

# INTERACCIONES ENTRE *Gluconacetobacter diazotrophicus* Y LA COMUNIDAD BACTERIANA ENDÓFITA DE LA CAÑA DE AZÚCAR

Marcia M. Rojas<sup>✉</sup>, Odette González, Nidia Rojas y Mayra Heydrich

**ABSTRACT.** *Gluconacetobacter diazotrophicus* is an endophyte of sugarcane that produces high quantities of fixed nitrogen and plant growth regulating substances. These capacities are very important for the improvement of sugarcane crop. In this work, the interactions between this species and endophytic microbial community members were demonstrated. Different interactions are present in the microbial endophytic community. *Gluconacetobacter diazotrophicus* inhibits the growth of some species and it is also stimulated by others. These relationships are influenced by their strain and growth time. The relationships between *Gluconacetobacter diazotrophicus* and other members of the microbial endophytic community could contribute to enhance their effect on this important graminaceous crop.

**Key words:** bacteria, nitrogen fixation, sugarcane

**RESUMEN.** *Gluconacetobacter diazotrophicus* es una bacteria endófitas de caña de azúcar, que se ha comprobado que es capaz de fijar cantidades considerables de nitrógeno y producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, lo cual puede ser de suma importancia en el mejoramiento de este cultivo sobre bases agroecológicas. En el presente trabajo se demuestran, por primera vez, las interacciones que esta especie establece con otros representantes de la comunidad bacteriana endófitas de la caña de azúcar empleando el micrométodo en portaobjetos. *G. diazotrophicus* ejerce efecto antagonista sobre otros miembros de la comunidad, lo cual está influido por las cepas y el tiempo de crecimiento de la especie, que a su vez es estimulada por otras presentes en el interior de la caña de azúcar. Este hecho pudiera contribuir a potenciar la promoción del crecimiento que puede ejercer *G. diazotrophicus* en la caña de azúcar.

**Palabras clave:** bacteria, fijación del nitrógeno, caña de azúcar

## INTRODUCCIÓN

A finales de la década del 80 se aisló la especie *Acetobacter diazotrophicus* a partir de la caña de azúcar (1, 2), actualmente clasificada como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (3, 4). Esta es una bacteria endófitas nitrificadora, presente en este y otros cultivos. Esta bacteria tiene la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de  $\text{NO}_3^-$  (10 mM) (1) hasta pH3 (5) y produce sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal (6). Además, se ha podido comprobar que *G. diazotrophicus* puede excretar más del 50 % del nitrógeno fijado en una forma asimilable por la planta (7).

Actualmente, se tiene plena conciencia de que los procesos naturales resurgen como alternativas ecológicas y económicas, para la sustitución parcial o total de compuestos que se utilizan en múltiples cultivos, elevar las producciones y contrarrestar los efectos nocivos al ambiente debido al uso continuado de la quimización (8).

Por su gran importancia, se ha previsto la utilización en los agroecosistemas de los microorganismos endófitos

con actividad nitrificadora o capacidad para producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, para lo cual se hacen necesarios estudios integrales de la relación de estos con la planta y los otros microorganismos presentes en esos ecosistemas.

Se han estudiado las interacciones que establecen muchos microorganismos en la rizosfera de diferentes plantas, pero se conoce muy poco acerca de las interacciones microbianas entre poblaciones endófitas, que se ha sugerido que desempeñen un papel fundamental en la promoción del crecimiento por estar en contacto más directo con la planta (9).

En el presente trabajo se estudia la influencia del tiempo de cultivo en las interacciones que se establecen entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* y el resto de la comunidad microbiana endófitas de la caña de azúcar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron las cepas PAI5 (ATCC 49037), PAI3 (1), 1.05 y 4-02 de *G. diazotrophicus* (10) y 35 aislados no identificados de la comunidad bacteriana endófitas de la caña de azúcar, obtenidos en el Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

Las cepas de *G. diazotrophicus* se sembraron en medio LGI-P (1) y los 35 aislados de la comunidad en Agar Nutriente; los inóculos de cada una de las bacterias

Dra.C. Marcia M. Rojas, Profesora Asistente; Nidia Rojas y Mayra Heydrich, Profesoras Auxiliares; Odette González, Especialista del Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

✉ marcia@fbio.uh.cu

para el ensayo de interacción se cultivaron durante 24 h a 30°C y en agitación a 150 rpm. La concentración se ajustó a 10<sup>8</sup>UFC.mL<sup>-1</sup>, según el tubo 0.5 de la escala de MacFarland (11).

