± 1.38
T16	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	03.3 ^h ± 1.38

a, b, c, d, e, f, g, hMeans with different letters are significantly different (P = 0.05).

a, b, c, d, e, f, g, hMedias con letras diferentes son significativamente diferentes (P = 0,05).

In these analyses, 42% of bacteria in sugarcane rhizosphere have ability to solubilize insoluble phosphorus, mainly *Bacillus* and *Pseudomonas* genera, like that observed by Mohammadi (2012), PSB bacteria belong to genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and

La prueba de Tukey (P = 0,05) mostró que *Pseudomonas mediterranea* (21,6 mm) tuvo la mayor solubilización de fósforo, seguida por *Bacillus aryabhattai* (14,4 mm) (cuadro 2).
Esto es importante ya que el fósforo es uno de los macroelementos

Enterobacter, these bacteria can be used as biofertilizers (de Santi Ferrara *et al.*, 2012). Biofertilizers represent a sustainable solution to improve plant growth, nutrition, root growth, productivity, and response to stress factors (Sharma *et al.*, 2013; Anand *et al.*, 2016).

HPLC analysis. HPLC analysis results showed that *Bacillus aryabhattai* (6.0 ppm), *Bacillus safensis* (50.9 ppm), *Bacillus pumilus* (5.8 ppm) and *Ensifer adhaerens* (5.6 ppm) had highest production of 3-indoleacetic acid (IAA). These results agree with those reported by Lee *et al.* (2012), who reported that *Bacillus aryabhattai* strain LS15 generated highest production IAA and Souza (2016) reported that *Ensifer adhaerens* have ability to fix atmospheric nitrogen and IAA production.

Different *Rhizobacteria* genera have ability to produce and secrete chemical compounds regulate and promote plant growth (Ashraf *et al.*, 2011). IAA-producing bacteria have longer survival and colonize plant roots better than other bacteria (Etesami *et al.*, 2015), weakening the plant defense mechanisms. In these results, *Bacillus* genus had a great capacity to produce IAA which may be due to ability to release growth-promoting substances and have a better capacity for adaptation and colonization of sugarcane rhizosphere in soils of Tamaulipas state, such as was observed by de Santi Ferrara *et al.* (2012). Production of phytohormones, such as auxins or gibberellins, is a direct mechanism that is used by

esenciales necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin embargo, solo hay una pequeña fracción de fósforo en la solución del suelo (1 ppm o 0,1 %) (Awais *et al.*, 2017). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) tienen la capacidad de solubilizar el fósforo insoluble y ponerlo a disposición de las raíces de las plantas para su absorción (Awais *et al.*, 2017), se concentran predominantemente en la rizósfera (Chen *et al.*, 2006).

En estos análisis, el 42 % de las bacterias en la rizósfera de la caña de azúcar tienen capacidad para solubilizar fósforo insoluble, principalmente los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, como el observado por Mohammadi (2012), las bacterias PSB pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Enterobacter*, estas bacterias pueden ser utilizados como biofertilizantes (de Santi Ferrara *et al.*, 2012). Los biofertilizantes representan una solución sostenible para mejorar el crecimiento de las plantas, la nutrición, el crecimiento de las raíces, la productividad y la respuesta a los factores de estrés (Sharma *et al.*, 2013; Anand *et al.*, 2016).

Análisis por HPLC. Los resultados del análisis de HPLC mostraron que *Bacillus aryabhattai* (6,0 ppm), *Bacillus safensis* (50,9 ppm), *Bacillus pumilus* (5,8 ppm) y *Ensifer adhaerens* (5,6 ppm) tuvieron la mayor producción de ácido 3-indolacético (IAA). Estos resultados concuerdan con los reportados por Lee *et al.* (2012), quienes informaron que la cepa LS15 de *Bacillus aryabhattai*

PGR microorganisms. IAA is one of the most physiologically active auxins which controls many physiological processes including stimulation of cell division, cell elongation, cell differentiation, light and gravitational responses, and regulation of leaf fall and fruit ripening (Massena and dos Santos, 2015).

The bacterial evaluation under greenhouse conditions, the chlorophyll nitrogen amount in leaves and shoots number per plant showed highly significant differences in ANOVA analysis (table 3).

generó la mayor producción de IAA y Souza (2016) informaron que *Ensifer adhaerens* tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y la producción de IAA.

