



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Isolation and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains

Yoania Ríos Rocafull¹✉, Marcia Rojas Badia², Marisel Ortega García¹, Bernardo Dibut Álvarez¹ y Janet Rodríguez Sánchez¹

ABSTRACT. *Gluconacetobacter diazotrophicus* is an endophyte microorganism with direct and indirect mechanisms for vegetable growth promotion among its characteristics. Despite its great perspective to constitute the active principle of a bioproduct for agricultural purposes, so far there is not any product derived from this bacterial species in Cuba. The strain isolation and its characterization are important steps to obtain a biopreparation, since it enables the initial selection of strains with adequate characteristics for vegetable growth stimulation. In this research, 85 endophyte isolates were purified from different organs of 24 plant species. Four of them were identified as *Gluconacetobacter diazotrophicus*, when comparing its characteristics with those from pattern strains of the bacterial species. Microorganisms were selected from mango (*Mangifera indica* L.) and guava (*Psidium guajava* L.) fruits as well as from yucca (*Manihot esculenta* Crantz.) and beet (*Beta vulgaris* L.) stems. The presence of this microorganism was relevant in the first two crops for Cuba whereas the isolation in guava at the international level. The four strains had differences regarding their capacity to solubilize phosphorus, to produce indol acetic acid and its antagonistic activity against *Fusarium moniliforme* and *Fusarium incarnatum*. As strains were grouped according to their characteristics, mango and beet microorganisms were different, which are considered promising to study the effect of its interaction with other crops under *in vivo* conditions.

RESUMEN. *Gluconacetobacter diazotrophicus* es un microorganismo endófito que presenta, dentro de sus características, mecanismos directos e indirectos de estimulación del crecimiento vegetal. A pesar de sus grandes perspectivas para constituir el principio activo de un bioproducto de uso agrícola, en Cuba no existe ninguno elaborado a partir de esta especie bacteriana. El aislamiento de cepas del microorganismo y su caracterización constituyen pasos importantes para la obtención de un biopreparado, pues permiten la selección inicial de cepas que tengan características adecuadas para la estimulación del crecimiento. En la presente investigación se purificaron 85 aislados de microorganismos endófitos, a partir de los diferentes órganos de 24 especies vegetales. Cuatro de ellos fueron identificados como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, al comparar sus características con las de cepas patrones de la especie bacteriana. Los microorganismos seleccionados provenían de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) y mango (*Mangifera indica* L.), así como de tallos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz.) y remolacha (*Beta vulgaris* L.). Se destacó la presencia del microorganismo en los dos primeros cultivos para Cuba y el aislamiento en la guayaba a nivel internacional. Las cuatro cepas mostraron diferencias en su capacidad de solubilizar fósforo, producir ácido indol acético y en su actividad antagonista frente a *Fusarium moniliforme* y *Fusarium incarnatum*. Al agruparse las cepas por sus características, se diferenciaron los microorganismos provenientes de mango y remolacha, los que se consideran promisorios para realizar estudios en condiciones *in vivo* del efecto de su interacción con otros cultivos.

Key words: endophytes, stimulation, inoculants

Palabras clave: endófitos, estimulación, inoculantes

INTRODUCCIÓN

Gluconacetobacter diazotrophicus es una bacteria endófito perteneciente al phylum Proteobacteria, sección Alfa, orden Rhodospirillales y familia *Acetobacteriaceae*. Se aisló por primera vez en 1988 (1), asociada al cultivo de la caña de azúcar

¹ Instituto de Investigaciones en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), calle 188 no. 38754, Santiago de las Vegas, Boyeros, La Habana, Cuba.

² Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Vedado, La Habana, Cuba.

✉ dpagrobiotec@inifat.co.cu

(*Saccharum officinarum* L.). Posee grandes atractivos para la elaboración de bioproductos estimuladores del crecimiento vegetal, debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, producir ácido indol acético (AIA), solubilizar nutrientes minerales como el fósforo y el zinc y presentar actividad antagonista frente a organismos fitopatógenos (2).

Los resultados positivos de su inoculación en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (3), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench.) (4), maíz (*Zea mays* L.) (5), malanga (*Xanthosoma* spp.), boniato (*Ipomoea batata* L.) y yuca (*Manihot esculenta* Crantz.) (6) refuerzan las perspectivas de poder utilizar con éxito esta bacteria en la elaboración de inoculantes. Sin embargo, en Cuba aún no existe un producto comercial, elaborado a partir de este microorganismo.

