

## Relación de la fijación de nitrógeno y la producción de auxinas en cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* procedentes de diferentes cultivos

### Relationships between nitrogen fixation and auxins production in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains from different crops

Marcia M. Rojas<sup>1</sup>, Anar J. Rodríguez<sup>2</sup>, Iván D. Trujillo<sup>3</sup>, Mayra Heydrich<sup>4</sup>

---

#### Resumen

Se determinó la capacidad de fijar nitrógeno mediante la actividad reductora de acetileno para 8 cepas de *G. diazotrophicus* aisladas de diferentes ecosistemas empleando el medio LGI-P. Además, se determinó la producción de auxinas a través del método de Salkowski y se analizó la influencia del aminoácido triptófano y del AIA en la actividad de la nitrogenasa. El triptófano, al igual que otros aminoácidos y las diferentes concentraciones de AIA, inhiben en distinta medida la actividad de la enzima solo parcialmente. Se demostró que las condiciones de nitro fijación no afectan la producción de AIA en esta bacteria. Esta relación entre ambas capacidades fisiológicas beneficiosas para los cultivos agrícolas pudiera tener gran importancia ya que pueden desarrollarse paralelamente, y potenciar la acción beneficiosa hacia la planta, basada en la dinitro fijación y la producción de auxinas estimuladoras del crecimiento vegetal.

**Palabras clave:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, auxinas, fijación de nitrógeno.

#### Abstract

The capacity to fix nitrogen of 8 strains of *G. diazotrophicus* from different ecosystems was determined by acetylene reduction assay using LGIP medium. Moreover, auxins production was determined by Salkowski's method and the influence of tryptophan and indoleacetic acid (IAA) in the nitrogenase activity were analyzed. The tryptophan as other aminoacids and different concentrations of IAA, inhibit at different levels

- 
- 1 Profesora asistente, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. marcia@fbio.uh.cu
  - 2 Profesora asistente, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
  - 3 Estudiante de postgrado, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
  - 4 Profesora auxiliar, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

the nitrogen fixation only partially. There were demonstrated that the nitrogen fixation conditions do not affect the auxins production of this bacteria. This relationship between both crop beneficial physiological capacities should be a great importance since they may be parallelly developed, and enhance the beneficial action to the plant, based on dinitrogen fixation and stimulating plant growth auxins production.

**Key words:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, auxins, nitrogen fixation.

Recibido: febrero 2 de 2008

Aprobado: junio 16 de 2009

## Introducción

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) benefician a las plantas a través de diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la producción de hormonas (especialmente las auxinas) del crecimiento vegetal, el mejoramiento de la disponibilidad de nutrientes para la planta (la solubilización de fosfatos inorgánicos, la fijación de nitrógeno), y el control biológico de patógenos (Kloepper, 1993). Una gran parte de las bacterias identificadas para utilizarse como PGPB se han aislado de la rizosfera y pocas de estas han clasificado como endófitas (Manjula et ál., 2002; Sessitsch et ál., 2004; Kishore et ál., 2004).

*G. diazotrophicus* es una PGPB que se puede encontrar asociada con la caña de azúcar como endófito (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Esta especie ha sido objeto de estudio debido a su potencialidad para mejorar el crecimiento vegetal por su capacidad de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, la producción de auxinas, la solubilización de fosfatos y la liberación de sustancias antimicrobianas (Mowade y Bhattacharyya, 2000; Sevilla et ál., 2001; Muñoz-Rojas, 2005).

Se ha informado que esta bacteria, además de asociarse a la caña de azúcar y la chinche harinosa coligada a esta (*Saccharococcus sacchari*) (Muñoz-Rojas, 2005), se ha encontrado en otros cultivos agrícolas como el boniato (*Ipomoea batatas*), algunos pastos de forraje (*Pennisetum purpureum* Cameroon) (Paula et ál., 1991),

el cafeto (*Coffea arabica*) (Jiménez-Salgado et ál., 1997), la piña (*Ananas comosus*) (Tapia-Hernández et ál., 2000), el mango (*Mangifera indica*) (Muthukumarasamy et ál., 2002), wetland rice (*Oryza sativa* L.) (Muthukumarasamy et ál., 2005), entre otros.

