





## Cinética de crecimiento in vitro de *Brevibacillus brevis* en diferentes medios de cultivo

### Kinetics of in vitro growth of *Brevibacillus brevis* in different culture media

Uldarico Bigurra-Quintero<sup>1</sup> ,  
 Rosalinda Mendoza-Villarreal<sup>2\*</sup> ,  
 Valentín Robledo-Torres<sup>2</sup> ,  
 José Rafael Paredes-Jácome<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Estudiante de Maestría en ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, CP. 25315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

<sup>2</sup>Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, CP. 25315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

\*Autor de correspondencia: ros-alindamendoza@hotmail.com

#### Nota científica

Recibida: 27 de mayo de 2019

Aceptada: 18 de mayo de 2020

**Como citar:** Bigurra-Quintero U, Mendoza-Villarreal R, Robledo-Torres V, Paredes-Jácome JR (2020) Cinética de crecimiento in vitro de *Brevibacillus brevis* en diferentes medios de cultivo. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 7(2): e2310. DOI: 10.19136/era.a7n2.2310

**RESUMEN.** El desarrollo de técnicas para la reproducción de rizobacterias benéficas del suelo abre una gama de alternativas para su investigación. El desconocimiento de condiciones químicas y físicas de un medio óptimo para el desarrollo *Brevibacillus brevis* generó la presente investigación al evaluar cinco medios de cultivo líquidos (SM 1%, SM 0.5%, SM 0.1%, LB y NFb), tres pHs (6, 7 y 8) y dos tiempos de incubación (48 y 96 h). El objetivo fue determinar un medio óptimo para la reproducción de la bacteria en laboratorio. Se estandarizaron los medios de cultivo, reactivo la cepa, tinción de Gram, inoculación, incubación para reproducción y recuento de bacterias. La interacción demostró que el medio SM 1% (Sábila y Melaza), con pH 7 y 48 h tuvo los mejores resultados, comparado con los otros medios y condiciones con  $15.38 \times 10^{11}$  UFC mL<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** *Bacillus*, melaza, rizobacterias, sábila, sustratos.

**ABSTRACT.** The development of techniques for the reproduction of soil beneficial rhizobacteria opens up a range of alternatives for your research. The ignorance of chemical and physical conditions of an optimal means for development *Brevibacillus brevis* generates this research by evaluating five liquid culture media (SM 1%, SM 0.5%, SM 0.1%, LB and NFb), three pHs (6, 7 and 8) and two incubation times (48 and 96 h). The objective of this work was to evaluate an optimal medium for the reproduction of the bacteria at the laboratory level. The methodology included processing, standardizing of culture media, reactivation of the strain, Gram staining, inoculation, incubation for reproduction and bacterial count. The triple interaction showed that the medium SM 1% (Sábila and Melaza), with pH 7 and 48 h had the best results, compared to the other media and conditions with  $15.38 \times 10^{11}$  CFU mL<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Aloe*, *Bacillus*, molasses, rhizobacteria, substrates.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos procariotas que se clasifican según su forma, temperatura y pH en el que se desarrollan, la estructura de su pared y por su requerimiento de oxígeno (Mollinedo y Gonzales 2014). También hay bacterias importantes como agentes de control biológico por su efecto antagonico frente a otros microorganismos (Földes *et al.* 2000). Las bacterias Gram positivas que forman endosporas se agrupan en el género *Bacillus*, las cuales se encuentran distribuidas en diversos hábitats tanto marinos como terrestres y a las especies asociadas a plantas; se les conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Chen *et al.* 2006). El término rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, (PGPR o plant growth promoting rhizobacteria), fue propuesto para bacterias que habitan en las raíces de las plantas y que ejercen un efecto positivo sobre los cultivos (Hernández-Rodríguez *et al.* 2006, Pedraza *et al.* 2010). En últimos años, el uso de este tipo de bacterias ha tenido una fuerte demanda, ya que esta nueva tecnología promete mejorar la productividad de los sistemas agropecuarios a largo plazo (Cassán y Díaz-Zorita 2016). El *Brevibacillus brevis* se clasifica de acuerdo a su genotipo y filogenética (Goto *et al.* 2004) actúa como agente de control biológico, presenta antagonismo frente a otros microorganismos, y producen sustancias antimicrobianas y antifúngicas, y promueven el crecimiento vegetal, debido a la producción de ácido indolacético (AIA), hormona utilizada para el desarrollo radical, vegetativo y producción de frutos (Reinoso-Pozo *et al.* 2012, Chalé-Carrillo *et al.* 2016). Estudios previos con *Brevibacillus brevis* indican que tiene efectos en el control de *Botrytis cinerea* (Edwards y Seddon 2001) y en *Rhizoctonia solani* en frijol (Hernández-Pérez y Díaz-Zorita 2018).