El aislamiento de cepas de *G. diazotrophicus* asociadas a especies vegetales cultivadas en el país y su caracterización, objetivos de la presente investigación, permitirán realizar una selección de microorganismos adaptados a las condiciones edafoclimáticas de Cuba, que tengan características adecuadas para la estimulación del crecimiento de las plantas. En un futuro estas cepas podrían constituir el principio activo de un bioproducto, que provoque efectos positivos al ser aplicado sobre cultivos de interés agrícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de microorganismos: el aislamiento de los microorganismos endófitos se realizó a partir del macerado, con ayuda de un mortero estéril de un gramo de los diferentes órganos (raíz, tallo, hojas, flores y frutos) de 24 especies vegetales (Tabla I).

Tabla I. Cultivos utilizados en el estudio

Número	Cultivo	Nombre científico	Cultivar
1	Zanahoria	<i>Daucus carota</i> L.	New Kuroda
2	Remolacha	<i>Beta vulgaris</i> L.	Detriot Dark Red
3	Quimbombó	<i>Abelmoschus esculentus</i> L. (Moench)	Tropical C-17
4	Ají	<i>Capsicum annuum</i> L.	Verano 1
5	Calabaza	<i>Curcubita moschata</i> (Duch ex Lam) Duch.	VME
6	Melón	<i>Cucumis melo</i> L.	Gerona 1582
7	Rábano	<i>Raphanus sativus</i> L.	PS-9
8	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	INIFAT-28
9	Maíz	<i>Zea mays</i> L.	Francisco mejorado
10	Caña	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Cristalina blanca
11	Millo	<i>Sorghum vulgare</i> Pres.	Criollo
12	Boniato	<i>Ipomoea batata</i> L.	Cemsa 78-384
13	Yuca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz.	CMC-40
14	Malanga	<i>Xanthosoma sagittifolium</i> Schott.	CMC-22
15	Plátano	<i>Musa</i> sp.	Jhonson 3319
16	Mango	<i>Mangifera indica</i> L.	Keit
17	Acerola	<i>Malpighia glabra</i> L.	Nc
18	Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i> Sims.	Nc
19	Guayaba	<i>Psidium guajaba</i> L.	Enana cubana
20	Fruta Bomba	<i>Carica papaya</i> L.	Maradol Roja
21	Mamoncillo Chino	<i>Litchi sinensis</i> Sonn.	Nc
22	Maní	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Cascajal rosado
23	Girasol	<i>Helianthus annuus</i> L.	Cubasoy 113
24	Ajonjolí	<i>Sesamun indicum</i> L.	Blanco 5 A

Nc: no conocido

La savia extraída se adicionó a razón de 0,5 mL, en frascos de 10 mL con 5 mL de medio LGI semisólido (6). Durante el macerado se añadió un mililitro de agua destilada para favorecer el procedimiento.

La purificación de los microorganismos se realizó en el medio LGI sólido (6) vertido en placas Petri de 90 mm, a partir de una muestra inicial de la película de crecimiento en la variante semisólida, sembrada por diseminación. Tanto los frascos con medio semisólido, como las placas Petri, fueron incubados durante cinco días a una temperatura de 28 ± 2 °C.

Selección de cepas de *G. diazotrophicus*: los microorganismos purificados fueron sometidos a un proceso de selección por descarte, a partir de la ejecución de cuatro bloques de pruebas, incluidas dentro de ellas las determinaciones morfológicas y fisiológicas (1):

- ◆ Bloque I. Pigmentación en los medios LGI y Agar Papa.
- ◆ Bloque II. Tinción de Gram y presencia de enzimas catalasa (cat) y citocromo oxidasa (ox).
- ◆ Bloque III. Utilización de citrato como fuente de carbono (cit), hidrólisis de proteínas (almidón (alm) y gelatina (gel)), producción de indol a partir del triptófano (tpr) y utilización de manitol como fuente de carbono.
- ◆ Bloque IV. Crecimiento en sacarosa (sac 30 %) y glucosa al 30 % (glu 30%) y degradación de tiras de papel de filtro (actividad celulolítica).

