

Medios alternativos para el aislamiento de *Azotobacter* nativos de Calana - Tacna

Alternative media for the isolation of native Azotobacter from to Calana - Tacna

Resumen

La investigación sobre medios alternativos para el aislamiento de *Azotobacter* es importante para la obtención de biofertilizantes. El objetivo fue determinar si los medios de cultivo naturales que tienen como fuente de azúcar la sacarosa, la miel de abeja o la chancaca constituyen medios alternativos al medio de cultivo agar Ashby-2 manitol para el aislamiento de *Azotobacter* nativo de Calana, en Tacna. Se sembraron muestras de suelo de rizósfera de los cultivos de papa, lechuga y haba del distrito de Calana, en los medios de cultivo agar Asby-2 manitol (tratamiento control), agar Ashby-2 sacarosa, agar Ashby-2 miel de abeja y agar Ashby-2 chancaca (tratamientos experimentales), incubados a 27°C durante 72 horas. El aislamiento de *Azotobacter* se determinó cualitativamente por las características macroscópicas y microscópicas de las colonias que se desarrollaron en los medios de cultivo y que coincidieron con las descritas para *Azotobacter* en las referencias bibliográficas. En los cuatro medios de cultivo evaluados se desarrollaron colonias de *Azotobacter*, siendo los medios de cultivo más recomendables para su aislamiento y obtención como biofertilizante los medios alternativos agar Ashby-2 sacarosa y el de miel de abeja.

Palabras clave: aislamiento, ashby, *Azotobacter*, eficiencia, medios alternativos

Abstract

Research on alternative media for the isolation of Azotobacter is important for the production of biofertilizers. The objective was to determine if growing media with sucrose, bee honey or chancaca as sugar source constitute alternative media to the Ashby-2 mannitol agar medium for the isolation of native Azotobacter from Calana, Tacna. Rhizosphere soil samples from potato, lettuce and bean crops from Calana were sown in the growing: Asby-2 mannitol agar (control treatment), Ashby-2 sucrose agar, Ashby-2 honey agar, and Ashby-2 chancaca agar (experimental treatments), incubated at 27°C for 72 hours. The isolation of Azotobacter was qualitatively determined by the macroscopic and microscopic characteristics of the colonies that developed in the growing media, which coincided with those described for Azotobacter in the bibliographic references. In the four growing media evaluated, Azotobacter colonies developed, with the most recommended culture media for their isolation and obtaining as biofertilizer the alternative media Ashby-2 sucrose agar and honey agar.

Keywords: alternative media, ashby, azotobacter, efficiency, isolation

Artículo Original

Kely Paola Suricalllo-Menendez^{1*}
Marco Abad Mendoza-Atahuachi²
Nathalie Fabiana Valderrama-
Maquera³
Nayely Alejandra Yucra-Ayma⁴
Gina Milagros Arocutipa-Phatt⁵
Andrea Alejandra Velásquez
Gómez⁶

¹Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. <https://orcid.org/0009-0006-2283-5393>

²Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. <https://orcid.org/0009-0007-3285-4683>

³Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. <https://orcid.org/0009-0004-1476-6194>

⁴Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. <https://orcid.org/0009-0003-0260-7711>

⁵Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. <https://orcid.org/0000-0001-8567-7851>

⁶Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. <https://orcid.org/0009-0006-8495-8591>

Correspondencia:

*kpsuricallom@unjbg.edu.pe

Introducción

En el contexto global, la agricultura sostenible ha emergido como una prioridad crucial para garantizar la seguridad alimentaria y la conservación del medio ambiente. La búsqueda de prácticas agrícolas más ecológicas ha llevado a un interés creciente en los biofertilizantes, especialmente los basados en bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter* spp. Estas bacterias juegan un papel fundamental en la reducción del uso de fertilizantes químicos, por lo que contribuyen a la mitigación del cambio climático y la preservación de los recursos naturales. Numerosos estudios han resaltado la capacidad de *Azotobacter* para mejorar la fertilidad del suelo y aumentar los rendimientos de los cultivos. Países con grandes sectores agrícolas, como India y Brasil, han implementado programas nacionales para fomentar el uso de biofertilizantes. Estas iniciativas han demostrado que la aplicación de *Azotobacter* en los sistemas agrícolas puede resultar en una reducción significativa de los costos de producción y una menor dependencia de insumos sintéticos, promoviendo la agricultura orgánica y sostenible.