*G. diazotrophicus* es una bacteria de especial interés porque además de su capacidad de fijar el nitrógeno en presencia de  $\text{KNO}_3$  y a valores de pH bajos (Stephan et ál., 1991), puede excretar casi la mitad del nitrógeno fijado en una forma potencialmente disponible para la plantas (Cojho et ál., 1993; Youssef et ál., 2004).

Además de la fijación biológica del nitrógeno se han podido determinar otras acciones beneficiosas que pueden ejercer estos microorganismos sobre las plantas. Se ha demostrado la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como ácido 3indolacético (AIA) y giberelinas en medio de cultivo por *G. diazotrophicus* (Fuentes-Ramírez et ál., 1993; Heydrich et ál., 1998; Bastián et ál., 1998, Jiménez-Salgado et ál., 1997), lo que contribuiría de manera general con el crecimiento de la planta.

Muñoz-Rojas et ál. (2005) demostraron que cuando se inocula *G. diazotrophicus* en plantas de caña de azúcar, la bacteria puede fijar ciertas cantidades de nitrógeno y promover el crecimiento de las plantas predominantemente a través de mecanismos hormonales, dependiendo de la variedad de caña de azúcar y del genotipo de la bacteria inoculada. Pedraza (2008) plantea que es necesario llevar a

cabo estudios más profundos para esclarecer las interrogantes que existen sobre la interacción entre los diazotrofos y la planta, lo cual es imprescindible para su utilización comercial.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó el presente trabajo, donde se analiza la relación que se establece, *in vitro*, entre la fijación biológica del nitrógeno y la producción de

ácido indolacético por la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

## Materiales y métodos

### Cepas bacterianas utilizadas

Se utilizaron 8 cepas de referencia de la especie *G. diazotrophicus* aisladas de diferentes ecosistemas que se listan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* utilizadas en el trabajo

Cepas	Origen	Referencia
PAI5(ATCC49037), PAI3 PRC1	Caña de azúcar, Brasil <i>Pennisetum purpureum</i> , Brasil	Cavalante y Dobereiner, 1988 Caballero-Mellado et ál., 1995
CFNCf52, UAPCf53	Cafeto, México	Jiménez-Salgado et ál., 1997
UAPAc10	Piña, México	Tapia-Hernández et ál., 2000
4-02, 1-05	Caña de azúcar, Cuba	Rojas, 2005

### Determinación de la influencia de la fijación de nitrógeno en la producción de auxinas

Se midió la producción de AIA por las cepas PAI5 (ATCC 49037) y 4-02 en el tiempo (24, 48,72 y 96 horas) a partir de lo cual se seleccionó el tiempo y las condiciones adecuadas para determinar la producción de esta auxina por todas las cepas en estudio. Se utilizó medio LGI-P líquido con las siguientes variantes en cuanto a las condiciones de nitro fijación y la presencia de triptófano.

- 0,132 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> y 100 µg. mL<sup>-1</sup> de Trp
- 0,132 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> y sin adición de Trp
- 2 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> y 100 µg. mL<sup>-1</sup> de Trp
- 2 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> y sin adición de Trp

Después del periodo de incubación indicado se centrifugaron los cultivos a 5000

rpm a durante 10 min. A los sobrenadantes se les adicionó el reactivo de Salkowski (Sawar et ál., 1992) en una relación 1:1. La mezcla se incubó durante 30 min en la oscuridad, y luego se midió la absorbancia a 530 nM en un espectrofotómetro. Previamente se realizó una curva patrón empleando soluciones de 5, 10, 15, 20, 40, 60, y 80 µgmL<sup>-1</sup> de AIA sintético.