La utilización de sábila y melaza para desarrollo de microorganismos es una opción debido a los contenidos de sustancias que son vitales para el desarrollo de estos. Entre los componentes de la sábila (Domínguez-Fernández *et al.* 2012), se encuentran las antraquinonas, Vitaminas (B1, 2, 3 y 6, E, C, ácido fólico y beta caroteno), minerales (Calcio, mag-

nesio, potasio, zinc, fósforo y hierro), carbohidratos (celulosa, fructosa, glucosa, glucomanosa), enzimas (lipasa, amilasa y catalasa), aminoácidos (alanina, ácido aspártico, glicina, fenilalanina, ácido glutámico), lípidos (esteroides, giberelinas, ácido úrico, ácido salicílico, saponinas y triterpenos). Por otro lado, la melaza (Swan y Karalazos 1990) contiene 20% de agua sacarosa, 35%, glucosa 7%, levulosa 9%, sustancias reductoras 3%, carbohidratos estructurales 4%, cenizas 12%, compuestos nitrogenados 4.5%, compuestos no nitrogenados 5%, ceras, esteroides y esterofosfolípidos 0.4%, así como vitaminas en pequeña cantidad. Los medios de cultivo contienen sustancias en las que se desarrollan microorganismos debido a que les brinda de manera artificial las condiciones necesarias para su crecimiento (Negrón 2009), como el C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg y en menor cantidad el Fe, Mn, Zn, Cu y Mo (Pelczar *et al.* 2010). Además, de que tienen alto costo; como el medio de Luria Bertani (LB), que ha sido utilizado para aislar bacterias promotoras del crecimiento vegetal, otro es el NFb (Nitrogen free broth) el cual no tiene nitrógeno, quien identifica bacterias con capacidad de fijar nitrógeno (Mantilla-Paredes *et al.* 2009). Por otro lado, los factores como pH y la concentración del sustrato, afectan directamente en los patrones de crecimiento y formación de productos asociados con el metabolismo del microorganismo (Ossa *et al.* 2010). Por ello, en el presente trabajo se evaluaron los factores físico-químicos del sustrato para el óptimo desarrollo y reproducción *in vitro* de la bacteria *Brevibacillus brevis*, hacer eficiente el tiempo e insumos para la preparación de medios de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento y material biológico

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Horticultura, en Saltillo, Coahuila, México. Como material biológico se utilizó una cepa extraída de raíces de nopal e identificada mediante la técnica de PCR con la que se obtuvo una secuencia de aminoácidos que

se comparó con la base de datos BLAST<sup>®</sup>, determinando que es *Brevibacillus* sp. G12, la cual se conservó en congelación a -20 °C

### Tratamientos

Se establecieron treinta tratamientos con las combinaciones de medios de cultivo: Sábila y Melaza 1% (SM 1%), Sábila y Melaza 0.5% (SM 0.5%), Sábila y Melaza 0.1% (SM 0.1%), Luria Bertani (LB), Nitrogen Free broth (NFb), tres pHs: 6, 7 y 8, dos tiempos de incubación: 48 y 96h, y cuatro repeticiones por tratamiento.