Las interacciones se evaluaron mediante el micrométodo en portaobjetos descrito por Rojas *et al.* (12). En este método se añade el medio de cultivo fundido con el microorganismo a probar en un portaobjetos y se colocan sobre el mismo cilindros de medio de cultivo con las cuatro cepas de *G. diazotrophicus* crecidas. Como control se utilizaron cilindros con medio sin inocular, observándose un halo donde hay inhibición del crecimiento de la cepa a probar. Se incubó durante 24 horas a 30°C.

Simultáneamente, se probó el efecto que tenían los metabolitos producidos por las cepas de *G. diazotrophicus* sobre el resto de la comunidad, para lo cual los cultivos se trataron a 80°C durante 30 min.

Se seleccionaron los aislados sobre los cuales *G. diazotrophicus* ejerció efecto antagónico y se cultiva-

ron las cuatro cepas de esta especie desde cuatro hasta 10 días y con cada uno de esos cultivos se realizó el ensayo de interacción, como ya se explicó previamente, y se midieron los halos de inhibición producidos. Con estos mismos aislados de la comunidad bacteriana endófito se realizó el experimento, para probar su acción antagónica sobre *G. diazotrophicus*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

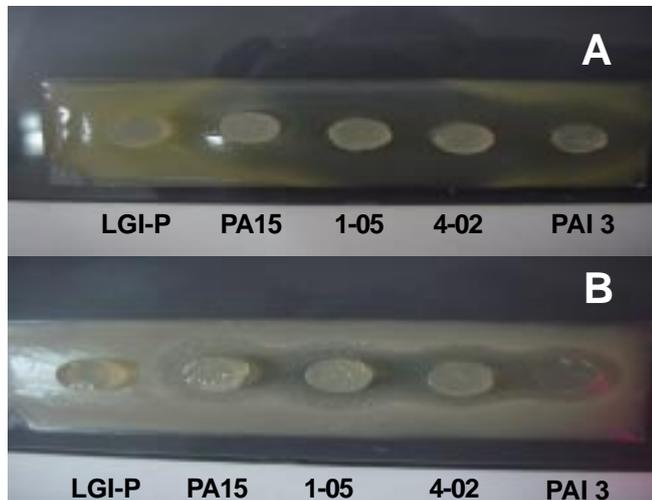
*Efecto antagónico de G. diazotrophicus con otros miembros de la comunidad bacteriana endófito de la caña de azúcar.* Al determinar las interacciones que se establecen entre las cuatro cepas de *G. diazotrophicus* inoculadas en medio LGI-P sólido y las cepas endófitas de la comunidad microbiana, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla I.

**Tabla I. Efecto antagónico de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAI 5, 4-02, 1-05 y PAI 3) cultivado en medio LGI-P sólido durante cinco, siete y 12 días de crecimiento sobre aislados de la comunidad bacteriana endófito de la caña de azúcar**

C	Cinco días				Siete días				Doce días			
	PAI 5	1-05	4-02	PAI 3	PAI 5	1-05	4-02	PAI 3	PAI 5	1-05	4-02	PAI 3
CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	±	-	-	±	±	-	+	+	+	+
12	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	±	+	+	-	±	±	+	+	±	±	±	-
15	+	+	+	-	-	-	+	-	±	±	±	+
100	-	±	-	±	-	-	-	-	±	±	-	+
101	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
102	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
103	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
105	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
106	+	--	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
107	±	±	+	+	-	-	-	+	±	±	±	+
109	+	+	±	±	-	-	-	+	-	-	-	-
20	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	-	-	-	+	±	±	±	+
24	+	±	±	+	-	-	-	+	-	-	-	-
28	-	+	-	+	-	-	-	+	±	±	±	±
29	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
202	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
203	-	±	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
204	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
205	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
207	+	+	+	+	-	-	-	-	±	±	-	-
208	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
31	+	+	+	+	-	-	-	+	±	±	±	±
32	+	+	+	+	+	-	-	-	±	-	-	-
33	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
34	+	+	+	+	-	-	-	±	-	+	+	-
35	+	+	+	+	-	-	-	+	±	±	±	±
37	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
39	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
302	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
303	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
304	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
305	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ crecimiento, - inhibición total del crecimiento, ± inhibición parcial, C: cepas, CN: control negativo (medio LGI-P sin inocular)