Los resultados se compararon con los obtenidos en tres cepas patrones donadas por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), la PAL5 (ATCC 49037) de caña de azúcar, la UAPAc 7 de piña (*Annanas comosus* L. Merrill.) y la CFNCf 13 aislada del cultivo del cafeto (*Coffea arabica* L.).

Caracterización de cepas de *G. diazotrophicus*: la caracterización se realizó a partir de los siguientes indicadores:

- ◆ Fijación biológica de nitrógeno. La capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico se determinó de forma cualitativa. Las cepas fueron inoculadas en medio LGI semisólido (1) carente de nitrógeno combinado. Se consideró que el microorganismo fijaba nitrógeno atmosférico al mantener el crecimiento después de cinco inoculaciones sucesivas en este medio de cultivo. En todos los casos se incubó a 30 °C de temperatura.
- ◆ Solubilización de fósforo. Se utilizó el medio de cultivo NBRIP (7). La solubilización del nutriente se determinó a partir de la medición del halo amarillo formado alrededor de la colonia bacteriana a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 30 °C de temperatura.
- ◆ Producción de ácido indol acético (AIA). La producción de AIA se cuantificó utilizando el método colorimétrico de Salkowsky (8). Para realizar el ensayo los microorganismos fueron crecidos en medio Caldo Triptona Soya. Se utilizó para la fermentación una zaranda orbital regulada a 180 rpm de agitación, 30 °C de temperatura durante 24 horas. El experimento se realizó con tres repeticiones por cepa y como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin inocular. Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 535 nm en un espectrofotómetro UV visible.
- ◆ Actividad antagonista frente a *Fusarium* spp. El medio de cultivo Agar Avena se inoculó con una suspensión celular de un 10 % de las cepas de *G. diazotrophicus* y se dejó reposar durante cuatro horas. Luego se colocó en el centro de la placa Petri de 90 mm, un disco de 7 mm de los hongos *Fusarium moniliforme* (cepa 2387) y *F. incarnatum* (cepa 3188), ambos provenientes de la colección de hongos del INIFAT (853 de la WFCC).

Se mantuvo una placa testigo, donde solo se inoculó el hongo fitopatógeno. Todos los tratamientos se incubaron durante siete días a una temperatura de 28 °C. Para realizar las evaluaciones se midió el diámetro del crecimiento micelial del hongo a los tres, cinco y siete días. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición micelial (IM) ($IM = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$, donde dc: diámetro del micelio del control (testigos) y dt: diámetro del micelio en los tratamientos (9). Se utilizaron cinco réplicas por cada una de las variantes.

Procesamiento estadístico: los valores obtenidos en cada una de las determinaciones realizadas se promediaron con el programa Microsoft Excell 2007 corrido sobre Windows, que también se utilizó para el cálculo de la desviación estándar de la media y la confección de los gráficos. El procesamiento estadístico se realizó con el programa Statgraph versión 5.1 (10). Las medias se compararon mediante una prueba “t” de Student para la solubilización de nutrientes, mientras que para el resto de los ensayos se utilizó la prueba de Duncan. El agrupamiento de las cepas se realizó por medio de un Análisis Multivariado mediante un Clúster elaborado con este mismo paquete estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 24 especies vegetales muestreadas, se purificaron 85 aislados bacterianos, de los que se seleccionaron cuatro, como *G. diazotrophicus*, a partir de los resultados de las pruebas morfológicas y fisiológicas. Estos microorganismos, provenientes de los frutos de guayaba (E 19) y mango (E 42), así como de tallos de remolacha (E 26) y yuca (E 46), presentaron las características descritas para la especie (1) y coincidieron en comportamiento con la cepa patrón empleada en la investigación (Tablas II y III).

Tabla II. Características morfológicas de las cepas de *G. diazotrophicus* aisladas en el estudio y su comparación con el patrón de referencia internacional PAL 5

Cepa	Color de la colonia en medios de cultivo		Respuesta a la tinción de Gram
	LGI	Agar papa	
E 19	Naranja amarilla	Carmelita	Bacilo corto Gram negativo
E 26	Amarillo oscuro-naranja	Carmelita	Bacilo corto Gram negativo
E 42	Naranja	Carmelita	Bacilo corto Gram negativo
E 46	Naranja	Carmelita	Bacilo corto Gram negativo
PAL 5	Naranja	Carmelita	Bacilo corto Gram negativo

