

319823



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
UNAM



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
SOBRE FIJACIÓN DE NITRÓGENO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN DE NITRÓGENO

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA
MOLECULAR Y MICROBIANA

TESIS

Evaluación de algunos factores en la interacción
Acetobacter diazotrophicus - caña de azúcar

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q.F.B. Jesús Muñoz Rojas

Dr. Jesús Caballero Mellado
DIRECTOR

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO DE 2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN DE NITRÓGENO

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA MOLECULAR Y MICROBIANA

TESIS

Evaluación de algunos factores en la interacción

***Acetobacter diazotrophicus*-caña de azúcar**

**Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas**

P R E S E N T A:

Q.F.B. Jesús Muñoz Rojas

**Dr. Jesús Caballero Mellado
DIRECTOR DE TESIS**

Cuernavaca, Morelos, Junio de 2003

Gracias Señor por haberme permitido estar dentro de la comunidad científica y haberme dado la oportunidad de desarrollar éste tema de investigación.

Elizabeth, Mauricio y Mariana gracias por tener la paciencia suficiente y apoyarme en todos los momentos difíciles, dentro y fuera del laboratorio. No podré recuperar el tiempo que decidí no estar a su lado, pero les dedico con mucho amor éste trabajo.

Al Dr. Jesús Caballero-Mellado mis mas profundos agradecimientos por haberme formado, por todo el tiempo dedicado a la discusión del proyecto y por darme un tema donde se pusieron los cimientos para investigaciones futuras.

Gracias a los integrantes del ICBUAP (Departamento de microbiología) y del Campo experimental de Zacatepec (INIFAB) por sus múltiples enseñanzas.

A mis padres, espero ésta sea una forma de retribuirles lo mucho que me han dado.

A Yolanda García y Arturo Morales, gracias por la confianza que han puesto en mi y por el apoyo incondicional que me dieron para continuar mis estudios.

Agradecimientos a Sandra Hernández, Alejandra Ocampo, Yesenia Castellanos y Oscar Aguilar de manera especial por el apoyo técnico en las diferentes etapas del proyecto.

A Paulina, Guadalupe, Lulú y Rocío por toda su ayuda.

A mi comité tutorial por las críticas constructivas del proyecto de investigación.

A mis sinodales por los comentarios sobre el trabajo de investigación.

A mis amigos del laboratorio y del CIFN (Investigadores y estudiantes), Gracias por todo.

Gracias Luis Manuel García Padilla (†)

A la Comunidad Educativa Caleyá gracias por el carácter que me forjaron

Gracias a todos.

INDICE

I.	Resumen.....	1
II.	Abstract	2
III.	Introducción.....	3
IV.	Antecedentes.....	4
V.	Objetivos.....	9
VI.	Resultados y discusión de resultados.....	10
	a) Evaluación de los factores que intervienen en la interacción <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> -caña de azúcar.....	11
	b) Population dynamics of <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> in sugarcane cultivars and its effect on plant growth.....	15
	c) Evaluación de la interacción entre cepas de <i>G. diazotrophicus in vitro</i> y en asociación con la caña de azúcar.....	36
VII.	Discusión general y perspectivas.....	53
VIII.	Referencias.....	55
IX.	Anexo 1. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> , modelo de bacteria endófito.....	64
X.	Anexo 2. BACTERIOCINAS: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano.....	95

RESUMEN

El uso indiscriminado de los fertilizantes nitrogenados que se aplican a los cultivos, para satisfacer las necesidades de alimentación del hombre, ha traído como consecuencia efectos indeseables contra el ambiente. Ante este hecho es conveniente modificar las prácticas agrícolas sin que disminuya el rendimiento de los cultivos. Una alternativa es reemplazar y/o favorecer la absorción del nitrógeno aplicado a los cultivos a través de las bacterias que se asocian naturalmente con las plantas.

En diferentes experimentos se ha estimado que la contribución de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es muy variable entre las diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Aún cuando no se conoce cuál es la bacteria que más contribuye con el proceso de FBN en la caña de azúcar, se ha sugerido a la bacteria endófito *G. diazotrophicus* como una de las principales. En el estudio presente se evaluó el potencial de diferentes cepas de *G. diazotrophicus* para promover el crecimiento de la caña de azúcar.

Plántulas micropropagadas de cinco variedades de caña de azúcar fueron inoculadas con tres cepas de *G. diazotrophicus* pertenecientes a diferentes genotipos. La dinámica de población de las diferentes cepas fue monitoreada en las plántulas crecidas con dosis variables de fertilizante nitrogenado y en diferentes fases de su crecimiento. El análisis mostró que las poblaciones de las diferentes cepas de *G. diazotrophicus* disminuyen drásticamente con relación a la edad de la planta, independientemente del nivel de nitrógeno aplicado, del genotipo bacteriano o de la variedad de caña de azúcar. Sin embargo, la persistencia de las tres cepas inoculadas fue significativamente mayor en la variedad MEX 57-473 que en las otras (e.g., MY 55-14). El estudio reveló que algunas cepas de *G. diazotrophicus* (e.g., PAI 5^T) pueden persistir por periodos de tiempo más largos y en números más altos que otras cepas (ej. PAI 3) en todas las variedades de caña examinadas. Además, se logró establecer que la inoculación de la caña de azúcar con *G. diazotrophicus* puede estimular el crecimiento de la planta pero ésta respuesta es dependiente tanto del genotipo bacteriano como de la variedad de caña de azúcar. La mejor respuesta de estimulación del crecimiento de la planta de caña de azúcar fue observada con la combinación de la cepa PAI 5^T y la variedad MEX 57-473. Aún cuando el efecto benéfico sobre el crecimiento de la caña de azúcar ocurrió, aparentemente, por mecanismos diferentes a la fijación de nitrógeno, el estudio desarrollado muestra la importancia de la variedad de la caña de azúcar para la persistencia de *G. diazotrophicus* en la interacción bacteria-planta, y podría explicar las diferentes tasas de FBN estimadas entre las variedades de caña de azúcar.

En el presente trabajo también se exploró la capacidad de algunos genotipos de *G. diazotrophicus* para producir sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano, tanto *in vitro* como en asociación con la planta. Los resultados mostraron que algunas cepas del genotipo identificado como ET 3 tienen la capacidad de antagonizar en medios de cultivos a gran número (50) de cepas de la misma especie con otro genotipo o de especies filogenéticamente muy cercanas. Más relevante fue observar que el efecto antagonista entre cepas de *G. diazotrophicus* se manifiesta en asociación con la planta de caña de azúcar. La purificación y los análisis de la sustancia antagonista mostraron que ésta presenta características de una proteína de bajo peso molecular. Moléculas con las características descritas corresponden a las llamadas genéricamente como bacteriocinas, el nombre de Gluconacetocina para la sustancia inhibitoria identificada en el presente estudio. La capacidad de algunas cepas de *G. diazotrophicus* para antagonizar a otras de su misma especie o muy relacionadas podría ofrecer ventajas competitivas en su ambiente.

Los resultados obtenidos en el presente estudio contribuyen de manera significativa al mejor entendimiento de algunos factores involucrados en la interacción *G. diazotrophicus*-caña de azúcar, los cuales probablemente puedan ser extrapolados a otras asociaciones endófito-planta. El estudio también aporta nuevos conocimientos que contribuyen a mejorar las estrategias tendientes a posibles aplicaciones agronómicas y abre nuevas preguntas sobre los eventos que ocurren durante la interacción planta-bacteria y bacteria-bacteria.

ABSTRACT

Since green revolution emerged excessive nitrogen fertilization levels have been applied to the crops for increasing the production and to satisfy the human needs but unfortunately, undesirable effects on the environment are well known as a consequence of such fertilization. For this reason, we must modify the agriculture practices so that biological systems rather than mineral fertilizers can replace the soil nitrogen extracted for the crops and to avoid the harmful effects for the environment. Associative bacteria could replace and/or to improve the nitrogen assimilation required by the plants.

Different experiments have estimated that the contribution of biological nitrogen fixation (BNF) is largely variable among sugarcane cultivars. Which bacteria are the most important in sugarcane-associated BNF is unknown. However, *Gluconacetobacter diazotrophicus* has been suggested as a strong candidate responsible for the BNF observed. In the present work was evaluated the potential of different *G. diazotrophicus* strains for enhancement the sugarcane growth.

Bacteria free micropropagated plantlets of five sugarcane cultivars were inoculated with three *G. diazotrophicus* strains belonging to different genotypes. Bacterial colonization was monitored under different nitrogen fertilization levels and at different stages of plant growth. Analysis of the population dynamics of *G. diazotrophicus* strains in the different sugarcane varieties showed that the bacterial populations decreased drastically in relation to plant age, regardless of the nitrogen fertilization level, bacterial genotype or sugarcane cultivars. However, the persistence of the three strains was significantly longer in some cultivars (e.g., MEX 57-473) than in others (e.g., MY 55-14). In addition, some strains (e.g., PAI 5^T) persisted for longer periods in higher numbers than other strains (e.g., PAI 3) inside plants of all the cultivars tested. Indeed, the study showed that the inoculation of *G. diazotrophicus* may be beneficial for sugarcane plant growth but this response is dependent both on the *G. diazotrophicus* genotype and the sugarcane variety. The most positive response to inoculation was observed with the combination of strain PAI 5^T and the variety MEX 57-473. Although the positive effect on sugarcane growth apparently occurred by mechanisms other than nitrogen fixation, the results show the importance of the sugarcane variety for the persistence of the plant-bacteria interaction, and it could explain the different rates of BNF estimated among sugarcane cultivars.

In addition, in this study also was explored the ability of different *G. diazotrophicus* strains to produce antagonistic substances both in culture media as well as in association with sugarcane plants. Results revealed antagonistic effects by strains (e.g., strain PAI 5^T) of the ET 3 genotype of *G. diazotrophicus* against many other strains with different genotype of this species as well as against closely related species. Interestingly, this antagonistic effect was observed in coinoculation experiments in association with sugar cane plants. The purification and the analysis of the antagonistic substance revealed that this molecule show characteristics from a protein with a low molecular weight. Molecules with features as described before correspond to the group of substances named bacteriocins, the name Gluconacetocin is proposed. The ability of some *G. diazotrophicus* strains to antagonize to strains of the same species or closely related species could give competitive advantages in their habitat.

The results obtained in the present thesis significantly contribute with a better understanding of the factors involved in the *G. diazotrophicus*-sugarcane interaction, which might be extended to other endophyte-plant associations. This thesis also contributes with new knowledge that could allow successful agronomic applications, and show new questions about the events involved in the interaction plant-bacteria and bacteria-bacteria.

Introducción

El crecimiento de la gran mayoría de los organismos es dependiente del nitrógeno en sus formas combinadas, debido a que este elemento forma parte integral de moléculas fundamentales en los procesos vitales. A pesar de su importancia, el nitrógeno combinado es muy escaso en la naturaleza, por lo que en la agricultura moderna se aplican cada vez mayores cantidades de fertilizantes nitrogenados con el fin de elevar el rendimiento de los cultivos para satisfacer las necesidades del hombre (Tilman, 1999; Tilman et al., 2002). No obstante, en la actualidad están bien documentados algunos efectos nocivos para el medio ambiente, derivados de la aplicación excesiva de los fertilizantes (Mulder et al., 1977; Tilman, 1999; Tilman and Lehman, 2001). Además, sólo del 30 al 50 % del nitrógeno aplicado a los cultivos es aprovechado por las plantas y el restante se pierde rápidamente por lixiviación o desnitrificación (Mulder et al., 1977; Tilman et al., 2002). Ante este hecho es conveniente modificar las prácticas agrícolas para permitir que los sistemas biológicos, más que los fertilizantes minerales, puedan reemplazar el nitrógeno del suelo extraído por los cultivos.

Entre los sistemas biológicos más ampliamente estudiados que contribuyen al crecimiento de las plantas se encuentran las asociaciones *Rhizobium*-leguminosas y *Frankia*-árboles actinorrízicos, en las cuales existe una ganancia neta de nitrógeno a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Lynch, 1990; Mulder et al., 1977; Mylona et al., 1995; Wall, 2000). La FBN es llevada a cabo exclusivamente por microorganismos de los dominios eubacteria y arquea. Este proceso consiste en la captación del nitrógeno molecular (N_2) de la atmósfera y su reducción catalítica a amonio por la enzima llamada nitrogenasa (Newton, 1993). La asociación *Azospirillum*-gramíneas es otro sistema que contribuye con el crecimiento de las plantas y con el cual se puede conseguir una disminución del uso de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, en este caso el principal mecanismo de promoción del crecimiento es diferente a la FBN, aceptándose en términos generales la participación de fitohormonas (Caballero-Mellado et al., 1992; Okon and Labandera-González, 1994; Dobbelaere et al., 2001). En estas asociaciones, para obtener los máximos beneficios en el rendimiento de los cultivos, es importante hacer una adecuada selección de las cepas bacterianas (Döbereiner, 1992; Freire, 1982; Graham, 1981; Paredes-Cardona et al., 1988). Sobre las bases antes referidas se considera importante explorar nuevos sistemas biológicos que permitan disminuir el uso de los fertilizantes nitrogenados. Así, se ha

demostrado que algunas variedades de caña de azúcar obtienen hasta el 80% de nitrógeno necesario para su crecimiento a través de la FBN (Boddey et al., 1991).

Antecedentes

La caña de azúcar es una planta de gran interés agrícola que se cultiva ampliamente en los países tropicales (Food and Agriculture Organization [FAO], 2002). En México actualmente se destinan alrededor de 677,366 hectáreas (Food and Agriculture Organization [FAO], 2002) para el cultivo de caña de azúcar con una producción total de 46,000,000 MT (Tabla 1). La mayor parte de la producción mundial es destinada para la obtención de azúcar. Sin embargo, diversos productos pueden obtenerse a partir de esta planta, entre los que destaca el alcohol etílico que es usado ampliamente en Brasil como combustible renovable (Boddey, 1993; Baldani et al., 2002). Uno de los principales problemas en el cultivo de caña de azúcar, es el elevado nivel de nitrógeno combinado que requiere la planta para su desarrollo. A pesar de este hecho, la caña de azúcar cultivada en Brasil ha sido tradicionalmente fertilizada con bajas cantidades de nitrógeno debido a su escasez, lográndose rendimientos similares a los obtenidos en cultivos fertilizados con altas cantidades de nitrógeno (Boddey et al., 1995). Además, en Brasil no se ha detectado disminución de las reservas de nitrógeno del suelo donde se cultiva caña de azúcar a pesar de décadas de cultivo. Esto en conjunto sugirió que el proceso de FBN está ocurriendo en las plantas de caña de azúcar cultivadas en Brasil (Boddey et al., 1995; Baldani et al., 1997; 2002). En diversos trabajos se ha demostrado que la FBN se lleva a cabo en gramíneas (Boddey et al., 2000) y particularmente en la caña de azúcar (Lima et al., 1987; Urquiaga et al., 1992; Yoneyama et al., 1997). En estos trabajos se observó que algunas variedades obtienen hasta el 70% de nitrógeno a través de la FBN pero en otras no se observó contribución alguna mediante este proceso. A pesar de que se han aislado muchas bacterias tanto de la rizósfera como endófitas de la caña de azúcar, no se conoce cual de ellas podría contribuir con la mayor tasa de FBN (Asis et al., 2000; Cavalcante and Döbereiner, 1988; Olivares et al., 1996; Ruschel, 1981). Se ha sugerido que las bacterias endófitas de la caña de azúcar contribuyen, de manera más significativa que las rizosféricas en el proceso de FBN (Döbereiner, 1992), ya que este tipo de bacterias podrían escapar a los efectos fisicoquímicos adversos del suelo así como a la competencia con otros microorganismos en éste ambiente y podrían recibir de una forma más directa los nutrientes necesarios para su

multiplicación y para la expresión de la FBN. Entre las bacterias endófitas de la caña de azúcar se han aislado, por ejemplo, especies de los géneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella* y *Gluconacetobacter*, sugiriéndose que *Gluconacetobacter diazotrophicus* podría ser una de las especies que más contribuye con la tasa de FBN observada en este cultivo (Cavalcante and Döbereiner, 1988; Boddey et al., 1995, James, 2000; Sevilla and Kennedy, 2000). Esta propuesta se ha basado en el hecho de que *G. diazotrophicus*, bajo condiciones *in vitro*, crece y fija nitrógeno óptimamente en condiciones de acidez y concentraciones de sacarosa similares a las encontradas en el interior de la caña de azúcar. Se ha sugerido también que *G. diazotrophicus* podría promover y aumentar el crecimiento de la caña de azúcar a través de efectos hormonales (Fuentes-Ramírez et al., 1993) debido a su capacidad de producir ácido indol acético (IAA) y giberelinas (Fuentes-Ramírez et al., 1993; Bastian et al., 1998). Es de importancia hacer notar que inicialmente el nombre de esta bacteria acética fue *Acetobacter diazotrophicus* el cual fue cambiado posteriormente a *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre la base de nuevas evidencias taxonómicas (Yamada et al., 1997).

Las características generales sobre el aislamiento, identificación, habitat, colonización, dispersión, características fenotípicas y genotípicas de *G. diazotrophicus* se describen en el trabajo "*Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito" (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2001). A continuación se mencionan solamente algunos aspectos relevantes de la bacteria en estudio.

G. diazotrophicus ha sido encontrado en asociación endófito, además de con la caña de azúcar, con *Ipomoea batatas* (camote), *Pennisetum purpureum* var. Cameroon (pasto forrajero) (Döbereiner et al., 1993), *Coffea arabica* (cafeto) (Jiménez-Salgado et al., 1997), *Eleusine coracana* (Loganathan et al., 1999), *Ananas comosus* (piña) (Tapia-Hernández et al., 2000), y recientemente con *Byrsonima crassifolia* (nanche) (Fuentes-Ramírez et al., 2002). *G. diazotrophicus* se ha aislado frecuentemente del interior de los tejidos de la caña de azúcar en el rango de 10^1 a 10^5 células por gramo de peso fresco (Dong et al., 1994; Fuentes-Ramírez et al., 1999; Muthukumarasamy et al., 2002; Reis et al., 1994, 1999; Reis dos et al., 2000). El aislamiento de *G. diazotrophicus* a partir de plantas de caña de azúcar parece depender de la cantidad de fertilización nitrogenada aplicada a los cultivos (Fuentes-Ramírez et al., 1993; Muthukumarasamy et al., 1999; Reis dos et al., 2000). Con altos niveles de fertilización

nitrogenada se observaron bajas frecuencias o bajos números de *G. diazotrophicus*. Se ha reportado que la capacidad de una cepa de *G. diazotrophicus* para colonizar las plantas de caña de azúcar disminuye bajo condiciones de elevada fertilización nitrogenada (**Fuentes-Ramírez et al., 1999**). Usando la metodología de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) para estimar la diversidad genética, se identificaron siete tipos electroforéticos (ETs) entre los aislados de *G. diazotrophicus* obtenidos de plantas de caña de azúcar cultivadas en campos de Brasil, país en el que se aplican bajos niveles de fertilizante nitrogenado (\leq a 100 kg/ha). En contraparte sólo un genotipo (designado ET 1) se identificó entre muchas cepas de *G. diazotrophicus* aisladas de plantas de caña de azúcar cultivada comercialmente en campos de México, en los que se aplican altos niveles de fertilizante nitrogenado (\geq 120-300 kg/ha). Esos resultados sugirieron que la diversidad genética de *G. diazotrophicus* podría ser afectada negativamente por las altas tasas de fertilización nitrogenada usadas en los cultivos de caña de azúcar de México (**Caballero-Mellado et al., 1995**).

Por otro lado, se conoce que las bacterias emplean distintas estrategias para competir mejor en un ambiente determinado, algunas produciendo sustancias inhibitorias tales como antibióticos (**Raaijmakers et al., 2002**), bacteriocinas (**Riley and Wertz, 2002**) o sideróforos (**Mirleau et al., 2000**), otras bacterias cambiando las condiciones de su microambiente (ej. el pH [**Lavermicocca et al., 2000**]), algunas otras mediante procesos de quimiotaxis (**de Weert et al., 2002**) y adherencia a la superficie de las raíces (**Dorr et al., 1998; Lugtenberg et al., 2002**). En la mayoría de los casos anteriores la estrategia implica impedir el establecimiento de las bacterias vecinas. Aquellas bacterias más competitivas tienen una mejor oportunidad de establecerse en su hábitat. Hablando de bacterias benéficas que se asocian con plantas, las más competitivas podrían ser las mejores para interactuar con su hospedero o dominar su ambiente. Por ejemplo, el estudio de poblaciones de *G. diazotrophicus* mostró que las cepas identificadas como genotipo ET 3 son predominantes en plantas de caña de azúcar cultivada en Brasil, en tanto que el ET 1 es el predominante entre los aislados de caña de azúcar cultivada en México (**Caballero-Mellado, et al., 1995; Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994**). Aún cuando estos resultados no se complementaron con experimentos que pudieran explicar el predominio de los ETs 1 y 3, es concebible que existan en el interior de las plantas interacciones microbianas semejantes a las descritas entre la comunidad microbiana de la rizósfera. Esas interacciones parecen desempeñar una función importante en el medio ambiente

rizosférico, sin embargo, se conoce muy poco acerca de las interacciones entre las bacterias fijadoras de N₂ en el medio endófito.

En la actualidad es escaso el conocimiento acerca de los factores que influyen o intervienen en la interacción endófito-planta así como de la interacción endófito-endófito. No obstante, esos factores podrían determinar el que una bacteria endófito cause o no efectos benéficos en la planta hospedera, o bien determinar la predominancia de un grupo bacteriano particular.

En el presente trabajo se evaluaron algunos factores involucrados en la interacción *G. diazotrophicus*-caña de azúcar. Se evaluó el genotipo bacteriano, la variedad de planta, y la dosis de fertilización nitrogenada en diferentes etapas de desarrollo de la caña de azúcar. Así mismo se evaluó el potencial de *G. diazotrophicus* para promover el crecimiento de la planta de caña de azúcar. Además, se determinó la capacidad competitiva de los genotipos de *G. diazotrophicus* y se investigó su relación con la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano.

Tabla 1. Productividad de caña de azúcar en México

Año	Área plantada (ha)	Producción (MT) Millones de toneladas	Índice de productividad (MT)/ha
2002	677,366	46,000,000	67.9101
2001	623,739	47,275,000	75.7929
2000	618,282	44,150,000	71.4075
1999	643,152	46,880,000	72.8910
1998	630,578	48,895,256	77.5403
1997	614,759	45,219,512	73.5564
1996	633,614	45,080,648	71.1484
1995	573,049	44,452,952	77.5726
1994	587,544	40,587,768	69.0803
1993	561,686	42,930,960	76.4323
1992	558,179	41,696,600	74.7011
1991	546,994	38,433,992	70.2640
1990	571,340	39,919,368	69.8697
1989	612,654	43,910,480	71.6725
1988	605,296	42,735,216	70.6021
1987	615,724	45,874,232	74.5045
1986	586,041	44,271,284	75.5429
1985	488,723	34,430,840	70.4506
1984	523,384	34,969,728	66.8146
1983	507,722	34,232,016	67.4227
1982	523,044	35,511,016	67.8929
1981	529,639	33,197,404	62.6793
1980	539,882	35,278,624	65.3450

Food and Agriculture Organization (FAO), 2002.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar algunos factores que intervienen en la interacción de *G. diazotrophicus* con la caña de azúcar.

Objetivos particulares.

1.- Evaluar la capacidad de algunos genotipos de *G. diazotrophicus* para colonizar endofíticamente a distintas variedades de caña de azúcar.

2.- Evaluar el efecto de los diferentes genotipos de *G. diazotrophicus* sobre el crecimiento de la caña de azúcar.

3- Evaluar la capacidad de algunos genotipos de *G. diazotrophicus* para colonizar endofíticamente a la caña de azúcar cuando crece con diferentes dosis de nitrógeno combinado.

4.- Explorar la existencia de actividad antagonica entre cepas de *G. diazotrophicus in vitro* y en asociación con la planta de caña de azúcar. Así como conocer la naturaleza química de la sustancia inhibitoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LOS FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA INTERACCIÓN *G. diazotrophicus*-CAÑA DE AZÚCAR.