Los diferentes géneros de Rhizobacteria tienen la capacidad de producir y secretar compuestos químicos que regulan y promueven el crecimiento de las plantas (Ashraf *et al.*, 2011). Las bacterias productoras de IAA tienen una supervivencia más prolongada y colonizan las raíces de las plantas mejor que otras bacterias (Etesami *et al.*, 2015), lo que debilita

Table 3. Analysis of variance for amount of nitrogen, chlorophyll and number of shoots traits in sugarcane cultivar CP 72-2086 inoculated with bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane in Tamaulipas state, Mexico.

Cuadro 3. Análisis de varianza para las características cantidad de nitrógeno, clorofila y número de brotes en el cultivar de caña de azúcar CP 72-2086 inoculado con bacterias aisladas de la rizósfera de la caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México.

Variation source	Chlorophyll content	Nitrogen content	Shoot number
Treatments	2975.64**	4045.72**	0.0022**
Repetitions	67.70 ^{ns}	0.588 ^{ns}	0.9052 ^{ns}
Error	35.00	15.46	0.0194
CV (%)	11.00	10.00	10.00

CV = Coefficient of variation; ns= no significance (P = 0.01).

CV = coeficiente de variación; ns = sin importancia (P = 0,01).

Tukey’s test (P = 0.05) showed that *Ensifer adhaerens* and *Bacillus megaterium* species presented highest chlorophyll and nitrogen averages in cultivar sugarcane CP 72-2086. *Bacillus megaterium* species

los mecanismos de defensa de las plantas. En estos resultados, el género *Bacillus* tuvo una gran capacidad de producir IAA lo cual puede deberse a la capacidad de liberar sustancias promotoras del crecimiento y tener

presented two shoots per plant that represented highest value, showing significant biostimulant behavior (table 4). Situation that is presented in the work of Cook *et al.* (2011), in pot growth of sugarcane plants inoculated with the species *Pseudomonas luteola*, *P. fluorescens* N50, *Ochrobactrum anthropi* N208 and *Stenotrophomonas maltophilia* 79 had the highest leaf area indices and growth rates.

una mejor capacidad de adaptación y colonización de la rizósfera de la caña de azúcar en suelos del estado de Tamaulipas, como lo observó de Santi Ferrara *et al.* (2012). La producción de fitohormonas, como auxinas o giberelinas, es un mecanismo directo que utilizan los microorganismos PGR. IAA es una de las auxinas más fisiológicamente activas que controla muchos procesos fisiológicos, incluida

Table 4. Tukey’s means comparison (P = 0.05) of amount of nitrogen, chlorophyll and number of shoots traits in sugarcane cultivar CP 72-2086 inoculated with bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane in Tamaulipas state, Mexico.

Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey (P = 0,05) para las características de cantidad de nitrógeno, clorofila y número de brotes en el cultivar de caña de azúcar CP 72-2086 inoculado con bacterias aisladas de la rizosfera de la caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México.

Number	Treatments	Chlorophyll content	Nitrogen content	Shoot number
T1	<i>Bacillus aryabhattai</i>	37.8 ^c ± 1.03	1.18 ^b ± 0.08	2 ^a ± 0.18
T2	<i>Bacillus licheniformis</i>	45.8 ^a ± 1.03	2.38 ^a ± 0.08	1 ^b ± 0.18
T3	<i>Bacillus megaterium</i>	48.0 ^a ± 1.03	2.53 ^a ± 0.08	2 ^a ± 0.18
T4	<i>Bacillus pumilus</i>	35.2 ^d ± 1.03	1.78 ^c ± 0.08	2 ^a ± 0.18
T5	<i>Bacillus simplex</i>	38.6 ^c ± 1.03	1.80 ^c ± 0.08	2 ^a ± 0.18
T6	<i>Bacillus subtilis</i>	43.6 ^b ± 1.03	2.30 ^a ± 0.08	1 ^b ± 0.18
T7	<i>Bacillus safensis</i>	44.9 ^b ± 1.03	2.37 ^a ± 0.08	1 ^b ± 0.18
T8	<i>Ensifer adhaerens</i>	48.1 ^a ± 1.03	2.50 ^a ± 0.08	1 ^b ± 0.18
T9	<i>Pseudomonas</i>	30.0 ^b ± 1.03	2.49 ^a ± 0.08	1 ^b ± 0.18
T10	Control	48.0 ^a ± 1.03	1.05 ^b ± 0.08	4 ^a ± 0.18

a, b, c, d]Means with different letters are significantly different (P = 0.05).

a, b, c, d]Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (P = 0,05).

