

## Revisión bibliográfica

# *Gluconacetobacter diazotrophicus*: UN MICROORGANISMO PROMISORIO EN LA ELABORACIÓN DE BIOPREPARADOS

Yoania Ríos<sup>✉</sup> y B. Dibut

**ABSTRACT.** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a recently discovered bacterium, is able to associate to vegetable species with high sugar levels. It permits to increase available nitrogen for the plant by nitrogen fixation process. The microorganism also releases up to 50 % of this transformed element. Besides, it allows yield increase by producing physiologically active substances. In spite of different theories for nature dispersion of the bacterium, as well as its colonization and distribution in vegetables, it is necessary to carry on studies for obtaining a product to increase growth, development and yield of important crops. Investigations to elucidate the controversial aspects by the international scientific community are very necessary too.

**RESUMEN.** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bacteria descubierta recientemente, se asocia a especies vegetales con altos contenidos de azúcares. Ello permite el incremento del nitrógeno disponible para la planta a partir del proceso de fijación biológica. El microorganismo libera al medio de hasta el 50 % de este elemento químico transformado. Además, posibilita el incremento de los rendimientos por la producción de sustancias fisiológicamente activas. A pesar de las diversas teorías en cuanto a la dispersión de la bacteria, así como de su colonización y distribución en el vegetal, es necesario realizar estudios para obtener un producto que incremente el crecimiento, desarrollo y rendimiento de importantes cultivos. Las investigaciones para dilucidar los aspectos controversiales por la comunidad científica internacional son también muy necesarias.

**Key words:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, biofertilizantes, nitrogen fixation, microorganisms

**Palabras clave:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, biofertilizantes, fijación del nitrógeno, microorganismos

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos endófitos viven en el interior de las plantas superiores, durante una parte considerable de su ciclo de vida (1).

La diversidad y el número de bacterias rizosféricas es muy grande y, por tanto, la competencia por los nutrientes también. Sobre esta base las bacterias endófitas tendrían ciertas ventajas (2), además de alguna protección ante condiciones adversas (3). El potencial de este grupo se amplió al comprobarse que, por sus efectos beneficiosos, pueden utilizarse en el control de hongos fitopatógenos (4). Igualmente, se ha demostrado que el interior de las

plantas es un ambiente propicio para la fijación biológica de nitrógeno (5). También se plantea que promueven el crecimiento vegetal por la producción de sustancias reguladoras (6).

### **GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS**

*G. diazotrophicus*, microorganismo aislado por primera vez por Cavalcante y Döbereiner (7) a partir de raíces y tallos de caña de azúcar, recibió el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans*, el que se modificó por *Acetobacter nitrocaptans* sobre la base de experimentos de hibridación ARN/ADN y ADN/ADN, nomenclatura que fue corregida por *Acetobacter diazotrophicus* (8) y en 1998 por su nombre actual (9).

Su descubrimiento abrió un nuevo capítulo en la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas, potencial que se amplió cuando se demos-

tró que libera hasta el 50 % del nitrógeno fijado (10) y produce diversas auxinas, principalmente ácido indol acético (11) y citocinas (12).

Pertenece a la familia *Acetobacteraceae*, la que a su vez se inserta en la subclase  $\alpha$ -Proteobacteria (13). En ella se incluyen bacterias aerobias, gram negativas o gram variables, que se caracterizan fenotípicamente por oxidar etanol a ácido acético en medios de cultivo con pH neutro o ácido (14). Genotípicamente puede ser distinguida por la presencia de dos sitios de restricción internos en la secuencia del gen 16S ADN-ribosomal. Dentro de ella se insertan los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Acidomonas* (9).

El genoma completo de *G. diazotrophicus* contiene aproximadamente 4.2 MB (15). En él se encuentran plásmidos de 20 a 170 KB, que pudieran conferirle ventajas competitivas y desempeñar funciones de

Ms.C. Yoania Ríos, Investigadora y Dr.C. B. Dibut, Investigador Titular del Laboratorio de Biofertilizantes, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), calle 2 esq. 1. Stgo. de las Vegas, La Habana, Cuba.