Los resultados y la interpretación de los mismos se encuentran descritos en el trabajo “Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth” (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003. *Microbial Ecology*, en prensa). Un resumen de este estudio se presenta a continuación.

Debido a la naturaleza endófito de *G. diazotrophicus* en diversas plantas, para el desarrollo del presente estudio fue necesario obtener plántulas de caña de azúcar libres de bacterias mediante la micropropagación de cultivo de tejidos (Fig. 1) para posteriormente demostrar que *G. diazotrophicus* es capaz de colonizar endofíticamente a estas plántulas mediante un esquema de inoculación simple (inmersión de la raíz en una suspensión bacteriana) (Fig 2).

En el presente estudio, plántulas de cinco variedades de caña de azúcar obtenidas por micropropagación se inocularon con tres cepas diferentes de *G. diazotrophicus* pertenecientes a diferentes genotipos. Las plántulas se crecieron bajo condiciones de invernadero con tres dosis de fertilización nitrogenada y la colonización bacteriana se monitoreó en diferentes fases de crecimiento de las plantas. El análisis de la dinámica de población de las cepas de *G. diazotrophicus* en las diferentes variedades de caña de azúcar mostró que la población bacteriana disminuyó drásticamente en relación con la edad de la planta, independientemente del nivel de nitrógeno utilizado, del genotipo bacteriano y de la variedad de caña de azúcar. Sin embargo, la persistencia de las tres cepas fue significativamente mayor en algunas variedades (ej. MEX 57-473) que en otras (ej. MY 55-14). La cepa PAI 5^T persistió por periodos más largos y en números más altos que las otras cepas (ej. PAI 3) en el interior de plantas de todas las variedades analizadas.

Aún cuando este estudio reveló que la inoculación de *G. diazotrophicus* puede ser benéfica para el crecimiento de caña de azúcar, la respuesta depende tanto del genotipo de *G. diazotrophicus* como de la variedad de la caña de azúcar. La mejor respuesta positiva a la inoculación se observó con la combinación de la cepa PAI 5^T y la variedad MEX 57-473. A pesar de que el efecto positivo sobre el crecimiento de caña de azúcar aparentemente ocurrió por mecanismos diferentes a la fijación de nitrógeno, los resultados de este estudio mostraron la importancia de la variedad de la caña de azúcar en la persistencia de la interacción planta-

bacteria endófitas, lo cual podría explicar las diferentes tasas de FBN estimadas entre las variedades de caña de azúcar.

En el presente trabajo se demuestra que la fertilización nitrogenada afecta negativamente a la asociación *G. diazotrophicus*-caña de azúcar, independientemente del genotipo bacteriano. Se ha sugerido que el efecto del nitrógeno combinado podría ser a través de los cambios fisiológicos que experimenta la planta (Caballero-Mellado et al., 1995; Fuentes-Ramírez et al., 1999). También se ha propuesto un efecto directo del nitrógeno combinado sobre el crecimiento de *G. diazotrophicus* (Muthukumarasamy et al., 1999; Muthukumarasamy et al., 2002). Sin embargo, los resultados sobre los que se basan ambas propuestas no son contundentes y serán necesarios estudios futuros para definir estas posibilidades.

También ha sido mostrada la influencia negativa del nitrógeno combinado sobre las poblaciones de otras bacterias endófitas asociadas a gramíneas (Kirchhof et al., 1997). Sin embargo, el efecto negativo de la fertilización nitrogenada no es una regla general. Las poblaciones de otras bacterias como *Herbaspirillum seropedicae* (Muthukumarasamy et al., 1999) no disminuyen en su número. Será de gran relevancia conocer la dinámica poblacional de otras bacterias endófitas cuando sus hospederos sean fertilizados con diferentes dosis de nitrógeno combinado, lo cual seguramente aumentará nuestro entendimiento sobre las fluctuaciones de las poblaciones bacterianas asociadas con las plantas. Esto podría conducir a encontrar relaciones estables planta-bacteria con potencial de aprovechamiento agronómico.

Además, será de gran interés explorar cuáles son los cambios fisiológicos que las plantas de caña de azúcar experimentan a lo largo de su desarrollo y que impiden el establecimiento endófito de una población bacteriana particular. También será importante analizar si la disminución de la población de *G. diazotrophicus* observada bajo condiciones de elevada fertilización nitrogenada y con relación a la edad de la planta son eventos independientes o es el mismo proceso de cambios fisiológicos que las plantas experimentan durante su desarrollo y que se aceleran cuando éstas son fertilizadas.

Fig. 1. Micropropagación de caña de azúcar mediante cultivo de tejidos.



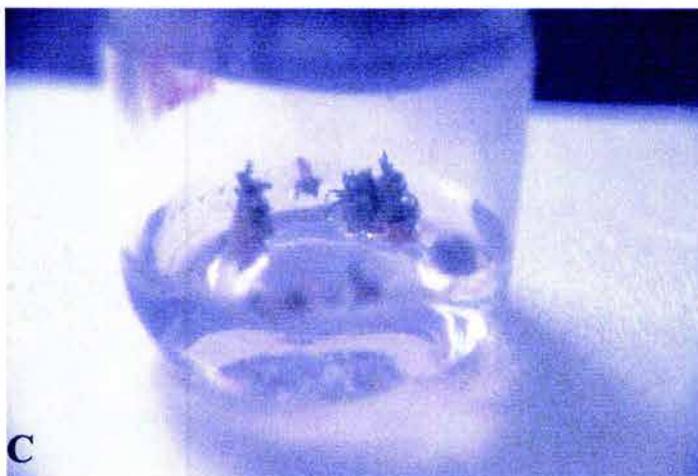
A

Callos obtenidos 30-40 días después del explante.



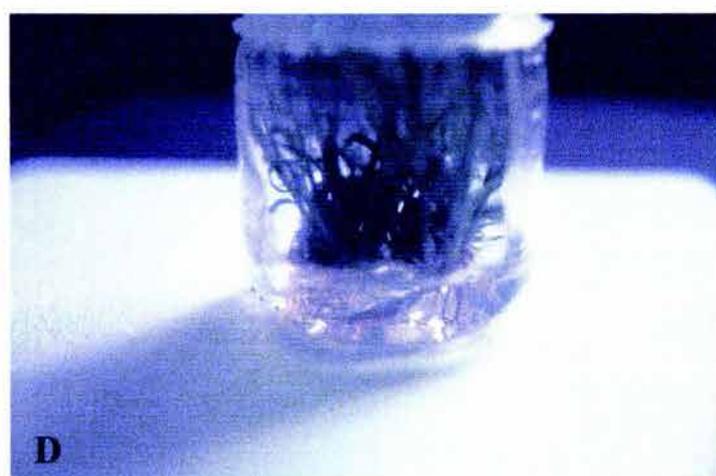
B

Callos al inicio de la diferenciación a plántula 15 días después de exposición a la luz. Zonas verdes indican el inicio de la fotosíntesis.



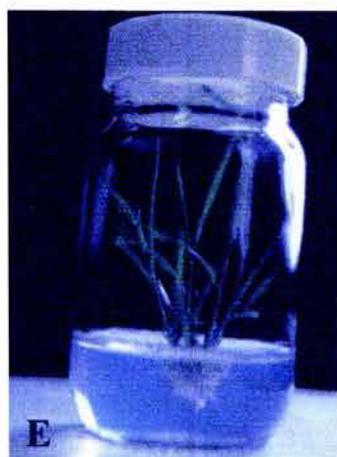
C

Callos en la etapa de diferenciación a plántula 30 días después de exposición a la luz.



D

Macollo de plántulas diferenciadas a partir de callos después de 70 días de exposición a la luz.



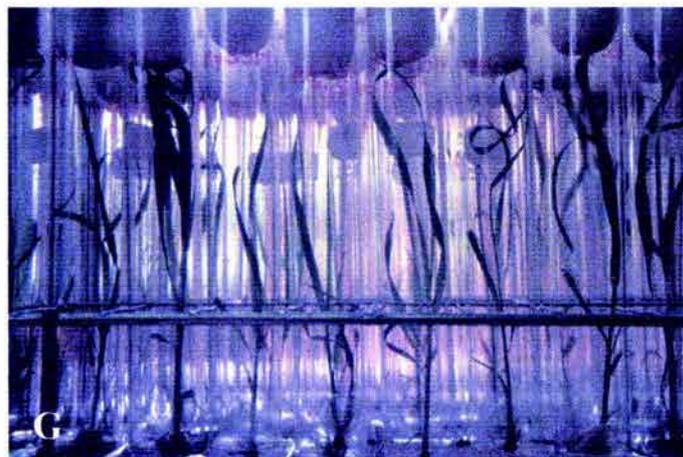
E

Macollo dividido a partir de otro como en D y después de eliminar las zonas de oxidación.



F

Plántula individualizada a partir de macollo (E) 90 días después de la exposición a la luz.



G

Plántulas individualizadas 120 días después de la exposición a la luz.

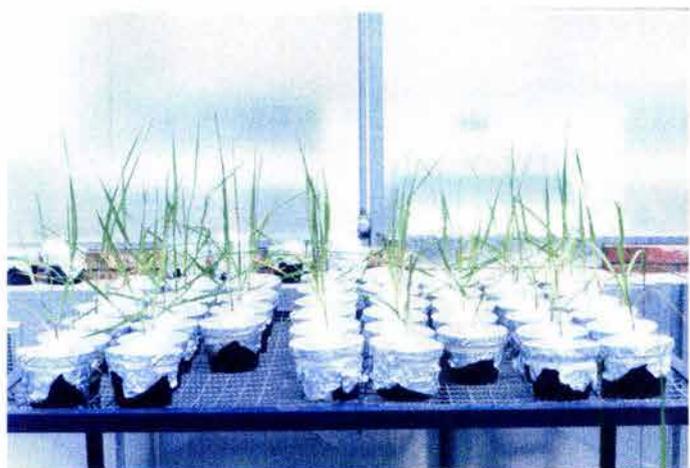
Fig 2. Inoculación de caña de azúcar con *Gluconacetobacter diazotrophicus* y condiciones de invernadero.



Esquema de inoculación de plántulas de caña de azúcar y trasplante posterior en macetas conteniendo vermiculita estéril. Las plántulas trasplantadas fueron regadas posteriormente con la solución de MS modificada y un nivel adecuado de nitrógeno. El experimento en el invernadero se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad.



Inoculación de plántulas micropropagadas de caña de azúcar con *G. diazotrophicus*. La raíz fue sumergida durante una hora en una suspensión bacteriana (1×10^8 UFC/ml).



Plantas de 35 dpi (días posteriores a la inoculación) en condiciones de invernadero.

Title

Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth

Authors

Jesús Muñoz-Rojas and Jesús Caballero-Mellado*

Institution

Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno; Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México.

Running title: Population dynamics of *G. diazotrophicus* in sugarcane

Keywords: Biological nitrogen fixation, endophytic bacteria, indoleacetic acid, population dynamics, rhizosphere, sugarcane.

***Corresponding author:** Jesús Caballero-Mellado

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno; Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México.

Tel. (+52 777) 329 17 03

Fax: (+52 777) 317-55-81

Electronic mail address: jesuscab@cifn.unam.mx

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL
SCIENCES



Professor E.M.H. Wellington

UNIVERSITY OF WARWICK
Coventry CV4 7AL

Telephone: 024 765 23184
Facsimile: 024 765 23701
Email: ewellington@bio.warwick.ac.uk

MICROBIAL ECOLOGY

RE:EMHW 55/1002

9th April 2003

Dear Dr Caballero-Mellado,

I am pleased to confirm that your manuscript "Population dynamics of *Gluconobacter diazotrophicus* in sugar cane cultivars and its effect on plant growth" by Jesus Munoz-Rojas & Jesus Caballero-Mellado has been accepted for publication in Microbial Ecology.

Sincerely,
David Porter pp Professor EMH Wellington

Dr D. Porter
Tel. 024 76522431
e-mail dporter@bio.warwick.ac.uk

Professor E M H Wellington
Department of Biological Sciences
University of Warwick
Coventry CV4 7AL
UK
tel. 024 76523184
fax. 024 76523568
e-mail ewellington@bio.warwick.ac.uk

1 Abstract

2 Different experiments have estimated that the contribution of biological nitrogen fixation
3 (BNF) is largely variable among sugarcane cultivars. Which bacteria are the most important
4 in sugarcane-associated BNF is unknown. However, *Gluconacetobacter diazotrophicus* has
5 been suggested as a strong candidate responsible for the BNF observed. In the present
6 study, bacteria free micropropagated plantlets of five sugarcane cultivars were inoculated
7 with three *G. diazotrophicus* strains belonging to different genotypes. Bacterial
8 colonization was monitored under different nitrogen fertilization levels and at different
9 stages of plant growth. Analysis of the population dynamics of *G. diazotrophicus* strains in
10 the different sugarcane varieties showed that the bacterial populations decreased drastically
11 in relation to plant age, regardless of the nitrogen fertilization level, bacterial genotype or
12 sugarcane cultivars. However, the persistence of the three strains was significantly longer in
13 some cultivars (e.g., MEX 57-473) than in others (e.g., MY 55-14). In addition, some
14 strains (e.g., PAI 5^T) persisted for longer periods in higher numbers than other strains (e.g.,
15 PAI 3) inside plants of all the cultivars tested. Indeed, the study showed that the inoculation
16 of *G. diazotrophicus* may be beneficial for sugarcane plant growth but this response is
17 dependent both on the *G. diazotrophicus* genotype and the sugarcane variety. The most
18 positive response to inoculation was observed with the combination of strain PAI 5^T and the
19 variety MEX 57-473. Although the positive effect on sugarcane growth apparently occurred
20 by mechanisms other than nitrogen fixation, the results show the importance of the
21 sugarcane variety for the persistence of the plant-bacteria interaction, and it could explain
22 the different rates of BNF estimated among sugarcane cultivars.

24 INTRODUCTION

25 It has been estimated that the contribution of biological nitrogen fixation (BNF) in
26 some sugarcane cultivars may reach up to 70% of total plant nitrogen (5). However, such
27 BNF is largely variable among sugarcane cultivars (23, 45, 46). Even though many
28 diazotrophic species have been isolated from both the rhizosphere and inner tissues of
29 sugarcane plants (1, 9, 31, 40), it is still unknown which bacteria are the most important in
30 plant-associated BNF. The endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* has
31 long been proposed as a strong candidate responsible for such N₂-fixation observed in
32 sugarcane (4, 9, 18, 42). It has also been suggested that *G. diazotrophicus* could promote
33 and improve sugarcane growth through hormonal effects on metabolic processes (14)
34 because of its ability to produce indoleacetic acid (IAA) and gibberellins (3, 13).

35 In addition to sugarcane plants, *G. diazotrophicus* has been isolated from inner
36 tissues of sweet potato (*Ipomoea batatas*), *Pennisetum purpureum* var. Cameroon (11),
37 *Coffea arabica* (22), *Eleusine coracana* (25) and pineapple plants (43). *G. diazotrophicus*
38 has been commonly recovered from inner tissues of the sugarcane plant in the range of 10¹
39 to 10⁵ cells per gram of fresh weight (12, 14, 36, 37, 38). Isolation of *G. diazotrophicus*

1 from sugarcane plants seems to depend on the amount of nitrogen fertilization applied to
2 the crops (13, 28, 36). In these studies low isolation frequencies or low cell numbers of *G.*
3 *diazotrophicus* were found in sugarcane cultivated with high nitrogen fertilization rates, and
4 vice versa. Greenhouse experiments showed that the ability of one strain of *G.*
5 *diazotrophicus* to colonize sugarcane plants diminishes when high nitrogen fertilizer doses
6 were applied (14). Using multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) assays to determine
7 the genetic diversity, seven distinct electrophoretic types (ETs) were identified among *G.*
8 *diazotrophicus* isolates recovered from sugarcane plants cultivated in Brazil with low
9 nitrogen doses, but only one genotype (designed ET 1) was identified among many isolates
10 recovered from sugarcane plants cultivated in Mexico with high N-fertilization levels.
11 These results suggested that the genetic diversity of this bacterial species, living
12 endophytically in sugarcane, could be diminished by the high rates of nitrogen fertilization
13 used in the sugarcane crops in Mexico (7).

14 With respect to the factors that influence the endophyte-plant interaction little is
15 known. This work was carried out with the aim of assessing the influence of bacterial
16 genotype, plant cultivar and nitrogen fertilization rates on the sugarcane-*G. diazotrophicus*
17 interaction. The potential of *G. diazotrophicus* to promote sugarcane growth was also
18 evaluated.

19

20 **MATERIALS AND METHODS**

21 **Bacterial strains and growth conditions**

22 Different strains of *G. diazotrophicus* were used for plant inoculation. Each strain
23 represented a different electrophoretic type (ET), recognized as genotype, as described
24 previously (7). Strains used were UAP 5560 (ET 1), CFNE 550 (ET 2), PAI 5^T (ET 3), PSP
25 22 (ET 4), PAI 3 (ET 5), 1772 (ET 6) and PRC 1 (ET 7). Cells were grown in MESMA
26 liquid medium (14) at 29°C and shaken at 200 rpm for 24 hours. The cultures were
27 centrifuged and the pellet washed three times with 10 mM MgSO₄ and finally resuspended
28 in the MgSO₄ solution at optical density of 0.8 at 450 nm (approximately 2X10⁸ bacterial
29 cells per ml).

30 **Sugarcane cultivars**

31 Micropropagated sterile sugarcane plants of cultivars MY 55-14, MEX 57-473,
32 MEX 62-280, CP 72-2086 and SP 70-1141 were obtained by meristem tissue culture (16).
33 MS medium (27), supplemented with 10% coconut water and plant hormones (3 mg of 2,
34 4-diclorophenoxyacetic acid and 0.1 mg of kinetin per L), was used for callus induction.
35 Explants were maintained in MS medium at 28°C in the dark for approximately two months
36 for callus propagation. The presence of bacterial contamination of callus was evaluated by
37 plating macerated samples (ratio 1:9 w/v) on different culture media such as Congo Red
38 (39), MacConkey, LB (Luria Bertani), PY (Peptone yeast), acetic LGI (9), and MESMA
39 (14). Contaminated calli were discarded. Differentiation to plantlets from calli was

1 accomplished by transfer of callus to the basal MS medium without hormones, and
2 maintained then for 70 days with a 16/8 photoperiod (light/dark) provided by cool
3 fluorescent light ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) at $25\text{-}28^{\circ}\text{C}$ (16). Differentiated plantlets (after the
4 plantlets had rooted) were separated and maintained for 40 days in the same medium and
5 conditions described above. Plantlets were tested for bacterial contamination as described
6 for callus.

7 **Inoculation, evaluation of the colonization of sugarcane plants, and plant growth** 8 **conditions**

9 Micropropagated sterile sugarcane plants are essential both for evaluating the
10 endophytic establishment of bacteria as well as to evaluate effects on the plant growth
11 produced by the endophytic bacteria inoculated. In this work these evaluations were carried
12 out with the following experiments:

13 **Experiment 1.** Endophytic colonization of sugarcane plants var. MY 55-14 by different *G.*
14 *diazotrophicus* strains (PAI 5^T, UAP 55-60, and PAI 3) was evaluated. These strains were
15 selected considering their ET as well as the predominance of the ET among *G.*
16 *diazotrophicus* populations. Strain PAI 5^T corresponds ET-3 which is predominant among
17 *G. diazotrophicus* populations recovered from sugarcane plants cultivated in Brazil; strain
18 UAP 55-60 represents the predominant ET-1 genotype identified among *G. diazotrophicus*
19 populations collected from sugarcane cultivated from different host plants including
20 *Ipomoea batatas*, *Pennisetum purpureum* (7), *Coffea arabica* (22), and *Ananas comosus*
21 plants (43); strain PAI 3 represents the ET-5, a genotype rarely identified among isolates of
22 *G. diazotrophicus* (7). The variety MY 55-14 is extensively cultivated in Morelos State,
23 Mexico. Micropropagated sterile sugarcane plantlets of this variety were inoculated
24 separately, by immersing the roots in a bacterial suspension for 1 hour under sterile
25 conditions, with three strains of *G. diazotrophicus*. Each inoculated plantlet was
26 transplanted to a 1 L capacity pot containing sterile vermiculite. Plantlets were watered
27 with 200 ml of MS nutrient solution (only mineral salts) supplemented with NH_4NO_3 as
28 nitrogen source. In this experiment the plants were fertilized with different nitrogen doses
29 (10, 60, 180 mg N/plant). Uninoculated plantlets were included in the experiment with each
30 treatment. The pots were covered with aluminum foil and the zone where the plants
31 emerged was protected with sterile cotton. The plantlets were maintained in a greenhouse
32 with controlled temperature ($26\text{-}30^{\circ}\text{C}$) and the natural photoperiod corresponding to
33 January through July of 1999. Endophytic bacterial recovery from shoots and roots of
34 inoculated plants was determined at 35, 65, 105 and 170 days post-inoculation (dpi). Five
35 replicate plants for each ET and nitrogen level were analyzed. At harvest, plants were
36 removed from the pots, washed with tap water and disinfected with 70% ethanol for 30
37 seconds. Then the plants were rinsed with distilled water and surface sterilized with a 1.5%
38 sodium hypochlorite solution for 20 minutes. Later, the plants were rinsed 6 times with
39 sterile distilled water under sterile conditions. Fresh plants were divided into roots and

1 shoots and macerated separately in water in a 1:10 (w/v) proportion. The macerates were
2 serially diluted with sterile water. Three replicates per 10-fold dilution were inoculated in
3 vials containing N-free-semisolid acetic LGI medium (9) and incubated for 8 days at 29°C.
4 Vials with a thick yellow surface pellicle were streaked onto acetic LGI agar plates
5 supplemented with yeast extract (50 mg/l), and incubated at 29°C for 3 days to verify the
6 presence of the inoculated strain. The electrophoretic type and plasmid profile of 6 colonies
7 recovered on LGIP agar plates, from each nitrogen treatment where *G. diazotrophicus* was
8 isolated, were further verified both by MLEE assays of 11 metabolic enzymes (7) and by
9 the modified Eckhardt method (17). The bacterial number was determined by the most
10 probable number (MPN) method using the McCrady tables.

11 **Experiment 2.** To evaluate the influence of sugarcane variety on the endophytic and
12 rhizospheric establishment of *G. diazotrophicus*, five sugarcane varieties (MY 55-14, MEX
13 57-473, MEX 69-290, CP 72-2086 and SP 70-1141) were evaluated at different sugarcane
14 growth states. Micropropagated sterile sugarcane plantlets of each variety were inoculated
15 separately with the three strains of *G. diazotrophicus* used in experiment 1. Plantlets were
16 watered with 200 ml of MS nutrient solution containing 10 mg NH₄NO₃, which was
17 considered a basal level, in order to avoid nitrogen deficiencies of the plants. The plantlets
18 were maintained under the greenhouse conditions described in experiment 1 but during the
19 months of February to August of 2000. Uninoculated control plants were included in all of
20 the experiments. At 35, 70, 105, and 170 dpi five plants of each treatment were removed
21 from the pots under sterile conditions. The vermiculite adhered to the roots (considered as
22 the “rhizosphere” in this work) was resuspended in water in a proportion of 1:10 (w/v).
23 This suspension was vortexed at 3000 rpm for 3 minutes. The resulting suspension, which
24 was considered to contain bacteria from the rhizosphere, was serially diluted. Endophytic
25 bacteria were recovered as described in experiment 1. The cell numbers of *G.*
26 *diazotrophicus*, both rhizospheric and endophytic, and the confirmation of the inoculated
27 strain were determined as described in experiment 1.

28 **Experiment 3.** This experiment was carried out to evaluate the potential of *G.*
29 *diazotrophicus* to promote sugarcane growth in two varieties. Micropropagated plantlets of
30 the varieties MY 55-14 and MEX 57-473 were inoculated as described in experiment 1.
31 Plantlets of variety MY 55-14 were inoculated separately with seven different strains of *G.*
32 *diazotrophicus*, and maintained under the greenhouse conditions and during the period
33 described in experiment 1. The leaf numbers, height and diameter of stems of sugarcane of
34 this variety were measured at 35, 65, 105 and 170 dpi, both for inoculated and non-
35 inoculated plants (50 inoculated plants with each strain assayed and 50 control plants). In
36 addition, 10 inoculated plants and 10 uninoculated control plants were used to determine
37 the fresh and dry weight of roots and shoots at 35 and 105 dpi.

