



## The culture medium effect in plant growth promotion activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in carrot and sugar beet

### El medio de cultivo influye en la actividad promotora del crecimiento vegetal de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en zanahoria y remolacha

Ríos Rocafull, Y.<sup>1</sup>, Sánchez López, M.I.<sup>2</sup>, Dibut Álvarez, B. L.<sup>1</sup>, Ortega García, M.<sup>1</sup>,  
Tejeda González, G.<sup>1</sup>, Rodríguez Sánchez, J.<sup>1</sup>, Rojas Badía, M. M.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", Cuba.

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 #455 e/ J e I Vedado, La Habana. Cuba.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Ríos Rocafull, Y., Sánchez López, M.I., Dibut Álvarez, B. L., Ortega García, M., Tejeda González, G., Rodríguez Sánchez, J., Rojas Badía, M. M. (2019). The culture medium effect in plant growth promotion activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in carrot and sugar beet. *Revista Bio Ciencias* 6, e470. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e470>



#### ABSTRACT

For *Gluconacetobacter diazotrophicus* cultivation have been used different media, but a few researches shows the changes in the plant growth promoting traits of this microorganism. The aim of this work was to evaluate *in vitro* and *in vivo* conditions the effect of five culture media in plant growth promotion activity of this bacterium in carrot and sugar beet. The bacterium concentration after 48 hours of fermentation in a shaker was  $10^{12}$  CFU.mL<sup>-1</sup> in all media. After the fermentation process, the bacterium has stable growth in culture medium without combine nitrogen; but it has difference in the solubilization halo in NBRIP medium, indicating the affectation of phosphorous solubilization ability. The effect of final fermentation products application over carrot and sugar beet also depend of the medium used for microorganism growth. Media like SG and SYP where better for the action over lives and MA medium (rice) was

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 21<sup>st</sup> 2018.

Accepted/Aceptado: June 27<sup>th</sup> 2019.

Available on line/Publicado: July 1<sup>st</sup> 2019.

#### RESUMEN

Para el crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* se han utilizado diferentes medios de cultivos, aunque existen pocos trabajos que ilustran cómo estos afectan las características del microorganismo y su efecto en la planta. El objetivo de esta investigación fue evaluar en condiciones *in vitro* e *in vivo* el efecto de cinco medios de cultivos sobre el potencial como promotor del crecimiento vegetal de esta especie bacteriana en zanahoria y remolacha. La concentración del microorganismo después de 48 horas de fermentación en zaranda rotatoria se mantuvo en el orden de  $10^{12}$  CFU.mL<sup>-1</sup> para todos los medios de cultivo evaluados. Al finalizar el proceso fermentativo la bacteria presentó un crecimiento estable en un medio carente de nitrógeno combinado; sin embargo, las diferencias en los halos de solubilización en el medio NBRIP indican una afectación en la capacidad de solubilización de fósforo. El efecto de la aplicación de los productos finales de la fermentación sobre zanahoria y remolacha depende del medio utilizado para el crecimiento del microorganismo. Variantes como el SG y SYP producen una mayor influencia sobre el follaje, mientras que el medio MA (elaborado a base de arroz) sobresale por su efecto

#### \*Corresponding Author:

Marcia María Rojas Badía. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 #455 e/ J e I Vedado, La Habana. Cuba. Phone: (53) 7832 9241. E-mail: [marcia@fbio.uh.cu](mailto:marcia@fbio.uh.cu)

better in the action over root in both vegetables species. The results show the influence of culture medium in plant growth promotion activities of *G. diazotrophicus* in carrot and sugar beet.

sobre las raíces de ambas especies hortícolas. De esta forma se demuestra que el medio de cultivo influye en las características como promotor del crecimiento vegetal de *G. diazotrophicus* en zanahoria y remolacha.

---

## KEY WORDS

---

*Gluconacetobacter diazotrophicus*, bioproduct, metabolism.

---



---

## PALABRAS CLAVE

---

*Gluconacetobacter diazotrophicus*, bioproductos, metabolismo.

---

### Introduction

*Gluconacetobacter diazotrophicus* is an endophytic bacterium belonging to the phylum Proteobacteria, section Alpha, order Rhodospirillales and family Acetobacteraceae. It has great attractions for the preparation of biofertilizers due to its ability to fix atmospheric nitrogen, produce indoleacetic acid (IAA), solubilize mineral nutrients and exhibit antagonistic activity against phytopathogenic fungi (Reis *et al.*, 2015). Also, the positive results obtained by the inoculation on graminaceous plants (Kumarasamy & Santhaguru, 2011; Indi *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2011, Hernández-Escareño *et al.*, 2015) and tropical foods (Dibut *et al.*, 2011) were interesting in this way.

Different culture media used for the growth of this bacterial species are described. The liquid medium LGIM was used by Molinari & Bioardi (2013) to evaluate the production of biomass and levana. On the other hand, Dibut *et al.* (2011) obtained a biopreparate for agricultural use in the SG medium. The liquid DYGS medium was used to determine the influence of gluconic acid on the antagonistic activity of the microorganism (Nieto-Peñalver *et al.*, 2014), as well as to investigate aspects related to the endophytic colonization process (Alquéres *et al.*, 2013). Although the culture medium used for the bacterial growth, can exert effects on its metabolism, no research was found in the consulted literature where the effect as plant growth promoting bacteria for this species is demonstrated. This aspect has great importance for the biotechnological application of *G. diazotrophicus*. It is also decisive for the use of this microorganism in the bioproducts obtainment for stimulate the plant growth in species of economic interest, since the effectiveness of these will depend on the composition of the medium.

### Introducción

*Gluconacetobacter diazotrophicus* es una bacteria endófito perteneciente al phylum Proteobacteria, sección Alfa, orden Rhodospirillales y familia Acetobacteraceae. Tiene grandes atractivos para la elaboración de biofertilizantes por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, producir ácido indolacético (IAA), solubilizar nutrientes minerales y presentar actividad antagonista frente a organismos fitopatógenos (Reis *et al.*, 2015). A ello se le une los resultados positivos obtenidos por su inoculación sobre gramíneas (Kumarasamy & Santhaguru, 2011; Indi *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2011; Hernández-Escareño *et al.*, 2015) y viandas tropicales (Dibut *et al.*, 2011).