### Reactivación de *Brevibacillus* sp. G12

La cepa bacteriana contenida en microtubos se descongeló a 32 °C por 1 h, pasado el tiempo se tomaron 160  $\mu$ L y se inocularon en 80 mL de medio nutritivo líquido Nitrogen Free broth (NFb) a pH 7, para luego incubar por 48 h a 32 °C. Después de dos días se realizaron diluciones seriadas 1 a 10, tomando 1 mL del caldo nutritivo y depositándolo en tubos de ensaye (kimble-KIMAX 16 x 150 mm) con 9 mL de agua destilada. De los tubos con dilución  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$  se tomaron 500  $\mu$ L de cada tubo y se depositaron en cajas de Petri (vaciado en placa) con medio NFb sólido a pH 6.8 sembrado en estría, para luego incubar por 48 h a 32 °C. Para cada tubo se utilizó una caja Petri por triplicado.

### Tinción de Gram

Se realizó después de 48 h de la reactivación de la bacteria, aplicando los reactivos para teñir y observar la bacteria en el microscopio con objetivo de 100X (López-Jácome *et al.* 2014).

### Preparación de medio de cultivo Sábila y Melaza (SM)

Para este medio SM se prepararon 3 concentraciones: melaza al 1% ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), al 0.5% ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) y 0.1% ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), mezclando para cada concentración con 1% de pulpa de sábila ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), los medios de cultivo de cada concentración se prepararon por triplicado. Con el potenciómetro (Hanna Hi-98128), se ajustó el pH a 6, 7 y 8. Se depositaron 80 mL de

medio SM en frascos con capacidad de 100mL a 120 °C por 15 min para esterilizar cada medio.

### Preparación del medio Luria Bertani (LB)

Para 1 L de medio se pesaron 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio. Una vez disueltos los ingredientes se ajustó el pH por separado a 6, 7 y 8. Se depositaron 80 mL de medio LB en frascos de 100 mL y se esterilizaron en autoclave a 120 °C por 15 min.

### Preparación de medio de cultivo Nitrogen Free broth (NFb)

Este medio de cultivo no tiene nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), por lo que permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente nitrógeno. Además, contiene ácido málico, principal fuente de carbono para la bacteria. Para la preparación de un litro de medio de cultivo se pesaron:  $0.04 \text{ g L}^{-1}$  Fosfato de potasio dibásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de Fosfato de potasio monobásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),  $0.01 \text{ g L}^{-1}$  de Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ),  $0.002 \text{ g L}^{-1}$  de Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ),  $0.002 \text{ g L}^{-1}$  de Sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ),  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  de Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ),  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  de Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ),  $2 \text{ g L}^{-1}$  de Ácido málico ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$ ),  $2 \text{ g L}^{-1}$  de Agar bacteriológico, y 6 gotas  $\text{L}^{-1}$  de Azul de bromotimol. Posteriormente, con un potenciómetro se reguló el pH a 6, 7 y 8. Para luego depositar 80 mL del medio NFb líquido en frascos con capacidad de 100 mL, los cuales se esterilizaron en autoclave a 120 °C por 15 min.

### Inoculación e incubación del microorganismo

Con una micropipeta se midieron 160  $\mu$ L de la bacteria sembrada en medio NFb líquido pH 7 y se depositaron en los medios nutritivos NFb, LB y SM contenidos en los frascos. Posteriormente, se colocaron en un agitador mecánico oscilatorio (Labnet 211DS), a temperatura de 32 °C a 100 RPM, para luego evaluar las rizobacterias a las 48 y 96 h. Por cada medio de cultivo se emplearon cuatro repeticiones.

## Diluciones

Para cada tiempo (48 y 96 h) y repeticiones se hicieron diluciones seriadas 1/10 tomando 1 mL del medio nutritivo con la bacteria, para luego depositar en un tubo de ensaye (kimble-KIMAX 16 x 150 mm) con 9 mL de agua destilada previamente esterilizada, el mismo procedimiento se aplicó con el segundo tubo, y así sucesivamente hasta llegar al undécimo tubo. Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de los tubos de la dilución  $10^{11}$ , que se depositaron en placas para su siembra por estría y posterior incubación. Después de 48 h se contabilizaron las UFC  $\text{mL}^{-1}$  de cada placa.

## Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial (5x3x2). Los factores incluyeron medio de cultivo (cinco niveles), pH (tres niveles) y tiempo de incubación (dos niveles). Los datos obtenidos se analizaron con el programa SAS 9.4 utilizando una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza (Tabla 1) muestra diferencias altamente significativas entre los factores individuales y las interacciones. En la Figura 1a, se observa que los mayores valores de UFC los tuvieron los medios de cultivo NFb pH 7 y SM 0.1% pH 7 con  $9.91$  y  $9.82 \times 10^{11}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Mientras que el medio de cultivo para NFb este resultado es 71.64% mayor al obtenido con pH 6 y 48.64% que con pH 8. En tanto que el medio SM 0.1% con pH 7 fue superior un 47.55% al obtenido con pH 6 y 59.98% mayor con pH 8. Al respecto, Sezonov *et al.* (2007) reportan que el crecimiento de *Escherichia coli* en medio LB está limitado por la disponibilidad del carbono y no por el pH, aunque considera que el pH alcalino causa la inhibición del crecimiento. Mientras que Jiménez-Delgadillo *et al.* (2018) encontraron que el pH y no la temperatura influyen en la tasa de crecimiento de *Bacillus subtilis* en caldo infusión papa. En tanto que Sánchez y Pérez (2018) reporta que al evaluar el crecimiento de *Pseudomonas* y *Azotobacter* en medios de cultivo agar tripton de soya y Asbhy a pH

7, no encontró efecto del pH en el crecimiento, por lo que concluyó que para las rizobacterias el pH 7 es el adecuado, lo que coincide con los resultados de la presente investigación.

**Tabla 1.** Cuadrados medios del recuento de bacterias con los diferentes factores evaluados.

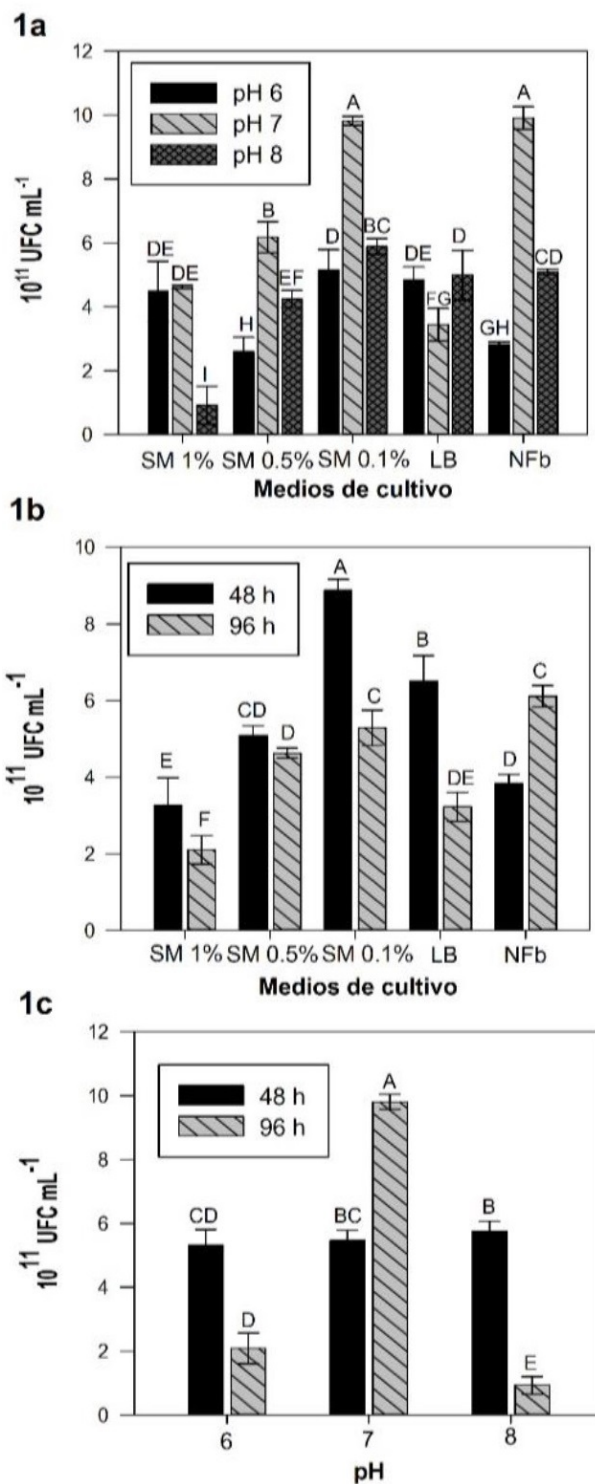
Fuente de Variación	Grados de Libertad	CM
		$10^{11}$ UFC $\text{mL}^{-1}$
Medio de Cultivo	4	73.86***
pH	2	145.55***
Tiempo	2	25.16***
Medio de Cultivo*pH	8	46.93***
Medio de Cultivo*Tiempo	8	33.22***
pH*Tiempo	4	166.14***
Medio de Cultivo*pH*Tiempo	16	49.00***
CV (%)		10.99