38 Once we identified the variety MEX 57-473 (results from experiment 2) as
39 maintaining *G. diazotrophicus* strains at higher numbers for longer periods than others

1 sugarcane cultivars tested, plantlets of this variety were inoculated with strains PAI 5^T (a
2 good colonizer) and PAI 3 (a poor colonizer). Thereafter, the inoculated plantlets were
3 treated as in experiment 1 but supplemented with 10 mg of nitrogen at 0 and 35 dpi.
4 Plantlets were maintained under similar greenhouse conditions described in experiment 1
5 during the months of February to April of 2001. Uninoculated plants were included as
6 controls. The fresh and dry weight of roots and shoots of 17 plants as well as the total N
7 content of these plants were evaluated at 35 and 75 dpi. Total N content of plants was
8 evaluated with the semimicro-Kjeldahl method modified for inclusion of nitrates (6).

9 **Data analysis**

10 All data were analyzed statistically using Student's *t* test.

12 **RESULTS**

13 Micropropagated sugarcane plantlets were obtained from callus in a period of about
14 four months. All sugarcane plantlets tested were free-bacteria. The inoculation of plantlets
15 by immersion of roots into a bacterial suspension for one hour was adequate for the
16 endophytic establishment of *G. diazotrophicus*. All of the *G. diazotrophicus* strains
17 recovered from sugarcane plants analyzed in the different experiments had the same ET and
18 showed an identical plasmid profile to the inoculated strain (data not shown).
19 Electrophoretic type and plasmid profile from strains of *G. diazotrophicus* inoculated have
20 been previously reported (8, 44). The endophytic establishment of *G. diazotrophicus* within
21 stems of sugarcane was confirmed by scanning electron microscopy (data not shown) using
22 stem samples treated as described previously (14). Apparently, the xylem vessels were the
23 stem tissues colonized by *G. diazotrophicus*. However, a detailed analysis on the
24 localization of this bacterium was not carried out.

25 **Ability of *G. diazotrophicus* to colonize sugarcane var. MY 55-14 growing with**
26 **different nitrogen levels.** The ability of three strains of *G. diazotrophicus* (UAP 5560, PAI
27 3 and PAI 5^T) to colonize sugarcane plants growing with different N-levels is shown in
28 Table 1. The three *G. diazotrophicus* strains were recovered 65 and 160 dpi when low
29 nitrogen levels (10 mg N/plant) were applied, but not when high N-levels (180 mg N/plant)
30 were used (Table 1). Surprisingly, it was observed that the endophytic bacterial number
31 diminished drastically in relation with the age of the plant. This occurred regardless of the
32 *G. diazotrophicus* strain inoculated or the nitrogen level applied in the experiment. The cell
33 numbers of strain PAI 3 diminished more drastically than strains UAP 5560 and PAI 5^T
34 after 35 dpi.

35 **Population dynamics of *G. diazotrophicus* in sugarcane varieties.** A drastic decrease of
36 *G. diazotrophicus* populations, with all three strains tested, was observed both in the
37 rhizosphere as well as inside the plant tissues from all of the sugarcane varieties tested
38 through plant growth time (Table 2). This behavior was a general feature in the *G.*
39 *diazotrophicus*-sugarcane interaction. Population dynamics of *G. diazotrophicus* was

1 similar in roots and in the rhizosphere although the bacterial population in the rhizosphere
2 was always higher than inside the roots (Table 2). The presence of *G. diazotrophicus* inside
3 shoot tissues was not consistent; bacteria were not recovered from aerial parts of some
4 plants even at 35 dpi. During the experiment it was observed that strains UAP 5560 (ET 1)
5 and PAI 5^T (ET 3) were always maintained in higher numbers than strain PAI 3 (ET 5).
6 This behavior was observed in all sugarcane varieties tested. Two examples are shown in
7 Fig. 1.

8 Higher numbers of *G. diazotrophicus* cells of three ETs (ET 1, ET 3, ET 5) tested
9 were always found in association with plants of sugarcane var. MEX 57-473, while in
10 sugarcane varieties SP 70-1141 and CP 72-2086 lower bacterial numbers always were
11 detected. The Fig. 2 shows two examples of this.

12 **Evaluation of *G. diazotrophicus* inoculation on sugarcane plant growth (var. MY 55-**
13 **14).** The inoculation of sugarcane var. MY 55-14 plants with seven different strains of *G.*
14 *diazotrophicus* showed that only strain PAI 3 increased slightly the height and diameter of
15 shoots. These increases were observed even 160 dpi although the strain was not recovered
16 from aerial tissues. However, the dry weight of inoculated plants was not statistically
17 different from control plants (data not shown).

18 **Effect of *G. diazotrophicus* inoculation on growth of sugarcane var. MEX 57-473.** In
19 order to verify that *G. diazotrophicus* is able to promote sugarcane growth, the strains PAI
20 5^T (a good colonizer) and PAI 3 (a poor colonizer) were evaluated in association with the
21 variety MEX 57-473, which maintain the highest numbers of this bacterium. Positive
22 effects on sugarcane growth were observed with both strains but the most beneficial
23 response was observed with the strain PAI 5^T (Table 3, 4 and Fig. 3). The fresh and dry
24 weight as well as the total nitrogen content from sugarcane plants inoculated with strain
25 PAI 5^T were statistically higher than control plants both at 35 (Table 3) and 75 dpi (Table
26 4), with the increases being more evident at 35 dpi. Plants inoculated with the strain PAI 3
27 showed increases in fresh and dry weight only at 75 dpi (Table 4), slightly lower than those
28 observed in sugarcane plants inoculated with the strain PAI 5^T at this time. In contrast, the
29 percent nitrogen content of plants inoculated with the strain PAI 5^T was lower at 35 dpi and
30 similar at 75 dpi compared to the nitrogen percentages determined in control plants (Table
31 3, 4). Obviously, the increase in total nitrogen content resulted from a significant increase
32 in plant dry weight. Sugarcane plants inoculated with the strain PAI 3 showed similar
33 percent nitrogen content than uninoculated control plants. The endophytic bacterial number
34 of the strains PAI 5^T and PAI 3 recovered from sugarcane plants from this experiment (data
35 not shown) was in accordance with results described in the Table 2 and Fig. 1-I.

1 DISCUSSION

2 In the present work, without causing visible disease symptoms, the infection
3 followed by colonization of sugarcane plantlets by *G. diazotrophicus* was successful with
4 the single immersion of the plantlet roots in a bacterial suspension. This result confirms the
5 endophytic colonization ability of *G. diazotrophicus* described in different studies using
6 other inoculation methods (14, 19, 21).

7 Although the population dynamics of *G. diazotrophicus* in association with five
8 sugarcane varieties tested was variable, the decrease of bacterial population related to the
9 age of the plant was a general characteristic of this bacterial species. Strains UAP 5560 and
10 PAI 5^T (genotypes 1 and 3, respectively) remained associated with all sugarcane cultivars
11 for longer periods than strain PAI 3 (genotype 5). This result shows the different ability of
12 *G. diazotrophicus* genotypes for endophytically colonizing of sugarcane, and it could
13 explain the predominance of ET 1 and ET 3 identified among *G. diazotrophicus* isolates
14 recovered from sugarcane cultivated in fields of Mexico and Brazil, respectively (7) as well
15 as the highest isolation frequency of ET 1 strains recovered from different host plants such
16 as coffee and pineapple (22, 43). A similar effect on the decrease of the *G. diazotrophicus*
17 population in the rhizosphere of sugarcane plants was observed. However, the population of
18 *G. diazotrophicus* in the rhizosphere was always higher than inside the roots, which
19 suggests that under suitable conditions this putatively endophytic bacterium is capable of
20 surviving and proliferating in such an environment. Although little emphasis has been
21 given to the isolation of “endophytic” bacteria out of plants, the natural occurrence of *G.*
22 *diazotrophicus* in the rhizosphere of coffee and sugarcane plants has been reported
23 previously (22, 29). Recent results show that the bacterial population on the root surface
24 may be equally, if not more, important than the bacterial population within the plant, such as
25 was observed with *Herbaspirillum seropedicae*, another putative endophyte, benefiting the
26 rice plant growth (15).

27 Previously, it was reported that high nitrogen fertilization levels diminished the
28 sugarcane colonization by one strain of *G. diazotrophicus* (14). In the present work we
29 observed that such a decrease occurs regardless of the *G. diazotrophicus* genotype.
30 Recently, Muthukumarasamy et al. (29) reported that *G. diazotrophicus* form long,
31 pleomorphic, immobile cells in the presence of high concentrations of nitrogen sources,
32 especially ammonium (25 mM NH₄NO₃), in culture media. These authors suggested that
33 the morphological changes might play a negative role in the survival of *G. diazotrophicus*
34 in high N-fertilized environments. This possibility cannot be discarded, however, in the
35 present study it was observed that the population of *G. diazotrophicus* decrease even with a
36 low (10 mg N/plant = 0.35 mM NH₄NO₃) nitrogen level.

37 We cannot explain the influence of plant age or nitrogen fertilization level on the
38 population decrease of *G. diazotrophicus* in the inner tissues of sugarcane plants. However,
39 it is known that changes in tissue water relations (26), and in the concentration of sucrose

1 may occur (10, 24) during sugarcane growth. In addition, changes in enzymatic activities
2 have been observed in sugarcane plants when they are nitrogen fertilized (33). These
3 physiological and metabolic changes might modify the establishment and even the
4 endophytic permanence of *G. diazotrophicus* in sugarcane. Moreover, other possibilities
5 could explain the population diminution of *G. diazotrophicus*. Although this species is
6 considered as a non-pathogen (2, 35, 42), it has been described that *G. diazotrophicus*
7 elicits a localized host defense response (19). On this basis, it is conceivable that the
8 endophytic population of *G. diazotrophicus* decrease as a result of host plant defense
9 response mechanisms similar to systemic acquired resistance (SAR) induced by pathogens,
10 or induced systemic resistance (ISR) observed with non-pathogenic rhizobacteria (34).

11 In the present work, the *G. diazotrophicus* number inside root tissues ranged from
12 10^4 to 10^5 CFU/g fresh weight of plants at 35 dpi in all varieties tested, but at 170 dpi this
13 number decreased to 10 CFU/g fresh weight, or the bacterium was not detected. In contrast,
14 the cell numbers of *G. diazotrophicus* found in adult sugarcane plants were in the range of
15 10^5 - 10^7 CFU/g fresh tissue (9, 38). However, cell numbers of *G. diazotrophicus* as low as
16 10 to 10^2 CFU/g fresh weight of plant have been found in mature sugarcane cultivated in
17 Brazil (36). These authors suggested that the variation in the bacterial number of *G.*
18 *diazotrophicus* was due to changes in environmental factors, mainly rainfall, but in the
19 present work conditions were controlled and the number of *G. diazotrophicus* cells
20 decreased as well.

21 The data analysis of population dynamics of *G. diazotrophicus* in association with
22 sugarcane revealed that variety MEX 57-473 is able to harbor this diazotrophic species in
23 greater populations than the other four sugarcane varieties assessed. This fact shows the
24 significance of sugarcane variety for the persistence of the plant-bacteria interaction, and it
25 could explain both the discrepancies in the frequencies or bacterial number of *G.*
26 *diazotrophicus* recovered from sugarcane plants analyzed in diverse studies (9, 13, 36, 38)
27 as well as the different rates of BFN estimated among sugarcane cultivars (23,45, 46). It is
28 important to mention that *G. diazotrophicus* has been isolated from sugarcane var. MEX
29 57-473 cultivated in fields fertilized with 275-300 kg N/ha but not from other varieties
30 fertilized with the same amount of nitrogen (13).

31 Interestingly, plant growth promotion was observed in var. MEX 57-473, but not in
32 var. MY 55-14, inoculated with *G. diazotrophicus* strains PAI 5^T and PAI 3. The lack of
33 growth promotion of MY 55-14 plants could be due to the drastic diminution of *G.*
34 *diazotrophicus* population through plant growth time. Even though the population of strain
35 PAI 3 declined more rapidly than PAI 5^T populations in all sugarcane tested through plant
36 growth, the ability of strain PAI 3 to promote the growth of sugarcane variety MEX 57-473
37 might be explained by the bacterial permanence at the time evaluated (75 dpi) in this
38 variety.

1 The present work shows the sugarcane growth promotion when there are
2 appropriate interaction between sugarcane variety and *G. diazotrophicus* genotype.
3 However, the beneficial effect on sugarcane growth observed with variety MEX 57-473
4 was apparently not due to BNF, since the percent nitrogen content of inoculated plants was
5 statistically similar or even lower than in uninoculated plants. This could reflect an effect of
6 dilution of nutrients generally observed when a hormonal effect is involved. Because *G.*
7 *diazotrophicus* has been shown to produce plant growth promoting substances (3, 13) IAA
8 could be the compound responsible for the beneficial effects observed, as suggested by
9 Fuentes-Ramírez et al., (13) and recently by Sevilla et al., (41) as well as by Oliveira et al.,
10 (32). In addition, the consistent decrease of *G. diazotrophicus* populations observed, and
11 the low cell numbers of this bacterium inside sugarcane seems not to be sufficient to sustain
12 the BNF process required by the plant. In fact, it has been argued that the endophytic
13 bacterial number appears trivial when it is compared with the *Rhizobium*-legume
14 association where high bacterial numbers are required in the nodule for sustaining BNF
15 (20). However, Sevilla et al. (41) with a ¹⁵N₂ incorporation experiment reported that *G.*
16 *diazotrophicus* strain PAI 5^T was capable of fixing N₂ inside sugarcane plants var. SP 70-
17 1143. Although these authors did not show evidence that strain PAI 5^T was responsible of
18 such an activity inside sugarcane, because they did not eliminate the rhizosphere or root
19 surface bacterial populations, the possibility that other growth promoting factors might be
20 responsible for the enhancement of sugarcane growth was not excluded. Differences in
21 sugarcane variety might explain the discrepancies between the results of the present study
22 and those of Sevilla et al. (41). Recently, data on expression of sugarcane genes induced by
23 inoculation with *G. diazotrophicus* suggested that the plant might be actively involved in
24 the establishment of this bacterium (30).

25 Although the inoculation of sugarcane with *G. diazotrophicus* may promote plant
26 growth, it will be necessary to search for the best *G. diazotrophicus* genotype-sugarcane
27 variety interaction to obtaining consistent responses that contribute to sugarcane growth
28 enhancement.

30 ACKNOWLEDGMENTS

31 We are indebted to Dr. Michael Dunn for constructive English corrections, and Dr. Maria
32 Valdés for valuable opinions on the work. Jesús Muñoz-Rojas was supported by Consejo
33 Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)-México and by Dirección General de
34 Estudios de Posgrado (DGEP)-UNAM.

Table 1. Endophytic colonization of sugarcane variety MY 55-14 by *G. diazotrophicus*.

Days post inoculation	Strain/Genotype <i>G. diazotrophicus</i>		Nitrogen level applied (mg/plant)					
			10		60		180	
			A	R	A	R	A	R
35	UAP 5560	ET 1	3.25	4.08	2.80	3.25	1	2.87
	PAI 5 ^T	ET 3	4.67	5.40	4.05	2.39	3.57	3.21
	PAI 3	ET 5	4.72	5.76	3.84	4.71	3.61	4.87
65	UAP 5560	ET 1	0.90	3.57	nd	1.69	nd	nd
	PAI 5 ^T	ET 3	2.57	3.12	nd	1.53	nd	1.53
	PAI 3	ET 5	nd	1.95	nd	1.57	nd	nd
105	UAP 5560	ET 1	nd	0.90	nd	nd	nd	nd
	PAI 5 ^T	ET 3	1.55	1.41	nd	nd	nd	nd
	PAI 3	ET 5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
160	UAP 5560	ET 1	1.79	2.87	nd	2.17	nd	nd
	PAI 5 ^T	ET 3	2.36	2.14	nd	nd	nd	nd
	PAI 3	ET 5	nd	nd	nd	nd	nd	nd

A = Log *G. diazotrophicus* cell number/g fresh weight of shoots (stem and leaves); R = Log *G. diazotrophicus* cell number/g fresh weight of root; nd = Not detected. Each value represents the average of five determinations.

Table 2. Number of *G. diazotrophicus* cells associated with different sugarcane varieties.

			Sugarcane variety								
			MEX 57-473			MY 55-14			CP 72-2086		
dpi	Strain/genotype <i>G. diazotrophicus</i>		Rh	R	A	Rh	R	A	Rh	R	A
35	UAP 5560	1	6.10(±0.18)	4.95(±0.40)	nd	6.45(±0.44)	5.12(±0.53)	1.40(±0.79) ¹	6.86(±0.32)	4.62(±0.94)	0.29(±0.66)*
	PAI 5 ^T	3	6.99(±0.26)	5.46(±0.58)	2.52(±0.56)	5.70(±0.28)	4.86(±0.63)	0.75(±1.04) ³	5.77(±0.68)	3.39(±0.91)	nd
	PAI 3	5	6.68(±0.29)	4.61(±0.23)	nd	3.84(±1.00)	5.09(±0.63)	1.75(±1.17) ¹	4.08(±0.85)	4.72(±1.03)	0.96(±0.87) ²
70	UAP 5560	1	5.12(±0.96)	3.61(±0.87)	nd	4.97(±1.04)	2.74(±0.89)	nd	3.04(±0.47)	1.79(±1.85) ²	nd
	PAI 5 ^T	3	6.06(±0.64)	4.37(±0.50)	nd	5.55(±0.84)	2.52(±0.69)	0.71(±0.98) ³	4.90(±0.84)	0.92(±1.28) ³	nd
	PAI 3	5	4.39(±0.59)	4.35(±0.41)	0.32(±0.71)*	2.87(±0.88)	2.19(±1.33) ¹	0.78(±1.07) ³	1.59(±1.45) ²	0.39(±0.87)*	nd
105	UAP 5560	1	5.36(±0.96)	2.86(±0.48)	nd	4.53(±0.71)	2.91(±0.73)	nd	1.51(±0.90) ¹	1.12(±1.07) ²	nd
	PAI 5 ^T	3	5.33(±0.52)	4.10(±0.57)	0.32(±0.71)*	4.83(±0.68)	2.60(±1.13)	nd	4.53(±0.79)	1.58(±0.89) ¹	nd
	PAI 3	5	2.62(±1.02)	1.03(±0.95) ²	nd	1.12(±1.07) ²	nd	nd	1.03(±0.95) ²	0.64(±0.87) ³	nd
170	UAP 5560	1	3.60(±0.11)	1.95(±0.42)	nd	3.70(±0.41)	0.64(±0.87) ³	nd	nd	1.03(±0.95) ²	nd
	PAI 5 ^T	3	4.06(±0.70)	2.50(±0.39)	0.32(±0.71)*	3.66(±0.20)	1.42(±0.81) ¹	nd	1.63(±0.98) ¹	0.32(±0.71)*	nd
	PAI 3	5	0.85(±1.22)	0.39(±0.87)*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Rh=Number (log cfu/g fresh weight) detected in "rhizosphere"; R=Number (log cfu/g fresh weight) detected inside of root tissues; A=Number (log cfu/g fresh weight) detected inside of shoot tissues; dpi=Days postinoculation; nd=Bacteria were not detected in any plant. Each value represents the average of 5 determinations. (Standard deviation). Bacterial number in variety MEX 69-290 was similar to MY 55-14 and the bacterial number in variety SP 70-1141 was similar to CP 72-2086. Superscript number means the number of plants where bacteria were not detected, * means that bacteria were detected only in one plant.

Table 3. Dry weight and N content in sugarcane variety MEX 57-473 at 35 dpi.

Treatment	Shoot dry Weight (g)	% N in shoots	Total N of shoots (mg)	Root dry weight (g)	% N in roots	Total N of roots (mg)	Total dry weight (g)	Total N of plants (mg)
Control	0.184 (\pm 0.04) B	2.292 (\pm 0.29) A	4.217 (\pm 1.11) B	0.139 (\pm 0.03) B	1.304 (\pm 0.14) A	1.812 (\pm 0.57) B	0.325 (\pm 0.08) B	6.029 (\pm 1.63) B
PAI 5 ^T	0.325 (\pm 0.06) A	1.888 (\pm 0.23) B	6.136 (\pm 1.05) A	0.253 (\pm 0.06) A	1.043 (\pm 0.13) B	2.638 (\pm 0.35) A	0.578 (\pm 0.12) A	8.774 (\pm 1.13) A
PAI 3	0.179 (\pm 0.06) B	2.292 (\pm 0.27) A	4.109 (\pm 1.31) B	0.144 (\pm 0.04) B	1.254 (\pm 0.12) A	1.818 (\pm 0.68) B	0.323 (\pm 0.10) B	5.927 (\pm 1.92) B

Each value represents the average \pm S.D. of 17 plants. Values with the same letter within each column do not differ at P<0.05.

Table 4. Dry weight and N content in sugarcane variety MEX 57-473 at 75 dpi.

Treatment	Shoot dry Weight (g)	% N in shoots	Total N of shoots (mg)	Root dry weight (g)	% N in roots	Total N of roots (mg)	Total dry weight (g)	Total N of plants (mg)
Control	1.273 (\pm 0.22) B	0.966 (\pm 0.10) B	12.148 (\pm 1.57) B	1.272 (\pm 0.24) B	0.524 (\pm 0.04) A	6.651 (\pm 1.32) B	2.455 (\pm 0.46) B	18.799 (\pm 2.26) B
PAI 5 ^T	1.517 (\pm 0.17) A	0.911 (\pm 0.07) A	13.753 (\pm 1.57) A	1.581 (\pm 0.19) A	0.538 (\pm 0.03) A	8.482 (\pm 1.04) A	3.098 (\pm 0.35) A	22.235 (\pm 2.41) A
PAI 3	1.450 (\pm 0.18) A	0.889 (\pm 0.06) A	12.915 (\pm 1.77) AB	1.583 (\pm 0.15) A	0.521 (\pm 0.04) A	8.279 (\pm 1.35) A	3.033 (\pm 0.27) A	21.195 (\pm 2.69) A

Each value represents the average \pm S.D. of 17 plants. Values with the same letter within each column do not differ at P<0.05.