Tras cinco días de crecimiento en LGI-P, las cuatro cepas de *G. diazotrophicus* afectaron el crecimiento de las bacterias endófitas, pero en diferente magnitud, detectándose la presencia de halos de inhibición alrededor de los cilindros de medio inoculado (Figura 1). Además, hubo halos menos traslúcidos pero detectables que se denotaron con el símbolo  $\pm$  y lo denominamos inhibición parcial del crecimiento.



**Figura 1. Halos de inhibición de los aislados 15 (A) y 100 (B) producidos por la acción de distintas cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (siete días de crecimiento) comparados con el control de LGI-P**

Cuando las cepas de *G. diazotrophicus* se dejaron crecer por siete días en el medio LGI-P, en los resultados se detectó un aumento notable en el número de cepas

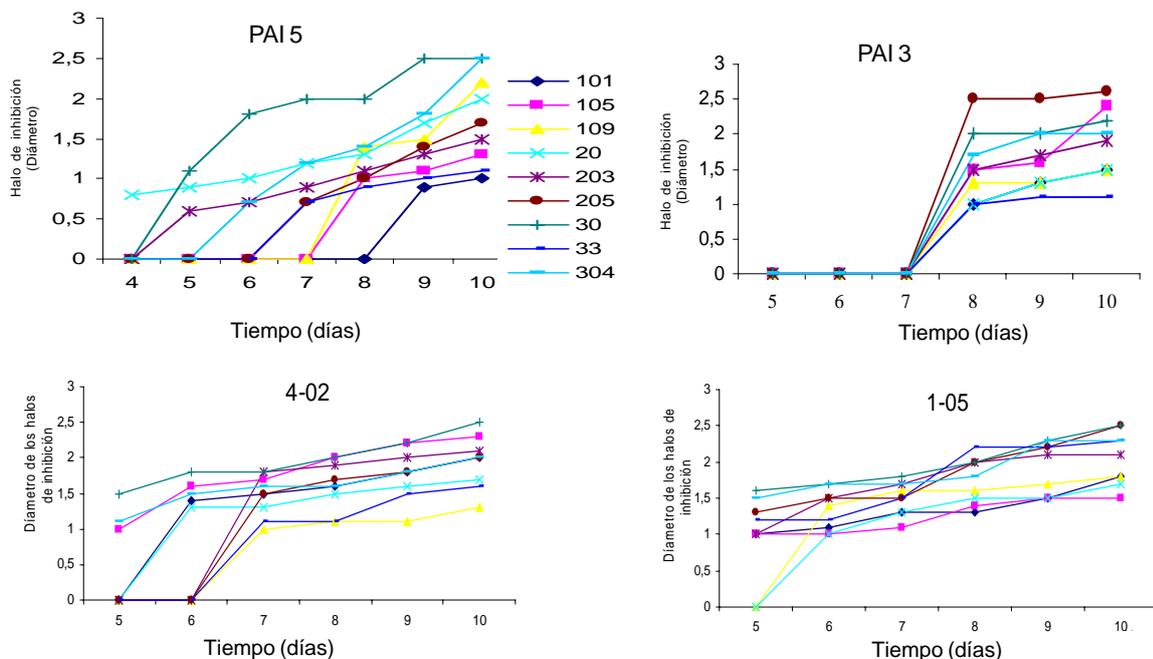
endófitas inhibidas; en este caso, todas las inhibiciones en los cultivos de siete días son totales, con halos transparentes bien evidentes.