### Determinación de la producción de auxinas de las 8 cepas en estudio

Se sembraron tubos con 5 mL de medio al 5% con los preinóculos preparados de cada una de las cepas en estudio y se incubaron a 30 °C en condiciones de agitación en zaranda. Para la determinación de la producción de auxinas se siguió la metodología previamente descrita y se tuvieron en cuenta las condiciones seleccionadas en el experimento anterior respecto a las condiciones de nitro fijación, la presencia de Trp y el tiempo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### ***Determinación de la influencia de aminoácidos y hormonas en la fijación de nitrógeno***

Para este experimento se utilizó la cepa 4-02 de *G. diazotrophicus*. Partiendo de una suspensión de células microbianas ajustada a la concentración  $10^8$  ufc correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland (NCCLS, 1993), se inocularon frascos de 10 ml que contenían 5 ml de medio LGI-P semisólido suplementado con AIA y ácido giberélico por separado a las concentraciones de 0,025; 0,25 y 2,5 mg/l y se incubaron 5 repeticiones por concentración por microorganismo a 30° C durante 48 horas. Luego se les extrajo el 12% del aire con jeringuillas y se les inyectó esa misma cantidad de acetileno, se incubaron durante 96 horas y se midió la reducción del acetileno a etileno en un cromatógrafo de gases por ionización de llamas acoplado a una computadora con el programa Biocrom mediante el cual se procesaron los resultados.

### ***Análisis biométricos***

Para los análisis biométricos se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza a todas las variables de los experimentos y después del Anova se aplicó el método SNK paramétrico o no paramétrico según el caso, utilizando el programa Statistica para Window versión 6.0.

## **Resultados y discusión**

### ***Influencia de la fijación de nitrógeno en la producción de auxinas***

En las últimas décadas se ha observado que las asociaciones entre los procariotas y las plantas son de gran importancia para la agricultura como herramienta para mejorar el rendimiento de los cultivos y la preservación del medioambiente, lo que se complementa con la reducción de los riesgos por el uso de fertilizantes químicos (Pedraza, 2008). *G. diazo-*

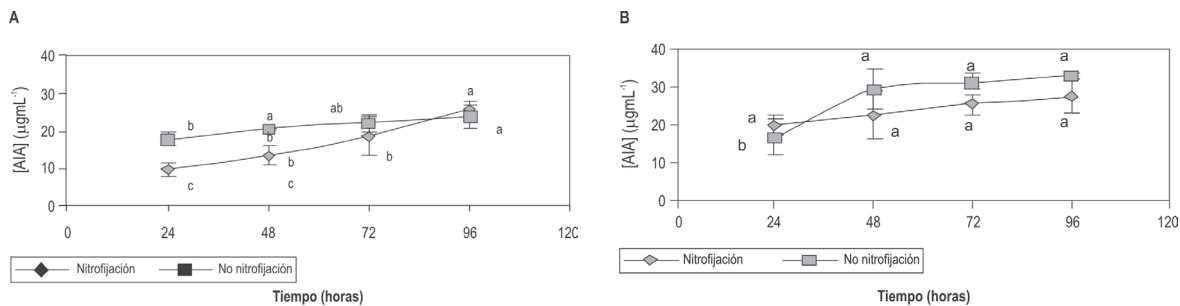
*trophicus*-caña de azúcar representa un sistema modelo de la asociación entre los diazotrofos y las monocotiledóneas, pero aún no se ha entendido totalmente dicha interacción.

Momose et ál. (2009) detectaron fijación de nitrógeno en tallos de plantas jóvenes de caña de azúcar y sugieren que esto se debe a la actividad de endófitos como *G. diazotrophicus* que se han descrito previamente en esa misma variedad (Asis et ál., 2000).

*G. diazotrophicus* también produce el ácido 3 indolacético (AIA), auxina natural de gran importancia y significativa actividad biológica (Arshad y Frankerberger, 1998; Velázquez et ál., 1999). Teniendo en cuenta estos aspectos, debería ser analizada y bien entendida la relación entre la FBN y producción de AIA para aplicar esta bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB) de la manera más eficaz en la agricultura sostenible.