En el ámbito nacional, se ha comenzado a reconocer la importancia de los biofertilizantes en la promoción de prácticas agrícolas más sostenibles. El Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego ha desarrollado políticas y programas destinados a la investigación y aplicación de biofertilizantes. En este contexto, el aislamiento y uso de *Azotobacter* nativos es importante para maximizar los beneficios ecológicos y económicos de estos microorganismos en la agricultura (Reynoso et al., 2022).

En Calana, Tacna, hay un potencial considerable para el aislamiento y uso de *Azotobacter* nativos (Ibarra et al., 2021). Las características únicas del suelo y el clima de Calana son un entorno ideal para la investigación y desarrollo de este biofertilizante, cuyo aislamiento necesita de medios de cultivo. En el aislamiento de *Azotobacter* se emplean medios de cultivo comerciales, los cuales son costosos, por lo que es importante investigar medios de cultivo alternativos de menor costo para su aislamiento. Estas bacterias no solo fijan nitrógeno atmosférico, haciéndolo disponible para las plantas, sino que también promueven el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas y la mejora de la estructura del suelo. Su aplicación en los cultivos vegetales reduce la dependencia de fertilizantes químicos, los agricultores pueden disminuir sus costos y minimizar el impacto ambiental de sus actividades agrícolas (Guzmán & Montero, 2021).

La investigación sobre medios alternativos con costos menores a los comerciales para el aislamiento de *Azotobacter* es fundamental para reducir la inversión económica en el proceso que lleva al aislamiento y aplicación del *Azotobacter* en el suelo de los cultivos vegetales. Esto conlleva que los agricultores tengan más posibilidades de acceso para aplicar *Azotobacter* como biofertilizante, aumentar la productividad agrícola, contribuir a la sostenibilidad ambiental y ayudar a la resiliencia del ecosistema local.

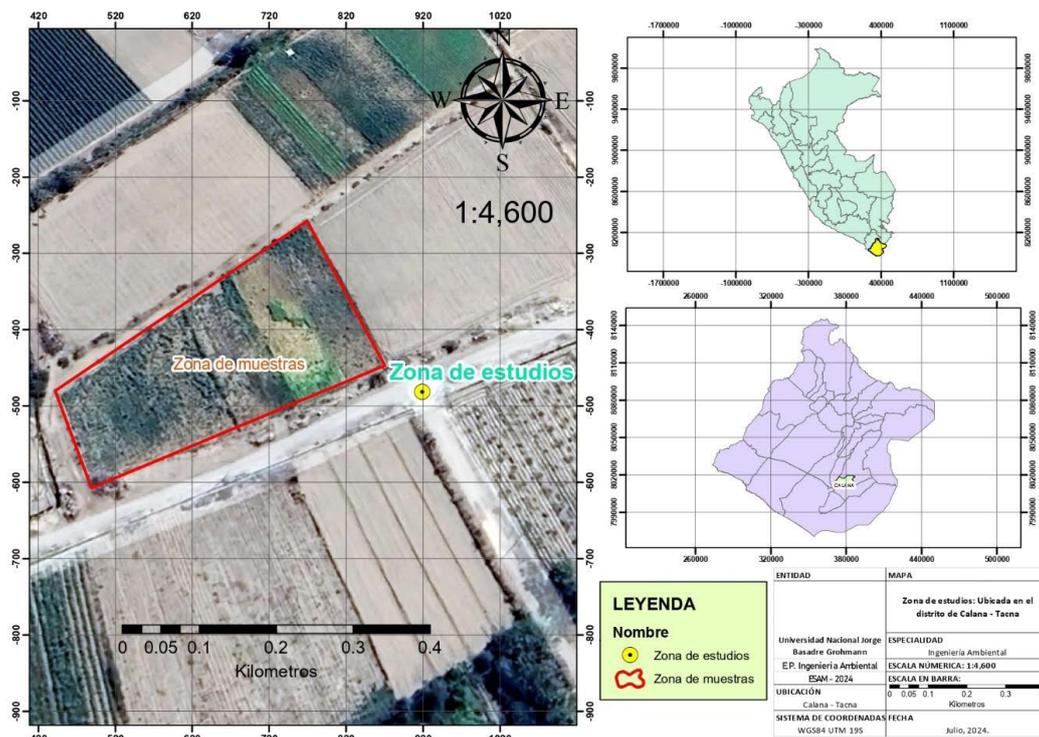
En este trabajo, se tuvo como objetivo evaluar tres medios de cultivo naturales no comerciales con base en la fuente de carbono para el aislamiento de *Azotobacter* nativos de Calana - Tacna, con el propósito de conocer si estos medios constituyen medios de cultivo alternativos al medio de cultivo comercial agar Ashby-2 que normalmente se usa para aislar *Azotobacter* y que es de mayor costo.