Tukey \*\*( $p \leq 0.001$ ), \*\*\*( $p \leq 0.0001$ ), CV = coeficiente de variación.

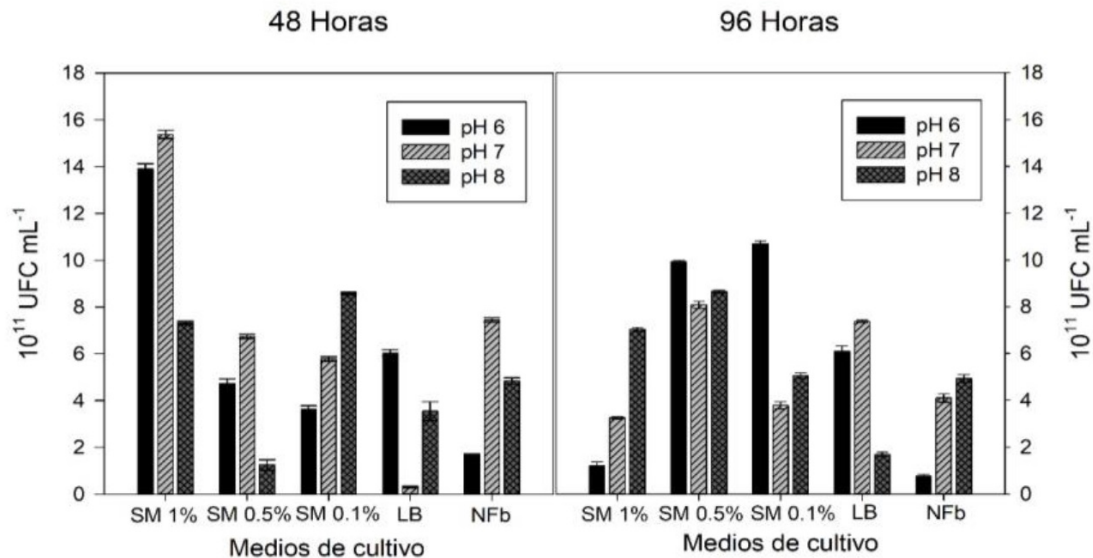
En la Figura 1b se observa que para el medio SM 0.1% a 48 h de incubación se produce la mayor concentración de bacteria con  $8.88 \times 10^{11}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , lo que presenta diferencias significativas sobre los otros tiempos de incubación, teniendo un aumento de 37.05% en relación con el tiempo de 96 h de incubación. Resultados similares fueron encontrados en el desarrollo de *Lactobacillus plantarum* con melaza como sustrato (Ossa *et al.* 2010), mientras que en bacterias fijadoras de nitrógeno con tiempos de incubación de 24 y 48 h, se reporta que con 48 h se tiene el mayor crecimiento (Muangthong *et al.* 2015).