El triptófano (Trp) es un aminoácido esencial que sirve como precursor fisiológico para la biosíntesis de auxinas en plantas y microorganismos. Muchos investigadores han informado un incremento en la biosíntesis de auxinas en suelos rizosféricos suplementados con Trp (Frankenberger y Poth, 1987). En este experimento se determinó cómo se afecta la producción de AIA *in vitro* por la presencia de Trp como inductor y las condiciones de nitrificación, lo cual se puede observar en la figura 1.

En este experimento se demostró que en las dos variantes de concentración de nitrógeno en el medio de cultivo las cepas 4-02 y PA15 producen auxinas en presencia de Trp desde el primer día de crecimiento y de manera incrementada durante un periodo de 96 horas. Por el contrario, la producción de auxinas en ausencia de Trp fue nula, independientemente de si existió suplemento de nitrógeno o no. Teniendo en cuenta este resultado se podría asumir que la vía principal de biosíntesis de AIA en *G. diazotrophicus* es dependiente de la presencia de Trp. Resultados contrastantes fueron obtenidos por Rojas (2005), quien empleó el medio SYP para



**Figura 1.** Producción de auxinas de *G. diazotrophicus* (A: PA15 (ATCC 49037) y B: 4-02) en presencia de Trp, en condiciones de nitro fijación y no nitro fijación. Las letras no comunes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras indican la desviación estándar de la media de 3 repeticiones.

la cuantificación del AIA para las mismas cepas de *G. diazotrophicus*. En este caso la bacteria produjo las hormonas en ausencia de Trp añadido, pero no escapa su presencia en el medio con extracto de levadura, la cual es una fuente de aminoácidos.

Se han descrito 3 vías fundamentales para la producción de AIA para las plantas y los microorganismos las cuales son dependientes de triptófano (Normanly y Bartel, 1999). Evidentemente *G. diazotrophicus* debe utilizar una de ellas, según se muestra en los experimentos realizados.

De acuerdo con los resultados obtenidos para las cepas PA1 5 y 402 se decidió realizar el estudio de producción de AIA en condiciones de nitro fijación para todas las cepas (no se realizó este ensayo sin nitro fijación debido a que no existieron diferencias significativas en la producción de AIA bajo las dos variantes de nitro fijación). Se seleccionaron las 96 horas como el tiempo óptimo de producción para todas las cepas del estudio debido a que existió diferencia significativa entre las concentraciones de AIA producidas entre 72 y 96 h en condiciones de nitro fijación por la cepa PA15, que es la cepa tipo de la especie.

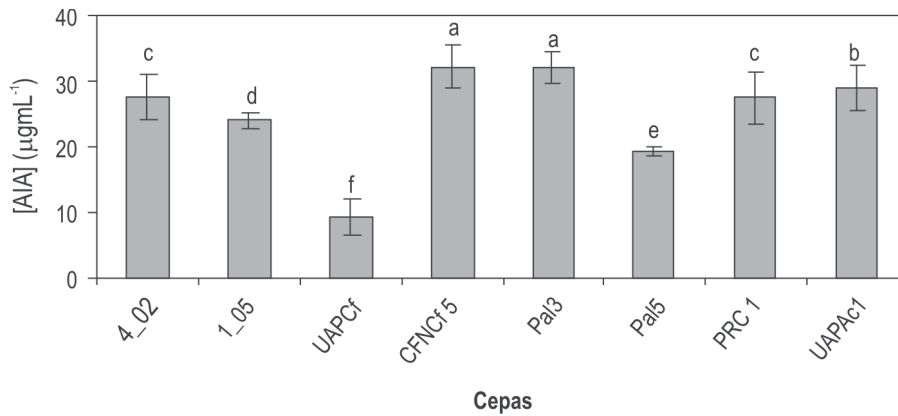
Los resultados expresados en la figura 2 indican que todas las cepas de *G. diazotrophicus* del estudio son productoras de auxinas. El rango de concentraciones varió desde  $9,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  hasta  $32,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ , donde UAPCf 53 fue el menor productor y CFNCf 52 el mayor. La pro-

ducción de AIA se comporta para las diferentes cepas en orden decreciente como se señala a continuación: CFNCf 52, Pal 3, UAPAc10, 4-02, PRC 1, 1-05, Pal 5 y UAPCf 53, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas, según lo mostrado en la figura 2.