✉ yoania@inifat.co.cu

importancia en su asociación con las plantas (16); aunque se ha demostrado que algunas características fundamentales, como son la producción de ácido acético, oxidación de alcohol y lactato, fijación de nitrógeno y producción de ácido indol acético, no son codificadas por ellos; e inclusive, que los genes estructurales de la nitrogenasa se encuentran en el cromosoma (17).

El análisis de poblaciones del microorganismo muestra la presencia de una diversidad genética limitada de alrededor de 0.060. También se conoce que su estructura genética es de tipo clonal (16), análisis que permite suponer que su genoma presenta poca variabilidad.

El crecimiento óptimo de la bacteria se presenta a 30°C de temperatura y resulta más abundante en medios de cultivo que contienen 10 % de sacarosa y pH de 5.5. Sin embargo, puede crecer en concentraciones de sacarosa hasta del 30 % (7) y fijar nitrógeno en concentraciones de oxígeno del 4 % (18). Puede utilizar glucosa, fructosa o sacarosa, produciendo ácido a partir de estos sustratos (19). Con excepción de la sacarosa no usa otros disacáridos y no crece con ácidos dicarboxílicos como única fuente de carbono (20).

Produce y secreta una proteína con actividad levanosacarasa (21) que se expresa de forma constitutiva (22) y cataliza la transfructificación de la sacarosa a una variedad de aceptores incluyendo agua, glucosa, fructano y sacarosa (23). Se ha comprobado que, cuando hidroliza la sacarosa, da origen a oligofructanos y levana, los que pudieran favorecer a la bacteria durante la colonización (24) y/o conferir cierta respuesta defensiva a la planta (25).

## HOSPEDERO, COLONIZACIÓN Y DISPERSIÓN DE *G. diazotrophicus*

*G. diazotrophicus* se ha aislado de raíces lavadas y del interior del tallo de caña de azúcar cultivadas en Brasil, Australia, México, India, Ca-

nadá y Cuba (7, 26, 27, 28, 29, 30), en los tejidos internos de plantas adultas e hijuelos de piña (31) y de la rizosfera del cafeto (32). Se encuentra presente en vasos de xilema de raíces de maíz inoculadas artificialmente (33) y también se ha detectado ocasionalmente en la rizosfera de la caña de azúcar (34) y cereales (35), así como en algunos pastos de la variedad Camerúm, en el cultivo del boniato (36) y la chinche harinosa (37). Su rango de hospederos se amplió recientemente tras su aislamiento en los cultivos de zanahoria, rábano, remolacha (38), melón, papaya, flores (39), calabaza, yuca y malanga (40).

Los estudios de colonización de la bacteria, realizados mayoritariamente en caña de azúcar, demuestran que esta coloniza la superficie de las raíces y penetra a través de los sitios de emergencia de las raíces laterales y de la zona meristemática (41), para lo cual podría involucrar estructuras similares a los hilos de infección formados por *Rhizobium* (42).

Los sitios que coloniza el microorganismo y su distribución en el interior de la planta de caña de azúcar aún no se han esclarecido. Se ha demostrado que coloniza los espacios intercelulares de la raíz y los vasos del xilema (11). Otros estudios señalan que se localiza en espacios intercelulares del tallo correspondientes al apoplasto de plantas adultas (43). Ortega *et al.* (44) encontraron las mayores poblaciones microbianas en la zona apical de los tallos de caña de azúcar, donde existe mayor concentración de glucosa en la planta.

La dispersión en el interior del cultivo también es motivo de discrepancia. Algunos trabajos sugieren que *G. diazotrophicus* se dispersa en los tejidos internos a través de los vasos del xilema (22), y en otros se objeta que esta sea la vía de dispersión, argumentando que existen barreras morfológicas que impiden la comunicación del xilema de un internodo a otro (43). Al respecto, Dong *et al.* (45) observaron que, en condiciones de transporte activo, las bacterias penetran al xilema y son

transportadas a través de éste; sin embargo, se determinó que la acumulación de ellas en los nudos provoca la no funcionalidad de la estructura. No obstante, se plantea que prefiere los espacios intercelulares y tejidos vasculares como el xilema (46).