El pH 7 por 96 h de incubación tuvo  $9.81 \times 10^{11}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , valor que es diferente significativamente con respecto a los otros resultados (Figura 1c). Al respecto, se reporta el rango óptimo de pH para las bacterias fluctuando de 6.0 a 8.5, pero sólo pocas bacterias prefieren un pH de 8.5 o mayor (Cervantes-Martínez *et al.* 2017). Al respecto, se observa que a las 96 h con pH de 7 se tuvo una diferencia del 78.7% en relación al pH 6 y de 90.52% para pH 8 a las 96 h, respectivamente. Para el medio SM 1%, pH 7 y 48 h de incubación se obtuvo el mayor crecimiento con  $15.38 \times 10^{11}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 2). Este valor es superior en un 9.62% con respecto a lo obtenido con el medio SM 1%, pH 6 y 48 h. Lo que coincide con aislados de la rizósfera de raíz con melaza de caña de azúcar con incubación de

24 h en medio Nfb (Mounthang *et al.* 2015). En relación al medio SM al 1% (Sábila-melaza) que produjo el mejor resultado, se puede deber a que la bacteria transforma la sacarosa en glucosa y fructosa como fuente de carbono y energía por medio de la enzima invertasa, lo que permite el aumento en la velocidad del crecimiento (Takehige y Ouchi 1995), aunado a que los minerales presentes como calcio, magnesio, fósforo y potasio ayudan a la reproducción de las bacterias (Ossa *et al.* 2010). Por otro lado, la sábila (*Aloe vera*) contiene 20 aminoácidos entre esenciales y no esenciales, enzimas y elementos minerales que son indispensables para el metabolismo y actividad celular (Contreras 2007), siendo complementarios la melaza y sábila al proveer los nutrientes necesarios que la bacteria requiere para su óptimo crecimiento, ya que la viabilidad de las bacterias se determina por la energía que requieren para crecer y mantenerse (Caltaneo *et al.* 2007). En relación al pH, *Brevibacillus brevis* es un microorganismo neutrófilo pudiendo ajustar el medio de crecimiento, lo que favorece el movimiento de sustancias a través de la membrana (Pírez y Mota 2000). Sin embargo, cuando el medio de crecimiento alcanza la alcalinidad el desarrollo de la bacteria tiende a disminuir, ya que afecta la permeabilidad de la membrana (Ossa *et al.* (2010). Mientras que a pH 7 aumenta 1.5 veces la cantidad de compuestos que controlan patógenos producidos por *Brevibacillus brevis* (Arumugan y Senthil, 2017). Para el tiempo de incubación se encontró que 48 h fue el tiempo de reproducción y desarrollo idóneo para *Brevibacillus brevis*, comparable con el tiempo utilizado por Sánchez-López *et al.* (2012), para la reproducción de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., ya que a 24 h la bacteria se encuentra en adaptación y el proceso de reproducción es parcial y en *Lactobacillus plantarum* con melaza al 20% como sustrato, encontraron que a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h, se tuvo el óptimo desarrollo con  $43 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, concentración que fue 100 veces mayor con una dilución de sábila y melaza al 1%. Las mejores condiciones para la reproducción de *Brevibacillus brevis* fueron con medio de sábila y melaza al 1% con pH 7, 100 RPM y 48 h de incubación.



**Figura 1.** Interacción entre el medio de cultivo y pH (1a); medio de cultivo y tiempo de incubación (1b); pH y tiempo de incubación (1c) en relación a la reproducción de *Brevibacillus brevis*. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 2.** Interacción del medio de cultivo, pH y tiempo de incubación en relación a la reproducción de *Brevibacillus brevis*.