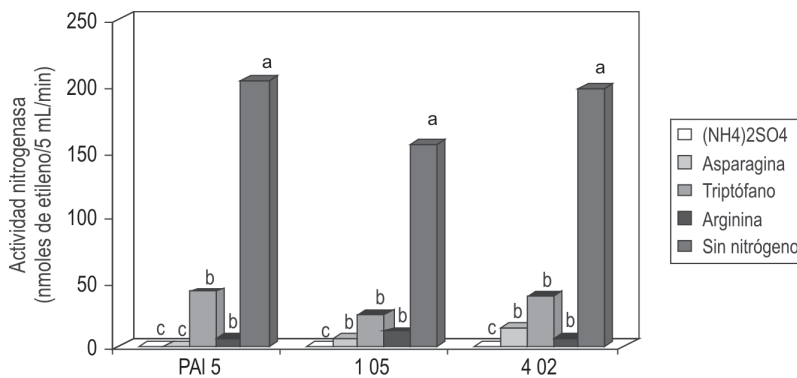
Los valores de auxinas obtenidos son comparables con los de otras bacterias como *Azospirillum* y *Azotobacter* según lo probado por Fuentes-Ramírez et ál. (1993). Igualmente, si comparamos la producción de la hormona con otros nitro fijadores como *Azospirillum* y *Herbaspirillum* se encuentran en el mismo rango, pero siempre mayores que este último género (Ríves, 2006).

### ***Influencia de aminoácidos y hormonas en la fijación de nitrógeno***

Cuando se añaden aminoácidos al medio de cultivo se evidencia una inhibición parcial de la actividad enzimática (figura 3). Resultados similares se encontraron con las cepas PA1 3 y la PA1 5 con otros aminoácidos (Stephan et ál., 1991; Reis y Dobereiner, 1998), aunque estos autores demostraron que la inhibición frente a los aminoácidos depende de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y de la cepa en cuestión, como se puede apreciar para la asparagina, que inhibe totalmente la actividad de la nitrogenasa en la cepa PA15, lo que no ocurre con las cepas 4-02 y 1-05. Se ha comprobado que todas las cepas tienen buen crecimiento en



**Figura 2.** Auxinas producidas por cepas de *G. diazotrophicus* a las 96 h de cultivo en medio LGI-P con triptófano en condiciones de nitrificación. Las letras no comunes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras indican la desviación estándar de la media de 3 repeticiones.



**Figura 3.** Actividad nitrogenasa de cepas de *G. diazotrophicus* (PAI 5, 4-02 y 1-05) en medio LGI con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, asparagina, triptófano y arginina como fuentes de nitrógeno y sin nitrógeno a las 48 horas. Medias de 3 repeticiones. Letras no comunes indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  para cada una de las cepas.

presencia de estos y otros aminoácidos, siendo mayor estadísticamente con la asparagina (Rodríguez et ál., 2002, Tejera et ál., 2004).

Tejera et ál. (2004) detectaron la presencia de varios aminoácidos y amonio en la savia de la caña de azúcar, siendo las concentraciones de amonio tanto en el fluido apoplástico como en el simplástico mucho menores que las de los aminoácidos. Esto favorecería la fijación de nitrógeno por esta bacteria, si se tienen en cuenta los resultados obtenidos respecto a la inhibición de la actividad nitrogenasa por estos compuestos del nitrógeno y pudiera tener importancia en la interacción planta-bacteria en sentido general, ya que se ha comprobado que

la presencia de triptófano estimula la producción de auxinas (Khalid et ál., 2001).

Muchos autores han abordado la influencia que pueden ejercer las fitohormonas producidas por los microorganismos sobre las plantas, pero son muy pocos los estudios realizados donde se analice la interacción endófito-planta en sentido contrario, respecto a la presencia de estimuladores del crecimiento vegetal.