Fig. 1

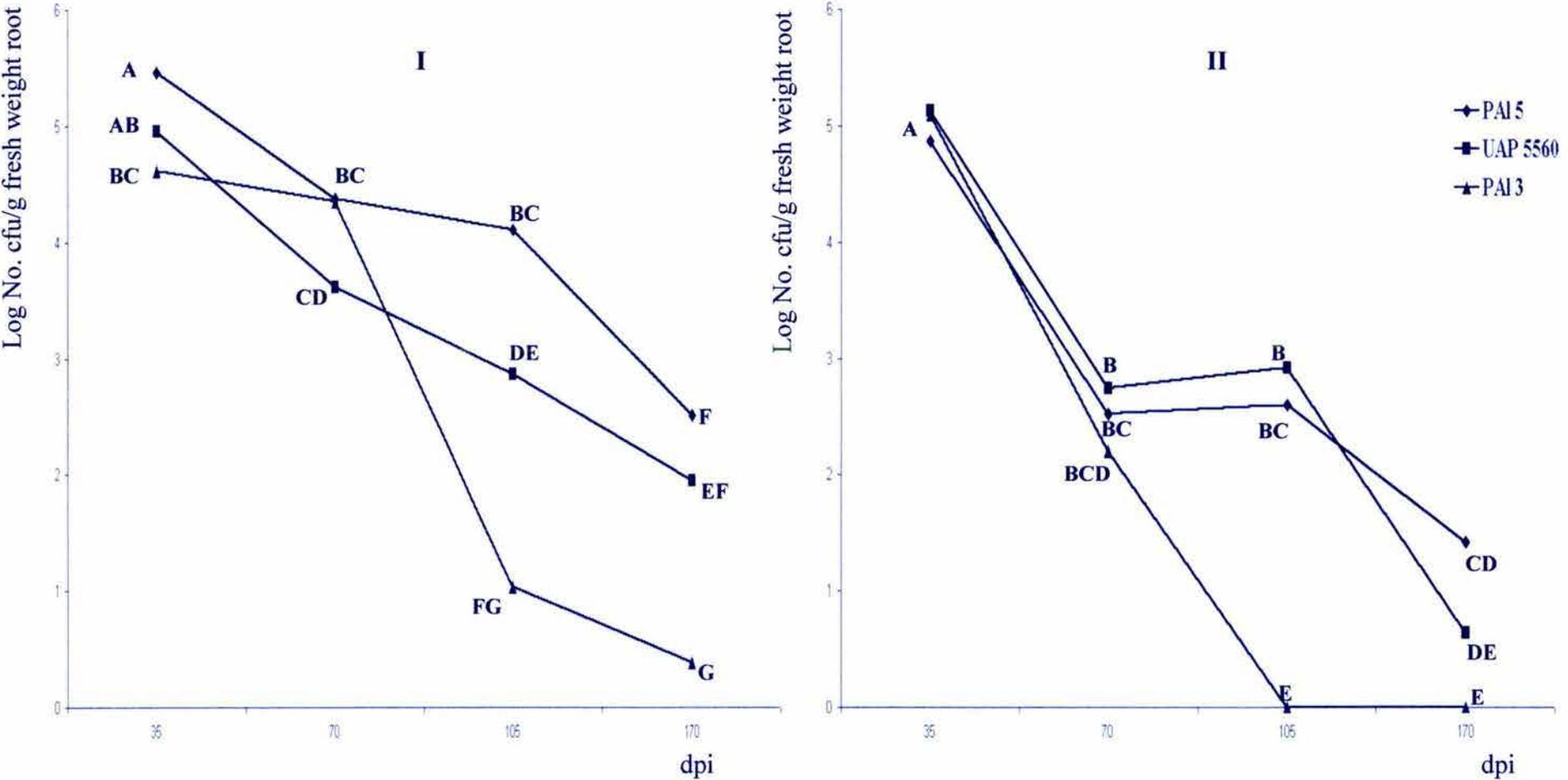


Fig. 1 Population dynamics of *G. diazotrophicus* in sugarcane. Comparative analysis among genotypes of *G. diazotrophicus*. Values of Log of cell number/g fresh weight used for analysis data were from I) plants of sugarcane variety MEX 57-473 and II) plants of sugarcane variety MY 55-14. Each point represents the average of 5 values. Points with the same letter within each graph do not differ by t-student test to $P < 0.05$

Fig. 2

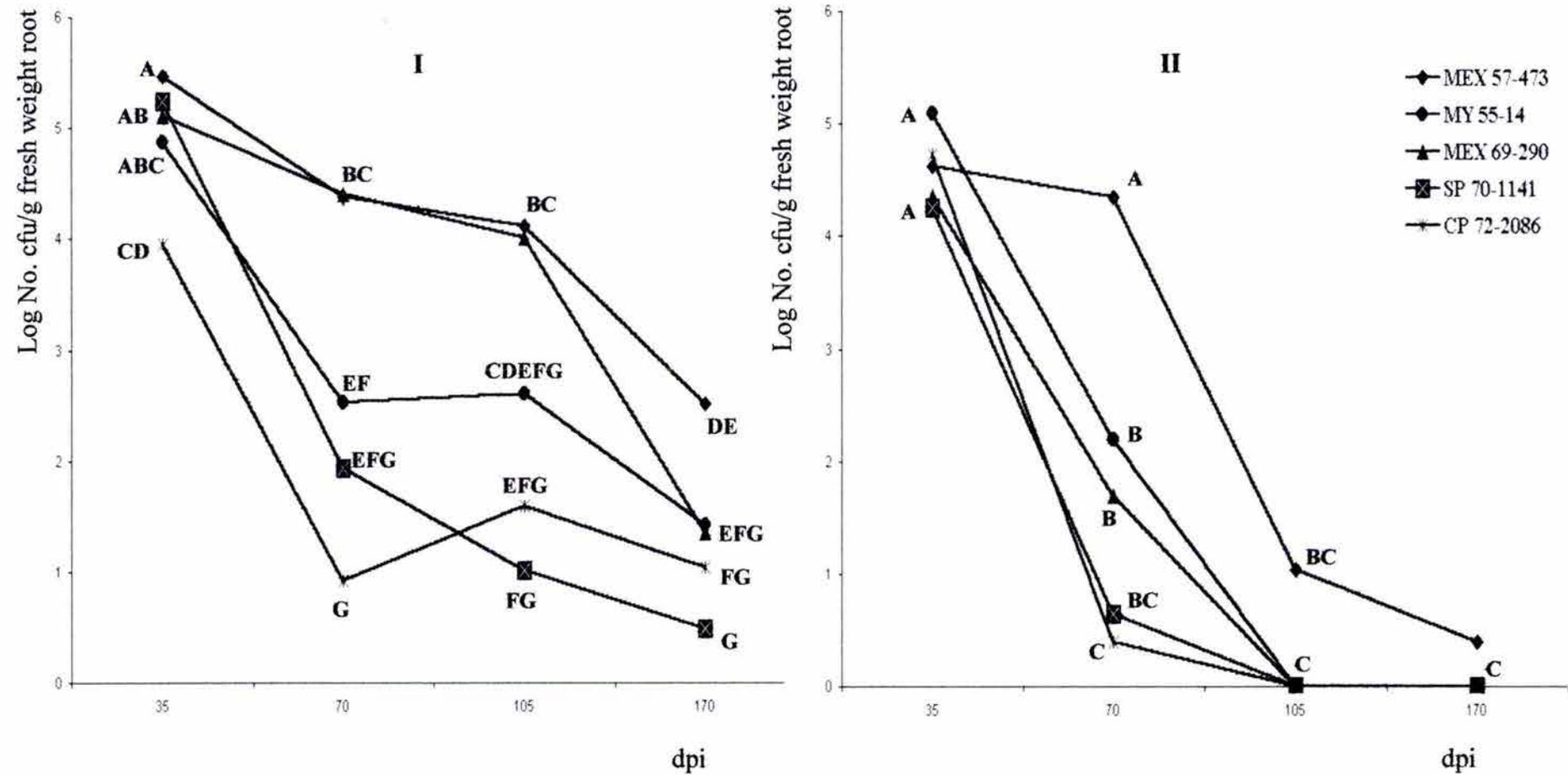
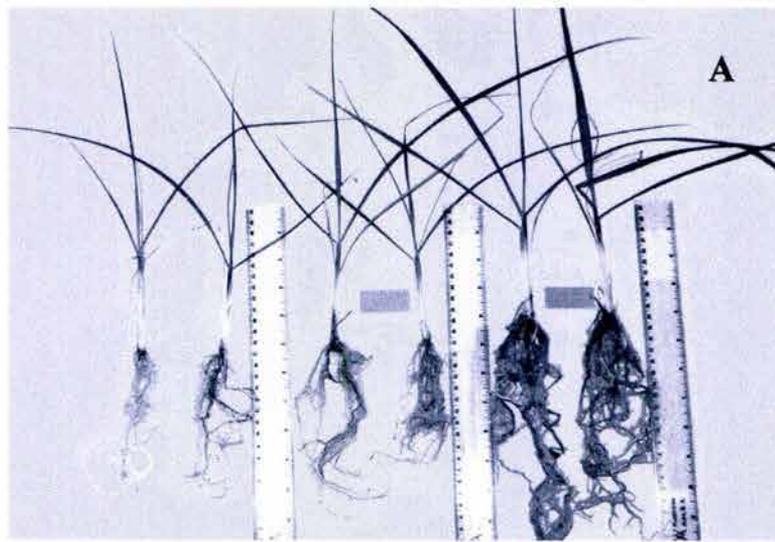


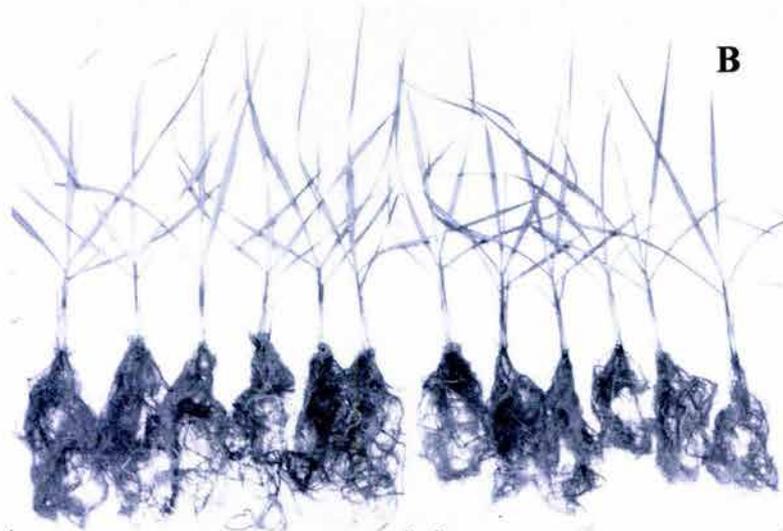
Fig. 2 Population dynamics of *G. diazotrophicus* in sugarcane. Comparative analysis among sugarcane cultivars. Values of Log of cell number/g fresh weight used for analysis data were from I) plants inoculated with strain PAI 5^T and II) plants inoculated with strain PAI 3. Each point represents the average of 5 values. Points with the same letter within each graph do not differ by t-student test to P<0.05. dpi=days post inoculation.



Strain PAI 3

Control

Strain PAI 5^T



Strain PAI 5^T

Control



Strain PAI 5^T

Control

Fig. 3. Effect of *G. diazotrophicus* inoculation on the growth of sugarcane var. MEX 57-473. A) Comparison between inoculated and control plants 35 dpi. B) 75 dpi. C) The same six plants from fig. B.

1 REFERENCES

- 2 1) Asis Jr CA, Kubota M, Chebotar VK, Ohta H, Arima Y, Nishiyama K, Tsuchiya K-
3 I, Akao S (2000) Endophytic bacterial population in Philippine sugarcane cultivars
4 and isolation of nitrogen-fixing strains. *Microbes Environ* 15:209-216
- 5 2) Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J (1997) Recent advances
6 in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29:911-922
- 7 3) Bastian F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998). Production of
8 indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and
9 *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg*
10 24:7-11
- 11 4) Boddey RM, De Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, De Olivares FL, Baldani VLD,
12 Döbereiner J (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and
13 rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174:195-209
- 14 5) Boddey RM, Urquiaga S, Reis V, Döbereiner J (1991) Biological nitrogen fixation
15 associated with sugar cane. *Plant soil* 137:111-117
- 16 6) Bremner JM (1965) Total nitrogen. In: Black CA (ed) *Methods of soil analysis*,
17 Part 2, Agronomy 9, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp
18 1149-1178
- 19 7) Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramírez L E, Reis VM, Martínez-Romero E (1995)
20 Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a
21 new genetically distant group. *Appl Environ Microbiol* 61:3008-3013
- 22 8) Caballero-Mellado J, Martínez-Romero E (1994) Limited genetic diversity in the
23 endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Environ*
24 *Microbiol* 60:1532-1537
- 25 9) Cavalcante VA, Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium
26 associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31
- 27 10) Chaugule RS, Ranade SS, Shah NC (2000) Magnetic resonance imaging (MRI)
28 of *Saccharum officinarum* L. (sugarcane) during its growth for sucrose content.
29 *Indian J Exp Biol* 38:1062-1065
- 30 11) Döbereiner J, Reis VM, Paula MA, Olivares FL (1993) Endophytes diazotrophs in
31 sugar cane, cereals and tuber plants. *Curr Plant Sci Biotechnol Agric* 17:671-676
- 32 12) Dong Z, Canny MJ, McCully ME, Roboredo MR, Cavadilla CF, Ortega E, Rodés R
33 (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the
34 apoplast. *Plant Physiol* 105:1139-1147
- 35 13) Fuentes-Ramírez LE, Jiménez-Salgado T, Abarca-Ocampo IR, Caballero-Mellado J
36 (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, and indoleacetic acid producing bacterium
37 isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154:145-150

- 1 14) Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J, Sepúlveda J, Martínez-Romero E
2 (1999) Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by
3 high N-fertilization. FEMS Microbiol Ecol 29:117-128
- 4 15) Gyaneshwar P, James EK, Reddy PM, Ladha JK (2002) *Herbaspirillum*
5 colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice
6 varieties. New Phytol 154:131-145
- 7 16) Heinz DJ, Mee GWP (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum*
8 species. Crop Sci 9:316-318
- 9 17) Hynes MF, McGregor NF (1990) Two plasmids other than the nodulation plasmid
10 are necessary for formation of nitrogen fixing nodules by *Rhizobium*
11 *leguminosarum*. Mol Microbiol 4:567-574
- 12 18) James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field
13 Crops Res 65:197-209
- 14 19) James EK, Olivares FL, De Oliveira ALM, Dos Reis Jr FB, Da Silva LG, Reis VM
15 (2001) Further observations on the interaction between sugar cane and
16 *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. J
17 Exp Bot 52:747-760
- 18 20) James EK, Gyaneshwar P, Barraquio WL, Mathan N, Ladha JK (2000) Endophytic
19 diazotrophs associated with rice. In: Ladha JK, Reddy PM (eds) The quest for
20 nitrogen fixation in rice, Los Baños, Laguna, Philippines, pp 119-140
- 21 21) James EK, Reis VM, Olivares FL, Baldani JI, Döbereiner J (1994) Infection of
22 sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. J Exp Bot
23 45:757-766
- 24 22) Jimenez-Salgado T, Fuentes-Ramirez LE, Tapia-Hernandez A, Mascarua-Esparza
25 MA, Martinez-Romero E, Caballero-Mellado J (1997) *Coffea arabica* L., a new
26 host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing
27 acetobacteria. Appl Environ Microbiol 63:3676-3683
- 28 23) Lima E, Boddey RM, Döbereiner J (1987) Quantification of biological nitrogen
29 fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. Soil Biol
30 Biochem 19:165-170
- 31 24) Lingle SE (1999) Sugar metabolism during growth and development in sugarcane
32 internodes. Crop Science 39:480-486
- 33 25) Loganathan P, Sunlta R, Parlda AK, Nair S (1999) Isolation and characterization of
34 two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant
35 *Eleusine coracana* L. J Appl Microbiol 87:167-172
- 36 26) Moore PH, Cosgrove DJ (1991) Developmental changes in cell and tissue water
37 relation parameters in storage parenchyma of sugarcane. Plant Physiol 96:794-801
- 38 27) Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays
39 with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473

- 1 28) Muthukumarasamy R, Revathi G, Lakshminarasimhan C (1999) Influence of N
2 fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp.
3 from Indian sugarcane varieties. Biol Fertil Soils 29:157-164
- 4 29) Muthukumarasamy R, Revathi G, Loganathan P (2002) Effect of inorganic N on
5 the population, *in vitro* colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus*
6 (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Plant Soil 243:91-102
- 7 30) Nogueira EM, Vinagre F, Masuda HP, Vargas C, Muniz de Pádua VL, Da Silva
8 FR, Dos Santos RV, Baldani JI, Ferreira PCG, Hemerly AS (2001) Expression of
9 sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and
10 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Gen Mol Biol 24:199-206
- 11 31) Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J (1996) Occurrence
12 of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves
13 predominantly of gramineae. Biol Fertil Soils 21:197-200
- 14 32) Oliveria ALM, Urquiaga S, Döbereiner J, Baldani JI (2002) The effect of
15 inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants.
16 Plant Soil 242:205-215
- 17 33) Pelaez AI, De Armas Urquiza R, Valadier M-H, Champigny ML (1994) Short-term
18 effect of nitrate on carbon metabolism of two sugarcane cultivars differing in their
19 biomass production. Phytochemistry 36:819-833
- 20 34) Pieterse CM, van Loon LC (1999) Salicylic acid-independent plant defense
21 pathways. Trends Plant Sci 4:52-58
- 22 35) Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes.
23 Trends Microbiol 6:139-144
- 24 36) Reis dos Jr FB, Reis VM, Urquiaga S, Döbereiner J (2000) Influence of nitrogen
25 fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and
26 *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). Plant Soil 219:153-159
- 27 37) Reis VM, Olivares FL, De Oliveira ALM, Dos Reis Jr FB, Baldani JI, Döbereiner J
28 (1999) Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with
29 *Acetobacter diazotrophicus*. Plant Soil 206:205-211
- 30 38) Reis VM, Olivares FL, Döbereiner J (1994) Improved methodology for isolation of
31 *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World J
32 Microbiol Biotechnol 10:401-405
- 33 39) Rodríguez-Cáceres E (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp.
34 Appl Environ Microbiol 44:990-991
- 35 40) Ruschel AP (1981) Associative N₂-fixation by sugarcane. In: Vose PB, Ruschel AP
36 (eds) Associative N₂-Fixation, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 81-90
- 37 41) Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of benefit to
38 sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile

- 1 plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. Mol
2 Plant-Microb Interact 14:358-366
- 3 42) Sevilla M, Kennedy C (2000) Genetic Analysis of nitrogen fixation and plant-
4 growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of
5 sugarcane. In: Triplett EW (ed) Prokariotic nitrogen fixation: A model system for
6 the analysis of a biological process, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp
7 737-760
- 8 43) Tapia-Hernández A, Bustillos-Cristales MR, Jiménez-Salgado T, Caballero-
9 Mellado J, Fuentes-Ramírez LE (2000) Natural endophytic occurrence of
10 *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. Microb Ecol 39:49-55
- 11 44) Teixeira KRS, Galler R, Kennedy C, Baldani JI (1994) Plasmid contents and *nif*
12 genes detection in *Acetobacter diazotrophicus* strains. In: Hegazi NA, Fayes M,
13 Monib (eds) Nitrogen fixation with non-legumes, The American University in Cairo
14 Press, pp 273-281
- 15 45) Urquiaga S, Cruz KHS, Boddey RM (1992) Contribution of nitrogen fixation to
16 sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. Soil Sci Soc Am J 56:105-
17 114
- 18 46) Yoneyama T, Muraoka T, Kim TH, Dacanay EV, Y Nakanishi (1997) The natural
19 ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and
20 Miyako (Japan). Plant Soil 189:239-244

EVALUACIÓN DE LA INTERACCION ENTRE CEPAS DE *G. diazotrophicus* IN VITRO Y EN ASOCIACIÓN CON LA CAÑA DE AZÚCAR.

En la actualidad no se conoce mucho acerca de las interacciones endófito-endófito, no obstante estas interacciones podrían ayudarnos a entender cuales bacterias son más competitivas en un ambiente. Una cepa competitiva podría tener una mayor oportunidad de establecerse en su hospedero y por lo tanto un ofrecer un efecto benéfico más exitoso, además esto podría ser determinante en la predominancia de un grupo bacteriano particular. En el presente trabajo se evaluó la interacción entre cepas de *G. diazotrophicus* tanto *in vitro* como en asociación con la caña de azúcar.

	Página
Resultados	37
Discusión.....	44
Material y métodos.....	48

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE CEPAS DE *G. diazotrophicus* *IN VITRO* Y EN ASOCIACIÓN CON LA CAÑA DE AZÚCAR.

RESULTADOS

De un total de 55 cepas de *G. diazotrophicus*, sólo tres representadas por el ET 3 y dos representadas por el ET 1 mostraron actividad antagonista contra 43 cepas (78%) de la misma especie (**Tabla 2, Figura 3**). Seis cepas del ET 3 y seis del ET 1 (incluyendo las mismas antagonistas en cada caso) tienen la característica de ser resistentes a la actividad antagonista. El antagonismo causado por las cepas del ET 3 fue observado en los diferentes medios de cultivo en placa utilizados (MESMA, SYP o LGIP) así como en el medio LGIP semigelificado. La actividad antagonista del ET 3 sólo se observó contra cepas de *G. diazotrophicus* o especies filogenéticamente muy cercanas tales como *G. liquefaciens*, *G. johannae* y *G. azotocaptans*, pero no con cepas de otras especies ensayadas (**Tabla 3**). Las dos cepas antagonistas del ET 1 de *G. diazotrophicus* causaron halos de inhibición menores que los observados con las cepas del ET 3 (**Fig. 3**), siendo el número de cepas antagonizadas menor que las inhibidas por las cepas del ET 3 (**Tabla 2**) y no antagonizaron a cepas de otras especies.

La actividad antagonista de una cepa inhibitoria (ej. PRX 6) de *G. diazotrophicus* se observó en medios de cultivo líquidos (MESMA y SYP) cuando fue coinoculada con una cepa sensible (ej. PAI 3) (**Fig. 4**). La inhibición del crecimiento de la cepa sensible se observó a pesar de que la cepa antagonista fue inoculada en una proporción menor que la cepa sensible. La actividad antagonista siempre fue observada al final de la fase logarítmica del crecimiento de la cepa productora de la sustancia inhibitoria.

Consideramos de gran relevancia conocer si el efecto antagónico expresado por algunas cepas de *G. diazotrophicus* en medios de cultivo también se expresa en asociación con la caña de azúcar. Por esta razón, se realizaron experimentos de coinoculación en planta con una cepa antagonista (PAI 5^T) y una cepa (UAP 5541 Sm^r) sensible al antagonismo. Los resultados mostraron que las poblaciones de las cepas PAI 5^T y UAP 5541 Sm^r fueron prácticamente iguales en número a los 25 dpi (días posteriores a la inoculación) tanto en el ambiente rizosférico como en el ambiente endófito de la caña de azúcar. Sin embargo, la población de la cepa antagonista fue mucho mayor que la población de la cepa sensible a los 63 dpi en ambos ambientes (**Tabla 4**). Estos resultados muestran que el antagonismo causado por la cepa PAI 5^T

en medios de cultivo contra otras cepas de *G. diazotrophicus* es una estrategia importante para competir en el ambiente endófito de la caña de azúcar.

Por considerar importante elucidar la naturaleza química de la sustancia inhibitoria del crecimiento, de gran número de cepas de *G. diazotrophicus*, se exploraron diferentes posibilidades. La actividad antagónica causada por cepas del ET 3 fue observada en medios de cultivo sin y con altas concentraciones de hierro, lo cual demuestra que no se trata de un sideróforo. También se descartó la posibilidad de que cambios en el pH del medio de cultivo causado por las cepas antagonistas fueran responsables de la inhibición, ya que el efecto antagónico se presentó aun en medios donde el pH (6.6) fue regulado. El tamaño de la molécula antagónica fue delimitado entre 3000 y 6500 Daltons con el uso de membranas de diálisis.

La estrategia de purificación de la sustancia inhibitoria consistió en dos pasos principales, primero esta sustancia se concentró realizando una extracción en cloroformo a partir de sobrenadantes de una cepa productora con 48 horas de crecimiento. Se obtuvieron alrededor de 100 ml de este concentrado con una actividad de 6400 UA/ml a partir de 1 L de cultivo (Fig. 7). El perfil de proteínas del concentrado de una cepa antagonista fue diferente al de una cepa sensible a esta actividad. Una banda de aproximadamente 14000 Daltons y una doble banda de alrededor de 3500 Daltons fueron observadas en los concentrados de la cepa antagonista (Fig. 5). El segundo paso consistió en separar a la sustancia inhibitoria mediante una cromatografía de afinidad y el tamaño molecular de ésta sustancia fue corroborado en 3400 Daltons mediante electroforesis (Fig. 6).

La sustancia antagónica fue sensible a la actividad de proteasas (Tabla 5) pero no a lisozima ni a una lipasa. La actividad de la sustancia antagónica resultó estable a cambios de pH en el rango de 3 a 8.5. Sin embargo, la actividad antagónica de la sustancia disminuye parcialmente con tratamientos a 75° C durante 2 h y se pierde totalmente después de 2 h a 95° C. La sustancia antagónica resultó estable a 4° C por un período de 10 meses, tiempo en el que el extracto crudo (concentrado) se agotó después de 3 evaluaciones mensuales.

Los datos en conjunto sugieren que la sustancia inhibitoria es de naturaleza protéica.