LGI: medio de cultivo

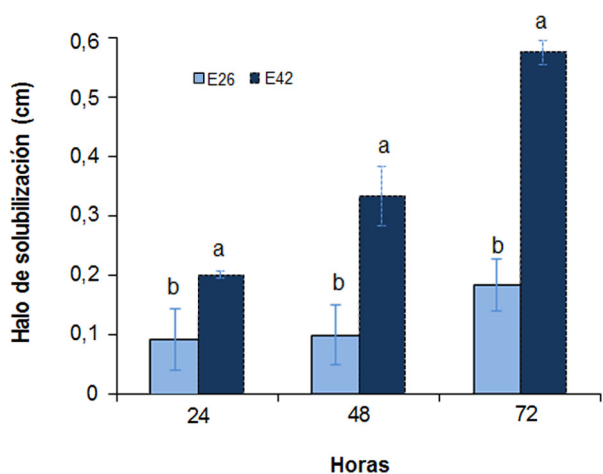
Tabla III. Características fisiológicas de las cepas de *G. diazotrophicus* aisladas en el estudio y su comparación con el patrón de referencia internacional PAL 5

Cepa	Cat	Ox	Ind	Cit	Mot	Alm	Gel	Sac 30 %	Glu 30 %
E 19	+	-	-	-	+	-	-	+	+
E 26	+	-	-	-	+	-	-	+	+
E 42	+	-	-	-	+	-	-	+	+
E 46	+	-	-	-	+	-	-	+	+
PAL 5	+	-	-	-	+	-	-	+	+

En otros trabajos se reconoce la presencia de *G. diazotrophicus* en mango (11), yuca (12) y remolacha (13), por lo que esta sería la primera referencia para el caso de la guayaba. El crecimiento óptimo del microorganismo tiene lugar en medios con una concentración de sacarosa del 10 % y un pH de 5,5, por lo que el interior de los frutos de este cultivo tiene condiciones favorables para su establecimiento.

Los cuatro microorganismos seleccionados como posibles cepas de *G. diazotrophicus* presentaron características favorables para la estimulación del crecimiento vegetal. Todas fijan nitrógeno atmosférico, teniendo en cuenta su crecimiento durante las cinco inoculaciones realizadas en el medio carente de nitrógeno mineral. La fijación biológica de nitrógeno es una característica descrita para la especie *G. diazotrophicus* desde su aislamiento (1). Teniendo en cuenta que este aspecto se evaluó como presencia/ausencia de crecimiento bacteriano, sería conveniente determinar si entre los cuatro microorganismos se presentan diferencias en la cantidad de nitrógeno fijado, a partir de otras técnicas como la reducción de acetileno (ARA).

Al evaluar el potencial de solubilización de fósforo, solo mostraron resultados positivos las cepas E 26 y E 42, destacándose esta última con diferencias significativas desde las 48 horas de incubación (Figura 1). Investigaciones realizadas en sistemas *in vitro* demuestran la solubilización de fósforo inorgánico para la especie *G. diazotrophicus*, que se encuentra asociada de forma directa a la liberación de ácido glucónico (14).



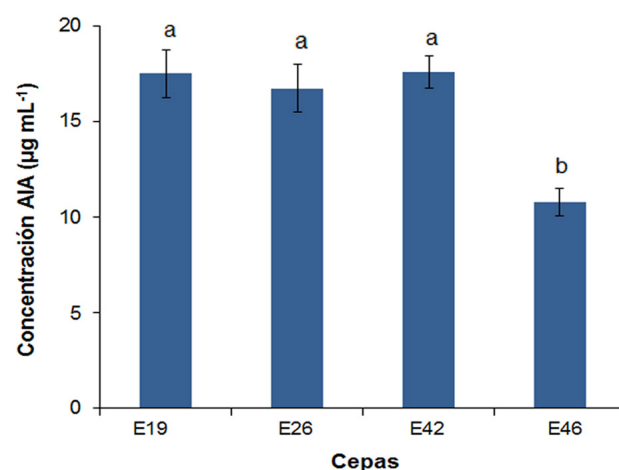
Medias del mismo tiempo con letras distintas difieren estadísticamente para 5 % de significación, según prueba "t" de Student
Las barras indican la desviación estándar en cada caso:
24 horas: t: -3,1788, P: 0,01910; 48 horas: t: -4,5826, P: 0,0038
72 horas: t: -14,1947, P: 0,000008

Figura 1. Solubilización de fósforo inorgánico en medio NBRIP por parte de los aislados E26 y E42 a las 24, 48 y 72 horas

Aunque de forma general, la solubilización de nutrientes se asocia a microorganismos rizosféricos, las especies endófitas como *G. diazotrophicus* podrían incrementar la disponibilidad de estos en los estadios iniciales de colonización y contribuir así a la estimulación del crecimiento vegetal. Además, la disminución del pH en el medio por la acción de los compuestos ácidos puede constituir una ventaja adaptativa al disminuir parte de la competencia presente en el ambiente rizosférico.