Material y métodos

El estudio fue básico, descriptivo y experimental. Se hizo trabajo de laboratorio y en campo. A nivel de campo se realizó muestreo de suelo de cultivos de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*), lechuga (*Lactuca sativa*) y haba (*Vicia faba*) del distrito de Calana de la región de Tacna. Se tomaron seis muestras de suelo a lo largo de las zonas de muestreo en forma de zig-zag a una profundidad aproximada entre los 10 y 15 cm (Martyniuk & Martyniuk, 2003; Tejera et al., 2005) (2 de cultivos de papa, 2 de cultivo de lechuga y 2 de cultivo de haba) (figura 1), cada una con un peso de 2 kg que fueron colocadas en tapetes de plástico de primer uso y estas en un cooler.

Figura 1

Zona de estudio para la obtención de muestras de suelo de cultivos vegetales en Calana, Tacna



A nivel de laboratorio, terrones de aproximadamente un centímetro por lado de cada muestra de suelo de cultivo vegetal fueron sembrados, colocándolos en forma equidistante sobre la superficie del medio de cultivo contenido en una placa de Petri para aislar *Azotobacter*. Los medios de cultivos empleados fueron agar Ashby-2 manitol (medio control), agar Ashby-2 sacarosa, agar Ashby-2 miel de abeja y agar Ashby-2 chancaca (medios alternativos).

El agar Ashby-2 tuvo en su composición (g/100 ml de agua destilada) 0,01 de fosfato dipotásico, 0,01 de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,01 de cloruro de sodio, 0,005 de sulfato de calcio dihidratado, 0,25 de carbonato de calcio, 1,5 de agar, 0,5 de glutamato de sodio. Si el azúcar del agar Ashby-2 fue el manitol, el medio se llamó agar Ashby-2 manitol; si fue sacarosa, agar Ashby-2 sacarosa; si fue miel de abeja, agar Ashby-2 miel de abeja, y si fue chancaca, agar Ashby-2 chancaca. La concentración de azúcar (g/100 ml de agua destilada) en el medio agar Ashby-2 fue de 0,75 de manitol, 1,41 de sacarosa, 0,59 de miel de abeja y 1,56 de chancaca.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 minutos a una libra de presión. Cada una de las tres placas de Petri de los 4 medios de cultivo fueron sembrados colocando 2 a 3 terrones de muestras de suelo del cultivo de papa, haba y lechuga sobre la superficie del medio de cultivo. Por lo cual, en total se sembraron 36 placas de Petri, conteniendo el medio del cultivo agar Ashby-2 con una sola fuente de azúcar; estas placas fueron envueltas con papel Kraf e incubadas a 27 °C durante 3 días (72 horas). Las colonias de bacterias desarrolladas en las placas fueron caracterizadas cualitativamente en forma macroscópica y microscópica en función del color, la forma, el borde, la superficie, el tamaño y la coloración de Gram. Los datos registrados fueron comparados con las descritas para *Azotobacter* (Ibarra *et al.*, 2020). En las placas donde hubo colonias compatibles a *Azotobacter* se consideró como placa con medio de cultivo adecuado para el aislamiento de *Azotobacter*.