Tabla 2. Efecto antagónico entre cepas de *G. diazotrophicus*

Cepa antagónica/ET	ET/(No. cepas indicadoras ensayadas)										
	ET 1				ET 2		ET 3		ET*	ET 7	
	(2)	(11)	(10)	(6)	(1)	(1)	(1)	(6)	(12)	(1)	(4)
PBD 4/ET 1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PBD 17/ET1	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
PRX 3/ET3	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
PRX 6/ET3	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
PAL 5 ^T /ET3	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

- Resistente a la actividad antagónica

+ Sensible a la actividad antagónica

* Incluye cepas de los ETs 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14

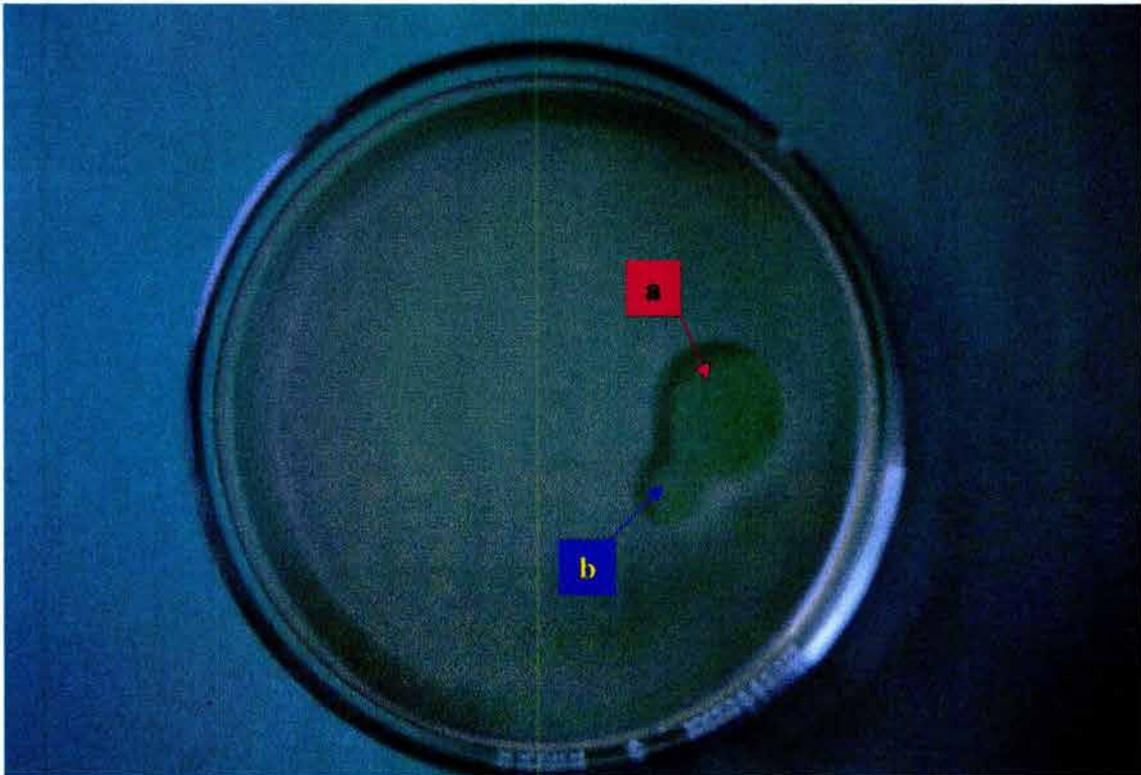


Figura 3. Efecto antagónico entre cepas de *G. diazotrophicus*. Inhibición del crecimiento de la cepa PSP 22 por las cepas antagonistas PAL 5^T (a) y PBD 4 (b). Ensayo en doble capa de agar en placa.

Tabla 3. Cepas de *G. diazotrophicus* antagonistas de especies filogenéticamente cercanas.

	Cepas de <i>G. diazotrophicus</i> antagonistas		
	PRX 3	PRX 6	PAI 5 ^T
<i>Gluconacetobacter johannae</i> (1)	+	+	+
<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i> (1)	+	+	+
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> (1)	+	+	+
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> (1)	-	-	-
<i>Acetobacter aceti</i> (1)	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i> (1)	-	-	-
<i>Gluconobacter oxidans</i> (1)	-	-	-
<i>Frateuria aurantia</i> (1)	-	-	-
<i>Azospirillum brasilense</i> (4)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	-	-	-
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (1)	-	-	-
<i>Rhizobium</i> sp. NGR 234 (1)	-	-	-
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (3)	-	-	-

-: Resistencia
+: Susceptibilidad

(No. cepas ensayadas)

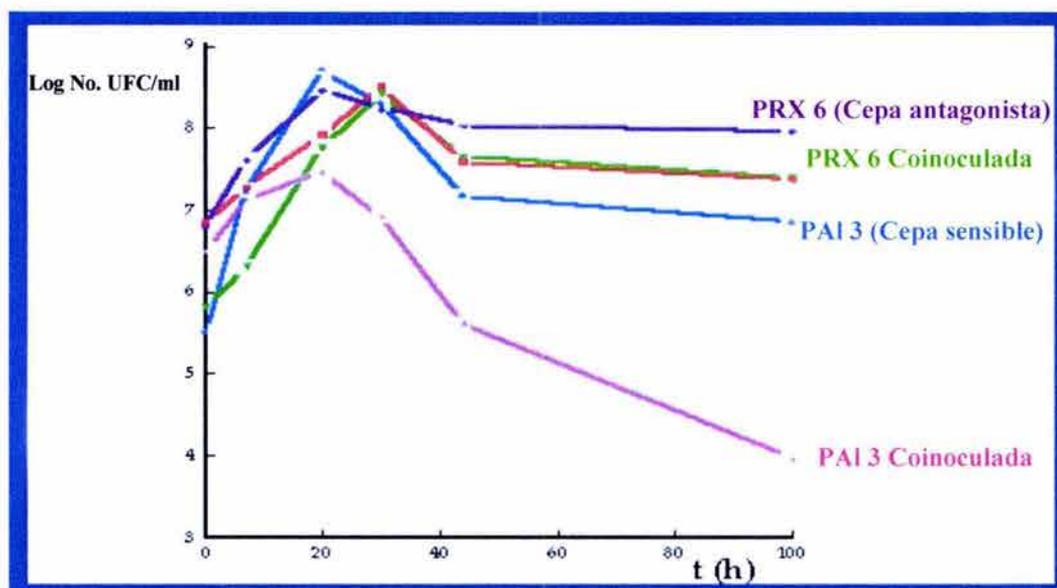


Fig. 4. Actividad antagonista de la cepa PRX 6 de *G. diazotrophicus* contra la cepa PAI 3 en el medio de cultivo líquido MESMA. La línea morada y la línea azul representan el crecimiento de la cepa PAI 3 y de la cepa PRX 6 respectivamente, inoculadas por separado en el medio líquido. La línea rosa corresponde al crecimiento de la cepa PAI 3 cuando fue coinoculada junto con la cepa antagonista PRX 6, cuyo crecimiento se muestra en verde. Línea roja corresponde a la suma de los crecimientos de la cepa PAI 3 y PRX 6 cuando fueron coinoculadas en el medio líquido.

Tabla 4. Coinoculación de plantas de caña de azúcar var. MEX 57-473 con cepas de *G. diazotrophicus*

Raíz	Cepa inoculada	25 dpi	63 dpi
Testigo 1	UAP 5541 Sm ^r	5.341 (± 0.74) A	3.30 (± 0.37) B
Testigo 2	PAI 5 ^T	5.132 (± 0.77) A	2.92 (± 0.40) B
M ←	UAP 5541 Sm ^r	4.867 (± 1.12) A	1.010 (± 1.38) C*
	PAI 5 ^T	5.084 (± 0.77) A	2.951 (± 0.64) B
Rizósfera			
Testigo 1	UAP 5541 Sm ^r	7.048 (± 1.13) AB	5.823 (± 0.89) B
Testigo 2	PAI 5 ^T	6.876 (± 0.47) AB	4.327 (± 0.77) C
M ←	UAP 5541 Sm ^r	7.332 (± 0.33) A	2.954 (± 0.61) D
	PAI 5 ^T	7.101 (± 0.29) A	4.067 (± 0.83) C

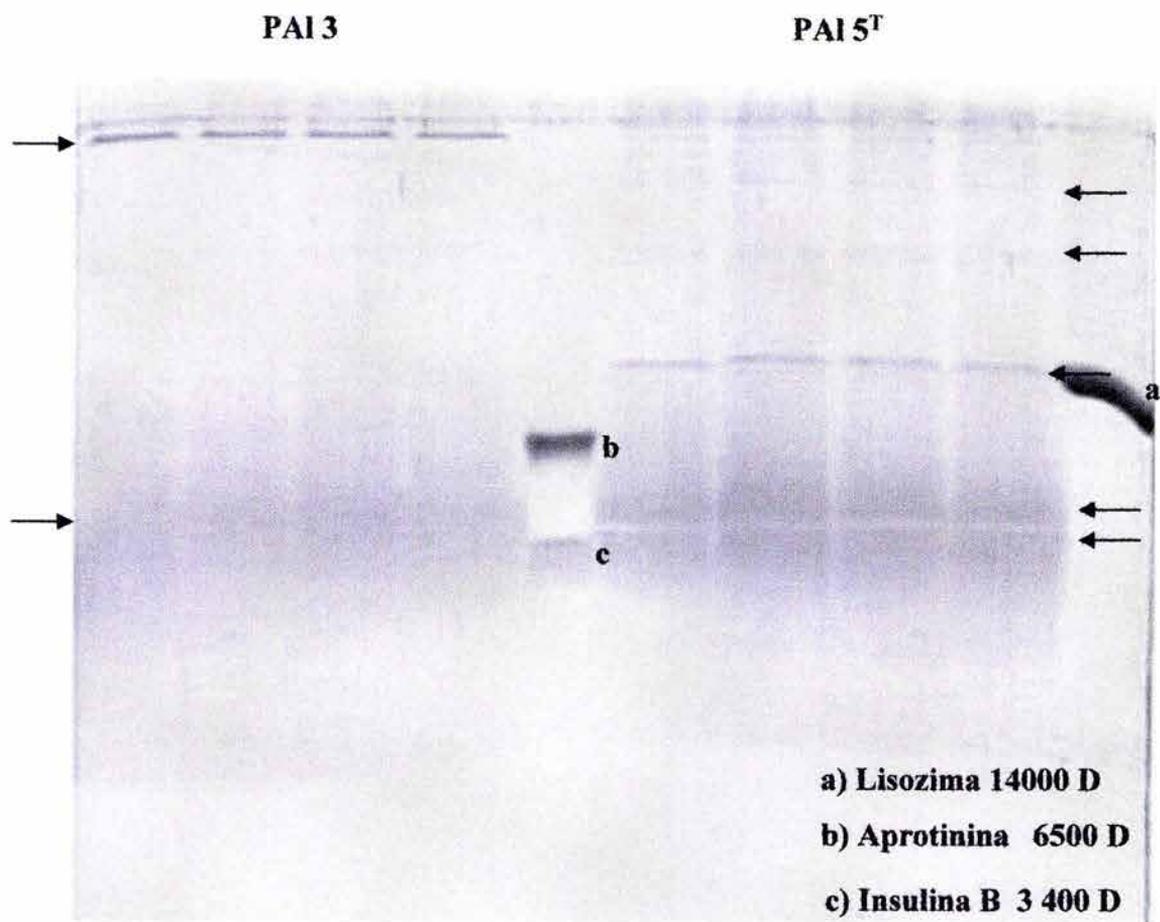
Los datos representan la media (Log No. UFC/g de planta) de 5 plantas seguidos por la desviación estandar (). Los valores con la misma letra dentro de cada columna no difieren por la prueba de *t*-student a P<0.05. *Plantas donde *G. diazotrophicus* no fue detectado fueron incluidas. Testigo 1 y 2 corresponden a plantas que fueron inoculadas con una sola cepa. M corresponde a plantas que fueron coinoculadas con las cepas PAI 5^T y UAP 5541 Sm^r.

Tabla 5. Estabilidad de la sustancia inhibitoria

Muestra	Condiciones de tratamiento		Acividad inhibitoria UA
	Temperatura °C	Tiempo (hr)	
E	---	--	32
E	30-55	2	32
E	70	2	16
E	80	2	4
E	95	2	0
E + Pronasa	37	2	8
E + Proteinasa K	37	2	8
E + Lipasa	37	2	32
E + Lipasa=(L)	37	1	32
(L) + Proteinasa	37	1	8
pH de 3 to 8.5	37	2	32

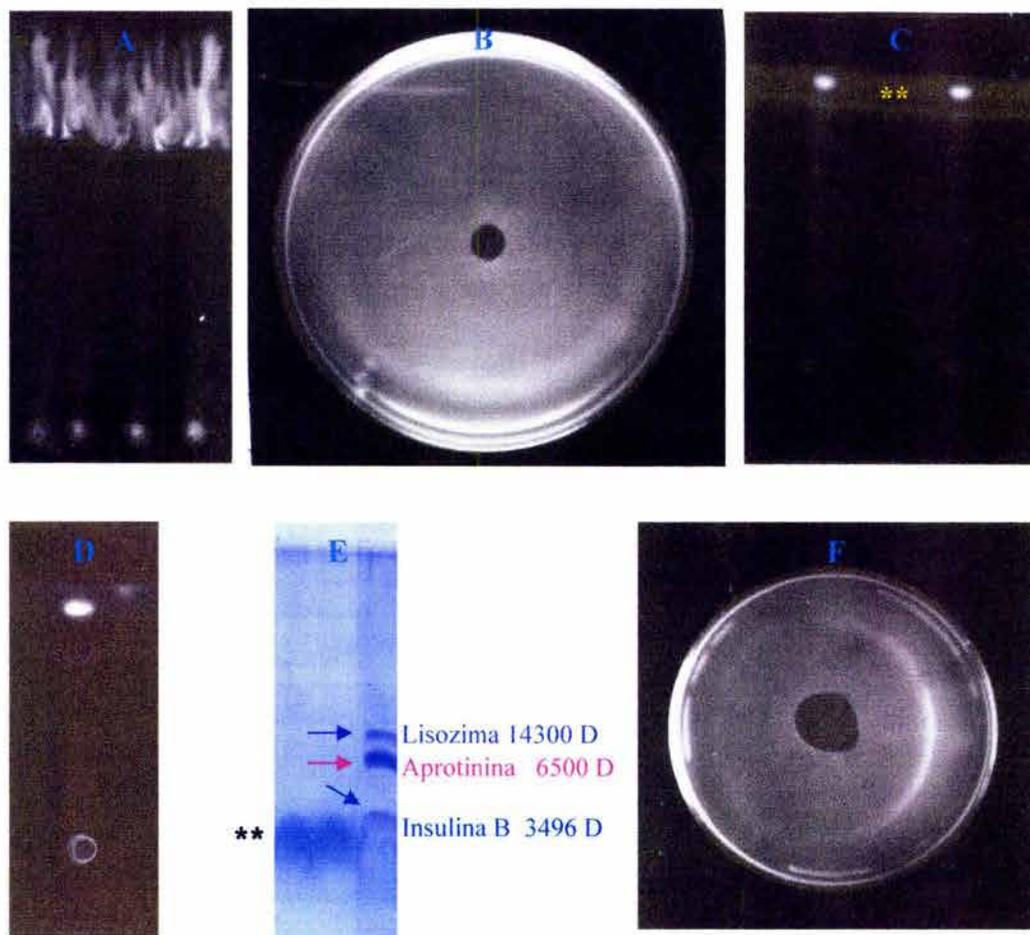
E = Extracto crudo o concentrado de sustancia antagonica parcialmente purificado.

Fig. 5. Comparación del perfil de proteínas de los concentrados de una cepa no productora de sustancia inhibitoria (PAI 3) con el de una cepa productora PAI 5^T.



Las flechas indican las bandas más sobresalientes de los perfiles de proteínas tanto de la cepa PAI 3 como de la PAI 5^T

Fig. 6. Purificación de la sustancia antagonista producida por *G. diazotrophicus*.



A) Cromatografía en capa fina (silica 70) del concentrado que contienen la sustancia antagonista usando etanol al 25% como fase móvil. La banda inferior del cromatograma A fue eluida con etanol al 75%. El solvente de la muestra eluida fue evaporado (centrifugación al vacío) y su actividad antagonista fue corroborada (B) por el método de agar en doble capa colocando 10 μ l de muestra. La muestra fue nuevamente sometida a una cromatografía en silica 70 pero ahora usando etanol al 75% como fase móvil (H). La banda visible con UV fue cortada y eluida. El solvente del nuevo eluido se evaporó y el concentrado resultante se sometió a una nueva cromatografía (etanol 75%) (D) y electroforesis (E), donde se observó una banda única, finalmente la actividad antagonista de la sustancia aislada fue corroborada (F).

DISCUSION

Distintas son las estrategias bacterianas para competir en su ambiente, siendo una de éstas la producción de sustancias antagónicas como las bacteriocinas (Riley and Wertz, 2002; Tagg et al., 1976). Cuando una bacteria produce este tipo de sustancias podría tener ventajas competitivas sobre miembros sensibles de su misma especie (Smith and Dworkin, 1994). En el presente trabajo se observó que algunas cepas de *G. diazotrophicus* agrupadas en el ET 3 fueron capaces de antagonizar a la gran mayoría de las cepas de otros genotipos de su misma especie. Se ha descrito que las cepas del genotipo ET 3 son predominantes entre las cepas de *G. diazotrophicus* aisladas de caña de azúcar cultivada en Brasil (Caballero-Mellado, et al., 1995), lo cual sugiere que esa predominancia no sólo es influenciada por la buena capacidad colonizadora de este genotipo (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003) sino también por su capacidad de antagonizar a otras cepas de la misma especie. Las dos cepas del ET 1 de *G. diazotrophicus* que inhibieron el crecimiento de otras cepas de la misma especie fueron aisladas de plantas de camote, por lo que en ese ambiente pudieran tener ventajas competitivas. Sin embargo, las cepas de *G. diazotrophicus* aisladas de este hospedero no son suficientes para probar esta hipótesis.

A pesar de las diferencias observadas en el rango de acción y el diámetro de halos producidos entre los 2 tipos cepas productoras (ET 1 y ET 3), las cepas del ET 1 fueron resistentes al antagonismo de las cepas productoras del ET 3 y viceversa, por lo que es probable que la sustancia responsable de la actividad antagónica producida por cepas del ET 1 y ET 3 son del mismo tipo o muy similares. Las diferencias observadas podrían atribuirse a que las cepas del ET 3 producen una mayor cantidad de sustancia inhibitoria comparado con las cepas del ET 1. Sin embargo, las evidencias con las que se cuentan no son suficientes para definir esta situación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la molécula responsable de la actividad antagónica producida por cepas del ET-3 de *G. diazotrophicus* es una bacteriocina. Por definición, una bacteriocina es una proteína producida por bacterias que inhiben el crecimiento de miembros de su misma especie o especies muy relacionadas (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1988). Se piensa que casi todas las especies bacterianas son capaces de producir bacteriocinas y que si éstas se conocen muy poco es porque no se han explorado lo

suficiente (Carolissen-Mackay et al., 1997; Klaenhammer, 1988). Sobre el tema de bacteriocinas se incluye una revisión (Muñoz-Rojas, 2003) en el anexo 2.

Por lo general las bacterias productoras de bacteriocinas requieren medios ricos o suplementados con nutrientes especiales para producirlas (De Vuyst, 1995; Tagg et al., 1976). Sin embargo, la producción de bacteriocinas por *G. diazotrophicus* aparentemente no requiere de medios de cultivo especiales y su producción se lleva a cabo tanto en condiciones microaerofílicas de fijación de nitrógeno como en condiciones aeróbicas. Estas moléculas fueron producidas por *G. diazotrophicus* aún en medios de cultivo a base de sales minerales y una fuente de carbono (sacarosa) pero sin nitrógeno combinado como en el caso del LGIP semigelificado, o adicionado con extracto de levadura (50 mg/litro) en el caso de LGI en placa. Estos resultados sugieren que la producción de bacteriocinas es constitutiva en las cepas del genotipo ET-3 de *G. diazotrophicus*.

Se han descrito diferentes metodologías para purificar a las bacteriocinas (Carolissen-Mackay et al., 1997) y no existe una estrategia general para purificarlas debido a la gran diversidad estructural que presentan (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1988). En este trabajo describimos una metodología basada en una extracción simple con cloroformo, quedando la sustancia antagónica en la interfase. Este hecho sugiere que la sustancia antagónica es de naturaleza anfipática. La mezcla etanol-agua en distintas proporciones y en consecuencia con distinta fuerza polar, fue adecuada para separar la molécula por cromatografía de afinidad.

La bacteriocina producida por *G. diazotrophicus* tiene un tamaño cercano a 3400 Da y aparentemente de naturaleza protéica debido a que las proteasas utilizadas no anularon completamente su actividad antagonista. Sobre esta base, consideramos que la bacteriocina en estudio podría corresponder a un péptido unido a otro tipo de molécula, por ejemplo polisacáridos. Bacteriocinas con estas características han sido reportadas previamente (Bruno and Montville, 1993). Se sugiere que la molécula purificada en este trabajo no está conformada por un lípido ya que su actividad antagonista no es inhibida por la actividad de una lipasa.

Con frecuencia se reporta que los genes responsables de la síntesis de bacteriocinas son codificadas en plásmidos (Gonzalez-Pastor et al., 1995; Hirsch, 1979; Smajs et al., 1997; Solbiati et al., 1996). Sin embargo, la bacteriocina producida por las cepas del genotipo ET 3 de *G. diazotrophicus* debe ser codificada en el cromosoma ya que estas cepas se caracterizan

por no albergar plásmidos (Caballero-Mellado et al., 1994; resultados no publicados). Trabajo posterior será necesario para identificar el gen o los genes de *G. diazotrophicus* involucrados en la síntesis de esta bacteriocina.

El tipo de bacteriocina producida por las cepas del ET 3 de *G. diazotrophicus* presenta características particulares que la diferencian de las bacteriocinas de otras especies: es de tamaño muy pequeño, estable en un rango amplio de pH, es inactivada parcialmente por proteasas y es relativamente termoestable por períodos prolongados. Conocer la estructura de esta bacteriocina contribuirá seguramente con el conocimiento de una forma química novedosa con un mecanismo de acción *sui generis*. Considerando que la bacteriocina producida por algunas cepas de *G. diazotrophicus* actúa sólo contra miembros de la misma especie o especies filogenéticamente muy relacionadas del género *Gluconacetobacter*, para esta sustancia proponemos el nombre de Gluconacetocina.

En la literatura se encuentran descritas diferentes tipos de bacteriocinas producidas tanto por bacterias Gram-positivas como por Gram-negativas (Muñoz-Rojas, 2003). Se han reportado bacteriocinas producidas por bacterias asociadas a plantas, entre las cuales podemos citar aquellas producidas por especies de *Corynebacterium* (Gross and Vidaver, 1979), por *Enterococci* (Ott et al., 2001), por *Pseudomonas* sp. (Parret et al., 2003) y por *Pseudomonas syringae* (Lavermicocca et al., 1999), así como por *Streptomyces ipomoeae* (Zhang et al., 2003). Incluso recientemente se reportó una bacteriocina producida por una cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pinon et al., 2002) con características diferentes a la reportada en este estudio. Por ejemplo esta bacteriocina tiene un tamaño de 12,500 D y es inactivada completamente después de una hora de tratamiento a 60°C o bien con el tratamiento de proteasas a 37°C. En la mayoría de éstos y otros trabajos sólo describen la identificación del antagonismo y una purificación parcial de las sustancias responsables pero no es elucidada la función ecológica de la bacteriocina o si la actividad antagonista se manifiesta en el hábitat de las cepas que tienen la capacidad de producirlas. En general, son tan pocos los ejemplos (Hodgson et al., 1985; Goel et al., 2001; Smidt and Vidaver, 1982; Van Zyl et al., 1986) donde una cepa bacteriocinogénica inhibe a una cepa sensible en un ambiente natural o en asociación con un hospedero, que en la revisión reciente hecha por Riley y Wertz (2002) se argumenta que no es claro el papel ecológico de las bacteriocinas.