En la literatura se describen diferentes medios de cultivo utilizados para el crecimiento de esta especie bacteriana. El medio LGIM líquido, se empleó por Molinari & Bioardi (2013) para evaluar la producción de biomasa y levana, mientras que en el 2011, Dibut *et al.* (2011) obtuvieron un biopreparado de uso agrícola en el medio SG. En las investigaciones realizadas para determinar la influencia del ácido glucónico en la actividad antagonista del microorganismo se usó el medio DYGS (Nieto-Peñalver *et al.*, 2014), al igual que para investigar aspectos relacionados con el proceso de colonización endofítica (Alquéres *et al.*, 2013). Aunque el medio de cultivo utilizado para el crecimiento del microorganismo puede ejercer efectos sobre su metabolismo, no se encontró en la literatura consultada ninguna investigación donde se demuestre su acción sobre el potencial como bacteria promotora del crecimiento vegetal de la especie bacteriana. Este aspecto es de gran importancia para la aplicación biotecnológica de *G. diazotrophicus*. Igualmente resulta determinante para el empleo del microorganismo en la obtención de bioproductos que estimulen el crecimiento de especies vegetales de interés económico, ya que de la composición del medio dependerá entonces la efectividad de estos.

The objective of this work was to determine the influence of the culture media used for the growth of *G. diazotrophicus* in its potential as a bacterium that promotes plant growth *in vitro* and *in vivo*.

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *G. diazotrophicus* en su potencial como bacteria promotora del crecimiento vegetal *in vitro* e *in vivo*.

## Material and Methods

**The research was conducted during 2012-2014 period.**

### Bacterial strain and culture media

The INIFAT Gd-42 strain of *Gluconacetobacter diazotrophicus* conserved in the Collection of Beneficial Bacteria of the Fundamental Research Institute for Tropical Agriculture Alejandro de Humboldt (INIFAT) (Ríos et al., 2016b) was used. The microorganism was grown under fermentation conditions in an orbital shaker at 150 rpm, at  $28 \pm 2$  °C of temperature. In the study, five culture media previously used in the study of this bacterium were used: LGI (Cavalcante & Döbereiner, 1998); SG (Döbereiner et al., 1993); SYP (Caballero-Mellado & Martínez-Romero, 1994); a modification of the

## Material y Métodos

**El trabajo se desarrolló durante los años 2012-2014.**

### Cepa bacteriana y medios de cultivo

Se utilizó la cepa INIFAT Gd-42 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* conservada en la Colección de Bacterias Beneficiosas del Instituto de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt (INIFAT) (Ríos et al., 2016b). El microorganismo fue crecido en condiciones de fermentación sumergida en agitador orbital a 150 rpm, a  $28 \pm 2$  °C de temperatura. En el estudio se utilizaron cinco medios de cultivo previamente empleados en el estudio de esta bacteria: LGI (Cavalcante & Döbereiner, 1998); SG (Döbereiner et al., 1993); SYP (Caballero-Mellado & Martínez-Romero, 1994); una modificación del medio DYGS (Siqueira

**Table 1.**  
**Media composition used in the study (each liter).**

**Tabla 1.**  
**Composición de los medios de cultivo utilizados en el estudio (para cada litro).**

LGI	SG	SYP	DYGS	MA
Sucrose 50 g	Glycerol 10mL	Sucrose 10 g	Sucrose 10 g	Sucrose 50 g Sugar 50 g
	Tryptone 5.0		Bacteriological Peptone 2 g	
			Glutamic acid 1.5	Rice cooked extract 50 g
Yeast extract 0.03	Yeast extract 1	Yeast extract 3 g	Yeast extract 3 g	Yeast extract 5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g	MgSO <sub>4</sub> 1.5 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.0 g	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.01	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 g	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,001			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.001	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,001			
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.005	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.05			
pH 5.5	pH 6.0	pH 6.0		pH 6.0
Cavalcante & Döbereiner, 1998	Döbereiner et al., 1993	Caballero-Mellado & Martínez-Romero, 1994	Siqueira et al., 2009	Ortega, 2012

DYGS medium (Siqueira *et al.*, 2009) and the MA medium (Ortega, 2012) (Table 1). All were prepared in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of effective volume, which were inoculated with the pure strain. The growth of the microorganism was evaluated by counting colonies on solid medium and calculating the colony forming units (CFU mL<sup>-1</sup>) (Madigan *et al.*, 2014). The samples were taken every two hours during the first 12 hours. Since that time, the samples were taken every four hours until the end of the 48 hours of fermentation.

#### ***In vitro* evaluation of nitrogen fixing and phosphorus solubilization activity**

Once the bacteria had grown in the five culture media, their capacity to fix atmospheric nitrogen and to solubilize phosphorus was evaluated under *in vitro* conditions. For the first case, a qualitative criteria was used (Pérez *et al.*, 2014), based on the growth of the microorganism during five successive inoculations performed by puncture in the semisolid LGI medium without combined nitrogen (Cavalcante & Döbereiner, 1998). The solubilization of phosphorus was evaluated from the subtraction between the halo of solubilization and the growth halo of the colony formed in the NBRIP medium (Nautiyal, 1999) at 72 hours of incubation. In both determinations the bacteria was maintained at temperature of 28 ± 2 °C and three repetitions of each one were made.

#### **Evaluation of the plant growth promotion activity**

To know the effect of the culture medium on the stimulation effect of *G. diazotrophicus* *in vivo* conditions, a greenhouse experiment was carried out. 2 kg capacity pots were used, which were filled with Ferralitic Red soil (Hernández *et al.*, 2015) without sterilization, characterized by having 2.85 % organic matter, pH 7.3, 2.09 ppm assimilable phosphorus and Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> content of 19.1; 4.2; 0.11 and 0.38 c.mol.kg soil<sup>-1</sup>.

Unsterilized seeds of carrot (*Daucus carota* L.) cultivar New Kuroda and sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivar Detroit Red were used. For the production of the bioproducts, *G. diazotrophicus* was cultivated in five culture media separately under submerged fermentation conditions in shaker orbital at 150 rpm and 28 ± 2 °C of temperature. Each culture was suspended in common water at 10 %, obtaining a final bacterial density of 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. The final solution was applied by spraying the

*et al.*, 2009) y el medio MA (Ortega, 2012) (Tabla 1). Todos se prepararon en matraces Erlenmeyers de 500 mL que contenían 250 mL de volumen efectivo, los que se inocularon con la cepa pura. El crecimiento del microorganismo se evaluó por conteo de colonias en medio sólido y calculando las unidades formadoras de colonias (CFU mL<sup>-1</sup>) (Madigan *et al.*, 2014). Las muestras se tomaron cada dos horas durante las primeras 12 horas de cultivo y a partir de ese momento, cada cuatro hasta finalizar las 48 horas de fermentación.