Resultados

Muestras de suelo evaluadas para el aislamiento de *Azotobacter*

Las muestras del suelo de la rizosfera de los cultivos de lechuga, haba y papa fueron sembrados y codificados en cada uno de los medios de cultivo agar Ashby-2 manitol (como medio control), agar Ashby-2 sacarosa, agar Ashby-2 miel de abeja y agar Ashby-2 chancaca (como medios alternativos) (tabla 1), siguiendo la metodología para alcanzar el objetivo de la investigación.

Tabla 1

Muestras de suelo provenientes de cultivo vegetales sembrados en medios de cultivo para el aislamiento de *Azotobacter*

Muestra de suelo	Medio de cultivo	Código de muestras de suelo	Cultivo vegetal
M-1	Ashby-2 - manitol	A2-M1-L1	lechuga
M-2	Ashby-2 - manitol	A2-M2-L2	lechuga
M-3	Ashby-2 - manitol	A2-M3-L3	lechuga
M-4	Ashby-2 - manitol	A2-M1-H1	haba
M-5	Ashby-2 - manitol	A2-M2-H2	haba
M-6	Ashby-2 - manitol	A2-M3-H3	haba
M-7	Ashby-2 - manitol	A2-M1-P1	papa
M-8	Ashby-2 - manitol	A2-M2-P2	papa
M-9	Ashby-2 - manitol	A2-M3-P3	papa
M-1	Ashby-2 - sacarosa	A2-S1-L1	lechuga
M-2	Ashby-2 - sacarosa	A2-S2-L2	lechuga
M-3	Ashby-2 - sacarosa	A2-S3-L3	lechuga
M-4	Ashby-2 - sacarosa	A2-S1-H1	haba
M-5	Ashby-2 - sacarosa	A2-S2-H2	haba
M-6	Ashby-2 - sacarosa	A2-S3-H3	haba
M-7	Ashby-2 - sacarosa	A2-S1-P1	papa
M-8	Ashby-2 - sacarosa	A2-S2-P2	papa
M-9	Ashby-2 - sacarosa	A2-S3-P3	papa
M-1	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA1-L1	lechuga
M-2	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA2-L2	lechuga
M-3	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA3-L3	lechuga
M-4	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA1-H1	haba
M-5	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA2-H2	haba
M-6	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA3-H3	haba
M-7	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA1-P1	papa
M-8	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA2-P2	papa
M-9	Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA3-P3	papa
M-1	Ashby-2 - chancaca	A2-C1-L1	lechuga
M-2	Ashby-2 - chancaca	A2-C2-L2	lechuga
M-3	Ashby-2 - chancaca	A2-C3-L3	lechuga
M-4	Ashby-2 - chancaca	A2-C1-H1	haba
M-5	Ashby-2 - chancaca	A2-C2-H2	haba
M-6	Ashby-2 - chancaca	A2-C3-H3	haba
M-7	Ashby-2 - chancaca	A2-C1-P1	papa
M-8	Ashby-2 - chancaca	A2-C2-P2	papa
M-9	Ashby-2 - chancaca	A2-C3-P3	papa

Características macroscópicas y microscópicas de *Azotobacter*

Las colonias aisladas de *Azotobacter* se observaron en los 4 medios de cultivo evaluados; tuvieron variadas características macroscópicas de forma, tamaño, borde y superficie y microscópicas de forma, tamaño y coloración de Gram. Estas características coincidieron con las reportadas en la bibliografía para *Azotobacter*. En algunas muestras de suelo sembradas en los medios de cultivo no se pudo determinar la presencia de *Azotobacter* porque estuvieron contaminadas (tabla 2) (figura 2) (figura 3) (figura 4).