Los niveles de producción de ácido indol acético (AIA) para los cuatro microorganismos aislados en el estudio (Figura 2) fueron altos (valores cercanos a $17 \mu\text{g mL}^{-1}$), según datos comentados por otros autores (5); de 35 cepas pertenecientes a la especie *G. diazotrophicus*, solamente siete alcanzaron concentraciones mayores a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Teniendo en cuenta esta referencia, los resultados son favorables aún para la cepa E 46, que liberó $11 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA al medio de cultivo.

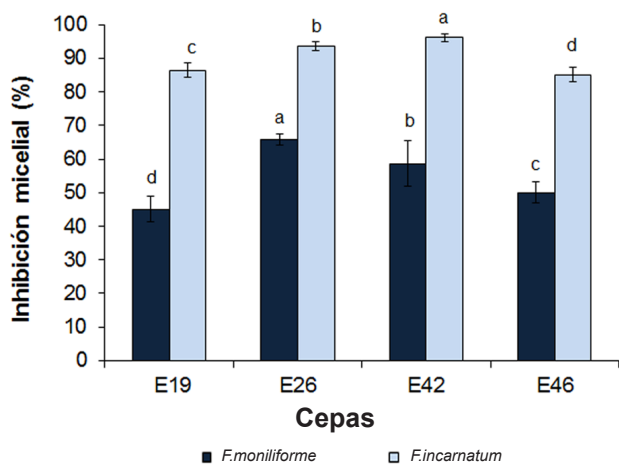
Se conoce el efecto del AIA en la formación de los dominios apicales, la diferenciación vascular y el desarrollo de los órganos (15). En particular, para *G. diazotrophicus* las investigaciones realizadas demuestran que incrementa el crecimiento y la longitud de las raíces, lo que trae como resultado un mayor acceso a los nutrientes al aumentar la superficie de exploración del cultivo (5). Por tal razón, el hecho de que todas las cepas aisladas en el estudio presenten esta característica, constituye un aspecto práctico importante para su futuro empleo en la elaboración de inoculantes para el beneficio de cultivos de interés.



Medias con letras distintas difieren estadísticamente para 5 % de significación, según ANOVA por Rangos Múltiples de Duncan
Las barras indican la desviación estándar en cada caso
Esx: 0,603043, CV (%): 19,48

Figura 2. Producción de ácido indol acético (AIA) en cuatro aislados posibles de *G. diazotrophicus*

Otro de los atributos metabólicos de la especie *G. diazotrophicus*, útil para la elaboración de productos de uso agrícola, es su capacidad antagonista. Este indicador mostró una respuesta positiva para todas las cepas frente a *Fusarium moniliforme* y *F. incarnatum*, con un control superior a 40 %. Sobresale el efecto sobre *F. incarnatum* y se destacan de forma general las cepas E26 y E42 por la inhibición provocada al crecimiento de los patógenos (Figura 3).



F. moniliforme: Esx: 0,10673; CV (%): 16,83
F. incarnatum: Esx: 0,433785; CV (%): 5,57

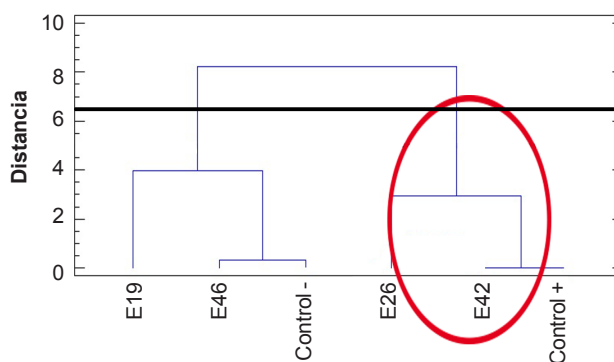
Medias con letras distintas difieren estadísticamente para 5 % de significación, según ANOVA por Rangos Múltiples de Duncan. Las barras indican la desviación estándar en cada caso.