En este trabajo se probó la capacidad de *G. diazotrophicus* para fijar nitrógeno en presencia de varias concentraciones de auxinas (AIA) y giberelinas (ácido giberélico, GA). La cepa 4-02

fija mayor cantidad de nitrógeno atmosférico en presencia de 0,025 mg/L de AIA, respecto a las otras concentraciones ensayadas, aunque la fijación es menor que en el medio donde no hay presencia de esta hormona (figura 4). Respecto a la presencia de giberelina, las mayores tasas de fijación de nitrógeno se obtienen cuando está presente esta hormona al 0,025 mg/L, la menor concentración ensayada.

Pudiera ser que para la fijación de nitrógeno esta cepa necesitara niveles menores de concentración de la fitohormona ya que se puede observar que la fijación de nitrógeno aumenta al disminuir tanto la concentración de AIA como la de GA, pero en el caso de esta última con la menor concentración utilizada hay una mayor actividad de la nitrogenasa (figura 4).

Los resultados son contrarios a los reportados por Christiansen-Weniger (1988) para *Azospirillum brasilense*, donde se muestra que el AIA a concentración de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> incrementa la fijación de nitrógeno y el GA a bajas concentraciones (0,025 mg.L<sup>-1</sup>) inhibe esta capacidad.

No está claro cómo las sustancias del crecimiento de la planta pueden interactuar con la actividad nitrogenasa de los microorganismos, pudiera ser un efecto realmente hormonal, comparable con el que estas sustancias realizan en la regulación de la fisiología de la planta.

Todas estas diferencias pudieran deberse a que la cepa de *Azospirillum brasilense* estudiada por estos autores se aisló de la rizosfera y la

utilizada en nuestro experimento proviene del interior de las plantas. Además, es obvio que las auxinas y giberelinas producidas por el propio microorganismo pueden estar involucradas en la fisiología de la bacteria.

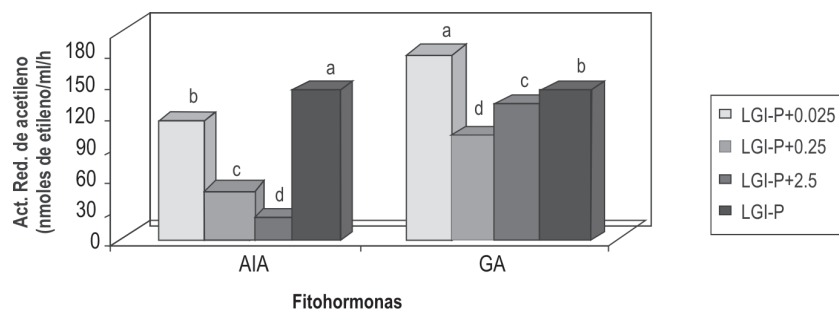
La medida de fijación de nitrógeno como actividad de reducción del acetileno por mg de proteína de 11 cepas de *G. diazotrophicus* a las 96 h (tiempo seleccionado con base en la curva patrón realizada) se muestra en la figura 5.

Estos resultados se corresponden con los encontrados por Lee et ál. (2002), quienes señalan que tanto la fijación de nitrógeno como la producción de ácido 3 indolacético pudieran contribuir a la promoción del crecimiento de la planta.

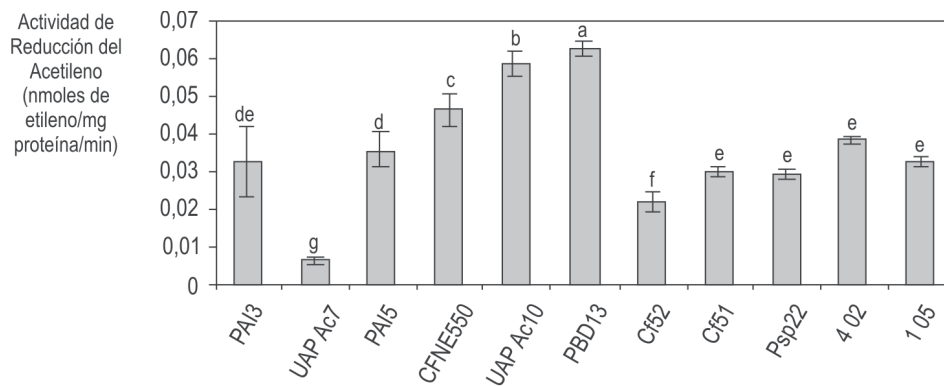
El estudio de la ecología de la interacción entre los endófitos y las plantas es de gran importancia. La influencia de los diferentes componentes de la planta en la selección y el desarrollo de la comunidad microbiana endófito es fundamental, teniendo en cuenta las perspectivas de utilización de estos microorganismos en el mejoramiento de los cultivos agrícolas.