Tabla 2

Características macroscópicas y microscópicas de Azotobacter considerando el medio de cultivo, el cultivo vegetal y la muestra de suelo para su aislamiento

Medio de cultivo	Código de muestras de suelo	Cultivo vegetal	Características macroscópicas de colonia	Características microscópicas	Presencia de <i>Azotobacter</i>
Ashby-2 - manitol	A2-M1-L1	lechuga	-	-	contaminada
	A2-M2-L2	lechuga	-	-	contaminada
	A2-M3-L3	lechuga	1, 2, 6	4, 7	sí
	A2-M1-H1	haba	-	-	contaminada
	A2-M2-H2	haba	-	-	contaminada
	A2-M3-H3	haba	1, 2, 3	1	sí
	A2-M1-P1	papa	1, 2	6	sí
	A2-M2-P2	papa	-	-	contaminada
	A2-M3-P3	papa	1, 2	6, 7	sí
Ashby-2 - sacarosa	A2-S1-L1	lechuga	-	-	contaminada
	A2-S2-L2	lechuga	1, 2	-	sí
	A2-S3-L3	lechuga	1, 4	4, 7	sí
	A2-S1-H1	haba	1, 2	6, 7	sí
	A2-S2-H2	haba	-	-	contaminada
	A2-S3-H3	haba	1, 6	4	sí
	A2-S1-P1	papa	-	-	contaminada
	A2-S2-P2	papa	2, 6	1	sí
	A2-S3-P3	papa	1	1	sí
Ashby-2 - miel de abeja	A2-MA1-L1	lechuga	-	-	contaminada
	A2-MA2-L2	lechuga	-	-	sí
	A2-MA3-L3	lechuga	-	-	sí
	A2-MA1-H1	haba	-	-	contaminada
	A2-MA2-H2	haba	-	-	contaminada
	A2-MA3-H3	haba	2, 3	1, 7	sí
	A2-MA1-P1	papa	-	-	contaminada
	A2-MA2-P2	papa	1, 2	6	sí
	A2-MA3-P3	papa	1, 3	1, 4	sí
Ashby-2 - chancaca	A2-C1-L1	lechuga	-	-	contaminada
	A2-C2-L2	lechuga	-	-	contaminada
	A2-C3-L3	lechuga	-	-	contaminada
	A2-C1-H1	haba	-	-	contaminada
	A2-C2-H2	haba	1	1	sí
	A2-C3-H3	haba	-	-	contaminada
	A2-C1-P1	papa	1, 2	1, 6	sí
	A2-C2-P2	papa	1, 2	1	sí
	A2-C3-P3	papa	-	-	contaminada

Características macroscópicas 1: circular, lisa, crema brillante; 2: circular, regular, elevada, transparente brillante; 3: ovalada, irregular, elevada, lisa, crema humo; 4: circular, regular, elevada, lisa, verde fosforescente; 5: circular, regular, elevada, lisa, marrón; 6: circular, regular, elevada, lisa, transparente brillante, presencia de halo; 7: circular, regular, elevada, lisa, marrón, presencia de halo.

Características microscópicas 1: bacilo largo y ovoide; 2: cocobacilos; 3: bacilos; 4: bacilos pequeños; 5: cocoides; 6: bacilos grandes; 7: bacilos ovoide con quiste.