En las cepas de *G. diazotrophicus* crecidas durante doce días, se detectó un aumento del número de inhibiciones por efecto de las cepas 4-02 y PAI 3. Sin embargo, se observa una pequeña disminución del número de cepas inhibidas por las cepas PAI 5 y 1-05 de 23 cepas inhibidas a 19.

La capacidad de *G. diazotrophicus* de producir sustancias que inhiban a otras especies puede ser una ventaja en el momento de la colonización de la planta. El hecho de que solo disminuya el crecimiento y deje proliferar parte de la población, es una ventaja adaptativa de la comunidad para mantener el equilibrio en el ecosistema.

Resulta conveniente destacar que en los resultados de los experimentos expuestos anteriormente, el efecto del tiempo de crecimiento fue de gran importancia para la detección de las interacciones que se establecen en la comunidad, por lo que se decidió estudiar la influencia directa del tiempo de cultivo de las cepas sobre el grado de inhibición, medida por el tamaño del halo producido en la comunidad bacteriana en estudio.

Al poner en contacto la cepa PAI 3 con las cepas endófitas seleccionadas, se demuestra que no hay acción inhibitoria visible hasta el octavo día, a partir del cual aumenta progresivamente el grado de la inhibición, manifestándose en el diámetro de los halos hasta un punto máximo de 2,5 cm (Figura 2). En el caso de la cepa PAI 5, puede observarse que la inhibición comienza en el cuarto día en el aislado 20, en los aislados 203 y el 30 al quinto día, al sexto día el 304 y en las restantes los aislados en estudio a partir del séptimo día.



**Figura 2. Influencia del tiempo de cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en medio líquido LGI-P en la acción de antagonismo que ejerce sobre otros miembros de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar**

El aislado 20 es el que mayor efecto negativo recibe de la cepa PAI 5, pues su inhibición comienza desde el cuarto día, aunque se debe señalar que el aislado 30 se afecta en mayor magnitud desde que comienza a ser inhibido, manteniendo el mismo halo de inhibición al final del experimento a los 10 días. El aislado 101 se ve menos afectado con halos de inhibición de 1,0 cm; además, su inhibición comienza al noveno día, de lo que se puede concluir que es más resistente a la acción de PAI 5.

La cepa 1-05 inhibe al resto de la comunidad en su mayoría a partir del quinto día de su crecimiento, solamente con los aislados 105 y 109 ocurrió a partir del sexto día, siendo también los inhibidos en menor magnitud con halos de inhibición de diámetros de 1.4 y 1.5 cm respectivamente. El aislado 30 fue el más afectado por la acción de la cepa 1-05, con un halo de inhibición de diámetro de 2,5 cm al noveno día.

La cepa 4-02 ejerce efecto antagonístico desde el quinto día sobre tres aislados de la comunidad, pero para la mayoría se afecta su crecimiento con esta 4-02 crecida durante siete días. Al igual que ocurre en la cepa 1-05, hay halos de inhibición de 2,5 cm de diámetro, que con los aislados 30 y 105.

Al comparar los resultados de las interacciones de las cepas bacterianas estudiadas con las de *G. diazotrophicus*, se aprecia que a medida que estas últimas han crecido durante más tiempo, aumenta la magnitud del halo de inhibición que denota el efecto antagonístico.

Como se ha demostrado, las cepas de *G. diazotrophicus* inhiben a un grupo de aislados de la comunidad bacteriana endófitas, y los diámetros de los halos de inhibición aumentan a medida que transcurre el tiempo de crecimiento de *G. diazotrophicus*; este efecto pudiera estar explicado por la acumulación en el medio de sustancias antagonistas, que inhiben el crecimiento de las otras bacterias o por la disminución del pH en el medio, producto del metabolismo de esta especie, como han propuesto para la inhibición de *Colletotrichum falcatum* (14).

**Efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por *G. diazotrophicus*.** Este mismo procedimiento se siguió con los metabolitos de las cepas de *G. diazotrophicus*, cuyos resultados fueron positivos en el ensayo de anta-

gonismo. Al comparar el efecto inhibitorio de los metabolitos con el ensayo en los cultivos vivos, se observa que disminuye el tiempo de cultivo de *G. diazotrophicus* para el cual aparecen los halos de inhibición (Tabla II), lo que pudiera explicarse por el aumento de la concentración de sustancias inhibitorias en el medio, debido a la muerte celular por el tratamiento de calor que se llevó a cabo.