## Conclusiones

Se corroboró que las cepas de *G. diazotrophicus* producen hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal del tipo de las auxinas y fijan nitrógeno atmosférico.



**Figura 4:** Influencia del ácido 3-indolacético y el ácido giberélico en la actividad nitrogenasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* 4-02. Las letras no comunes para cada hormona indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Media de 3 repeticiones.



**Figura 5.** Actividad nitrogenasa como actividad de reducción del acetileno de cepas de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sin nitrógeno. Letras no comunes indican diferencias significativas en la prueba SNK paramétrica para  $p < 0,05$ .

El ácido indolacético así como el triptófano inhiben parcialmente la actividad nitrogenasa de la especie *G. diazotrophicus*.

Las condiciones de nitro fijación no influyen notablemente en la producción de auxinas por esta bacteria, para lo cual hace falta suplemento del precursor triptófano.

## Referencias bibliográficas

- Arshad, M. F., Frankenberger, W. T. 1998. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Advances in Agronomy* 62: 45-51.
- Asis, C. A. Jr., Kubota, M., Chebotar, V. K., Ohta, H., Arima, Y., Nishiyama, K., Tsuchiya, K., Akao, S. 2000. Endophytic bacterial population in Philippine sugarcane cultivars and isolation of nitrogen-fixing strains. *Microbes Environ* 15: 209-216.
- Bastian, F. A., Cohen, P., Piccoli, V., Luna, R., Baraldi S., Bottini, R. 1998. Production of indole 3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24: 7-11.
- Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L. E., Reis, V. M., Martínez-Romero, E. 1995. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl Environ Microbiol* 61: 3008-3013.
- Cavalcante, V. A., Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Cojho, E. H., Reis, V. M., Schenberg, A. C., Döbereiner, J. 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol Lett* 106: 341-346.
- Christiansen-Weniger, C. 1988. An influence of plant growth substances on growth and nitrogenase activity from *Azospirillum brasilense*, p. 141-149. In W. Klingmüller (ed.), *Azospirillum* IV. Berlin: Springer-Verlag.
- Frankenberger, W. T., Poth, M. 1987. Biosynthesis of indole 3 acetic acid by pine ecto mycorizal fungi *Pisolithus tictorius*. *Appl Environ Microbiol* 53: 2908-2913.
- Fuentes-Ramírez, L. E., Jiménez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R., Caballero-Mellado, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154: 145-150.
- Heydrich, M., Rojas, M. M., Prieto, A., Manzano, J. 1998. Isolation and characterization of *Acetobacter diazotrophicus* from different varieties of sugar cane in Cuba. 16<sup>th</sup> North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Cancún, México.
- Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez, L. E., Tapia-Hernández, A., Mascarua-Esparza, M. A., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63 (9): 3676-83.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A., Khalid, M. 2001. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis. *Online Journal of Biological Sciences* 1: 750-754.