Figura 3. Inhibición del crecimiento micelial de especies de *Fusarium* por posibles cepas de *G. diazotrophicus*

El efecto de *G. diazotrophicus* frente a especies de *Fusarium* es un aspecto poco abordado a nivel internacional, por lo que los resultados de esta investigación son novedosos. Las especies fúngicas evaluadas forman parte del complejo de hongos del suelo y tienen una alta incidencia en numerosos cultivos, fundamentalmente en hortalizas y frutales, por la persistencia de las estructuras reproductivas del hongo en el suelo y los sustratos (16).

Los resultados de la investigación indican que los posibles aislados de *G. diazotrophicus* purificados en el estudio liberan diferentes metabolitos, en dependencia del patógeno que se encuentre presente, teniendo en cuenta las variaciones del porcentaje de control para una misma cepa bacteriana ante las dos especies de hongos y los resultados similares que han discutido otros investigadores para el caso de géneros bacterianos como *Bacillus* (17). La mayor cantidad de resultados de actividad de *G. diazotrophicus* frente al género *Fusarium* se concentran en la especie *F. oxysporum*, donde se ha demostrado el papel de los metabolitos de carácter antibiótico como el pirrolnitrin y pioletoerin (18).

Las cepas se agruparon según los resultados cuantitativos del estudio, quedando conformados dos grupos. Se destacan en la rama cercana al control positivo, compuesto por los mayores valores de cada una de las determinaciones realizadas, los microorganismos provenientes de remolacha (E26) y mango (E42), los que se recomienda evaluar en condiciones *in vivo* frente a diferentes cultivos (Figura 4).



Distancia de corte 50 %. El control positivo está formado por los valores más altos y el negativo por los más bajos

Figura 4. Dendrograma para el agrupamiento de las posibles cepas de *G. diazotrophicus*, calculado a partir de los valores obtenidos en cada uno de los experimentos cuantitativos. Cuadrado de la distancia euclidiana

A partir de la investigación realizada se cuenta con cuatro posibles cepas de *G. diazotrophicus* aisladas de plantas cultivadas en ecosistemas cubanos, las que presentan mecanismos directos e indirectos de estimulación del crecimiento vegetal. El trabajo ratificó que la especie bacteriana presenta características positivas para constituir la base de bioproductos estimuladores del crecimiento y demostró la necesidad de realizar investigaciones de este tipo, como paso inicial en la selección de cepas, teniendo en cuenta la diversidad en la expresión del potencial metabólico del microorganismo.

CONCLUSIONES

- ◆ Los cuatro microorganismos aislados desde los cultivos de mango, guayaba, yuca y remolacha tienen posibilidades de pertenecer a la especie *G. diazotrophicus*, teniendo en cuenta sus características morfológicas y fisiológicas.
- ◆ Los microorganismos aislados presentan características positivas que contribuyen a la estimulación del crecimiento vegetal, con un grado de expresión variable.
- ◆ Los microorganismos aislados de los cultivos de mango y remolacha sobresalen por sus características para la estimulación del crecimiento vegetal, por lo que son promisorias para evaluar su efecto en condiciones *in vivo* sobre cultivos de interés agrícola.