En el presente trabajo se demostró que una cepa bacteriocinogénica de *G. diazotrophicus* fue capaz de inhibir a una cepa de la misma especie aún en asociación con la planta hospedera (caña de azúcar), tanto en el ambiente endófito como en el rizosférico. Esto implica que cepas bacteriocinogénicas pueden tener ventajas competitivas sobre cepas sensibles en asociación con la planta hospedera y pone de manifiesto la importancia de las bacteriocinas en la dinámica poblacional de una especie bacteriana. Sin embargo, esas ventajas competitivas podrían ser sólo temporales en el medio ambiente natural (Czárán et al., 2002; Lenski and Riley, 2002; Kerr et al., 2002). De acuerdo con el modelo de Czárán et al., (2002), tres tipos de cepas pueden intervenir en la dinámica de una población bacteriana: las cepas productoras de bacteriocinas, cepas resistentes no productoras y cepas sensibles. En este modelo se asume que las cepas productoras de bacteriocinas gastan mucho más energía que las cepas resistentes-no productoras para vivir en un ambiente determinado por lo que las últimas predominan en ese ambiente. A su vez las cepas resistentes-no productoras requieren más energía que las cepas sensibles para vivir en ese ambiente, así las cepas sensibles son más competitivas que las cepas resistentes no productoras en dicho ambiente. Finalmente las cepas sensibles pueden ser vencidas por las cepas productoras de bacteriocinas dentro de un ambiente (para profundizar ver revisión Muñoz-Rojas, 2003). En este modelo se proponen fluctuaciones de las poblaciones de los tres tipos de cepas asemejando al juego de piedra papel o tijeras. De acuerdo con nuestro análisis, la población de *G. diazotrophicus* está compuesta por los tres tipos de cepas mencionadas, por lo que el modelo planteado podría aplicarse para describir la dinámica de población de esta especie. No obstante, en la interacción entre cepas de *G. diazotrophicus* en asociación con la caña de azúcar la situación podría ser diferente a la planteada en el modelo de piedra papel o tijeras. En ésta interacción la cepa productora no posee plásmidos y la sustancia antagonica se produce aún cuando las condiciones de nutrientes son escasas, esto sugiere que el costo energético para producir la sustancia inhibitoria es muy bajo, por lo que la cepa antagonista podría tener ventajas competitivas sobre las cepa sensibles y sobre las cepas resistentes todo el tiempo aún cuando las condiciones del medio ambiente sean variable.

Un manuscrito con los resultados descritos sobre la producción de bacteriocinas por *G. diazotrophicus* se encuentra en preparación.

MATERIAL Y METODOS. Antagonismo entre cepas de *G. diazotrophicus*.

Cepas bacterianas. El origen de cada una de las 55 cepas de *G. diazotrophicus* analizadas se lista en la Tabla 6.

Capacidad antagónica y medios de cultivo. Las 55 cepas de *G. diazotrophicus* fueron examinadas en su capacidad para producir sustancias antagónicas y las mismas 55 fueron ensayadas como cepas indicadoras de susceptibilidad, usando el método de doble capa de agar en placa (Muñoz-Rojas, 2003 (Fig. 2); Tapia-Hernández et al., 1990) con los medios de cultivo LGI-P (Reis et al., 1994), SYP (Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994) y MESMA (Fuentes-Ramírez et al., 1999). Algunas cepas de otras especies también se usaron para ensayos de susceptibilidad a las cepas antagonistas (Tabla 3). La capacidad de producir sustancias antagónicas también fue evaluada usando medios que contienen 20 ppm de FeCl₃. La capacidad antagonista de una cepa (PRX 6) sobre otra sensible (PAI 3) se evaluó en los medios líquidos MESMA y SYP. La cepa PRX 6 tiene una resistencia natural a gentamicina (40 µg/ml) y es sensible a ácido nalidíxico. La cepa PAI 3 es resistente al ácido nalidíxico (25 µg/ml) y sensible a gentamicina. Las cepas fueron coinoculadas en medios líquidos (1 ml de suspensión bacteriana conteniendo 10⁸ UFC/ml de cada cepa) e incubadas a 29°C en agitación. El número de bacterias de cada cepa se determinó cada 10 horas. Se incluyeron medios de cultivo inoculados con una sola cepa como controles.

Purificación. El tamaño de la sustancia antagónica fue delimitado mediante el uso de membranas de diálisis que permiten el paso de moléculas de distintos tamaños (12 000, 6000, 3500 y 3000 Da). Las cepas productoras se crecieron sobre las membranas de diálisis estériles en placas de medio MESMA durante 3 días a 29°C. Las membranas de diálisis conteniendo a las cepas productoras crecidas fueron retiradas de las placas de medio y se colocó una segunda capa con bacterias sensibles (cepa PAI 3). Después del tiempo de incubación se determinó la existencia de halos de inhibición.

La sustancia antagónica se concentró realizando una extracción en cloroformo a partir de sobrenadantes de una cepa productora de bacteriocinas con 48 horas de crecimiento. Con esta técnica de extracción se obtuvieron tres fases (acuosa, interfase y cloroformo) de las cuales sólo la interfase contiene a la sustancia antagonista. Se ensayó la actividad antagónica del concentrado parcialmente purificado y la actividad se definió en unidades arbitrarias/ml. Una unidad arbitraria es el recíproco de la dilución más alta que causa una zona de inhibición visible sobre la capa de la bacteria indicadora. Con esta metodología se obtuvieron alrededor de 100 ml de extracto crudo con una actividad de 6400 UA/ml a partir de 1 L de cultivo (Fig.

7). Para visualizar diferencias entre extractos de una cepa antagónica y una cepa susceptible se utilizó la electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) para moléculas pequeñas (**Schägger and von Jagow, 1987**).

La afinidad de la sustancia antagónica a distintos solventes se determinó mediante cromatografía en papel (Whatman 1) usando varias mezclas de solventes en distintas proporciones como fase móvil (Ej. etanol-agua, agua-acetonitrilo, cloroformo-agua-etanol, etanol-cloroformo, metanol-cloroformo). Los cromatogramas generados fueron esterilizados sumergiéndolos en cloroformo durante 30 minutos, el cloroformo en exceso fue evaporado y el cromatograma se colocó en cajas Petri conteniendo medio MESMA. Posteriormente se adicionó una segunda capa de agar MESMA antes de gelificar conteniendo 100 µl de una suspensión con 10^8 UFC/ml de una cepa sensible a la actividad antagonista (PAI 3). Las placas se colocaron a 30°C durante 36 horas, tiempo incubación suficiente para observar la actividad antagónica y localizar la banda responsable dentro del cromatograma. El mejor sistema de solventes para separar a esta sustancia fue la mezcla etanol-agua. La sustancia antagónica presentó una buena afinidad por etanol al 75% (**Fig. 6**) y no presenta afinidad a una solución de etanol al 25 %, sin embargo, esta última solución es capaz de arrastrar a los demás componentes del extracto crudo (**Fig. 6**).

La sustancia antagónica se purificó a partir del extracto concentrado usando una serie de cromatografías por afinidad de solvente (en silica gel 70), usando primero una solución de etanol 25% y después otra al 75% como fase móvil. La banda purificada fue eluida con etanol al 75% y su actividad antagónica fue confirmada en medios de cultivo (**Fig. 6**). La electroforesis SDS-PAGE fue también usada para la estimación del peso molecular de la sustancia.

Efecto de enzimas. Las enzimas usadas en este estudio fueron proteinasa k, pronasa, lisozima y lipasa. La sustancia antagónica purificada fue tratada con estas enzimas a una concentración final de 2 mg/ml e incubadas a 37°C por 2 h. La actividad residual de la sustancia antimicrobiana fue ensayada como se describió antes. Se utilizaron controles apropiados, incluyendo la sustancia antagónica en solución amortiguadora sin enzimas, las enzimas solas y las soluciones amortiguadoras.

Estabilidad de la sustancia. Muestras de la sustancia antagónica fueron sometidas a diferentes valores de pH, en el rango de 3 a 8.5. Las muestras se mantuvieron a 37°C durante 2 h y se evaluó su actividad antagónica. La termoestabilidad de las muestras parcialmente purificadas se determinó por calentamiento de 1 ml de suspensión a 30, 37, 45, 55, 60, 75, 80, y 95°C

durante 2 h. Las muestras se enfriaron en baño de hielo y se examinó su actividad antagónica. La sustancia parcialmente purificada se guardó a 4°C y su actividad se evaluó periódicamente durante 10 meses.

Coinoculación en plantas y condiciones de crecimiento. Plántulas de caña de azúcar estériles de la var. MEX 57-473 obtenidas por micropropagación fueron inoculadas con *G. diazotrophicus* como se describió previamente (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003). En el experimento se incluyeron plantas inoculadas con una sola bacteria así como plantas coinoculadas con una cepa productora (PAI 5^T) y con una cepa no productora (UAP 5541 Sm') (Fuentes-Ramírez et al., 1999); la cepa productora es sensible a estreptomycin. Cada plántula inoculada fue trasplantada a una maceta de 1 L de capacidad conteniendo vermiculita estéril. Las plántulas fueron regadas con 200 ml de solución MES que solo contiene sales minerales y una dosis basal de nitrógeno (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003). Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero durante el periodo de marzo a mayo del 2001. La población de las cepas inoculadas fue determinada 25 y 65 dpi.

Recuperación de bacterias de plantas inoculadas. La presencia de las cepas de *G. diazotrophicus* se determinó tanto de la "rizósfera" como de los tejidos de raíces de las plantas de caña de azúcar como se describió en Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003. A diferencia de esos experimentos, aquí se incluyeron medios LGI-P semigelificados con y sin 45 µg/ml de estreptomycin, para el aislamiento y enumeración de las bacterias recuperadas. La cepa productora sólo crece en medios sin estreptomycin, la cepa sensible crece en medios con y sin estreptomycin. En plantas coinoculadas, el número de bacterias productoras fue determinado por la diferencia del número de bacterias recuperadas en LGI-P sin estreptomycin y el número de bacterias recobradas en medios con estreptomycin. Los aislados de diluciones más elevadas se crecieron en placas de LGI-P con y sin 45 µg/ml de estreptomycin para corroborar el crecimiento característico de *G. diazotrophicus* y la identidad de la cepa inoculada. La capacidad de los aislados para inhibir a una cepa indicadora (PAI 3) fue ensayada, solo la cepa PAI 5^T inhibe el crecimiento de la cepa indicadora.

Análisis de datos. Todos los datos se analizaron estadísticamente usando la prueba *t*-student.

Tabla 6. Cepas de *G. diazotrophicus* analizadas.

CEPA	ET	Especie hoppedera	Fuente
1.- UAP 5560*	1	Caña de azúcar Z MEX 55 32	Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994
2.- CFNE 501	1	Caña de azúcar Z MEX 5532	Caballero-Mellado et al., 1995
3.- CFNE 502	1	Caña de azúcar MEX 69 290	Caballero-Mellado et al., 1995
4.- CFNE 506	1	Caña de azúcar RD 75 11	Caballero-Mellado et al., 1995
5.- CFNE 510	1	Caña de azúcar RB 72 1012	Caballero-Mellado et al., 1995
6.- CFNE 513	1	Caña de azúcar MY 55 14	Caballero-Mellado et al., 1995
7.- CFNE 515	1	Caña de azúcar SP 70 1248	Caballero-Mellado et al., 1995
8.- CFNE 521	1	Caña de azúcar CP 72 2086	Caballero-Mellado et al., 1995
9.- PRJ 6	1	Caña de azúcar CB 47 89	Colección CNPAB
10.- PRJ 17	1	Caña de azúcar IAC 52 150	Colección CNPAB
11.- PRJ 24	1	Caña de azúcar RB 73 9735	Colección CNPAB
12.- PRJ 54	1	Caña de azúcar Krakatau	Colección CNPAB
13.- PRJ 56	1	Caña de azúcar SP 70 1143	Colección CNPAB
14.- URU	1	Caña de azúcar	Colección CNPAB
15.- CFNE 533	1	Chinche harinosa-L 78 56	Caballero-Mellado et al., 1995
16.- CFNE 534	1	Chinche harinosa-MEX 68 P23	Caballero-Mellado et al., 1995
17.- CFNE 535	1	Chinche harinosa-RD 75-11	Caballero-Mellado et al., 1995
18.- CFNE 544	1	Chinche harinosa-RB 73-9953	Caballero-Mellado et al., 1995
19.- PBD 4	1	Tuberculo de camote	Colección CNPAB
20.- PBD 13	1	Corteza de camote	Colección CNPAB
21.- PBD 17	1	Tuberculo de camote	Colección CNPAB
22.- UAP 5541	1	Caña de azúcar MY 55 14	Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994
23.- UAP 5665	1	Caña de azúcar MEX 56 476	Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994
24.- CFN Cf 13	1	Cafeto-Cutai	Jiménez-Salgado et al., 1997
25.- UAP 5701	1	Caña de azúcar MEX 57 473	Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994
26.- UAP 7210	1	Caña de azúcar CP 72 2086	Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994
27.- UAP 6926	1	Caña de azúcar MEX 69-290	Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994
28.- UAP 0030	1	Caña de azúcar-Cristal	Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994
29.- UAP 7308	1	Caña de azúcar MEX 73 523	Caballero-Mellado and Martínez-Romero, 1994
30.- CFNE 554	2	Chinche harinosa-CB 45 3	Caballero-Mellado et al., 1995
31.- 550*	2	Chinche harinosa-CB 45 3	Caballero-Mellado et al., 1995
32.- PRJ 20	3	Caña de azúcar Na 56 79	Colección CNPAB
33.- PRX 3	3	Caña de azúcar CB 45 3	Colección CNPAB
34.- PRX 6	3	Caña de azúcar Na 56 79	Colección CNPAB
35.- PSP 15	3	Caña de azúcar Na 56 79	Colección CNPAB
36.- PSP 32	3	Caña de azúcar Na 56 79	Colección CNPAB
37.- PSP 19	3	Caña de azúcar Na 56 79	Colección CNPAB
38.- PAI 5 ^{T*}	3	Caña de azúcar	Gillis et al., 1989. ATCC 49037 ^T
39.- PSP 22*	4	Caña de azúcar Na 56 79	Colección CNPAB
40.- PPe 4	4	Caña de azúcar	Gillis et al., 1989
41.- PAI 3*	5	Caña de azúcar	Colección CNPAB
42.- 1772*	6	Chinche arinosa	M. W. Dawson
43.- PSP 17	6	Caña de azúcar Na 56 79	Colección CNPAB
44.- PRC 1*	7	Camote	Colección CNPAB
45.- PRJ 14	7	Caña de azúcar SP 70 1143	Colección CNPAB
46.- PRC 4	7	Camote	Colección CNPAB
47.- PRJ 40	7	Caña de azúcar CB 36 14	Colección CNPAB
48.- PRJ 36	7	Caña de azúcar SP 70 1143	Colección CNPAB
49.- UAP Cf01	8	Cafeto	Jiménez-Salgado et al., 1997
50.- UAP Cf05	8	Cafeto	Jiménez-Salgado et al., 1997
51.-CFN Cf52	9	Cafeto	Jiménez-Salgado et al., 1997
52.- UAP Cf58	10	Cafeto	Jiménez-Salgado et al., 1997
53.- CFN Cf50	11	Cafeto	Jiménez-Salgado et al., 1997
54.- UAP Cf51	12	Cafeto	Jiménez-Salgado et al., 1997
55.- UAP Cf53	14	Cafeto	Jiménez-Salgado et al., 1997

* Cepas usadas en los experimentos 1, 2 y 3 (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003)

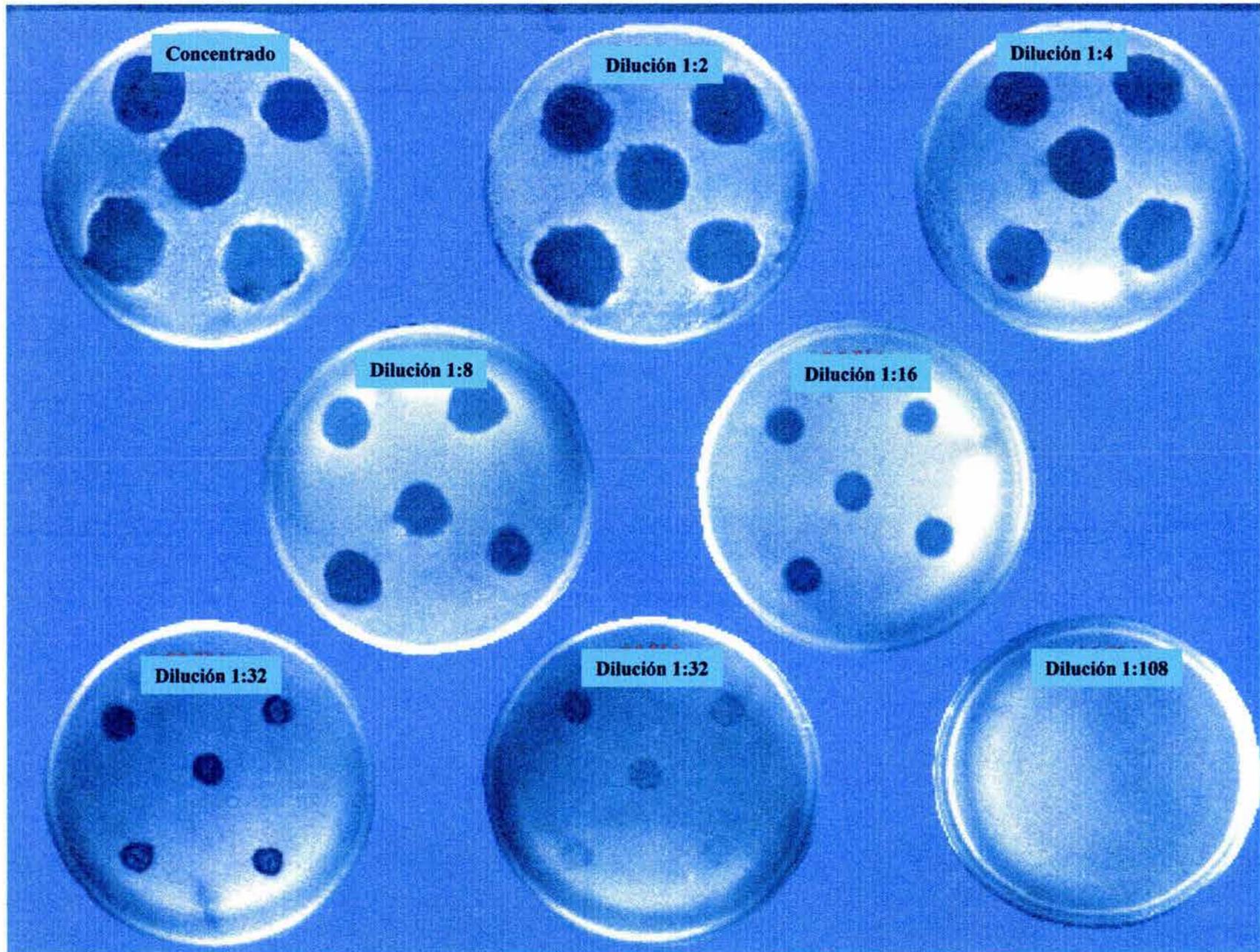


Fig. 7. Actividad del extracto concentrado por extracción en cloroformo. En cada placa se colocaron 10 μ l de muestra de cada dilución del concentrado, por quintuplicado. Por esta razón el recíproco de la dilución más alta que provoca inhibición de la cepa sensible (PAI 3) fue multiplicado por 100 para obtener la actividad antagonista en UA/ml.

Discusión general y perspectivas.

La evaluación en las últimas décadas del uso de inoculantes ha mostrado resultados variables en su éxito en la práctica común agrícola. Esta inconsistencia ha sido atribuida a diferentes factores incluyendo la pobre colonización de la planta hospedera por la bacteria inoculada. Por tal motivo la investigación tiene que enfocarse sobre las características involucradas en la competencia ecológica de las cepas introducidas y los factores que afectan en una interacción bacteria-planta.

En el presente trabajo se evaluaron algunos factores involucrados en la interacción *G. diazotrophicus*-caña de azúcar. Se evaluó la capacidad de algunos genotipos de *G. diazotrophicus* para colonizar a la caña de azúcar, se determinó la importancia de la variedad de planta para realizar la interacción con *G. diazotrophicus* y se analizó el efecto negativo de la fertilización nitrogenada sobre la colonización de diferentes cepas de *G. diazotrophicus* en diferentes fases de desarrollo de la caña de azúcar. Los resultados obtenidos permitieron elegir al genotipo de *G. diazotrophicus* que mejor coloniza a las diferentes variedades de caña de azúcar y también a la variedad de planta que mejor interacciona con la bacteria. Con el mejor par genotipo *G. diazotrophicus*-variedad caña de azúcar fue posible obtener buenos resultados de estimulación de crecimiento en la caña de azúcar, no obstante, este crecimiento fue independiente a la FBN y probablemente debido a un efecto hormonal.

Es de importancia destacar que la edad de la caña de azúcar influyó en el establecimiento de *G. diazotrophicus*, a medida que aumentó la edad de la planta los números de bacteria aislados fueron menores en dependencia del genotipo de *G. diazotrophicus*. Sería importante explorar cuáles son las causas de esta disminución de la población bacteriana, posiblemente son los cambios fisiológicos de la planta los que determinan el establecimiento de una bacteria endófito. Además será interesante conocer si la disminución de la población de *G. diazotrophicus* bajo condiciones de elevada fertilización nitrogenada y con relación a la edad de la planta son eventos independiente o es la misma serie de cambios fisiológicos que la planta sufre en sus diferentes fases de desarrollo y se intensifican cuando esta es fertilizada. Conocer la estabilidad de otras bacterias en asociación con la caña de azúcar será de gran relevancia para pensar en una aplicación agronómica exitosa. Es posible que dependiendo de la especie de bacteria existirá una dinámica de población característica. McInroy and Kloepper (1995) observaron fluctuaciones en las poblaciones de bacterias en el ambiente rizosférico del

algodón, a pesar de que estos autores no determinaron el tipo de bacterias presentes en dichas fluctuaciones, es atractivo pensar que las poblaciones de las distintas especies bacterianas se adaptan mejor en algunas fases de desarrollo de la planta que en otras. Será muy interesante explorar estas hipótesis, ya que de ser correctas los inóculos bacterianos deberán de contener bacterias de diferentes especies que aporten un bien a la planta hospedera en las diferentes fases de su desarrollo.

En el presente trabajo también se investigó la relación que hay entre la colonización de los diferentes genotipos de *G. diazotrophicus* con la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano. Se demostró que algunas cepas de *G. diazotrophicus* tienen la característica de producir bacteriocinas e inhibir a otras cepas de la misma especie o especies muy relacionadas. Se corroboró que una cepa que produce bacteriocina inhibe a una cepa sensible en asociación con la caña de azúcar, tanto en el ambiente endófito como en el rizosférico, lo cual pone de manifiesto la ventaja competitiva que tiene una cepa productora de bacteriocinas en su medio ambiente. Será interesante conocer cual es el gen o genes que codifican para la síntesis la bacteriocina pequeña producida por *G. diazotrophicus*, además de conocer su estructura química. Los datos que se obtengan seguramente serán novedosos dadas las características poco comunes del comportamiento de esta sustancia inhibitoria.

Aún quedan por resolver muchas preguntas de interés que han surgido durante el desarrollo de este proyecto de investigación, preguntas cuyas respuestas seguramente contribuirán al entendimiento de cómo funcionan las interacciones endófito-planta y endófito-endófito, y que tendrán como repercusión final contar con una mejor batería de herramientas científicas para poder obtener una agricultura sostenible más eficiente.