- Kishore, G. K., Pande, S., Podile, A. R. 2004. Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Letters in Applied Microbiology 40: 260-268.
- Kloepper, J. W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Soil Microbial Ecology. Metting, F. B. Jr. pp. 255-274.
- Lee, S., Pierson, E., Escamilla, E., Kennedy, C. 2002. Involvement of cytochrome *c* in the biosynthesis of IAA in *Gluconacetobacter diazotrophicus* and assessment of a role for IAA production in sugarcane growth enhancement. In: Nitrogen Fixation: Global Perspectives. Finan, T., M. O'Brian, D. Layzell, J. K. Vessey and W. Newton (eds.), CAB International.
- Manjula, K., Singh, S. D., Kishore, G. K. 2002. Role of endophytic bacteria in biological control of plant diseases. Annu Rev Plant Pathol 1: 231-252.
- Momose, A., Ohtake, N., Sueyashi, K., Sato, T., Nakonishi, Y., Akao S., Ohya, T. 2009. Nitrogen fixation and translocation in young sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants associated with endophytic nitrogen fixing bacteria. Microbes and Environment, Advanced Publication.
- Mowade, S., Bhattacharya, P. 2000. Resistance of P-solubilizing *Acetobacter diazotrophicus* to antibiotics. Current science 79 (11): 1591-1598.
- Muñoz-Rojas, J. 2005. La interacción *Gluconacetobacter diazotrophicus*-caña de azúcar como modelo para el estudio de la transmisión de bacterias benéficas. Elementos 57.
- Muñoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J. 2003. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effects on Plant Growth. Microb Ecol.
- Muñoz-Rojas, J., Fuentes-Ramírez, L. E., Caballero-Mellado, J. 2005. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. FEMS Microbiology Ecology 54: 57-66.
- Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vaidivelu, M., Janssens, D., Hoste, B., Gum, K. U., Park, K. D., Son, C. Y., Sa, T., Caballero-Mellado, J. 2005. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. Systematic and Applied Microbiology 28: 277-286.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshardri, S., Lakshminarasimhan, C. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. Current Science 83 (2): 137-145.
- NCCLS. 1993. Natural Committee for Clinical Laboratory Standards. "Performance standards for antimicrobial disk. Susceptibility Test". Approved standard M2-A5, 13 (24).
- Normanly J., Bartel, B. 1999. Redundancy as a way of life, IAA metabolism. Curr Opin Plant Biol 2: 207-213.
- Paula, M. A., Reis, V. M., Dobereiner, J. 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). Biol Fertil Soils 11: 111-115.
- Pedraza, O. 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. Int Journal of Food Microbiology 125: 25-35.
- Reis, V. M., Dobereiner, J. 1998. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. Arch Microbiol 171: 13-18.
- Rives, N. 2006. Caracterización de géneros bacterianos rizosféricos y endófitos asociados al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis en opinión al título académico de Maestro en Microbiología. Instituto de Investigaciones del Arroz, Departamento de Protección de Plantas, La Habana, Cuba.
- Rodríguez, A., Pérez, J., Rojas, M., Manzano, J., Heydrich, M. 2002. Fijación biológica del nitrógeno. Contribución a la educación y la protección ambiental 3. Sopor-te magnético.
- Rojas, M. M. 2005. Caracterización de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* aisladas de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas en Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
- Sawar, M., Ashad, M., Martens, D. A., Frankenberger Jr., W. T. 1992. Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. Plant soil 147: 207-215.
- Sawar, M., Ashad, M., Martens, D. A., Frankenberger, W. T. Jr. 1992. Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. Plant soil 147: 207-215.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Berg, G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth promoting and antagonistic abilities. Can J Microbiol 50: 239-249.
- Sevilla, M., Burris, R. H., Gunapala, N., Kennedy, C. 2001. Comparison of Benefit to sugarcane plant growth and

- $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild type and NIF- mutant strains. *Molecular Plant Microbe Interaction* 14: 358-366.
- Stephan, M. P., Oliveira, M., Teixeira, K. R. S., Martínez-Drets, G., Dobereiner, J. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* 77: 67-72.
- Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L. E. 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecology* 39: 49-55.
- Tejera, N. A., Ortega, E., Rodés, R., Lluch, C. 2004. Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity, and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol* 50: 745-750.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., Hubel, D. H. 1977. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* 37: 1016-1024.
- Velázquez, M., Hernández, A., Heydrich, M., Hernández, A. N. 1999. Estudio de la interacción maíz-*Burkholderia cepacia*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41: 17-23.
- Youssef, H. H., Fayed, M., Monib, M., Hegazi, N. 2004. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biol Fertil Soils* 39: 391-397.