RECOMENDACIONES

- ◆ Identificar los cuatro microorganismos aislados.
- ◆ Determinar mediante otros métodos el potencial de FBN de los cuatro microorganismos aislados en el estudio.
- ◆ Realizar ensayos para evaluar la estimulación del crecimiento en condiciones *in vivo* con los microorganismos provenientes de los cultivos de mango y remolacha.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cavalcante, V. A. y Dobereiner, J. "A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane". *Plant and Soil*, vol. 108, no. 1, mayo de 1988, pp. 23-31, ISSN 0032-079X, 1573-5036, DOI 10.1007/BF02370096.
2. Prabudoss, V. "A real multi beneficial endophytic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* for sugarcane". *International Journal of Current Research*, vol. 3, no. 6, 2011, pp. 103-106, ISSN 0975-833X.
3. Praduboss, V. y Stella, D. "Growth enhancing association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and AM fungi in sugarcane". *International Journal of Current Research*, vol. 4, 2010, pp. 140-141, ISSN 0975-833X.
4. Kumarasamy, V. y Santhaguru, K. "Growth performance of *Sorghum bicolor* (L.) Moench in response to inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*". *Genetic and Plant Physiology*, vol. 1, no. 3-4, 2011, pp. 130-138, ISSN 1314-6394, 1314-5770.
5. Patil, N. B.; Gajbhiye, M.; Ahiwale, S. S.; Gunjal, A. B. y Kapadnis, B. "Optimization of Indole 3acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane". *International Journal of Environmental Sciences*, vol. 2, no. 1, 2011, pp. 295-302, ISSN 0976-4402.
6. Dibut, B.; Martínez, R.; Ríos, Y.; Plana, L.; Rodríguez, J.; Ortega, M. y Tejada, G. "Estudio de la asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus*-viandas tropicales establecidas sobre suelo Ferralítico Rojo. II. Determinación del método de inoculación más eficiente para la incorporación de *G. diazotrophicus* en los cultivos de boniato, yuca y malanga". *Cultivos Tropicales*, vol. 31, no. 3, septiembre de 2010, pp. 20-26, ISSN 0258-5936.
7. Nautiyal, C. S. "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms". *FEMS Microbiology Letters*, vol. 170, no. 1, 1 de enero de 1999, pp. 265-270, ISSN 1574-6968, DOI 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
8. Glickmann, E. y Dessaux, Y. "A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 2, 2 de enero de 1995, pp. 793-796, ISSN 0099-2240, 1098-5336.
9. Singh, S.; Datta, P. y Patel, R. "Survival and Growth of Diazotrophic Cyanobacterial Isolates Exposed to Rice-Field Herbicides". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 70, no. 5, mayo de 2003, pp. 1052-1058, ISSN 0007-4861, 1432-0800, DOI 10.1007/s00128-003-0089-y.
10. 1Statistical Graphics Crop. *STATGRAPHICS® Plus* [en línea]. (ser. Profesional), versión 5.1, [Windows], 2000, Disponible en: <http://www.statgraphics.com/statgraphics/statgraphics.nsf/pd/pdpricing>.
11. Matiru, V. y Thomson, J. "Can *Acetobacter diazotrophicus* be used as a growth promoter for coffee, tea and banana plants". En: ed. Dakora F. D., *Proceedings of the 8th Congress of the African Association for Biological Nitrogen Fixation*, edit. University of Cape Town, South Africa, 1998, pp. 129-130.
12. Dibut, B.; Ortega, M.; Martínez, R.; Fey, L. y Ríos, Y. "Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba". *Cultivos tropicales*, vol. 26, no. 2, 2005, pp. 5-10, ISSN 0258-5936.
13. Crespo, J. M.; Boiardi, J. L. y Luna, M. F. "Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment". *Agricultural Sciences*, vol. 2, no. 1, 2011, pp. 16-22, ISSN 2156-8553, DOI http://dx.doi.org/10.4236/as.2011.21003.
14. Martínez, R. y Dibut, B. *Biofertilizantes Bacterianos*. edit. Científico Técnica, La Habana, Cuba, 2012, 279 p., ISBN 978-959-05-0659-8.
15. Velázquez, H. M. L.; Baizabal, A. V. M.; Cruz, V. F.; Trejo-, C. M. J.; Fuentes, R. L. E.; Bravo, P. A.; Cajero, J. M.; Chávez, M. M. P. y Valdez, A. J. J. "*Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation". *Archives of Microbiology*, vol. 193, no. 2, 20 de noviembre de 2010, pp. 137-149, ISSN 0302-8933, 1432-072X, DOI 10.1007/s00203-010-0651-z.
16. Agrios, G. N. *Plant Pathology*. 7ª ed., edit. Elsevier Academic Press, London, 2013, 929 p., ISBN 0-12-044565-4.
17. Reyes, R. A.; Ruiz, S. E.; Yam, C. C. y Dzul, C. M. "Selección de *Bacillus* spp. con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo". *Fitosanidad*, vol. 15, no. 2, 25 de abril de 2012, pp. 117-121, ISSN 1818-1686.
18. Logeshwarn, P.; Thangaraj, M. y Rajasundari, K. "Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*)". *Phytopathology and Plant Protection*, vol. 44, no. 1, 2011, pp. 216-223, ISSN 1477-2906.

Recibido: 1 de octubre de 2014

Aceptado: 16 de abril de 2015