Las cepas de *G. diazotrophicus* han mostrado en todos los experimentos realizados, que ejercen su acción de manera diferente sobre las cepas endófitas estudiadas. Varios aspectos analizados así lo demuestran, como son el número y tipo de interacciones al transcurrir el tiempo, el tamaño de los halos de inhibición en dependencia de la cepa endófitas analizada; por tanto, no se puede establecer un patrón general y se pudiera plantear que este hecho puede estar respaldado por las características de cepa y no de especie.

Existen varias posibilidades para explicar la acción inhibitoria de *G. diazotrophicus* sobre las cepas endófitas. Se ha demostrado que *G. diazotrophicus* produce disminución del pH del medio a partir de diferentes fuentes de carbono incluso hasta valores de 2 (5, 13), lo cual también pudiera afectar a las bacterias endófitas estudiadas, ya que la mayor parte de las bacterias crecen a pH neutro o cercano a la neutralidad y una disminución tan drástica de la concentración de iones hidrógeno pudiera influir en el crecimiento. A este hecho atribuyen Muthukumarasamy *et al.* (14) el efecto inhibitorio de esta especie sobre el hongo fitopatógeno de la caña de azúcar *Colletotrichum falcatum*.

Por otra parte, Rojas *et al.* (15) han demostrado que esta bacteria endófitas produce metabolitos del tipo sideróforos, los cuales se ha estudiado que pueden actuar en el control biológico de patógenos por especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia* (16).

Analizando las interacciones que establecen diferentes cepas de *G. diazotrophicus* entre sí, Muñoz-Rojas *et al.* (17) demostraron que en esta especie existen cepas productoras de una sustancia antagonista, similar a bacteriocinas, y otras sensibles a ella. Se conoce que las bacteriocinas actúan fundamentalmente entre especies muy cercanas filogenéticamente; no obstante, esta posibilidad no se puede descartar totalmente.

**Tabla II. Efecto inhibitorio de los metabolitos de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre aislados de la comunidad bacteriana endófitas seleccionados como positivos en el experimento de antagonismo**

cepa	PAI 5					1-05					4-02					PAI 3											
	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	9	10
CN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
101	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
105	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
109	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
20	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
203	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
205	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
33	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
304	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-

CN: control negativo (medio sin inocular), +: Crecimiento, ±: Inhibición parcial del crecimiento, -: Inhibición total del crecimiento

También existe la posibilidad de que *G. diazotrophicus* produzca algún producto antimicrobiano, estableciendo una relación amensalista con las cepas inhibidas, basado en los planteamientos de Park (18), donde se atribuye gran importancia a los antibióticos en este tipo de interrelaciones.

**Efecto antagónico de cepas de la comunidad bacteriana endófito sobre *G. diazotrophicus*.** Al analizar la influencia de los endófitos sobre *G. diazotrophicus*, se observó que el crecimiento no fue afectado por ningún miembro de la comunidad; así mismo, las únicas cepas de la comunidad microbiana endófito en estudio, capaces de ejercer influencia positiva sobre algunas cepas de *G. diazotrophicus*, son las que se muestran en la Tabla III, las cuales provocaron este efecto al ponerse en contacto al quinto día de crecimiento de *G. diazotrophicus*.

**Tabla III. Efecto de aislados seleccionados de la comunidad endófito sobre las cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus***

Cepas	PAI 5	1-05	4-02	PAI 3
CN	+	+	+	+
102	++	++	++	++
106	+	+	+	++
107	+	+	+	++
28	+	++	+	+
202	+	+	+	++
203	+	+	+	++
303	+	++	++	+

++ sobrecrecimiento de *G. diazotrophicus* alrededor de la cepa endófito en análisis, + crecimiento normal

Observando los aislados que muestran interacción, se puede apreciar que algunos son inhibidos por *G. diazotrophicus*, como 102, 106, 107, 28, 202 y 203 a diferentes tiempos en el crecimiento. Solo el aislado 303 no fue inhibido en ningún momento por las cepas *G. diazotrophicus*.