#### **Evaluación *in vitro* de la actividad fijadora de nitrógeno y de solubilización de fósforo**

Una vez crecida la bacteria en los cinco medios de cultivo, se evaluó en condiciones *in vitro* su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y de solubilizar fósforo. Para el primer caso se utilizó un criterio cualitativo (Pérez *et al.*, 2014), basado en el crecimiento del microorganismo durante cinco inoculaciones sucesivas realizadas por punción en el medio LGI semisólido libre de nitrógeno combinado (Cavalcante & Döbereiner, 1998). La solubilización de fósforo se evaluó a partir de la resta entre el halo de solubilización y el halo decrecimiento de la colonia formado en el medio NBRIP (Nautiyal, 1999) a las 72 horas de incubación. En ambas determinaciones la bacteria se mantuvo a una temperatura de 28 ± 2 °C y se realizaron tres repeticiones de cada uno.

#### **Evaluación de la actividad estimuladora del crecimiento de las plantas**

Para conocer el efecto del medio de cultivo sobre la acción estimuladora de *G. diazotrophicus* en condiciones *in vivo* se realizó un experimento en casa de cristal. Se utilizaron macetas de 2 kg de capacidad que se rellenaron con suelo Ferralítico Rojo (Hernández *et al.*, 2015) sin esterilizar, caracterizado por presentar un 2.85 % de materia orgánica, pH de 7.3 unidades, 2.09 ppm de fósforo asimilable y un contenido de iones Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> de 19.1; 4.2; 0.11 y 0.38 c.mol.kg suelo<sup>-1</sup>.

Se emplearon semillas sin esterilizar de zanahoria (*Daucus carota* L.) cultivar New Kuroda y de remolacha (*Beta vulgaris* L.) cultivar Detroit Red. Para la obtención de los productos se cultivó *G. diazotrophicus* en los cinco medios de cultivo por separado en condiciones de fermentación sumergida en zaranda orbital a 150 rpm de agitación, a 28 ± 2 °C de temperatura. Cada cultivo se resuspendió en agua común en una proporción del 10 %, obteniendo una densidad de población final de la bacteria de 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. La solución final se aplicó por aspersión al suelo, a razón de 10 mL por maceta, posterior a la germinación de la semilla de ambos cultivos, entendiéndose ésta

soil (10 mL per pot), after germination of the seed for both crops. The germination is considering as the emergence of the plant above the soil surface, which corresponded to a period of 15 days after sowing. At 75 days for sugar beet and 85 for carrot, several growth indicators were evaluated. The indicators were: length (cm) and diameter (cm) of the root, the widest part of the root (1 cm from the apex), the number of leaves, the height of the plants (cm), the fresh weight of the plant (g). For the first two indicators an instrument of 0.01 mm error was used, while in the height measurement of the plant a graduated rule was used and it was measured from the apex of the root to the beginning of the leaves for both plant species. The fresh weight was quantified with a semi-analytical balance (0.01 g of error). Twenty plants were used per treatment (culture medium). A control was added with the same number of plants, where only common water was applied.

#### Statistical tests

The obtained results in each experiment were averaged with the Microsoft Office Excel program on Windows, which was also used to prepare the graphs and to calculate the standard deviation of the mean. The statistical processing was carried out using the STATGRAPHICS version 5.0 program, which also verified the normality and homogeneity of the variances of the treatments, according to Kolmogorov-Smirnov, Cochran, Hartley and Bartlett tests. A completely randomized design was used. An Analysis of Variance (ANOVA) was performed with a Duncan test at 5 % significance.

## Results

The establishment of several stages in the five culture media used is highlighted when analyzing the growth curves of the INIFAT Gd-42 strain of *G. diazotrophicus* (Figure 1). This behavior corresponds to a diauxic growth. The first is framed between 0 and 10 h, the second between 10 and 16 h, the third, between 16 and 24 h, the fourth between 24 and 36 hours and the last from 36 to 48 h. The last stage corresponds to the stationary phase of growth. In the previous ones, the typical characteristics of a diauxic growth can be observed, where there are two lag phases followed by their corresponding exponential phase. The concentration values of the microorganism are in the order of  $10^{12}$  CFU.mL<sup>-1</sup>, and did not show significant

como la emergencia de la planta por encima de la superficie del suelo, la que se correspondió con un periodo de tiempo de 15 días después de sembradas. A los 60 días para el caso de la remolacha y 70 días para la zanahoria, correspondientes a plantas de 75 y 85 días de edad, respectivamente, se evaluaron como indicadores de crecimiento el largo (cm) y el diámetro (cm) de la raíz, considerando para este último la zona más ancha del órgano (1 cm del ápice), el número de hojas, la altura de las plantas (cm), el peso fresco de la planta (g). Para los dos primeros indicadores se utilizó un pie de Rey (0.01 mm de error), mientras que en la medición de la altura de la planta se empleó una regla graduada y se midió, para ambas especies vegetales, desde el ápice de la raíz hasta el inicio de las hojas. El peso fresco fue cuantificado con una balanza semianalítica (0.01 g de error). Se utilizaron 20 plantas por tratamiento (medio de cultivo). Se adicionó un testigo con la misma cantidad de plantas, donde se aplicó solamente agua común.

#### Pruebas estadísticas

Los resultados obtenidos en cada una de las determinaciones realizadas se promediaron con el programa Microsoft Office Excel sobre Windows, el que también se empleó para elaborar los gráficos y para el cálculo de la desviación estándar de la media. El procesamiento estadístico se realizó con el empleo del programa STATGRAPHICS versión 5.0, con el que también se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas de los tratamientos, según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Cochran C, Hartley y Bartlett. Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) con una prueba de Duncan al 5 % de significación.