Figura 2

Colonias de *Azotobacter* en los medios de cultivo agar Ashby-2 manitol, sacarosa (azúcar), miel de abeja y chancaca

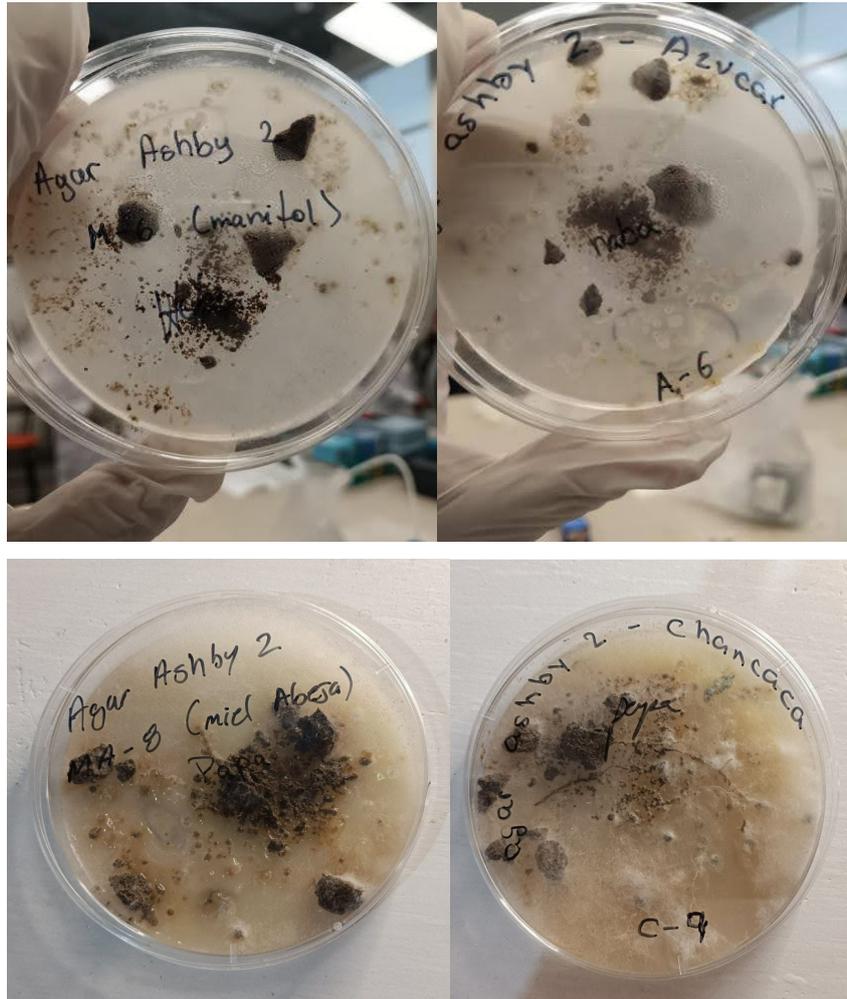


Figura 3

Bacterias coloreadas de *Azotobacter* aislado de la muestra de suelo del cultivo de lechuga en el medio de cultivo agar Ashby-2 manitol (izquierda) y en el agar Ashby-2 manitol Ashby-2 miel de abeja (derecha)