REFERENCIAS

- 1) **Asis Jr., C. A., M. Kubota, V. K. Chebotar, H. Ohta, Y. Arima, K. Nishiyama, K.-I. Tsuchiya, and S. Akao.** 2000. Endophytic bacterial population in Philippine sugarcane cultivars and isolation of nitrogen-fixing strains. *Microbes Environ.* **15**:209-216.
- 2) **Baldani, J. I., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goi, and J. Döbereiner.** 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* **29**:911-922.
- 3) **Baldani, J. I., V. M. Reis, V. L. D. Baldani, and J. Döbereiner.** 2002. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. *Funct. Plant Biol.* **29**:417-423.
- 4) **Bastian, F., A. Cohen, P. Piccoli, V. Luna, R. Baraldi, and R. Bottini.** 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg.* **24**:7-11.
- 5) **Boddey, R.** 1993. Green energy from sugar cane. *Chemistry and Industry.*
- 6) **Boddey R. M., L. G. da Silva, V. Reis, B. J. R. Alves, and S. Urquiaga.** 2000. Assesment of bacterial nitrogen fixation in grass species, p. 705-726. *In* Triplett, E.W. (ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation. A model system for the analysis of a biological process.* Horizon Scientific Press. Wymondham, U.K.
- 7) **Boddey, R. M., O. C. de Oliveira, S. Urquiaga, V. M. Reis, F. L. de Olivares, V. L. D. Baldani, and J. Döbereiner.** 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* **174**:195-209.
- 8) **Boddey, R. M., S. Urquiaga, V. Reis, and J. Döbereiner.** 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant soil* **137**:111-117.
- 9) **Bruno, M. E. C., and T. J. Montville.** 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic-acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3003-3010.
- 10) **Caballero-Mellado, J., M. G. Carcaño-Montiel, and M. A. Mascarúa-Esparza.** 1992. Field inoculation of whet (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* **13**:243-253.

- 11) **Caballero-Mellado, J., L. E. Fuentes-Ramírez, V. M. Reis, and E. Martínez-Romero.** 1995. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3008-3013.
- 12) **Caballero-Mellado, J., and E. Martínez-Romero.** 1994. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1532-1537.
- 13) **Carolissen-Mackay, V., G. Arendse, and J. W. Hastings.** 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* **34**:1-16.
- 14) **Cavalcante, V. A., and J. Döbereiner.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**:23-31.
- 15) **Czárán, T. L., R. F. Hoekstra, and L. Pagie.** 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:786-790.
- 16) **De Vuyst, L.** 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:28-33.
- 17) **De Weert, S., H. Vermeiren, I. H. Mulders, I. Kuiper, N. Hendrickx, G. V. Bloemberg, J. Vanderleyden, R. De Mot, and B. J. Lugtenberg.** 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**:1173-1180.
- 18) **Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Labandera-Gonzalez, J. Caballero-Mellado, J. F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig, and Y. Okon.** 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**:871-879.
- 19) **Döbereiner, J.** 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* **13**:1-13.
- 20) **Döbereiner, J., V. M. Reis, M. A. Paula, and F. L. Olivares.** 1993. Endophytes diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.* **17**:671-676.

- 21) **Dong, Z., M. J. Canny, M. E. McCully, M. R. Roboredo, C. F. Cavadilla, E. Ortega, and R. Rodés.** 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiol.* **105**:1139-1147.
- 22) **Dorr, J., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek.** 1998. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.* **30**:7-17
- 23) **Food and Agriculture Organization.** 2002. Disponible en <http://apps.fao.org> (verificado el 11 de febrero del 2003).
- 24) **Freire, J. R.** 1982. Research into the *Rhizobium/leguminosae* symbiosis in Latin America. *Plant Soil* **67**:227-239.
- 25) **Fuentes-Ramírez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Abarca-Ocampo, and J. Caballero-Mellado.** 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, and indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* **154**:145-150.
- 26) **Fuentes-Ramírez, L. E., J. Caballero-Mellado, J. Sepúlveda, and E. Martínez-Romero.** 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**:117-128.
- 27) **Fuentes-Ramírez, L. E., Y. Santoyo-Páez, D. León-Burgoa, A. Tapia-Hernández, T. Jiménez-Salgado, M. A. Mascarua-Esparza, L. R. Caso-Vargas and M. Rosales-Pérez.** 2002. Diversidad de habitat de las acetobacterias fijadoras de nitrógeno, p. 44. In XXI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y VI Congreso Nacional de la Fijación Biológica de Nitrógeno. 21-24 Octubre de 2002. Cocoyoc, Morelos, México.
- 28) **Goel, A. K., S. S. Sindhu, and K. R. Dadarwal.** 2001. Symbiotic effectiveness of bacteriocin producing and non-producing strains of *Rhizobium* in green gram (*Vigna radiata*). *Indian J. Exp. Biol.* **39**:821-823.
- 29) **Gonzalez-Pastor, J. E., J. L. San Millan, M. A. Castilla, and F. Moreno.** 1995. Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *J. Bacteriol.* **177**:7131-7140.
- 30) **Graham, P. H.** 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. *Field crops Res.* **4**:93-112.
- 31) **Gross, D. C., and A. K. Vidaver.** 1979. Bacteriocins of phytopatogenic *Corynebacterium* especies. *Can. J. Microbiol.* **25**:367-374.

- 32) **Hirsch, P. R.** 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. **113**:219-228.
- 33) **Hodgson, A. L. M., W. P. Roberts, and J. S. Waid.** 1985. Regulated nodulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin-producing strains of *Rhizobium trifolii*. Soil Biol. Biochem. **17**:475-478.
- 34) **James, E. K.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res. **65**:197-209.
- 35) **Jiménez-Salgado, T., L. E. Fuentes-Ramírez, A. Tapia-Hernández, M. A. Mascarúa-Esparza, E. Martínez-Romero and J. Caballero-Mellado.** 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3676-3683.
- 36) **Kerr, B., M. A. Riley, M. W. Feldman, and B. J. M. Bohannan.** 2002. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. Nature **418**:171-174.
- 37) **Kirchof, G., V. M. Reis, J. I. Baldani, B. Eckert, J. Döbereiner, and A. Hartmann.** 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. Plant Soil **194**: 45-55.
- 38) **Klaenhammer, T. R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie **70**:337-349.
- 39) **Lavermicocca, P., S. L. Lonigro, A. Evidente, and A. Andolf.** 1999. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* pv. *Ciccaronei* NCPPB255. Isolation and partial characterization of the antimicrobial compound. J. Appl. Microbiol. **86**:257-265.
- 40) **Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, y M. Gobbetti.** 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Appl. Environ. Microbiol. **66**:4084-4090.
- 41) **Lenski, R. R., and M. A. Riley.** 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. Proc. Natl. Acad. USA **99**:556-558.
- 42) **Lima, E., R. M. Boddey, and J. Döbereiner.** 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. Soil Biol. Biochem. **19**:165-170.

- 43) **Loganathan, P., R. Sunlta, A. K. Parlda, and S. Nair.** 1999. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. J. Appl. Microbiol. **87**:167-172.
- 44) **Lugtenberg, B. J. J., T. F. C. Chin-A-Woeng, and G. V. Bloemberg.,** 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. Antonie van Leeuwenhoek **81**:373-383.
- 45) **Lynch, J. M.** 1990. Beneficial interactions between micro-organisms and roots. Biotech. Adv. **8**:335-346.
- 46) **Marscher, P., J. Gerendás, and B. Sattelmacher.**1999. Effect of N concentration and N source on root colonization by *Pseudomonas fluorescens* 2-79RLI. Plant Soil **215**:135-141.
- 47) **McInroy, J. A., and J. W. Kloepper.** 1995. Population dynamics of endophytic bacteria in field grown sweet corn and cotton. Can. J. Microbiol. **41**:895-901.
- 48) **Mirleau, P., S. Delorme, L. Philippot, J-M. Meyer, S. Mazurier, and P. Lemanceau.** 2000. Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. FEMS Microbiol. Ecol. **34**:35-44.
- 49) **Mulder, E. G., T. A. Lie, and A. Houwers.** 1977. In: A treatise on dinitrogen fixation. Section IV. Agronomy and Ecology. Hardy R. W. F. and A. M. Gibson (eds). John Willey. P 221-242.
- 50) **Muñoz-Rojas, J.** 2003. BACTERIOCINAS: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. **En prensa.** In Martínez-Romero, E., and J. Martínez-Romero (eds.), Microbios en línea. Coordinación de la investigación científica, U.N.A.M.
- 51) **Muñoz-Rojas, J., and J. Caballero-Mellado.** 2001. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito, p. 157-176. In Martínez-Romero, E., and J. Martínez-Romero (eds.), Microbios en línea. Coordinación de la investigación científica, U.N.A.M. Disponible en <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>
- 52) **Muñoz-Rojas, J., and J. Caballero-Mellado.** 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugar cane cultivars and its effect on plant growth. Microbial Ecology, **En prensa.**

- 53) **Murashige, T., and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**:473.
- 54) **Muthukumarasamy, R., G. Revathi, and C. Lakshminarasimhan.** 1999. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biol. Fertil. Soils* **29**:157-164.
- 55) **Muthukumarasamy, R., G. Revathi, and P. Loganathan.** 2002. Effect of inorganic N on the population, in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant Soil* **243**:91-102.
- 56) **Mylena, P., K. Pawlowski, and T. Bisseling.** 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell.* **7**:869-885.
- 57) **Newton, W. E.** 1993. Nitrogenases: distribution, composition, structure and function. In R. Palacios et al., (eds.), *New Horizons in Nitrogen Fixation*, 5-18. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- 58) **Olivares, F. L., V. L. D. Baldani, V. M. Reis, J. I. Baldani, and J. Döbereiner.** 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biol. Fertil. Soils* **21**:197-200.
- 59) **Okon, Y., and C. A. Labandera-González.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**:1591-1601.
- 60) **Ott, E. M., T. Muller, M. Muller, C. M. Franz, A. Ulrich, M. Gabel, and W. Seyfarth.** 2001. Population dynamics and antagonistic potential of *Enterococci* colonizing the phyllosphere of grasses. **91**:54-66
- 61) **Paredes-Cardona, E., M. Carcaño-Montiel, M. A. Mascarua-Esparza, and J. Caballero-Mellado.** 1988. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **30**:351-355.
- 62) **Parret, A. H. A., G. Schoofs, P. Proost, and R. De Mot.** 2003. Plant lectin-like bacteriocin from a rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* isolate. *J. Bacteriol.* **185**:897-908.
- 63) **Pinon, D., M. Casas, M. Blanch, B. Fontaniella, Y. Blanco, C. Vicente, M. T. Solas, and M. E. Legaz.** 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane

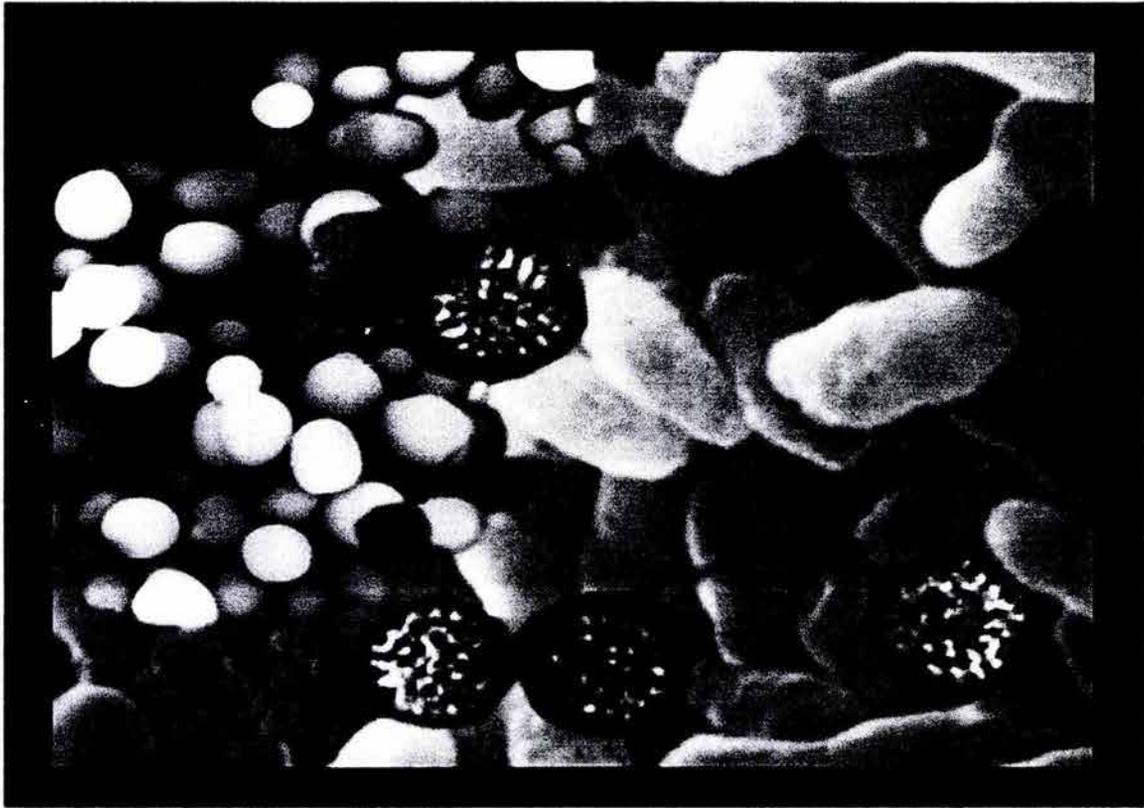
- endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. Res. Microbiol. **153**: 345-351.
- 64) **Raaijmakers, J. M., M. Vlami, and J. T. de Souza.** 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek **81**:537-547.
- 65) **Reis dos Jr., F. B., V. M. Reis, S. Urquiaga, and J. Döbereiner.** 2000. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). Plant Soil **219**:153-159.
- 66) **Reis, V. M., F. L. Olivares, A. L. M. de Oliveira, F. B. dos Reis Jr., J. I. Baldani, and J. Döbereiner.** 1999. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. Plant Soil **206**:205-211.
- 67) **Reis, V. M., F. L. Olivares, and J. Döbereiner.** 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World J. Microbiol. Biotechnol. **10**:401-405.
- 68) **Riley, M. A., and J. E. Wertz.** 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Annu. Rev. Microbiol. **56**:117-137.
- 69) **Ruschel, A. P.** 1981. Associative N₂-fixation by sugarcane, p. 81-90. In P. B. Vose, and A. P. Ruschel (ed.), Associative N₂-Fixation, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 70) **Schägger, H., and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamine gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem. **166**:368-379.
- 71) **Sevilla, M., and C. Kennedy.** 2000. Genetic Analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane, p. 737-760. In Triplett, E. W. (ed.), Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for the analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- 72) **Smajs, D., H. Pils, and V. Braun.** 1997. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. J. Bacteriol. **179**:4919-4928.
- 73) **Smidt, M. L., and A. K. Vidaver.** 1982. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* PsW-1 in plant tissue. Can. J. Microbiol. **28**:600-604.
- 74) **Smith, D. R., and M. Dwrkin.** 1994. Territorial interactions between two *Myxococcus* species. J. Bacteriol. **176**:1201-1205.

- 75) Solbiati, J. O., M. Ciaccio, R. N. Farias, and R. A. Salomón. 1996. Genetic análisis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J. Bacteriol.* **178**:3661-3663.
- 76) Tagg, J. R., A. S. Dajani, L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bact. Rev.* **40**:722-756.
- 77) Tapia-Hernández, A., M. R. Bustillos-Cristales, T. Jiménez-Salgado, J. Caballero-Mellado, L. E. Fuentes-Ramírez. 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb. Ecol.* **39**:49-55.
- 78) Tapia-Hernández, A., M. A. Mascarua-Esparza, and J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* **64**:73-83.
- 79) Tilman, D. 1999. Global enviromental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:5995-6000.
- 80) Tilman, D., and C. Lehman. 2001. Human-caused environmental change: Impacts on plant diversity and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:5433-5440.
- 81) Tilman, D., K. G. Cassman, P. A. Matson, R. Naylor, and S. Polasky. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**:671-677.
- 82) Urquiaga, S., K. H. S. Cruz, and R. M. Boddey. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **56**:105-114.
- 83) Van Zyl, F. G. H., B. W. Strijdom, and J. L. Staphorst. 1986. Susceptibility of *Agrobacterium tumefaciens* strains to two agrocin-producing *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:234-238.
- 84) Wall, L. G. 2000. The Actinorhizal Symbiosis. *Plant Growth Regul.* **19**:167-182.
- 85) Yamada Y., K. Hoshino, and T. Ishikawa. 1997. 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. Biotechnol. Biochem.* **61**:1244-1251.
- 86) Yoneyama, T., T. Muraoka, T. H. Kim, E. V. Dacanay, and Y. Nakanishi. 1997. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant Soil* **189**:239-244.

- 87) **Zhang, X., C. A. Clark, and G. S. Pettis.** 2003. Interstrain inhibition in the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoeae*: Purification and characterization of a highly specific bacteriocin and cloning of its structural gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2201-2208.

ANEXO 1

***Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito**



Microbios en línea

Editado por

Esperanza Martínez Romero y

Julio Martínez Romero

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno

Coordinación de la Investigación Científica

Universidad Nacional Autónoma de México



Todos los derechos reservados.

Esta publicación no puede ser reproducida, ni en todo, ni en parte, ni registrada en o transmitida por, un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por ningún medio, sin el permiso previo por escrito del autor.

Este libro fue desarrollado con el apoyo de la CPD-DGSCA

Prólogo

INDICE

Generalidades

1. Microbiología general.
Esperanza Martínez

2. Microbiología del petróleo y sus derivados.
Brenda Valderrama

γ -Proteobacterias

3. *Pseudomonas aeruginosa.*
Gloria Soberón

4. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública.
Edmundo Calva

5. Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli.*
Valeria Souza, Martha Rocha, Luisa Sander y Luis E. Eguarte

6. Biología de *Azotobacter vinelandii.*
Guadalupe Espín

α - Proteobacterias

7. *Brucella.*
Ahidé López Merino

8. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas.
En Tao Wang, Julio Martínez Romero, Isabel María López Lara

9. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófitas.
Jesús Muñoz-Rojas y Jesús Caballero-Mellado

10. El género *Azospirillum.*
Jesús Caballero

ϵ -Proteobacteria

11. *Helicobacter pylori.*
Ma del Rosario Morales Espinosa, Gonzalo Castillo Rojas, Yolanda López Vidal, Alejandro Cravioto.

Gram-positivas

12. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas.
Mario Soberón y Alejandra Bravo

13. La bacteria filamentosa *Frankia.*
María Valdés, Néstor Octavio Pérez, Luis Vásquez

14. El género *Actinomadura* como una fuente de principios biodinámicos de interés medicinal y agroquímico.
María Teresa Gutiérrez-Lugo y Rachel Mata Essayag.

Eucariontes

15. Trypanosoma cruzi y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana).
Ana María Cevallos, Roberto Hernández

16. Saccharomyces cerevisiae.
Alicia Gonzalez

Virus

17. Los rotavirus.
Susana López y Carlos F. Arias

18. Bacteriófago Lambda.
Luis Kameyama, Norma Oviedo y Gabriel Guarneros

Enfoques globales

19. Escherichia coli en estudios post-genómicos microbianos.
Julio Collado Vides y Gabriel Moreno Hagelsieb

20. Estructura y dinámica de genomas bacterianos.
David Romero

21. El proteoma, una herramienta para el análisis global del estado celular de organismos microbianos.
Sergio Manuel Encarnación Guevara.

Orígenes

22. LCA (último ancestro común).
Antonio Lazcano

Gluconacetobacter diazotrophicus, modelo de bacteria endófito

Jesús Muñoz-Rojas y Jesús Caballero-Mellado

Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal No. 565-A, Cuernavaca Morelos.

Introducción

Los microorganismos endófitos comprenden a los hongos y bacterias que viven sin causar daño en el interior de células o tejidos de plantas superiores durante una parte considerable de su ciclo de vida (72). En general, los microorganismos endófitos pueden localizarse en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular (72, 73).

La asociación de los microorganismos endófitos con su hospedero puede ser mutualista y llegar hasta el umbral de un organismo patógeno en estado de latencia (88). Existen alrededor de 500,000 variedades distintas de plantas superiores, por lo que la diversidad de hongos y bacterias asociadas pueden estimarse en valores superiores, sugiriendo una extensa diversidad de endófitos (88) y la posibilidad de usarlos en agrobiotecnología. Especies de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Erwinia* y *Xanthomonas* han sido aislados frecuentemente de diversas plantas.

La diversidad y número de bacterias rizoféricas es muy grande, lo cual ocasiona que en este ambiente exista una fuerte competencia por los nutrientes y en consecuencia que su disponibilidad sea limitada. Sobre esta base se ha considerado que las bacterias endófitas podrían tener algunas ventajas competitivas sobre las bacterias rizoféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de las plantas y el número de microorganismos endófitos es menor que el de los rizoféricos (45). Por otro lado, las bacterias endófitas se encuentran mejor protegidas que las rizoféricas de las condiciones adversas que se presentan en el medio ambiente (73). Considerando que las bacterias endófitas se ubican en contacto íntimo con las plantas, ellas podrían brindar beneficios más directos a su hospedero en comparación con las bacterias rizoféricas. Por ejemplo, podrían excretar fitohormonas en el interior de las plantas y/o protegerlas contra la acción de los fitopatógenos. Se ha demostrado que algunas fitohormonas, e.g., ácido indol acético, producidas por los microorganismos rizoféricos pueden provocar un aumento de la superficie de la raíz, permitiendo a la planta una mayor absorción de nutrientes (66). La protección podría ser a través de efectos antagónicos, debido a la producción de sustancias que inhiben el crecimiento de los patógenos (64) o bien, por el desencadenamiento de una respuesta de defensa de la planta en contra de patógenos inducida por el endófito, en forma similar a la que se observa con algunas rizobacterias (71). Por otro lado, se ha sugerido que el interior de las plantas es un ambiente propicio para que se lleve a cabo la fijación

biológica de nitrógeno (FBN), ya que este ambiente es bajo en oxígeno y relativamente alto en fuentes de carbono (45, 46, 85), por lo que las bacterias diazóticas endófitas podrían fijar el nitrógeno y liberarlo directamente en el interior de las plantas (25) contribuyendo con una parte de los requerimientos nitrogenados de la planta hospedera (12).

Con excepción de las plantas leguminosas y los árboles actinorrízicos, ninguna otra familia de plantas en asociación con bacterias tiene la capacidad de formar estructuras nodulares donde se lleve a cabo la FBN. No obstante, con el empleo de diversas metodologías, como el balance de nitrógeno, la dilución de N^{15} , y la abundancia natural de N^{15} , se ha demostrado que existen altos índices de FBN en plantas gramíneas de importancia económica entre las que se incluyen algunas variedades de caña de azúcar (11, 13, 56, 96, 99), de arroz (81) y el pasto forrajero Kallar (*Lapochloa fusca*) (60). Estos hallazgos han generado un gran interés en la fijación biológica de nitrógeno en plantas de familias diferentes a las leguminosas. Aún cuando no se conoce cual o cuales son los microorganismos responsables de la FBN observada en las plantas gramíneas, son diversos los diazóticos endófitos que se han aislado de estas plantas, entre los que se encuentran especies de los géneros *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* y *Burkholderia*. Será de gran importancia conocer la función(es) que desempeñan los endófitos, incluyendo los fijadores de nitrógeno, en el interior de las plantas y determinar si estimulan su crecimiento.