## Resultados

Al analizar las curvas de crecimiento de la cepa INIFAT Gd-42 de *G. diazotrophicus* se destaca el establecimiento de varias etapas en los cinco medios de cultivo utilizados (Figura 1), lo que corresponde con un crecimiento diáuxico. La primera se encuentra enmarcada entre las horas 0 y 10, la segunda entre 10 y 16, la tercera, entre las 16 y 24, la cuarta entre 24 y 36 y la última desde las 36 hasta las 48 h. Esta última etapa corresponde con la fase estacionaria del crecimiento. En las anteriores, se pueden observar las características típicas de un crecimiento diáuxico, donde existen dos fases lag seguidas de su correspondiente fase exponencial. Los valores de concentración del microorganismo oscilaron en el orden de las  $10^{12}$  CFU.mL<sup>-1</sup>, y no mostraron diferencias

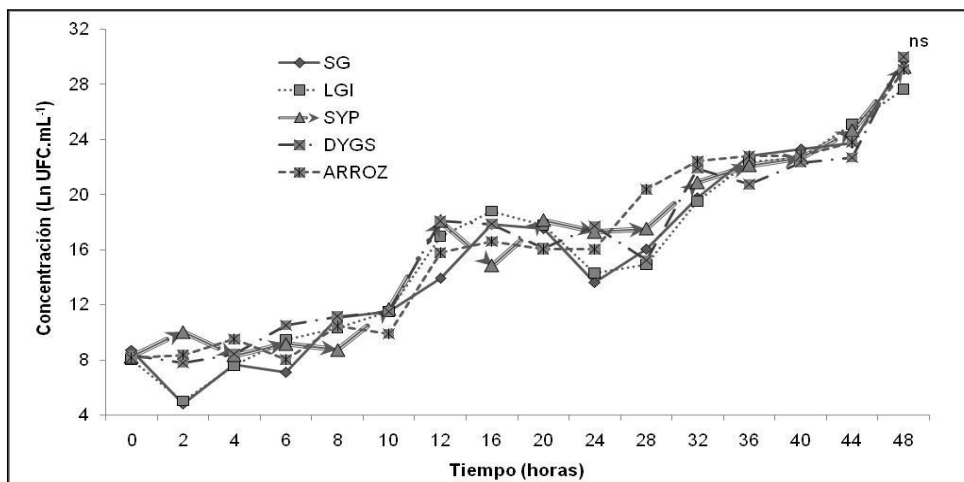


Figure 1. Behavior of the concentration of *G. diazotrophicus* strain INIFAT Gd-42 growing in five culture media. Hour 48: Esx: 0.386189; CV (%): 5.08.

Figura 1. Comportamiento de la concentración de *G. diazotrophicus* cepa INIFAT Gd-42 creciendo en cinco medios de cultivo. 48 horas: Esx: 0.386189; CV (%): 5.08.

statistical differences among the studied media when completing the 48 hours of the fermentation process.

Although the bacterial concentration remained stable, during the study their characteristics were checked, both *in vitro* conditions and the effect that the application of the final fermentation product on carrots and beets *in vivo*, related with the culture medium used for the growth of the strain. The microorganism kept the growth during five successive inoculations in semi-solid culture medium without combined nitrogen. This result suggests that the bacterium maintained its capacity to fix atmospheric nitrogen. On the other hand, the solubilization halo produced in the NBRIP solid medium was greater when the microorganism grew previously in the SYP and MA media (Table 2), which indicates that the medium used for the growth of the microorganism affects its ability to solubilize phosphorus.

Differences were observed in the stimulation of the growth of the two horticultural crops studied under *in vivo* conditions, depending on the culture medium where the microorganism grew during the fermentation process. In the case of carrots, there are differences in the variables measured with the different treatments (Table 3). The strain of

estadísticas significativas al completar las 48 horas del proceso fermentativo.

Aunque se mantuvo estable la concentración de la bacteria, durante el estudio se comprobaron sus características, tanto en condiciones *in vitro* como el efecto que puede producir la aplicación del producto final de la fermentación sobre la zanahoria y la remolacha *in vivo*, en relación con el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la cepa. El microorganismo mantuvo su crecimiento durante cinco inoculaciones sucesivas en medio de cultivo semisólido carente de nitrógeno combinado, resultado que sugiere que la bacteria mantuvo su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Por otra parte, el halo de solubilización producido en el medio sólido NBRIP fue mayor cuando el microorganismo creció previamente en los medios SYP y MA (Tabla 2), lo que indica que el medio utilizado para el crecimiento del microorganismo afecta su capacidad de solubilizar fósforo.

Al realizar el estudio en condiciones *in vivo*, se observaron diferencias en la estimulación del crecimiento de los dos cultivos hortícolas estudiados, en dependencia del medio de cultivo donde creció el microorganismo durante el proceso fermentativo.



**Table 2.**  
Phosphorous solubilization in NBRIP medium by *G. diazotrophicus* strain INIFAT Gd-42 grew in different culture media.

**Tabla 2.**  
Solubilización de fósforo en medio NBRIP por la cepa INIFAT Gd-42 de *G. diazotrophicus* creciendo en diferentes medios de cultivo.

Culture media	Solubilization halo (cm)
LGI	0.10 b
SYP	0.16 a
DYGS	0.09 b
SG	0.11 b
MA	0.16 a
Esx	0.0059
CV (%)	32.49

Note: Different letters indicate statistically differences according ANOVA and Duncan's test (5 %).

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, ANOVA y Duncan (5%).

*G. diazotrophicus* grown in the SG medium exerted a greater effect on the variables measured in the aerial part of the plants, such as height and fresh weight of the leaves, while there is no difference in this treatment with the non-inoculated control in the variable number of leaves. When the bacteria grew in MA medium, a positive effect was observed with respect to the control and superior to the rest of the

Para el caso de la zanahoria, existen diferencias de las variables medidas con los diferentes tratamientos (Tabla 3). La cepa de *G. diazotrophicus* crecida en el medio SG ejerció mayor efecto en las variables medidas en la parte aérea de las plantas, como altura y peso fresco de las hojas mientras que no existen diferencias de este tratamiento con el testigo en cuanto al número de hojas. Cuando la bacteria

**Table 3.**  
Effect of *G. diazotrophicus* INIFAT Gd-42 grown in different culture media in carrot crop (*Daucus carota* L.).

**Tabla 3.**  
Efecto de *G. diazotrophicus* INIFAT Gd-42 cultivado en diferentes medios de cultivo en cultivo de zanahoria (*Daucus carota* L.).

Culture media	Height (cm)	Number leaves	of	Leaves fresh weight (g)	Root diameter (cm)	Root length (cm)	Root Fresh weight (g)
SG	36 a	8.29 a		5.73 a	2.925 b	5.75 b	0.45 b
LGI	25.94 cd	6.88 bcd		3.85 bc	1.2 c	6.7 b	0.156 c
SYP	29.81 bc	6.43 cd		2.58cd	3.1 b	6.375 b	0.30 bc
DYGS	22.85 d	6.13 d		1.69 d	2.475 b	6.375 b	0.17 c
MA	31.31 b	7.56 ab		4.7 ab	5.56 a	7.9 a	0.92 a
non-inoculated	30.0 b	7.29 abc		4.04 b	1.475 c	6.175 b	0.244 c
Esx	1.3852	0.3557		0.4715	0.3012	0.3655	0.0543
CV (%)	18.83	16.52		48.92	55.79	14.72	74.32

Note: different letters indicate statistically differences according ANOVA and Duncan's test (5 %).