Biological evaluations by Castellanos-González *et al.* (2016), showed responses to biofertilization with the combination of cachaça and

la estimulación de la división celular, el alargamiento celular, la diferenciación celular, las respuestas lumínicas y gravitacionales y la regulación de la

phosphate rock with commercial biofertilizers EcoMic® and Azotofos®, achieving increases in the number of shoots in sugarcane seedlings. Gómez *et al.* (2019), also with inoculation of the biofertilizer NITROFIX® provoked a stimulating response on the radical growth of the evaluated varieties of sugarcane.

Conclusions

The isolation and bacterial identification by the 16S rRNA gene of the rhizosphere of the sugarcane variety CP 72-2086 cultivated in the state of Tamaulipas, Mexico, identified in greater proportion species of the genus *Bacillus*.

The analysis of *in vitro* parameters of dissolution of phosphorus and IAA and the measured parameters of the amount of chlorophyll, nitrogen and shoots detected in the greenhouse bacterial inoculation in the sugarcane variety CP 72-2086, indicated that *Bacillus megaterium* and *Ensifer adhaerens* had the highest performance, postulating these isolates to future evaluations in sugarcane cultivated in the state of Tamaulipas, Mexico to evaluate their effect as possible biofertilizers in the production of sugarcane.

Acknowledgment

Conacyt-FOMIX-Tamaulipas: Tamaulipas Key: 00000000019961, and Instituto Politécnico Nacional.

End of English Version

caída de las hojas y la maduración del fruto (Massena y dos Santos, 2015)

La evaluación bacteriana en condiciones de invernadero, la cantidad de nitrógeno clorofílico en hojas y el número de brotes por planta mostró diferencias altamente significativas en el análisis ANAVAR (cuadro 3).

La prueba de Tukey ($P = 0,05$) mostró que las especies de *Ensifer adhaerens* y *Bacillus megaterium* presentaron los promedios más altos de clorofila y nitrógeno en el cultivar de caña de azúcar CP 72-2086. Las especies de *Bacillus megaterium* presentaron dos brotes por planta que representaron el mayor valor, mostrando un comportamiento bioestimulante significativo (cuadro 4). Situación que se presenta en el trabajo de Cook *et al.* (2011), en macetas de plantas de caña de azúcar inoculadas con las especies *Pseudomonas luteola*, *P. fluorescens* N50, *Ochrobactrum anthropi* N208 y *Stenotrophomonas maltophilia* 79 tuvieron los índices de área foliar y tasas de crecimiento más altos.

Evaluaciones biológicas de Castellanos-González *et al.* (2016), mostraron respuestas a la biofertilización con la combinación de cachaça y roca fosfórica con biofertilizantes comerciales EcoMic® y Azotofos®, logrando incrementos en el número de brotes en plántulas de caña de azúcar. Gómez *et al.* (2019), también con la inoculación del biofertilizante NITROFIX® provocó una respuesta estimulante sobre el crecimiento

radical de las variedades evaluadas de caña de azúcar.

Conclusiones

El aislamiento e identificación bacteriana por el gen 16S rRNA de la rizósfera de la variedad de caña de azúcar CP 72-2086 cultivada en el estado de Tamaulipas, México, identificó en mayor proporción especies del género *Bacillus*.

El análisis de los parámetros *in vitro* de disolución de fósforo e IAA y los parámetros medidos de la cantidad de clorofila, nitrógeno y brotes detectados en la inoculación bacteriana en invernadero en la variedad de caña de azúcar CP 72-2086, indicó que *Bacillus megaterium* y *Ensifer adhaerens* presentaron los mayores niveles de desempeño, postulando estos aislados para futuras evaluaciones en caña de azúcar cultivada en el estado de Tamaulipas, México para evaluar su efecto como posibles biofertilizantes en la producción de caña de azúcar.