## LITERATURA CITADA

- Arumugam T, Senthil Kumar P (2017) Optimization of media components for production of antimicrobial compound by *Brevibacillus brevis* EGS9 isolated from mangrove ecosystem. *Journal of Microbiological Methods* 142: 83-89.
- Cassán F, Díaz-Zorita M (2016) *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry* 103: 117-130.
- Cattaneo C, Larcher L, Togo S, Chaillou L (2007) Aplicación de método de Monte Carlo para el estudio de crecimiento de bacterias y levaduras. *Mecánica Computacional* 25: 3380-3393.
- Cervantes-Martínez J, Orihuela-Equihua R, Rutiaga-Quiñones J (2017) Acerca del desarrollo y control de microorganismos en la fabricación de papel. *Conciencia Tecnológica* 54: 54-58
- Chalé-Carrillo VM, Ruiz-Sánchez E, Reyes-Ramírez A, Borges-Gómez L, Cristobal-Alejo J, Pacheco-Aguirre J (2016) Crecimiento y respuesta a *Bemisia tabaci* en genotipos de *Capsicum annuum* inoculados con *Brevibacillus brevis* CEPA CBTC1. *Agrociencia* 50: 323-334.
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai W, Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Contreras-Pinzón M, Domínguez-Espinosa R, González-Burgos A (2007) Proceso de biotransformación láctica del jugo de *Aloe vera*. *Tecnología, Ciencia, Educación* 22: 35-42.
- Domínguez-Fernández RN, Arzate-Vázquez I, Chanona-Pérez JJ, Welte-Chanes JS, Alvarado-González JS, Calderón-Domínguez G, Gutiérrez-López GF (2012) El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11: 23-43.
- Edwards S, Seddon B (2001) Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal of Applied Microbiology* 91: 652-659.

- Földes T, Banhegyi I, Varga Z, Szageti J (2000) Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and epiphyte microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* 89: 840-845.
- Goto K, Fujita R, Kato Y, Asahara M, Yokota A (2004) Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (= NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 419-427.
- Hernández-Pérez D, Díaz-Castellanos M, Quiñones-Ramos R, Santos-Bermúdez R, Portal-González N, Herrera-Isla L (2018) Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales. *Centro Agrícola* 45: 55-60.
- Hernández-Rodríguez A, Heydrich-Pérez M, Velázquez-del Valle M, Hernández-Lauzardo A (2006) Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 42-49.
- Honig P (1974) Principios de tecnología azucarera. 2a ed. Compañía Edit. Continental. México. pp: 23-54.
- Jiménez-Delgadillo R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R, García-Hernández JL (2018) Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 256-275.
- López-Jácome L, Hernández-Durán M, Colín-Castro C, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas F (2014) Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad* 3: 10-18.
- Mantilla-Paredes AJ, Cardona G, Peña-Venegas CP, Murcia U, Rodríguez M, Zambrano MM (2009) Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de Biología Tropical* 57: 915-927.
- Mollinedo-Patzi MA y Gonzáles-Villalobos C (2014) Bacterias Gram negativas. *Revista de Actualización Clínica Investigada* 49: 2609.
- Muangthong A, Youpensuk S, Rerkasem B (2015) Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. *Tropical Life Sciences Research* 26: 41-51.
- Negrón M (2009) Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 2a ed. Edición Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 656p.
- Ossa J, Vanegas M, Badillo A (2010) Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 13: 97-104.
- Pedraza RO, Teixeira KR, Scavino A, de Salamone I, Baca BE, Azcón VR, Baldani LD, Bonilla R. (2010) Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11: 155-164.
- Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR (2010) *Microbiology: an application based approach*. 5th Edition. Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd. New Delhi. 918p.
- Pérez M, Mota M (2000) Morfología y estructura bacteriana. *Revista en Internet* 3: 23-42.
- Reinoso-Pozo Y, Vaillant-Flores D, Casadesús-Romero L, García-Pérez E, Pazos Álvarez-Rivera V (2007) Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad* 11: 35-40.

- Sánchez LDB, Pérez PJV (2018) Caracterización y evaluación de PGPRs sobre el crecimiento de plántulas de *Dioscorea rotundata in vitro*. *Agronomía Costarricense* 42: 33780-33798.
- Sánchez-López DB, Gómez-Vargas RM, Garrido-Rubiano MF, Bonilla-Buitrago RR (2012) Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 1401-1415.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology* 189: 8746-8749.
- Swan H, Karalazos A (1990) Las melazas y sus derivados. *Revista Tecnología* 19: 78- 82.
- Takeshige K, Ouchi K (1995) Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *Journal of fermentation and Bioengineering* 79: 449-452.