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, ANOVA y Duncan (5 %).

treatments in the root zone, where the root diameter and length were measured, as well as its fresh weight.

For beet, a greater effect is shown in comparison with the non-inoculated control (Table 4). In the aerial part of the plant, greater height was obtained with the bacteria grown in the SG medium and a greater number of leaves when inoculated with the product of the fermentation in SYP medium. The effect on the root was more evident, significant differences are shown for all media with respect to the variant not inoculated with the microorganism. In the root length the products obtained in MA, SYP, SYGS and LGI media are superior to the control and in the diameter of this the best results were obtained with the bacterium grown in MA, SYP, SYGS and SG media, although there are also differences in the effect on LGI with the witness. In the case of the variable fresh weight of the plant, the effect of the bacterium grown in MA medium is highlighted over the rest of the treatments, included in the non-inoculated control.

## Discussion

Different culture media have been used for the growth of *G. diazotrophicus* (Eskin *et al.*, 2014). For example, the DYGS medium (Siqueira *et al.*, 2009)

creció en el medio MA, se observó un efecto positivo respecto al testigo y superior al resto de los tratamientos en la zona radical, donde se midieron el diámetro y el largo de la raíz, así como su peso fresco.

Para la remolacha se manifiesta un mayor efecto en comparación con el testigo no inoculado (Tabla 4). En la parte aérea de la planta se obtiene mayor altura con la bacteria crecida en el medio SG y mayor número de hojas cuando se inoculó con el producto de la fermentación en medio SYP. El efecto sobre la raíz fue más marcado, se muestran diferencias significativas para todos los medios con respecto a la variante no inoculada con el microorganismo. En el largo de la raíz los productos obtenidos en los medios MA, SYP, SYGS y LGI son superiores al testigo, y en el diámetro de esta, los mejores resultados se obtuvieron con la bacteria crecida en los medios MA, SYP, SYGS y SG, aunque también hay diferencias del efecto en LGI con el testigo. En el caso de la variable peso fresco de la planta, se destaca el efecto de la bacteria crecida en medio MA sobre el resto de los tratamientos, incluido en testigo no inoculado.

## Discusión

Diferentes medios de cultivo se han utilizado para el crecimiento de *G. diazotrophicus* (Eskin *et al.*,

**Table 4.**  
**Effect of *G. diazotrophicus* INIFAT Gd-42 grown in different culture media in sugar beet crop (*Beta vulgaris* L.).**

**Tabla 4.**  
**Efecto de *G. diazotrophicus* crecido en diferentes medios sobre el cultivo de la remolacha (*Beta vulgaris* L.).**

Culture media	Height (cm)	Number of leaves	Root diameter (cm)	Root length (cm)	Root weight (g)	Fresh weight (g)
SG	20.33 a	3.33 b	3.40 a	2.63 bc	3.88 abc	
LGI	17.8 bc	3.67 b	2.80 b	2.83 b	4.1 abc	
SYP	16.67 c	4.8 a	3.50 a	3.0 ab	4.38 ab	
DYGS	17.83 bc	3.83 ab	4.20 a	2.98 ab	3.84 bc	
MA	19.00 ab	4.33 ab	4.20 a	3.32 a	4.73 a	
Testigo	17.25 bc	3.50 b	2.30 c	2.32 c	3.27 c	
Esx	0.7323	0.3694	0.3574	0.1488	0.2436	
CV (%)	11.02	24.79	28.83	16.22	16.05	

Note: Different letters indicate statistically differences according ANOVA and Duncan's test (5 %).

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, ANOVA y Duncan (5%).



was used in fermentation trials to evaluate the effect of osmoprotective substances on this bacterial species; while the SYP medium has been used to determine the effect of different concentrations of phytohormones on the microorganism (Rojas *et al.*, 2015). For the growth of the bacterium in order to evaluate the effect of its application on plant species such as tropical meats (Dibut *et al.*, 2011) and grasses (Muthukumarasami *et al.*, 2006), media such as the LGI and SG have been used, respectively.

However, in the consulted literature no papers were found where the action exerted by the culture medium on the potential as a bacterium that promotes the plant growth of *G. diazotrophicus*, including the effect of the final product of the fermentation of the microorganism on the stimulation produced by the application on vegetables, is evaluated. There is also no consensus on which means to use to obtain a bioproduct for agricultural use, but the use of media based on natural products are more attractive considering the economic and environmental aspects. For this reason, the potential as a plant growth promoting bacterium of the INIFAT Gd-42 strain of *G. diazotrophicus* was evaluated under *in vitro* and *in vivo* conditions, after growing in five culture media.

The growth curve obtained in all cases is similar to that described by Molinari & Bioardi (2013). According to these authors there are few studies about the growth of *G. diazotrophicus* in the presence of sucrose as a carbon source. The establishment of a diauxic growth is probably associated with the presence of sucrose as a carbon source and the impossibility of the microorganism to transform this sugar directly, as well as the gradual consumption of the different substrates that are originated by the activity of the enzyme levansucrose (Hernández *et al.*, 1995; Molinari & Bioardi, 2013). In all used media, diauxic growth was obtained, and the two phases of adaptation or lag, and of exponential growth, typical of using more than one carbon and energy source in the medium, can be appreciated. The bacterium will first use the source of energy that allows it to grow better, and later when it is exhausted, others present in the environment (Madigan *et al.*, 2014). In all media there is more than one compound that can have this function as can be seen in Table 1. However, regarding the values of final concentration of the bacterium reached, these were similar to each other and to those referred to in the works from Dibut *et al.* (2011) and Luna *et al.* (2010).

2014). Por ejemplo, el medio DYGS (Siqueira *et al.*, 2009) se empleó en ensayos de fermentación para evaluar el efecto de sustancias osmoprotectoras sobre esta especie bacteriana; mientras que el medio SYP, se ha utilizado en la determinación del efecto de distintas concentraciones de fitohormonas sobre el microorganismo (Rojas *et al.*, 2015). Para el crecimiento de la bacteria con el fin de evaluar el efecto de su aplicación sobre especies vegetales como viandas tropicales (Dibut *et al.*, 2011) y gramíneas (Muthukumarasamy *et al.*, 2006) se han utilizado medios como el LGI y SG, respectivamente.