Agradecimiento

Conacyt-FOMIX-Tamaulipas:
Código Tamaulipas: 00000000019961,
e Instituto Politécnico Nacional.

Literature cited

- Anand, K., B. Kumari, and M. M. Anwar. 2016. Phosphate solubilizing microbes, an effective and alternative approach as biofertilizers. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 82, 37-40. <https://cutt.ly/rnajSSI>
- Arora, P. K. and H. Bae. 2014. Identification of new metabolites of bacterial transformation of indole by gas chromatography-mass spectrometry

and high performance liquid chromatography. *Int. J. Anal. Chem.* 2014, Article ID 239641, 5 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/239641>

- Ashraf, M., M. Rasool, and M. Mirza. 2011. Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane *Saccharum officinarum* L. *Adv. Biol. Res.* 56: 348-355. <https://cutt.ly/4najF9K>
- Awais, M., M. Tariq, A. Ali, Q. Ali, A. Khan, B. Tabassum, I. Nasir, and T. Husnain. 2017. Isolation, characterization, and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 11: 312-321. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.018>
- Berkhoff, H. A. and A. C. Vinal. 1986. Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. *Avian Dis.* 301: 117-121. <https://cutt.ly/7najJGA>
- Bhattacharyya, P. N. and D. K. Jha, 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria PGPR, emergence in agriculture. *World J Microb Biot.* 28: 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Castellanos-González, L., M. Abreus-Jiménez, C. N. Silva-Campos, R. Rivera-Espinosa, I. Fuentes-Romero, E. Parets-Selva, R. de Mello-Prado, and M. Romero. 2016. Efecto de la adición de cachaza, roca fosfórica y biofertilizantes en el suelo sobre el contenido de fósforo y el desarrollo de plántulas de caña de azúcar. *Cult. Trop.* 374: 145-151. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17308.08324>
- Castro-Nava, S., J. A. López-Santillán y F. Briones-Encinia. 2010. Retos y perspectivas de la caña de azúcar en Tamaulipas. *CienciaUAT.* 44: 38-43. <https://cutt.ly/JnajZgr>
- Chen, Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W. A. Lai and C. C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil. Ecol.* 341, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>

- Cordero, J., J. R. de Freitas, and J. J. Germida. 2020. Bacterial microbiome associated with the rhizosphere and root interior of crops in Saskatchewan, Canada. *Can. J. Microbiol.* 661: 71-85. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0330>
- Criollo, P. J., M. Obando, L. Sánchez, y R. Bonilla. 2012. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Corpoica Cienc. y Tecnol. Agropecu.* 13(2): 189-195. https://doi.org/10.21930/rcta.voll13_num2_art:254
- de Santi Ferrara, F. I., Z. Machado, H. H. Soto, E. I. Segal and H. Ramos. 2012. Endophytic and rhizospheric *Enterobacteria* isolated from sugarcane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil.* 353: 409-417. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1042-1>
- Dhanraj, B. N. 2013. Bacterial diversity in sugarcane *Saccharum officinarum* L. rhizosphere of saline soil. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 22: 60-64. <https://cutt.ly/5nacKSS>
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada y C. W. Robledo. 2019. InfoStat versión 2019. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://cutt.ly/InajNsM>
- Etesami, H., H. A. Alikhani and H. M. Hosseini. 2015. Indole-3-acetic acid IAA production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX.* 2: 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.02.008>
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies, An approach using the bootstrap. *Evolution.* 394: 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Galperin, M. Y. 2013. Genome diversity of spore-forming firmicutes. *Microbiol. Spectr.* 12: TBS-0015-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012>
- Gómez, E., Y. Guevara, A. N. San Juan, T. Lemes, M. Pérez and Y. Cutiño. 2019. Efecto del inoculante NITROFIX® sobre el desarrollo radical en tres variedades de caña de azúcar. *Cent. Agric.* 464: 61-64. <https://cutt.ly/Onakt1s>
- Hernández-Mendoza, J. L., J. D. Quiroz-Velásquez, J. G. García-Olivares, C. Lizarazo-Ortega, M. C. Martínez-Rodríguez y M. A. Ibarra-Rodríguez. 2018. Análisis económico del uso de biofertilizantes comerciales en el cultivo de sorgo. *Rev. Fac. Agron (LUZ).* 35(4): 496-513. <https://cutt.ly/RnakbeF>
- Heryania, H. and M. Dharma-Putrab. 2017. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electron. J. Biotechnol.* 27: 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>
- Kimura, M. A. 1980. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.037>
- Lee, S., J. O. Ka, and H. G. Song. 2012. Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhatai* in microcosm soil. *J. Microbiol.* 501: 45-49. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1415-z>
- Lim, S. M., M. Y. Yoon, G. J. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang, T. S. Shin, H. W. Park, N. H. Yu, Y. H. Kim and J. C. Kim. 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* 335: 488-498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>
- Männistö, M. K., E. Kurhela, M. Tirola and M. M. Häggblom. 2013. Acidobacteria dominate the active bacterial communities of Arctic tundra with widely divergent winter-time snow accumulation and soil temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 841: 47-59. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12035>