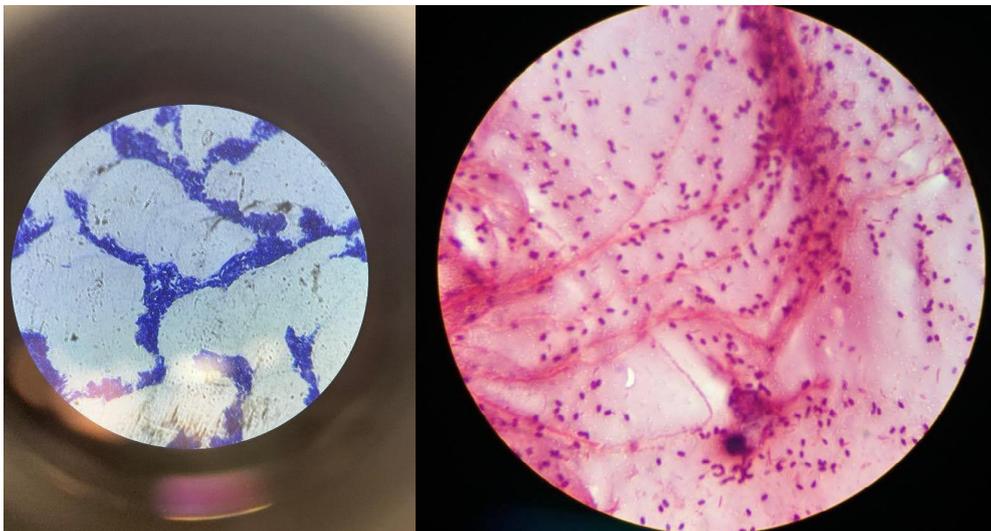
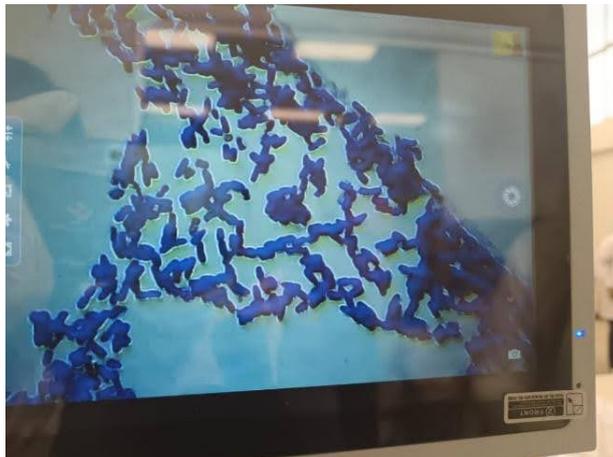


Figura 4

Bacterias coloreadas de *Azotobacter* aislado del suelo de cultivo de lechuga en agar Ashby-2 manitol observadas en el monitor de la computadora



Todos los medios de cultivo alternativos y control fueron adecuados para el aislamiento de *Azotobacter*; se desarrollaron colonias que provinieron de muestras de suelo de los cultivos de lechuga, papa y haba. El medio agar Ashby-2 sacarosa fue el mejor medio de cultivo para el aislamiento de *Azotobacter* en relación con los otros medios de cultivo, considerando que en ella se desarrollaron colonias de *Azotobacter*, pero de un mayor número de muestras de suelo de los cultivos vegetales (tabla 3).

Tabla 3

Medios de cultivo donde se desarrollaron colonias de Azotobacter provenientes de muestras de suelo de la rizosfera del cultivo de lechuga, papa y haba

Medio de cultivo	Cultivo vegetal	Muestras de suelo con <i>Azotobacter</i>	Muestras de suelo sin <i>Azotobacter</i>
Agar Ashby-2 sacarosa	lechuga - papa - haba	6	3
Agar Ashby-2 miel de abeja	lechuga - papa - haba	5	4
Agar Ashby-2 chancaca	lechuga - papa - haba	3	6
Agar Ashby-2 manitol	lechuga - papa - haba	4	5

Discusión

En el aislamiento de *Azotobacter* existen varios medios de cultivo comerciales que tienen en común como fuente de carbono un azúcar. Alvarado y Gutiérrez (2020) emplearon el agar Pikovskaya para la detección de microorganismos solubilizadores de fosfato del suelo, un medio elaborado a base de extracto de levadura que provee nutrientes esenciales para las bacterias y de dextrosa como fuente de carbono para el crecimiento bacteriano, beneficios para los suelos de cultivos vegetales. Padron *et al.* (2018), en el medio Pikovskaya, aisló cepas de *Azotobacter* que una vez purificadas sirvieron para que preparara inóculos de esta bacteria en el mismo medio Pikovskaya y en el medio de cultivo Ashby, demostrando que estos dos medios sirven para aislar *Azotobacter*, que tiene la capacidad de solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno en suelos; por esto, el agar Ashby que tiene como fuente de carbono al manitol usualmente se usa como un medio selectivo comercial para el aislamiento de *Azotobacter*, que es fijadora de nitrógeno y biofertilizante (Ibarra *et al.*, 2021).