Sin embargo, en la literatura consultada no se encontraron trabajos donde se evalúe la acción que ejerce el medio de cultivo sobre el potencial como bacteria promotora del crecimiento vegetal de *G. diazotrophicus*, incluyendo su efecto en estimulación que se produce por la aplicación sobre hortalizas, del producto final de la fermentación del microorganismo. Tampoco existe un consenso acerca de cuál medio emplear para la obtención de un bioproducto de uso agrícola, pero el empleo de medios a base de productos naturales, son más atractivos considerando los aspectos económicos y ambientales. Por esta razón se evaluó, en condiciones *in vitro* e *in vivo*, el potencial como bacteria promotora del crecimiento vegetal de la cepa INIFAT Gd-42 de *G. diazotrophicus*, después de crecer en cinco medios de cultivo.

La curva de crecimiento obtenida en todos los casos es similar a la descrita por Molinari & Bioardi (2013). Según estos autores existen pocos estudios acerca del crecimiento de *G. diazotrophicus* en presencia de sacarosa como fuente de carbono. El establecimiento de un crecimiento diauxico probablemente esté asociado a la presencia de la sacarosa como fuente de carbono y a la imposibilidad del microorganismo de transformar este azúcar de forma directa, así como al consumo gradual de los diferentes sustratos que se originan por la actividad de la enzima levanosacarasa (Hernández *et al.*, 1995; Molinari & Bioardi, 2013). En todos los medios utilizados se obtuvo un crecimiento diauxico, y se pueden apreciar las dos fases de adaptación o lag, y de crecimiento exponencial, típico de utilizar más de una fuente de carbono y energía presentes en el medio. La bacteria utilizará primero la fuente de energía que le permita crecer mejor, y posteriormente al agotarse esta, otras presentes en el medio (Madigan *et al.*, 2014). En todos los medios existe más de un compuesto que puede tener esta función como se puede observar en la Tabla 1. No obstante, en cuanto a los valores de concentración final de la bacteria alcanzados, estos fueron semejantes entre sí y a los referidos en los trabajos de Dibut *et al.* (2011) y Luna *et al.* (2010).

The fact that a formulation made from a natural product such as rice, supports the growth of the bacteria. It is an encouraging result from the technological point of view, because for the scaling of a bioproduct requires little complex means where they are incorporated natural sources. Therefore, this could be a variant to exploit in the search for a biofertilizer that has this bacterial species as an active principle. The rice medium (MA) can provide the microorganism with B vitamins, minerals, proteins, amino acids and other nutrients that are present in the rice grain (Pincioli, 2010). These compounds can contribute to the growth of the bacteria, obtaining a medium rich in nutrients from cooking the rice and mixing with the other components of the medium.

The ability to fix nitrogen was described for *G. diazotrophicus* from its isolation (Cavalcante & Döbereiner, 1998). There are references where the possibility of growth of microorganisms in semi-solid media without combined nitrogen with the process of biological nitrogen fixation is associated (Pérez *et al.*, 2014, de la Fé *et al.*, 2015). This criteria was used in the study for determine the maintenance of this characteristic in the bacteria. However, it would be interesting to show in later research that the amount of atmospheric nitrogen that can transform the microorganism is not affected either. On the other hand, the differences in phosphorus solubilization haloes are in corresponding with previous observation of Crespo *et al.* (2011). They described the influence of the carbon source on the solubilization potential of *G. diazotrophicus* and they showed that the increase in phosphorus soluble is proportional to gluconic acid production. This semiquantitative method allows having a reference of the maintenance of the capacity for phosphates solubilization by the bacteria.

The stimulation of growth indicators by the inoculation of promotig bacteria may be associated, in addition to the contribution of nutrients made by the biological fixation of nitrogen and the solubilization of phosphorus, to other factors such as the release of phytohormones (Pazos *et al.*, 2016 ) and colonization of the rhizospheric and endophytic environment (Jha *et al.*, 2013). For *G. diazotrophicus*, the ability to release hormones, mainly indoleacetic acid, is described, which can also be affected by the culture medium used for the growth of the bacteria (Patil *et al.*, 2011). It can be producing the particular stimulation of speciphic organ of the plant. Other authors describe the influence of the carbon source in the production of

El hecho de que una formulación elaborada a partir de un producto natural como el arroz, sustente el crecimiento de la bacteria, constituye un resultado alentador desde el punto de vista tecnológico, pues para el escalado de un bioproducto se necesitan medios poco complejos donde se incorporen fuentes naturales. Por lo tanto, esta podría ser una variante a explotar en la búsqueda de un biofertilizante que tenga como principio activo esta especie bacteriana. El medio de arroz (MA) puede proveer al microorganismo de vitaminas del complejo B, minerales, proteínas, aminoácidos y otros nutrientes que están presentes en el grano de arroz (Pincioli, 2010) y que pueden contribuir al crecimiento de la bacteria, obteniéndose un medio rico en nutrientes a partir del cocinado del arroz y la mezcla con los otros componentes del medio.

La capacidad de fijar nitrógeno fue descrita para *G. diazotrophicus* desde su aislamiento (Cavalcante & Döbereiner, 1998). Existen referencias donde se asocia la posibilidad de crecimiento de los microorganismos en medios semisólidos carentes de nitrógeno combinado con el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Pérez *et al.*, 2014; de la Fé *et al.*, 2015), criterio utilizado en el estudio para determinar el mantenimiento de esta característica en la bacteria. Sin embargo, sería interesante demostrar en investigaciones posteriores que tampoco se afecta la cantidad de nitrógeno atmosférico que puede transformar el microorganismo. Por otra parte, las diferencias en los halos de solubilización de fósforo está en correspondencia con lo que plantearon Crespo *et al.* (2011), quienes describieron la influencia de la fuente de carbono en el potencial de solubilización de *G. diazotrophicus* y demostraron que el incremento de fósforo soluble es proporcional al de ácido glucónico. Este método semicuantitativo permite tener una referencia del mantenimiento de la capacidad de solubilización de fosfatos por la bacteria.

La estimulación de indicadores del crecimiento por la inoculación de bacterias promotoras puede estar asociada, además de la contribución de nutrientes realizada por la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fósforo, a otros factores como la liberación de fitohormonas (Pazos *et al.*, 2016) y la colonización del ambiente rizosférico y endófito (Jha *et al.*, 2013). Para el caso de *G. diazotrophicus* se describe la capacidad de liberar hormonas, fundamentalmente ácido indolacético, aspecto que también puede ser afectado por el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la bacteria (Patil *et al.*, 2011), produciendo la estimulación particular de algún órgano de la planta. Otros autores describen la influencia de la fuente de carbono en la producción de exopolisacáridos, compuestos

exopolysaccharides, compounds of great importance for the biofilms formation, stress tolerance and the establishment of the bacteria inside of crops (Meneses *et al.*, 2011).