Considerando la presencia de la bacteria en plantas que se propagan asexualmente, se ha propuesto que su dispersión geográfica a gran distancia se lleve a cabo durante la reproducción del material vegetativo que alberga al microorganismo de forma natural (16), lo que se sustenta por el hecho de haberse encontrado poblaciones idénticas a la de la planta madre en esquejes previamente esterilizados (47). Otra hipótesis propone su transmisión a partir de la chinche harinosa, la cual podría succionar el jugo de la planta que contiene el microorganismo y transmitirla de igual forma a nuevas plantas (26, 46), teniendo en cuenta que se han aislado cepas de extractos del insecto que presentan una alta similitud con la cepa tipo de *G. diazotrophicus* (PAL-5) (48, 49).

Una tercera vía incluye a las esporas de algunos hongos micorrízicos del tipo vesículo-arbuscular (37), de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* (50). De hecho, se demostró experimentalmente que la introducción de *G. diazotrophicus* en caña de azúcar y trigo puede verse favorecida por la co-inoculación de esporas de estos hongos (51).

## CONDICIONES QUE AFECTAN LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE *G. diazotrophicus*

Algunas condiciones del entorno pueden afectar la capacidad de fijar nitrógeno de los organismos diazotrofos, por ejemplo, la presencia de oxígeno y amonio (52).

El efecto del oxígeno sobre la actividad de la nitrogenasa depende del suplemento de carbono y de la tasa de respiración de las células (53). Se ha observado que al aumentar la aireación se provoca un efecto positivo sobre el crecimiento (54).

En el caso del nitrógeno, la protección podría ser explicada por la baja asimilación de amonio que manifiestan las células del microorganismo cuando crecen al 10 % de sacarosa. Este mecanismo resulta de gran interés, considerando que el hábitat de la bacteria generalmente es rico en sacarosa, por lo que su nitrogenasa está activa aun cuando el microorganismo se encuentre rodeado de amonio (55).

También se ha demostrado que fija nitrógeno en condiciones microaerófilas a pH ácido, incluso por debajo de 3.0, así como en presencia de altas concentraciones de nitratos (10 mM), y su actividad nitrogenasa se inhibe solo parcialmente aún en concentraciones de 20 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  o por la presencia de aminoácidos (56).

## FACTORES QUE AFECTAN LA ASOCIACIÓN PLANTA HOSPEDERO-*G. diazotrophicus*

Se ha encontrado que la frecuencia de aislamiento en caña de azúcar es inversa a los niveles de fertilización nitrogenada. Con dosis de fertilización de 275-300 kg.ha<sup>-1</sup> la frecuencia máxima de aislamiento es de 2 %; sin embargo, con un nivel de fertilizante de 125 kg.ha<sup>-1</sup> este se incrementa hasta un 65 % (3, 26).

El nitrógeno aplicado en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  afecta la capacidad de colonizar la planta. Aparentemente no ejerce un efecto directo sobre la bacteria, sino que ocasiona cambios drásticos sobre la fisiología del cultivo (57), como por ejemplo, variaciones en la concentración de sacarosa (58).

Se ha demostrado además que la edad de la planta y variedad de la caña de azúcar influyen en el establecimiento del microorganismo (59). Igualmente, períodos del año de poca lluvia o sequía disminuyen la población microbiana de forma drástica (48).

## *G. diazotrophicus*: UN MICROORGANISMO PROMISORIO EN LA ELABORACIÓN DE BIOPREPARADOS

Teniendo en cuenta la potencialidad metabólica de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (37), resulta sumamente interesante estudiar la posibilidad de elaborar biopreparados a base de la bacteria, que estimulen el crecimiento, desarrollo y rendimiento de diferentes cultivos.