Se conoce que los plásmidos transportan genes de resistencia a antibióticos y las bacterias pueden adquirir genes de resistencia, lo que podría ser una respuesta a que *G. diazotrophicus* no sea inhibido por ningún representante de la comunidad endófito de la caña de azúcar. Existen plásmidos de virulencia que transportan genes que capacitan a la bacteria para colonizar el tejido de un hospedero e infectarlo, como por ejemplo los linajes de *Escherichia coli*, que transportan genes que codifican simultáneamente factores de colonización y toxinas (19).

Esta respuesta de las cepas de *G. diazotrophicus* en la comunidad puede explicarse por la posible utilización de algún producto del metabolismo de otros endófitos en su primera etapa del crecimiento (20); posteriormente, al aumentar la población en la comunidad son competidores, por lo que en ese momento resultaría necesario inhibir el desarrollo de las cepas bacterianas en estudio. Este hecho pudiera estar en función del mantenimiento de *G. diazotrophicus* en el ecosistema.

La respuesta diferenciada en las cepas de *G. diazotrophicus* puede deberse a que estas cepas se diferencian en su constitución genética, en cuanto a genes extracromosomales (plásmidos) (21), a los cuales algunos le han atribuido un papel importante en la interacción del microorganismo y la planta, y a esto le podemos añadir las relaciones microorganismo-microorganismo dentro de la comunidad que habita en el interior de la planta.

Se ha visto que al cultivar juntos diferentes microorganismos, se potencia la acción positiva hacia la planta, como son los casos de *A. brasilense* y *Staphylococcus sp.* aislado de la rizosfera del mangle (22) y *Azospirillum* y *Bacillus* (23), donde se potencia la fijación de nitrógeno de *Azospirillum*; este sería un aspecto a estudiar posteriormente en el caso de *G. diazotrophicus*, teniendo en cuenta que hay microorganismos de los estudiados que estimulan su crecimiento según los resultados obtenidos en este trabajo.

Todas las relaciones en su conjunto contribuyen a mantener el balance ecológico del ecosistema (24) y, de esta forma, los endófitos pueden influir en el metabolismo de la planta. Estudios integrales de las interacciones en la comunidad y con la planta se hacen necesarios, ya que sin dudas este aspecto reviste especial interés, toda vez que el resultado de estas interacciones determina la predominancia de *G. diazotrophicus* en el ecosistema y se pudiera pensar en *G. diazotrophicus* como un microorganismo con características que favorecen a la planta, no solo por la producción de hormonas del crecimiento vegetal, la fijación biológica del nitrógeno, sino también por la capacidad de controlar la comunidad donde se pueden encontrar especies patógenas a la planta y, de esta manera, se pone de manifiesto una vez más la hipótesis aditiva planteada por Bashan y Levanony (25).

## CONCLUSIONES

Se caracterizaron las interacciones que establece *G. diazotrophicus* con otros miembros de la comunidad bacteriana endófito de la caña de azúcar. *G. diazotrophicus* ejerce efecto antagonista sobre otros miembros de la comunidad, lo cual está influido por la cepa y el tiempo de crecimiento de la especie y, a la vez, esta especie es estimulada por otras presentes en el interior de la caña de azúcar. Este hecho pudiera contribuir a potenciar la acción beneficiosa de *G. diazotrophicus* en la caña de azúcar.