The ability of *G. diazotrophicus* to increase the growth of natural or occasional host crops has been demonstrated primarily for grasses (Nautiyal, 1999), food and fruit (Dibut *et al.*, 2011). For vegetables, Hazza *et al.* (2014) and Kumar *et al.* (2013), demonstrated *G. diazotrophicus* colonization in carrots, and the increase of sugar beet yields due to the application of the microorganism. In Cuba, Ríos *et al.* (2016a) obtained encouraging results in the bacteria interaction with carrot and sugar beet. However, in the present work it is shown that the effect on growth stimulation in these crops will depend on the culture medium used for the growth of the bacteria, so attention must be paid to their composition to obtain the best agronomic results. This effect is demonstrated mainly at the root level, an organ of vital agronomic importance in these crops. For this reason in this case it is sufficient for the analysis of the stimulation of the growth of the plant the measurements of fresh weight, since just the root is what is used for human consumption.

In general, it is demonstrated that the culture medium influences in the potential plant growth promotion by *G. diazotrophicus*. That is why, it is an important aspect to take into account in the biotechnological production of agricultural products for the benefit of economical important plant species.

## Conclusions

The culture medium used for the growth of *G. diazotrophicus* influences in its plant growth stimulating potential. The use of culture medium composed mainly of rice, sucrose and commercial sugar, produces greater benefits in the growth stimulation of carrot and sugar beet compared with other alternatives such as SG, SYP, DYGS and LGI.

## References

Alquéres S., Meneses C., Rouws L., Rothballer M., Baldani I., Schmid M. and Hartmann M. (2013). The Bacterial Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase Are Crucial for Endophytic Colonization of Rice Roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. MPMI; 26(8): 937-945. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0286-R>

de gran importancia para la formación de biopelículas, la tolerancia al estrés y el establecimiento de la bacteria en el interior de los cultivos (Meneses *et al.*, 2011).

La capacidad de *G. diazotrophicus* de incrementar el crecimiento de cultivos hospederos naturales u ocasionales ha sido demostrada fundamentalmente para gramíneas (Nautiyal, 1999), con algunos trabajos en viandas y frutales (Dibut *et al.*, 2011). Para hortalizas, autores como Hazza *et al.* (2014) y Kumar *et al.* (2013) demostraron la posibilidad de colonización de *G. diazotrophicus* en zanahoria y el aumento de los rendimientos de la remolacha por la aplicación del microorganismo. En Cuba, Ríos *et al.* (2016a) obtuvieron resultados alentadores en interacción con zanahoria y remolacha. Sin embargo, en el presente trabajo se demuestra que el efecto en la estimulación del crecimiento en estos cultivos dependerá del medio de cultivo empleado para el crecimiento de la bacteria, por lo que debe prestarse atención a su composición para obtener los mejores resultados agronómicos. Esto se demuestra fundamentalmente a nivel de raíz, órgano de vital importancia agronómica en estos cultivos. Por esta razón en este caso es suficiente para el análisis de la estimulación del crecimiento de la planta las medidas de peso fresco, ya que justamente la raíz es lo que se consume para la alimentación humana.

De forma general queda demostrado que el medio de cultivo influye en el potencial estimulador del crecimiento de *G. diazotrophicus*, por lo que es un aspecto importante a tener en cuenta en la obtención biotecnológica de productos de uso agrícola para el beneficio de especies vegetales de importancia económica.

## Conclusiones

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *G. diazotrophicus* influye en su potencial estimulador del crecimiento vegetal. El empleo de un medio de cultivo compuesto fundamentalmente por arroz, sacarosa y azúcar comercial, produce mayores beneficios en la estimulación del crecimiento de zanahoria y remolacha comparado con otras alternativas como el SG, el SYP, el DYGS y el LGI.

- Caballero-Mellado J. & Martínez-Romero E. (1994). Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60(5): 1532-1537. <https://aem.asm.org/content/aem/60/5/1532.full.pdf>
- Cavalcante V.A. & Döbereiner J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108: 23-31. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
- Crespo J.M., Bioardi J.L. and Luna M.F. (2011). Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agricultural Sciences* 2(1): 16-22. <https://doi.org/10.4236/as.2011.21003>
- de la Fé Y., Díaz A., Restrepo G.M., Diván-Baldani V.L. and Hernández A. (2015). Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 4 (1): 17-26. <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/85>
- Dibut B., Ríos Y. and Ortega M. (2011). 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* 32(4): 20-26. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_serial&lng=es&pid=0258-5936](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_serial&lng=es&pid=0258-5936)
- Döbereiner J., Reis V. M., Paula M. A. and Olivares F. L. (1993) Endophytic diazotrophs in sugarcane, cereals and tuber plants. In: Palacios R, Mora J, Newton WE, editors. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. p. 671-676. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2416-6\\_55](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2416-6_55)
- Eskin A., Vessey K. and Tian L. (2014). Research progress and perspective of nitrogen fixing bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. *International Journal of Agronomy*; 208383(2014): 1-13. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/208383>
- Hazza J. (2014). *GUS*-gene as visual marker for *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with carrot plantlets. *International Journal of Science and Technology*; 3 (12): 776-779. [http://www.journalofsciences-technology.org/archive/2014/dec\\_vol\\_3\\_no\\_12/6112114535361.pdf](http://www.journalofsciences-technology.org/archive/2014/dec_vol_3_no_12/6112114535361.pdf)
- Hernández A., Pérez J., Bosch D. and Castro N. (2015). Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Instituto de Suelos. Ediciones INCA, San José de las Lajas, Mayabeque; 45-48. [http://ediciones.inca.edu.cu/files/libros/clasificacionsueloscuba\\_%202015.pdf](http://ediciones.inca.edu.cu/files/libros/clasificacionsueloscuba_%202015.pdf)
- Hernández L., Arrieta J., Menendez C., Vazquez R., Coego A., Suarez V., Selman G., Petit-Glatron M.F. and Chambert R. (1995). Isolation of enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemical Journal* 309: 113-118. <https://doi.org/10.1042/bj3090113>
- Hernández-Escareño J.J., Gabriel Morales P., Farías Rodríguez R. and Sánchez-Yáñez J.M. (2015). Inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre la fenología y biomasa de *Triticum aestivum* var. Nana F2007 a 50% de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria* 6 (1): 07- 16. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.01>
- Indi D.V., Nalawade S.V., Deshmukh S.U. and Pawar S.M. (2014). Response of Sugarcane Varieties to Nitrogen and Phosphorus as Inoculated by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and PBS. *International Journal of Plant and Soil Science* 3(3): 260-269. [https://s3.amazonaws.com/academia.edu/documents/32820510/Indi332013IJPSS6246\\_1.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DIndi332013IJPSS6246\\_1.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190624%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4\\_request&X-Amz-Date=20190624T183646Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=2ae2b3168262237ac220c65bdcd291a15614d39704c3556a688056aac6f97d39](https://s3.amazonaws.com/academia.edu/documents/32820510/Indi332013IJPSS6246_1.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DIndi332013IJPSS6246_1.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190624%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20190624T183646Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=2ae2b3168262237ac220c65bdcd291a15614d39704c3556a688056aac6f97d39)
- Jha P.N., Grupta G., Jha P. and Mehrotra R. (2013). Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. *Greener Journal of Agricultural Science*; 3(2): 73-84. <https://pdfs.semanticscholar.org/cd5b/fcc939a317a32f772e99d277a47e515ccd3e.pdf>
- Kumar J.A., Sreeramulu K.R. and Kushala G. (2013). Effect of microbial inoculants on the yield of beet-root (*Beta vulgaris*). *Asian Journal of Bio Science* 8(1): 6-10 <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133288683>
- Kumarasamy V. & Santhaguru K. (2011). Growth performance of *Sorghum bicolor* (L.) Moench in response to inoculation