Aunque la comunidad científica ha aumentado su interés por este microorganismo, el efecto de su inoculación todavía se encuentra poco estudiado. En el cultivo en que más se ha abordado el tema es el de la caña de azúcar, donde se demostró, en condiciones de laboratorio, que las plantas inoculadas tenían una mayor altura, peso seco y contenido total de nitrógeno que aquellas inoculadas con un mutante no fijador de nitrógeno y que el testigo sin inocular. Es por ello que se sugiere que el microorganismo promueva el crecimiento, no solo por la fijación de nitrógeno sino también por la producción de ácido indol acético (60). Sin embargo, Sevilla y Kennedy (61), en un trabajo realizado en condiciones de invernadero, no obtuvieron efecto alguno sobre el crecimiento de plántulas de este cultivo.

Sevilla *et al* (62), en plántulas de caña de azúcar micropropagadas inoculadas con la cepa tipo PAL-5, confirmaron la ocurrencia del proceso de fijación biológica de nitrógeno en el cultivo inoculado, mientras que Oliveira *et al*. (63) demostraron que el 29 % del nitrógeno incorporado a la planta procedía de este proceso.

Se conoce, además, la inoculación artificial del microorganismo sobre cultivos que no son hospederos naturales de la bacteria como el maíz, donde los resultados también son controversiales (64).

En Cuba, a pesar del aislamiento de la bacteria en especies vegetales de importancia económica (30, 39, 40), todavía queda mucho por investigar.

Mediante la aplicación de un producto elaborado con la cepa INIFAT Abn-1, indicadores como la altura, el número de hojas y diámetro del tallo se incrementan entre un 20 y 50 %, para los cultivos de boniato, malanga, papa (65) y yuca (40), con respecto a áreas controles sin inocular con el microorganismo. En otro grupo de cultivos como la papaya, los incrementos oscilaron en un 40 % para el rendimiento total del cultivo (66), mientras que para la remolacha, se acrecienta entre un 40 y 70 % la altura y el área foliar, con respecto a la fracción sin inocular (67).

No obstante, es evidente que aún queda mucho por investigar en el campo de la biofertilización, con respecto al efecto que puede producir la adecuada incorporación de *G. diazotrophicus* al sistema planta, dadas las bondades y potencialidades de este microorganismo.

## REFERENCIAS

1. Reinhold-Hunrek, B y Hurek, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.*, 1998, vol. 6, p. 139-144.
2. James, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, 2000, vol. 65, p. 197-209.
3. Bueno, dos Reis Jr. F.; Reis, V. M.; Urquiaga, S. y Döbereiner, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* sp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp). *Plant Soil*, 2000, vol. 219, p. 153-159.
4. Muthukumarasamy, R.; Rebathi, G. y Vadivelu, M. Antagonic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went, a casual of red-rot of sugar. *Curr. Sci.*, 2000, vol. 78, p. 1063-1065.
5. James, E. K y Olivares, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 1998, vol. 17, p. 77-119.
6. Bashan, Y. y Holguin, G. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, p. 379-385.