El aislamiento de *Azotobacter* a 27°C con una incubación de 72 h en los medios: Ashby-2 manitol, sacarosa, miel de abeja y chancaca como fuente de azúcar constituyen las condiciones ambientales y los medios de cultivo adecuados para el aislamiento de *Azotobacter*. Según Clavijo *et al.* (2012) e Ibarra *et al.* (2021), el *Azotobacter* crece entre los 23°C a 27°C en 72 horas en los agares Ashby-1, Ashby-2 y medio *Azotobacter*. Cabe mencionar que el manitol del agar Ashby-2 manitol es un azúcar refinada y de costo alto. Por lo tanto, se demuestra que los medios Ashby-2 sacarosa, miel de abeja y de chancaca, al haber tenido como fuente de azúcar natural respectivamente a la sacarosa (azúcar de caña de azúcar), miel de abeja y chancaca, los cuales son azúcares naturales de mucho menos costo, constituyen medios alternativos al medio agar Ashby-2 manitol para el aislamiento de *Azotobacter* y que el medio Ashby-2 sacarosa y el de miel de abeja muestran mejores características que el agar Ashby-2 manitol para el aislamiento de *Azotobacter* porque sus colonias desarrolladas en ellas provienen de un mayor número de

muestras de suelo de los cultivos vegetales, respectivamente 6 y 5, en comparación a 4 del agar Ashby-2 manitol. Es posible que esto se deba a que los azúcares naturales, además de su azúcar propiamente dicho, presentan nutrientes adicionales como micronutrientes, entre otros, dependiendo del azúcar natural que favorece mucho más el crecimiento de *Azotobacter*.

Conclusiones

Los medios de cultivo, alternativos y control evaluados son adecuados para el aislamiento de *Azotobacter*, siendo los medios alternativos agar Ashby-2 sacarosa y el de miel de abeja mucho mejores que el agar Ashby-2 manitol para el aislamiento de *Azotobacter*, por lo que son más recomendables los medios alternativos agar Ashby-2 sacarosa y el de miel de abeja para aislar *Azotobacter*.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann y a la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental por su apoyo y colaboración en la presente investigación. Su dedicación y compromiso han sido fundamentales para el éxito de este proyecto, enriqueciendo significativamente nuestro conocimiento en el área de las ciencias ambientales y la biotecnología.

Referencias

- Alvarado Ibáñez, J. C., & Gutiérrez Araujo, M. K. (2020). Aislamiento y selección de rizobacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cultivos de *Theobroma cacao* L. *Revista Científica Dékamu Agropec*, 1(1), 15-20. <https://doi.org/10.55996/dekamuagropec.v1i1.21>
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna, Perú. *Ecología Aplicada*, 11(2), 89-102. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v11n2/a06v11n2.pdf>
- Guzmán Duchén, D., & Montero Torres, J. (2021). Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(2), 87-101. <https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99e>
- Ibarra Kocfú, J. A., Llica Flores, W. R., & Lazo Ramos, R. S. (2021). Determinación de la influencia de *Azotobacter* nativos en cultivos de *Raphanus sativus* como biofertilizante. *Ingeniería Investiga*, 3(1), 578-590. <https://doi.org/10.47796/ing.v3i1.482>
- Martyniuk, S., & M. Martyniuk. (2003). Occurrence of *Azotobacter* spp. in some Polish soils. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(3), 371-374.
- Padron, L., Torres Rodriguez, D. G., Olmos, J. C., López M., & Colmenares C. (2018). Aislamientos de cepas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo en un suelo Alfisol venezolano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(2). México, ME:285-97. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i2.1463>
- Reynoso Zárate, A. F., Cosme de la Cruz, R. C., Adama Rojas, E., & Quispe Huincho, M. R. (2022). *Producción de Biofertilizante Líquido Acelerado*. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - INIA. <https://hdl.handle.net/20.500.12955/1673>
- Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M. V., & González-López, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*, 270(1-2), 223-232.