## REFERENCIAS

1. Yamada, Y.; Hoshino, K. y Ishikawa, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, vol. 61, p. 1244-1251.

2. Yamada, Y.; Hocino, K. y Ishikawa, T. *Gluconacetobacter* nom. Corring. (*Gluconacetobacter* [sic]). En: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, list 64, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, vol. 48, p. 327-328.
3. Cavalcante, V. A. y Döbereiner, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant and Soil*, 1988, vol. 108, p. 23-31.
4. Gillis, M. K.; Kersters, B. y Ley, J. de. *Acetobacter diazotrophicus* sp nov. A nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bact.*, 1989, vol. 39, p. 361-364.
5. Stephan, M. P.; Oliveira, M.; Texeira, S.; Martínez-Drets, G. y Döbereiner, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *Fems Microbiology Letters*, 1991, vol. 77, p. 67-72.
6. Fuentes-Ramírez, L. E.; Jiménez-Salgado, T.; Abarca-Ocampo, I. R. y Caballero-Mellado, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and Soil*, 1993, vol. 154, p. 145-150.
7. Cojho, E. H.; Reis, M.; Schenberg, A. C. G. y Döbereiner, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylotyc yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Letters*, 1993, vol. 106, p. 341-346.
8. Pérez, J. Capacidad dinitro fijadora de *Azospirillum* sp. (cepa INICA 8-1) como inoculante en la caña de azúcar (*Saccharum* sp.). [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana, 2002.
9. Döbereiner, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic nitrogen fixing bacteria. *Ciencia e Cultura*, 1992, vol. 44, no. 5, p. 310-313.
10. Rojas, M. M. Caracterización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* aislado de variedades caña de azúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas en Cuba. [Tesis de Doctorado]; Universidad de La Habana, 2005.
11. NCCLS. Natural Committee for Clinical laboratory standards. «Performance standards for antimicrobial Disk. Susceptibility Test». Approved standard. M2-A5., 1993, vol. 13, no. 24.
12. Rojas, N. M.; Avellaneda, S. y Romeo, B. Desarrollo y uso de minimétodo para determinar la actividad antimicrobiana de productos naturales. En: Memorias de la Convención Trópico, Abril 2004, La Habana. 2004, vol. 613, p. 208-215.
13. Burris, H. R. Comparative study of the response of *Azotobacter vinelandii* and *Acetobacter diazotrophicus* to changes in pH. *Protoplasm*, 1994, vol. 183, p. 62-66.
14. Muthukumarasamy, R.; Rebathi, G. y Vadivelu, M. Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red-rot of sugarcane. *Curr. Sci.*, 2000, vol. 78, p. 1063-1065.
15. Rojas, M.; Montoute, M. y Heydrich, M. Potencialidades de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* aisladas de diferentes ecosistemas para la estimulación del crecimiento vegetal. En: Congreso Científico INCA, (15: 2006, nov 7-10, La Habana) Memorias. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISBN 959-7023-36-9. 2006.
16. Díaz, A.; Trujillo, I. D.; Hernández, A. y Heydrich, M. Determinación de las potencialidades de rizobacterias como agentes biocontroladores de fitopatógenos de gramíneas. En: Biotecnología Habana 2005: Agrobiotecnología por una producción sostenible de alimentos, La Habana, Noviembre 2005.
17. Muñoz-Rojas, J.; L. E. Fuentes-Ramírez y J. Caballero-Mellado. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Micobiol. Ecol.*, 2003, vol. 54, p. 57-66.
18. Park, D. The importance of antibiotics and inhibiting substances. En: Soil Biology, Academic Press, New York, p. 435-447, 1967.
19. Moretti, P. R. *Plasmídeos*. Microorganismos. Procariota. Bacteria. *Genética*, 2002, p. 1-2.
20. Atlas, R. M. y Bartha, R. *Microbial Ecology. Fundamentals and applications*. The Benjamin-Cummings. Sci. Pub., 1998, p. 37-65.
21. Caballero-Mellado, J. y Martínez-Romero, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 1994, p. 1532-1537.
22. Holguin G. y Bashan, Y. Nitrogen fization by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.) *Soil. Biol. Biochem.*, 1996, vol. 28, no. 12, p. 1651-1660.
23. Khammas, K. M. y Kaiser P. Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Can. J. Microbiol.*, 1992, vol. 38, p. 794-797.
24. Bull, A. T. y Slater, J. H. Microbial interactions and community structure. En: Microbial interactions and communities, London:Academic Press, 1982, p. 13-44.
25. Bashan, Y. y Levanony, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*, 1990, vol. 36, p. 591-608.

Recibido: 18 de diciembre de 2006

Aceptado: 13 de septiembre de 2007