7. Cavalcante, V. A. y Döbereiner, J. A. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*, 1998, vol. 108, p. 23-31.
8. Gills, M.; Kersters, K.; Hoste, B.; Janssens, D.; Kroppenstedt, R. M.; Stephan, M. P.; Teixeira, K. R. S.; Döbereiner, J. y Ley, J. de. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1989, vol. 39, p. 361-364.
9. Yamada, Y.; Hocino, K. y Ishhikawa, T. *Gluconacetobacter* nom. Corrig. (*Gluconacetobacter* (sci)). En: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 64. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, vol. 48, p. 327-328.
10. Cojho, E. H.; Reis, V. M.; Schenberg, A. C. y Döbereiner, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 1993, vol. 106, p. 23-31.
11. Fuentes-Ramírez, L. E.; Caballero-Mellado, J.; Sepúlveda, J. y Martínez-Romero, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic is inhibited by high N-fertilization. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, 1999, vol. 29, p. 117-128.
12. Jiménez-Salgado, T.; Aparicio, R. y Caballero-Mellado, J. Detección de citocinas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de caña de azúcar. En: Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. (15:1994: La Habana), 1994.
13. Young, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism. En: G. Stacey, R.H. Burris, H. J. Evans (ed.), *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman & Hall, 1992, p. 43-86.
14. Swings, J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. En: A. Blows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed). *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. New York: Springer-Verlag. 1992, vol. 3, p. 2268-2286.
15. Hearlache, T. C.; Kent, A. D.; Riggs, P.; Iniguez, A.; Chelius, M. K. y Triplett, E. W. The *Gluconacetobacter diazotrophicus* genome project. En: North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation (17:2000:Quebec), 2000. p. 82.
16. Caballero-Mellado, J.; Fuentes-Ramírez, L. E.; Reis, V. M. y Martínez-Romero, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, p. 3008-3013.
17. Caballero-Mellado, J. y Martínez-Romero, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, p. 1532-1537.
18. Boddey, R. M.; Urquiaga, S.; Reis, V. y Döbereiner, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant and Soil*, 1991, vol. 137, p. 111-117.
19. Fuentes-Ramírez, L. E.; Bustillos-Cristles, R.; Tapia-Hernández, A.; Jiménez-Salgado, T.; Wang, E. T.; Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellado, J. Novel nitrogen-fixing acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp nov and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. Nov, associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evolu. Microbiol.*, 2001.
20. Ureta, A.; Álvarez, B.; Ramón, A.; Vera, M. A. y Martínez-Drets, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant Soil*, 1995, vol. 172, p. 271-277.
21. Álvarez, B. y Martínez-Drets, G. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.*, 1995, vol. 41, p. 918-924.
22. Hernández, L.; Sotolongo, M.; Rosabal, Y.; Menéndez, C.; Ramírez, R.; Caballero-Mellado, J. y Arrieta, J. Structural levansucrase gene (lsdA) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.*, 2000, vol. 174, p. 111-119.
23. Arrieta, J.; Hernández, L.; Coego, A.; Suárez, V.; Balmori, E.; Menéndez, C.; Petit-Glatro, M. F.; Chambert, R. y Selman-Housein, G. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology*, 1996, vol. 142, p. 1077-1085.
24. Aymerich, S. GAT is the role of levansucrase in *Bacillus subtilis*?. *Symbiosis*, 1990, vol. 9, p. 179-184.
25. Geier, G. y Geider, K. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the firelight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 1993, vol. 42, p. 387-404.
26. Fuentes-Ramírez, L. E.; Jiménez-Salgado, T.; Abarca-Ocampo, I. R. y Caballero-Mellado, J. *Acetobacter diazotrophicus* and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant Soil.*, 1993, vol. 154, p. 145-150.
27. Reis-Junior, F. B.; Silva, L. G. da; Reis, V. M.; Döbereiner, J.; dos Reis Junior, F. B. Occurrence of diazotrophic bacteria in different sugarcane genotypes. *Pesq. Agrop. Bras.*, 2000, vol. 35, no. 5, p. 985-994.
28. Riggs, P. J.; Chelius, M. K.; Iniguez, A. L.; Kaepler, S. M. y Triplett, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant. Physiology*. 2001, vol. 28, no. 9, p. 829-836.
29. Shankaraiah, N.; Gururaj-Hunsigi, L. y Hunsigi, G. Field evaluation of some promising associative nitrogen fixing bio-abuts under grader levels of nitrogen for yield and quality of jiggery. *Cooperative Sugar*, 2001, vol. 33, no. 1, p. 39-43.
30. Ortega, P.; Ortega, E.; Fernández, L. y Rodés, R. Composición de cinco aislados fijadores de nitrógeno obtenidos del interior de la caña de azúcar y de *Saccharococcus sacchari*. En: Congreso Científico del INCA (13:2002 nov. 12-15: La Habana), 2002.
31. Tapia-Hernández, A.; Bustillos, M. R.; Jiménez Salgado, T.; Caballero Mellado, J. y Fuentes-Ramírez, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecology*, 2000, vol. 39, no. 1, p. 49-55.