- Massena, V. and K. dos Santos. 2015. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agricultura. J. Basic Microbiol. 558: 931-949. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400898>
- Mohammadi, K. 2012. Phosphorus solubilizing bacteria, occurrence, mechanisms, and their role in crop production. *Resources and Environment*, 2: 80-85.
- Momose, A., N. Ohtake, K. Sueyoshi, T. Sato, Y. Nakanishi, S. Akao and T. Ohyama. 2009. Nitrogen fixation and translocation in young sugarcane *Saccharum officinarum* L. plants associated with endophytic nitrogen-fixing bacteria. *Microbes Environ.* 243: 224-230. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me09105>
- Morgan, J. A. W., G. D. Bending, and P. J. White. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56(417): 1729-1739. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Naveed, M., S. Mubeen, S. U. Khan, I. Ahmed, N. Khalid, H. A. Rasul-Suleria, A. Bano, and A. S. Mumtaz. 2014. Identification and characterization of rhizospheric microbial diversity by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Braz. J. Microbiol.* 453: 985-993. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000300031>
- Nopparat, C., M. Jatupornpipat, and A. Rittiboon. 2009. Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Witthayasan Kasetsat.* 435: 172-181. <https://cutt.ly/enacb2n>
- Pisa, G., G. Magnani, H. Weber, E. M. Souza, H. Faoro, R. A. Monteiro, E. Daros, V. Baura, J. P. Bepalhok, F. O. Pedrosa and L. M. Cruz. 2011. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 4412: 1215-1221. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500148>
- Quecine, M. C., W. L. Araújo, P. B. Rossetto, A. Ferreira, S. Tsui, P. T. Lacava, M. Mondin, J. L. Azevedo, and A. A. Pizzirani-Kleiner. 2012. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 7821: 7511-7518. <https://doi.org/10.1128/AEM.00836-12>
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria, A critical review. *LSMR.* 1-30. <https://cutt.ly/HnaxyPZ>
- Serna-Cock, L., C. Arias-García and L. J. Valencia Hernández. 2011. Efecto de la biofertilización sobre el crecimiento en maceta de plantas de caña de azúcar *Saccharum officinarum* L. *Biotecnol. sector agropecuario agroind.* 92: 85-95. <https://cutt.ly/gnavuV8>
- Sharma S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. and Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilizing microbes, sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus.* 2: 587. <https://cutt.ly/OnalT8X>
- Solanki, M. K., Z. Wang, F. Y. Wang, Ch. N. Li, T. J. Lan, R. K. Singh, P. Singh, L. T. Yang and Y. R. Li. 2017. Intercropping in sugarcane cultivation influenced the soil properties and enhanced the diversity of vital diazotrophic bacteria. *Sugar Tech.* 19: 136-147. <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0445-y>
- Souza, A. K. 2016. Bactérias promotoras de crescimento de plantas associadas à diferentes doses de fertilização nitrogenada na cultura do trigo. *Dissertação Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.* 59 p. <https://cutt.ly/VnalOhk>
- Swanson, K. M., R. L. Petran, and J. H. Hanlin. 2001. Culture methods for enumeration of microorganisms". In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* 4th ed. *Downs, F. P. and Ito, K. Eds. APHA. Washington.* 53-67.
- Torriente, D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en Cuba. Cult. Trop.* 311: 19-26. <https://cutt.ly/ynalAED>