- with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Genetics and Plant Physiology* 1(3-4): 130-138. [http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/wp-content/uploads/2012/06/GPP\\_1\\_3-4\\_130-138.pdf](http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/wp-content/uploads/2012/06/GPP_1_3-4_130-138.pdf).
- Luna M.F., Galar M.L., Aprea J., Molinari M.L. and Boiardi J.L. (2010). Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnology Letters* 32: 1071-1076. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0256-2>
- Madigan M., Martinco J., Stahl D. and Clarck D. (2014) Brock Biology of Microorganisms. Thirteenth Edition, 2014; pp. 1155.
- Mehnaz, S. & Lazarovits G. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*. 51: 326–335. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9039-7>
- Meneses C.H.S.G., Rouws L.F.M., Simões-Araújo J.L., Vidal M.S. and Baldani J.I. (2013). Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 24(2): 1448-1458. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0127>
- Molinari M.L. & Bioardi, J.L. (2013). Levan production by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(3). <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-9>
- Muthukumarasamy R., Govindarajan M., Vadivelu M. and Revathi G. (2006) N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiological Research* 161: 238—245. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.007>
- Nautiyal S.C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiol Letters* 170: 265-275. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Nieto-Peñalver C.G., Savino M.J., Bertini E.V., Sánchez L.A. and de Figueroa L.I.C. (2014). Gluconic acid produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* possesses antimicrobial properties. *Research in Microbiology*; 165: 549-558. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.06.003>
- Ortega, M. (2012). Medio de arroz (MA). Comunicación personal. Laboratorio de Fermentaciones, Grupo Agrobiotecnología, INIFAT. Santiago de las Vegas, Boyeros, La Habana, Cuba.
- Patil N.B., Gajbhiye M., Ahiwale S.S., Gunjal A.B. and Kapadnis P.B. (2011). Optimization of Indole 3acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. *International Journal of Environmental Sciences* 2(1): 295-302 [https://www.researchgate.net/profile/Aparna\\_Gunjal/publication/279804624\\_Optimization\\_of\\_Indole\\_3acetic\\_acid\\_IAA\\_production\\_by\\_Acetobacter\\_diazotrophicus\\_L1\\_isolated\\_from\\_Sugarcane/links/561dc1fe08ae50795afd8371/Optimization-of-Indole-3acetic-acid-IAA-production-by-Acetobacter-diazotrophicus-L1-isolated-from-Sugarcane.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Aparna_Gunjal/publication/279804624_Optimization_of_Indole_3acetic_acid_IAA_production_by_Acetobacter_diazotrophicus_L1_isolated_from_Sugarcane/links/561dc1fe08ae50795afd8371/Optimization-of-Indole-3acetic-acid-IAA-production-by-Acetobacter-diazotrophicus-L1-isolated-from-Sugarcane.pdf)
- Pazos L.A., Marín V., Morales Y.E., Baez A., Villalobos M.A., Pérez M. and Muñoz-Rojas J. (2016) Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 7 (3): 72-85. [www.reibci.org/publicados/2016/dic/2000114.pdf](http://www.reibci.org/publicados/2016/dic/2000114.pdf).
- Pérez A., Tuberquia A. and Amell D. (2014). Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Agronomía Mesoamericana*; 25 (2): 213-223. <http://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v25n2/a01v25n2.pdf>
- Pinciroli M. (201). Proteínas de arroz: propiedades estructurales y funcionales. Tesis en opción del título de Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos Programa Arroz. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. Universidad Nacional de la Plata. Pp.81. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/1828/Documento\\_completo\\_.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/1828/Documento_completo_.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Reis V.M. & dos Santos K.R. (2015). Nitrogen fixing bacteria in the family *Acetobacteraceae* and their role in agriculture. *Journal of Basic Microbiology* 54: 1-19. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400898>
- Ríos Y., Dibut B., Rojas M.M., Ortega M., Arozarena N. and Rodríguez J. (2016a). Interacción de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* y hortalizas de raíz. *Cultivos Tropicales* 37 No. especial: 28-32. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362016000500004&script=sci\\_arttext&lng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362016000500004&script=sci_arttext&lng=en)
- Ríos Y., Rojas M.M., Ortega M., Dibut B. and Rodríguez J. (2016b). Aislamiento y caracterización de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Cultivos Tropicales* 37(1): 34-39. <http://scielo.sld.cu/scielo>

<http://www.dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5430273>

Rojas M.M., Rodríguez A.J., González L. and Heydrich M. (2015). Influencia de diferentes factores en el crecimiento de bacterias endófitas de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*; 17 (2): 149-155. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5430273>

Siqueira F., Cardosos R., Oliveira E., Moura M., Quintana V.M. and Amorim M. (2009). Glycine Betadine Enhances Growth Of Nitrogen-Fixing bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. *Current Microbiology* 59: 593-599. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9479-7>