32. Jiménez-Salgado, T.; Fuentes-Ramírez, L. E.; Tapia-Hernández, A.; Mascarúa-Esparza, M. A.; Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellado, J.. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63, p. 3676-3683.
33. Caballero-Mellado, J.; Martínez-Romero, E.; Estrada de los Santos, P. y Fuentes-Ramírez, L. E. Maize colonization by *Acetobacter diazotrophicus*. En: C. Elmerich, A. Kondorosi; W. E. Newton (Ed). *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher. 1998, p. 381-382.
34. Li, R. P. y MacRae, I. C. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.*, 1991, vol. 23, p. 999-1002.
35. Loganathan, P.; Suelta, R.; Parlda, A. K. y Nair, S. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. *J. Appl. Microbiol.*, 1999, vol. 87, p. 167-172.
36. Paula, M. A.; Urquiaga, S.; Siqueira, J. O. y Döbereiner, J. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomea batatas*). *Biol. Fert. Soils.*, 1992, vol. 14, p. 61-66.
37. Döbereiner, J.; Reis, V. M.; Paula, M. A. y Olivares, F. Endophytic diazotroph in sugarcane, cereals and tuber plants. En: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Netherlands:Kluwer Academic Publisher, 1993, p. 671-676.
38. Madhaiyan, M.; Saravanan, V. S.; Jovi, D. B. S. S.; Hyoungeok, J.; Thenmozhi, R.; Hari, K. y Sa, T. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Hats, India. *Microbiol. Res.*, 2004, vol. 159, p. 233-243.
39. Dibut, B.; Martínez-Viera, R.; Ríos, Y.; Ortega, M. y Fey, L. Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos Tropicales*, 2005, vol. 26, no. 2, p. 5-10.
40. Ríos, Y. Efecto de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) var CMC-40. [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana, 2007. 57 p.
41. James, E. K.; Reis, V. M.; Olivares, F. L.; Baldani, J. L. y Döbereiner, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.*, 1994, vol. 45, p. 57-66.
42. Bellone, C. H.; Bellone, S. D. V. C. de.; Pedraza, R. O. y Monzón, M. A. Cell colonization and infection thread formation in sugarcane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil. Biol. Biochem.*, 1997, vol. 29, p. 965-967.
43. Dong, Z.; Canny, M. J.; McCully, M. E.; Roboredo, M. R.; Cabadilla, C. F.; Ortega, E. y Rodés, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiol.*, 1994, vol. 105, p. 1139-1147.
44. Ortega, E. *et al.* Fijación de nitrógeno en la caña de azúcar: actualidad y perspectivas. En: *Biodiversidad y Biotecnología de la caña de azúcar*. La Habana:Elfos Scientiae, 1999, 168 p.
45. Dong, Z.; McCully, M. E. y Canny, M. J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in xylem of sugarcane stem?. Anatomical and physiological data. *Annals of Botany*, 1997, vol. 80, p. 147-158.
46. Loiret, F. G.; Ortega, E.; Ortega-Rodés, P.; Rodés, R. y Fuente, E. de la. *Gluconacetobacter diazotrophicus* es todavía un dilema para la ciencia. *Revista Biología*, 2004, vol. 18, no. 2, p. 113-122.
47. Muñoz-Rojas, J. y Caballero-Mellado, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, 2003, vol. 46, p. 454-464.
48. Loiret, F. G. *et al.* ¿Existe alguna relación entre *Acetobacter diazotrophicus* y el insecto *Saccharicoccus sacchari* en caña de azúcar?. Seminario Científico INCA (11:1998:La Habana).
49. Ortega-Rodés, P. Fijadores de N<sub>2</sub> en el sistema caña de azúcar-*Saccharicoccus sacchari*. Características fisiológicas y diversidad. [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana. 2004.
50. Isopi, R.; Fabbri, P.; Gallo, M. de y Puppi, G. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.). *Moench* spp. *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis*, 1995, vol. 18, p. 43-55.
51. Paula, M. A.; Reis, V. M. y Döbereiner, J. Interaction of *Glomus clarum* whit *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol. Fertility Soils*, 1991, vol. 11, p. 111-115.
52. Pan, B. y Vessey, J. Response of endophytic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* on solid media to changes in atmospheric partial O<sub>2</sub> pressure. *App. Env. Microbiol.*, 2001, vol. 67, no. 10, p. 4694-4700.
53. Kuhla, J. y Oesle, J. Dependence of nitrogenase switch off upon oxygen stress on the nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170, p. 5325-5329.
54. Galar, M. L. y Boiardi, J. L. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, vol. 43, p. 713-716.
55. Reis, V. M. y Döbereiner, J. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.*, 1998, vol. 171, p. 13-18.
56. Stephan, M. P.; Oliveira, M.; Teixeira, K. R. S.; Martínez-Drets, G. y Döbereiner, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991, vol. 77, p. 67-72.
57. Fernández, M. S. y Rosiello, R. O. P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1995, vol. 14, p. 11-148.
58. Peláez, I.; Armas, R. de.; Valadier, M. H. y Champigny, M. L. Short-term effect of nitrate on carbon metabolism of two sugar cane cultivars differing in their biomass production. *Phytochemistry*, 1994, vol. 36, p. 819-833.
59. Liu, M. C. Sugarcane. En: W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato., Y. Yamada (ed). *Handbook of Plant Cell Culture*, N. Y.:Macmillan Publishing, 1984, p. 572-605.

60. Sevilla, M.; Oliveira, A. de.; Baldani, I. y Kennedy, C. Contributions of the endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: a preliminary study. *Symbiosis*, 1998, vol. 25, p. 181-196.
61. Sevilla, M. y Kennedy, C. Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. En: Triplett, E.W. (ed). Prokaryotic nitrogen fixation. A model system for the analysis of a biological process. Wyomondham:Horizon Scientific Press., 1999, p. 737-760.
62. Sevilla, M.; Burris, R. H.; Nirmala-Gunalapa, G. L.; Kennedy, C. y Gunalapa, N. Comparison of Benedit to sugarcane plant growth and N<sub>15</sub> incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutant strains. *Molec. Plant. Micro. Interactions.*, 2001, vol. 14, no. 3, p. 358-366.
63. Oliveira, A. L. M.; Urquiaga, S.; Dobereiner, J. y Baldani, J. I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria in micropropagate sugarcane plants. *Plant and Soil.*, 2002, 242, p. 205-215.
64. Dibut, B. Biofertilizantes como insumos en Agricultura Sostenible. HUMIWORM S.R.P.de R. L. 2005. 108 p.
65. Dibut, B.; Martínez-Viera, R.; Ortega, M.; Ríos, Y. y Fey, L. Presencia y uso de microorganismos endófitos en plantas como perspectiva para el mejoramiento de la producción vegetal. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 2, p. 13-17.
66. Dibut, B.; Martínez-Viera, R.; Ortega, M.; Ríos, Y. y Fey, L. Potencial agrobiológico de la asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus-Carica papaya* L. En: Congreso Científico del INCA (14:2004, nov 9-12:La Habana). [CD-ROM].
67. Ríos, Y.; Dibut, B.; Fey, L.; Martínez, R.; Arozarena, N.; Lino, A. y Ortega, M. Efecto del endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el cultivo de la remolacha (*Beta vulgaris*) var. Detroit. *Agrotecnia de Cuba*, 2005, vol. 1-2.

Recibido: 25 de septiembre de 2007

Aceptado: 3 de diciembre de 2007