Historia

La bacteria motivo de este capítulo fue aislada por vez primera por Cavalcante y Döbereiner en 1988 (21) a partir de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cultivadas en diversas regiones de Brasil. La bacteria recién descubierta fue descrita como "una nueva bacteria fijadora de nitrógeno tolerante al ácido" la cual recibió el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans* (21). No obstante, durante el período de impresión del trabajo referido se incluyó como addendum el cambio de nombre ya propuesto, y a la nueva bacteria se le daba el nombre de *Acetobacter nitrocaptans*, sobre la base de experimentos de hibridación RNA/DNA y DNA/DNA. Anecdóticamente, el sobretiro recibido por JCM venía con una corrección, hecha de puño y letra de Johanna Döbereiner, en la que se indicaba el nombre de la especie como *Acetobacter diazotrophicus*. Fueron solo algunos meses después cuando *Acetobacter nitrocaptans* recibía el nombre oficial de *Acetobacter diazotrophicus* (39), nombre con el cual aun hoy día se sigue reconociendo a esta especie. Sin embargo, Yamada y col., (97) propusieron un nuevo esquema en la taxonomía de la familia Acetobacteraceae, y actualmente el primer fijador de nitrógeno descrito en esta familia es referido oficialmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

El descubrimiento de *G. diazotrophicus* serviría como modelo pionero de bacteria endófito fijadora de nitrógeno, pero además abriría un nuevo capítulo en la investigación sobre fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas. Los estudios sobre endófitos fijadores de nitrógeno han tomado gran auge en la actualidad, basados en las ideas pioneras sobre el potencial agrobiotecnológico de *G. diazotrophicus*. Las características consideradas fueron el habitat endófito y la capacidad de fijar N_2 en la presencia de nitratos (21), así como el excelente crecimiento de *G. diazotrophicus* en condiciones in vitro similares a las

encontradas en la caña de azúcar (13). Esto significaba que al multiplicarse *G. diazotrophicus* en el interior de la caña de azúcar existiría, por un lado, menor competencia por los nutrientes en comparación con el ambiente rizosférico y por otro, podría disponer de abundantes fuentes de carbono, producto de la fotosíntesis, para llevar a cabo la fijación de nitrógeno aun cuando los cultivos fueran fertilizados con este elemento. El nitrógeno, producto de la fijación biológica, sería excretado directamente en el interior de los tejidos de la planta, la cual los usaría para cubrir al menos parcialmente sus requerimientos en la síntesis de macromoléculas esenciales. El potencial agrobiotecnológico se amplió cuando se demostró que *G. diazotrophicus* tenía efectivamente la capacidad de excretar el 50% del nitrógeno fijado (22), así como de producir diversas auxinas, especialmente ácido indol acético (7, 35) y citocininas (48) las cuales podrían ejercer efectos directos sobre la fisiología de la planta e influir sobre el crecimiento de la caña de azúcar.

Técnicas de aislamiento y medios de cultivo

El aislamiento exitoso de una especie endófito particular depende de los métodos y medios de cultivo empleados. Es conocido que dependiendo de las características del medio (e.g., pH, fuente de carbono y nitrógeno) es el tipo de bacteria que se logra aislar (5). Para el aislamiento de *G. diazotrophicus* y en general de los endófitos, las plantas son lavadas con agua de la llave, y posteriormente desinfectadas con alcohol al 70%. Enseguida las plantas son enjuagadas con agua destilada y esterilizadas superficialmente, por ejemplo, con Cloramina T al 1% (35) o hipoclorito de sodio al 4% (59). Después, las plantas se enjugan abundantemente en condiciones de esterilidad para eliminar la sustancia empleada en la esterilización. Posteriormente, las muestras son maceradas en un volumen suficiente para obtener una dilución 1:10 (peso-volumen) y son inoculadas en medios de cultivo adecuados para el aislamiento de la bacteria de interés. Una estrategia alternativa para el aislamiento de *G. diazotrophicus* fue utilizada por Dong y col. (27), pero puede ser empleada para el aislamiento de otros endófitos. Esta estrategia consiste en impregnar con alcohol la superficie de los esquejes de tallo de caña de azúcar y esterilizar por fuego directo. Posteriormente los esquejes son centrifugados con una velocidad de 30 a 3000 g en tubos estériles para obtener el fluido apoplástico el cual contiene a las bacterias endófitas. El fluido puede sembrarse directamente o diluirse y alícuotas son sembradas en los medios de cultivo apropiados para el enriquecimiento de los diazotrofos de interés. Con estas técnicas, la contaminación por hongos puede ocurrir especialmente en medios de cultivo con pH ácido, lo cual se evita con la adición de antifúngicos, e.g., cicloheximida (3, 35). Cuando se requiere conocer el número de bacterias asociadas con la planta en estudio generalmente se recurre al método del número mas probable (MPN), para lo cual se preparan diluciones decimales a partir del macerado original o del fluido apoplástico y alícuotas de cada dilución son inoculadas por triplicado o quintuplicado en los medios de cultivo apropiados.

G. diazotrophicus puede ser aislado fácilmente utilizando medios de cultivo semigelificados y libres de nitrógeno combinado. Por ejemplo, en el medio LGI semigelificado, adicionado con azul de bromotimol, pH 5.5 (21), la bacteria forma una película densa de color amarillo 1 mm abajo de la superficie del medio, tornándose el color amarillo del medio de cultivo a incoloro después de 7 días de incubación a 30°C (Fig. 1). Para el aislamiento de *G. diazotrophicus* en cultivo puro se puede ocupar el medio LGI en placa adicionado con extracto de levadura (50 mg/l). Las colonias de esta especie son

planas, de forma irregular y toman un color naranja intenso después de 5 días de incubación (Fig. 2). Sin embargo, estas características no son absolutas para la identificación de la especie *G. diazotrophicus*. Las bacterias fijadoras de nitrógeno designadas previamente como tipo DOR y tipo SAd, (49), reconocidas actualmente como dos nuevas especies del género *Gluconacetobacter*, *G. johannae* y *G. azotocaptans* (33), pueden ser confundidas con *G. diazotrophicus* cuando crecen en placa sobre el medio LGI (Fig. 3). Aunque el medio LGI es el de elección para la purificación de *G. diazotrophicus*, para algunos fines específicos frecuentemente se recurre a otros medios de cultivo, como por ejemplo el medio SYP (19) o el medio MESMA (34).

Caracterización fenotípica y genotípica de *G. diazotrophicus*

La familia Acetobacteraceae pertenece a la subclase α -Proteobacteria (100). Son bacterias aeróbicas, gram negativas o gram variables que se caracterizan fenotípicamente por su capacidad de oxidar etanol a ácido acético en medios de cultivo con pH neutro o ácido (24, 89). Genotípicamente la familia Acetobacteraceae puede ser distinguida de otras α -Proteobacteria por la presencia de dos sitios de restricción *SphI* y *NcoI* internos en la secuencia del gen 16S ADN-ribosomal, excepto en *Gluconobacter oxydans* en el que falta uno de los sitios *NcoI*, correspondiente al nucleótido 110 de *G. diazotrophicus* (18, 49). Por lo tanto, cuando el ADN de un miembro de esta familia es digerido con la enzima de restricción *SphI* y se hibrida con una sonda de los genes 16S ADN-ribosomal, se detecta una banda de hibridación de 1.3 kb y cuando la restricción se hace con la enzima *NcoI* se encuentra una banda de 1.24 kb.

Tradicionalmente la familia Acetobacteraceae se ha dividido en los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (24, 89). Sin embargo, la clasificación de las bacterias acéticas ha sido materia de controversia durante largo tiempo (15, 82, 89, 94). Recientemente, Yamada y col. (97) propusieron la división de la familia Acetobacteraceae en los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Acidomonas*, sobre base del análisis de secuencias parciales del gen 16S ARN-ribosomal y del tipo de ubiquinona predominante. De esta forma, en el género *Acetobacter* fueron incluidas las especies que tienen el tipo de ubiquinona Q9, entre las que se encuentran *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, en tanto que las otras especies de *Acetobacter* equipadas con ubiquinona Q10, incluida *A. diazotrophicus*, fueron transferidas al género *Gluconoacetobacter*, con la especie tipo *Gluconoacetobacter liquefaciens*. En este género también fueron incluidas las especies *G. xylinus*, *G. hansenii*, y *G. europaeus*. El nombre de *Gluconoacetobacter* fue corregido a *Gluconacetobacter* (98), con base en la regla 61 del código internacional de nomenclatura bacteriana. Posteriormente otras especies de bacterias acéticas han sido descritas, entre ellas *Acetobacter obodiens* y *A. pomorun* (84), las cuales deben ser reasignadas al género *Gluconacetobacter*, y *G. sacchari* (32). Recientemente han sido descritas dos nuevas especies de *Gluconacetobacter*, *G. johannae* (en honor de Johanna Döbereiner) y *G. azotocaptans* (33).

Los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Acidomonas* son capaces de oxidar completamente el etanol y el lactato a CO₂ y H₂O (89). Aún cuando el género *Gluconacetobacter* comparte con otros miembros de la familia Acetobacteraceae la

capacidad de oxidar el etanol, este es el único género de la familia, reconocido actualmente, que contiene especies con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (39, 89, 33).

El crecimiento óptimo de *G. diazotrophicus* se presenta a 30°C en medios de cultivo que contienen 10% de sacarosa y pH de 5.5. Sin embargo, esta bacteria es capaz de crecer en concentraciones de sacarosa hasta del 30% (21). La especie *G. diazotrophicus*, puede usar glucosa, fructosa o sacarosa como única fuente de carbono, produciendo ácido a partir de estos substratos (21, 33). Con excepción de la sacarosa, esta especie no usa otros disacáridos y no es capaz de crecer con ácidos dicarboxílicos como única fuente de carbono (87, 95). *G. diazotrophicus* lleva a cabo la FBN en condiciones microaerofílicas a pH ácido, incluso abajo de 3.0, así como en presencia de altas concentraciones de nitratos (10mM) y su actividad nitrogenasa es inhibida solo parcialmente aún a concentraciones de 20 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o por aminoácidos (87). Estas características de *G. diazotrophicus*, son compartidas por las especies *G. johannae* y *G. azotocaptans*. La especie *G. diazotrophicus* puede ser diferenciada de las otras especies fijadoras de nitrógeno del género por la formación de colonias de color café oscuro (chocolate) con bordes claros en un medio de cultivo a base de extracto de papa adicionado con 5, 10 ó 15% de sacarosa, después de 5 a 7 días de incubación (33). Las especies *G. johannae* y *G. azotocaptans* permanecen de color beige o crema aun después de 10 días de incubación (Fig. 4). En la Tabla 1 se describen algunas características que permiten diferenciar a las especies fijadoras de N_2 del género *Gluconacetobacter*.

La electroforesis de proteínas totales en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato (SDS-PAGE) también se ha usado exitosamente en la caracterización de la especie *G. diazotrophicus* (90, 39). La electroforesis de enzimas metabólicas (MLEE) ha sido otra de las estrategias usadas en la caracterización y diferenciación de cepas de *G. diazotrophicus* (17, 19), así como en la diferenciación de esta especie de otras especies de acetobacterias (49, 33). Con esta metodología se han logrado identificar 14 patrones diferentes de enzimas metabólicas o tipos electroforéticos (ET1 a ET14) en cepas designadas como típicas de la especie *G. diazotrophicus* (Fig. 5), con la excepción del ET 13, el cual representa una cepa que difiere en algunas características con esta especie (49). Es de interés destacar que cerca del 98% de las cepas de *G. diazotrophicus* aisladas de plantas de caña de azúcar cultivadas en diferentes regiones de México han sido agrupadas en el ET 1 (17, 19), en tanto que numerosas cepas aisladas de plantas cultivadas en Brasil son agrupadas en 7 ETs, aunque predominan las cepas representadas por el ET 3 (17). Además, el ET 1 se ha identificado entre cepas de *G. diazotrophicus* aisladas de todos los hospederos conocidos colectados en México, Brasil y otros países como Cuba y la India (17, 49, 90, resultados no publicados).

Previo a la descripción de las especies *G. johannae* y *G. azotocaptans* se reportó que la caracterización específica de *G. diazotrophicus* se lograba mediante la amplificación del gen 16S ADN-ribosomal usando los oligonucleótidos AC (5'-CTGTTTCCCGCAAGGGAC-3') y D1 (5'-GCGCCCCATT GCTGGGTT-3'), los cuales generan una banda de 445 pb (83). No obstante, con estos oligonucleótidos también se amplifica una banda de 445 pb en las especies *G. johannae* y *G. azotocaptans* (Fuentes-Ramírez, com. personal) por lo que la amplificación puede considerarse específica para las especies fijadoras de N_2 del género *Gluconacetobacter* conocidas. La caracterización específica de *G. diazotrophicus* pudiera lograrse mediante la amplificación del gen 23S

ADN-ribosomal, usando el oligonucleótido 1440 (5'-GTTGGCTTA GAAGCAGCC-3', hélice 43a/43b) y el oligonucleótido AD (5'-TGCGGCAAAAGCCGGAT-3'), que generan un producto de 411pb(51). La secuencia complementaria AD ha sido usada como sonda de hibridación para la identificación de *G. diazotrophicus*, así como para su diferenciación de otras especies no fijadoras de N₂ del género (51). No obstante, es necesario determinar si con estos oligonucleótidos se pueden diferenciar las otras especies fijadoras de N₂ del género *Gluconacetobacter*.

Los patrones de hibridación de los genes estructurales de la nitrogenasa (*nifHDK*) y de los genes 16S ADN-ribosomal de *G. diazotrophicus*, así como ensayos de homología ADN-ADN han sido estrategias clave en la identificación de *G. diazotrophicus* y en su diferenciación con otras especies (49, 33). En las cepas típicas de *G. diazotrophicus*, se han observado tres bandas comunes de hibridación con los genes *nifHDK* (1.25, 2.0 y 9.0 kb) (Fig. 6) y 4 bandas de hibridación con los genes 16S ADN-ribosomal (1.6, 2.3, 3.6 y 9.3 kb) (Fig. 7) (19, 49), con excepción del ET 13 en el cual las 4 bandas de hibridación con los genes *nifHDK* difieren en tamaño (1.0, 1.20, 3.5 y 7.6 kb). Para la identificación de *G. diazotrophicus*, también se han realizado ensayos de hibridación con una sonda específica al gen 16S ARN-ribosomal de esta especie (90). La homología ADN/ADN que se observa entre las cepas de *G. diazotrophicus* analizadas en diferentes estudios se encuentra en el rango de 70 a 100% (19, 39, 49). La homología ADN/ADN del 70% es considerada el límite inferior para la diferenciación de especies (86).

Hospederos y dispersión de *G. diazotrophicus*

Como fue mencionado anteriormente, *G. diazotrophicus* fue aislado por vez primera de raíces lavadas y del interior del tallo de la caña de azúcar (21). Posteriormente, la asociación de *G. diazotrophicus* con la caña de azúcar fue confirmada al lograrse su aislamiento de los tejidos internos de diferentes variedades de caña de azúcar cultivadas en Australia (55) y México (35), pero no de la rizosfera de las plantas analizadas. Además *G. diazotrophicus* fue aislado del insecto homóptero *Saccharococcus sacchari* (3) plaga común en todas las regiones donde se cultiva la caña de azúcar, así como de plantas de camote (*Ipomoea batatas*) y de *Pennisetum purpureum* var. Camerún (26). La ausencia de *G. diazotrophicus* tanto de la rizosfera de la caña (21) como de la rizosfera de otras plantas (55), así como su ausencia en el interior de plantas diferentes a la caña que fueron colectadas entre los surcos de este cultivo (76), apoyaron la idea sobre el carácter endófito de esta bacteria y su asociación específica con plantas que acumulan sacarosa y que se propagan en forma vegetativa (26). Estos conceptos son aceptados generalmente en la actualidad y son apoyados con el aislamiento reciente de *G. diazotrophicus* de los tejidos internos de plantas adultas e hijuelos de la piña (*Ananas comosus*), aunque no de su rizosfera (90). No obstante, *G. diazotrophicus* ha sido detectado ocasionalmente en la rizósfera de la caña de azúcar (55) y también ha sido aislada tanto de la rizosfera como de los tejidos internos de otras plantas tales como el cafeto (*Coffea arabica*) (49) y del cereal *Eleusine coracana* (59) las cuales aparentemente no son ricas en sacarosa. El hecho de que *G. diazotrophicus* haya sido aislado de plantas pertenecientes a familias tan diversas como las Poaceae, Convolvulaceae, Rubiaceae y Bromeliaceae sugiere que esta bacteria tiene una amplia capacidad para dispersarse y colonizar diferentes hospederos. Se ha propuesto que los sitios de origen de las plantas leguminosas coinciden con los centros de diversificación

de sus bacterias simbióticas (61). Esta situación no es clara en la interacción *G. diazotrophicus*-planta hospedera, ya que la caña de azúcar es originaria de Nueva Guinea (57), el café del Medio Oriente (67) y la piña de la región Amazónica (58). No obstante y tomando en cuenta que la diversidad genética de la población de *G. diazotrophicus* aislada de la planta del café es mayor que la diversidad encontrada en las poblaciones recobradas de otros hospederos, se ha sugerido que la asociación de *G. diazotrophicus* con la planta del café es más antigua que la asociación con otras plantas hospederas (90). Existe la posibilidad de que el hospedero primario de *G. diazotrophicus* no sea una planta de interés agrícola y por lo tanto aun no se haya detectado. En cualquier forma, de acuerdo con los resultados obtenidos hasta ahora, es de esperarse que en el futuro cercano se descubran otras plantas con las cuales se asocia *G. diazotrophicus*.

Considerando el carácter endófito de *G. diazotrophicus* en plantas que se propagan asexualmente, se ha propuesto que su dispersión geográfica a gran distancia se lleva a cabo durante la reproducción del material vegetativo que alberga a la bacteria en forma natural. Por ejemplo, el aislamiento de *G. diazotrophicus* se logró a partir de esquejes de caña de azúcar cultivados en Cuba, los cuales fueron transportados a Canadá y propagados bajo condiciones de invernadero (27, 28). Esta forma de dispersión parece exitosa tomando en cuenta el intenso intercambio de variedades de caña de azúcar que existe entre los países productores (17). Es concebible que la dispersión regional de *G. diazotrophicus* entre variedades de caña de azúcar, cultivada comercialmente o en campos de germoplasma, se logre a través de insectos como *S. sacchari*, conocido en México como chinche harinosa. Es de interés comentar que la frecuencia de aislamiento de *G. diazotrophicus* es mayor en los tejidos cercanos a la región apical de los tallos de caña de azúcar (35) los cuales corresponden a las áreas (entrenudos 8-10) donde se alimenta la chinche harinosa (Fig. 8). De otros insectos tales como áfidos, hormigas y chapulines, colectados sobre plantas de caña de azúcar, no se logró el aislamiento de *G. diazotrophicus* (3). Probablemente la característica ácida de las secreciones de la chinche harinosa, en las cuales la fructosa es el azúcar más abundante, juegue una función importante en la multiplicación de *G. diazotrophicus*, ya que las secreciones de los chapulines aunque ricas en sacarosa son alcalinas (3). También se ha sugerido que la transmisión y dispersión de *G. diazotrophicus* pudiera ser a través de esporas de algunos hongos micorrízicos del tipo vesículo-arbuscular (VAM) (25, 26) de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* (69). De hecho se ha demostrado experimentalmente que la introducción de *G. diazotrophicus* a la caña de azúcar puede ser facilitado con la co-inoculación de esporas VAM (68, 69). Resultados similares fueron reportados cuando plántulas de *Sorghum bicolor* fueron inoculadas tanto con *G. diazotrophicus* como con cepas de *Glomus* (44). Además, las esporas podrían proporcionar a *G. diazotrophicus* protección contra las condiciones adversas del medio ambiente, e.g., cuando la bacteria se encuentra en la rizósfera del café.

Características genómicas de *G. diazotrophicus*

Muy poco se conoce sobre las características del genoma de *G. diazotrophicus* en comparación con otras bacterias que se asocian con plantas de interés agrícola, tales como *Rhizobium* o *Azospirillum*. Recientemente se iniciaron los estudios para conocer la secuencia completa del genoma de *G. diazotrophicus* (40) y actualmente se conoce que el genoma de esta especie bacteriana tiene un tamaño aproximado de 4.2 Mb. El análisis de la

secuencia del genoma aportará información sobre los genes involucrados en la interacción de la bacteria con sus hospederos, y particularmente sobre las características que podrían ser usadas en procesos de biotecnología agrícola.

Los plásmidos constituyen una parte sustancial del genoma de muchas de las especies bacterianas, desempeñando algunos plásmidos funciones importantes en la interacción hospedero-bacteria (9, 23, 37, 65). Sobre la base de estos conocimientos fueron analizadas diferentes cepas de *G. diazotrophicus*, encontrándose que la presencia de plásmidos de 20 a 170 kb es común en esta especie (Fig. 9), aún cuando la cepa tipo (PAI 5T = ATCC 49037) carece de ellos (16, 19, 91). Estos plásmidos podrían conferir algunas ventajas competitivas a las cepas de *G. diazotrophicus* que los contienen. Se ha sugerido que el plásmido de 170 Kb, albergado por muchas cepas aisladas de diferentes hospederos cultivados en México y Brasil, pudieran desempeñar una función importante en la asociación con la planta (17). Sin embargo, actualmente se desconocen los genes presentes en los plásmidos encontrados en cepas de *G. diazotrophicus* así como la función que desempeñan, por lo cual se les puede definir como plásmidos crípticos. La existencia de cepas de *G. diazotrophicus* carentes de plásmidos permitió sugerir que las características fenotípicas fundamentales de esta especie, como son la producción de ácido acético, oxidación de etanol, lactato y otras fuentes de carbono, la fijación de nitrógeno y la producción de ácido indolacético no son codificadas en plásmidos (19). De hecho fue demostrado que los genes estructurales de la nitrogenasa (*nifHDK*) se encuentran localizados en el cromosoma (19).

El análisis de poblaciones de *G. diazotrophicus*, aisladas de la caña de azúcar y de algunos otros hospederos, reveló que su diversidad genética es muy limitada, alrededor de 0.060 (17, 19). Este nivel de diversidad observado en *G. diazotrophicus* es uno de los más bajos entre todas las especies bacterianas analizadas (61). También se conoce que la estructura genética de *G. diazotrophicus* es de tipo clonal (17). Estos análisis en conjunto sugieren poca variabilidad del genoma de *G. diazotrophicus*.

Genes de *G. diazotrophicus* involucrados en la fijación biológica de nitrógeno

La síntesis de la enzima nitrogenasa activa requiere de la transcripción y traducción de alrededor de 20 genes, los cuales han sido identificados y caracterizados en diversas especies de diazótrofos (77). La FBN es un proceso que demanda mucha energía, por lo que los organismos fijadores de nitrógeno tienen que regular finamente la síntesis y la actividad de la nitrogenasa en respuesta a factores del medio ambiente tales como el oxígeno y el nitrógeno combinado (62). Para entender el proceso de fijación de nitrógeno en *G. diazotrophicus* se ha iniciado la identificación y la caracterización de los genes reguladores relacionados a los genes *nif* (78). El aislamiento y la secuenciación de los genes *nif* se logró construyendo una librería genómica de *G. diazotrophicus* en *E. coli*, usando el cósmido pLAFR3 de amplio rango de hospedero (78, 92) ó el vector de clonación lambda EMBL3 (78). Las clonas de esta librería fueron analizadas en su capacidad de complementar ciertos genes *nif* o *ntr* de cepas mutantes de *A. vinelandii* (93) o por hibridación de los genes *nif* de otros diazótrofos. Con estas estrategias se logró el aislamiento de los genes *nifHDK*, *nifA*, *nifB*, *nifV*, *nifE* y *ntrBC* (78). El grupo de los genes *nif* y los involucrados en la fijación de nitrógeno han sido secuenciados y analizados. El análisis de las secuencias, alrededor de 30.5 kb, reveló el grupo de genes contiguos *nif*, *fix* y

genes asociados más extenso reportado en la actualidad entre las bacterias diazótrofes (54). El análisis de la secuencia de los promotores en conjunto con ensayos tipo "Northern blot" indican que los genes de *G. diazotrophicus* están organizados dentro de ocho unidades transcripcionales. También se observó que los genes *nif* de *G. diazotrophicus* comparten características con los genes *nif* de otros diazótrofes, particularmente con miembros del subgrupo α -Proteobacteria. El orden de los genes *nif* en *G. diazotrophicus* es muy similar con el encontrado en *Azospirillum brasilense* (54).

Condiciones que afectan la fijación de nitrógeno en *G. diazotrophicus*

Algunas condiciones del entorno en las que se desarrollan los diazótrofes pueden afectar la capacidad de fijar nitrógeno, como por ejemplo la presencia de oxígeno y amonio. Se ha observado que el efecto de oxígeno sobre la actividad de la nitrogenasa depende del suplemento del carbono y de la tasa de respiración de las células (53). La sensibilidad de la actividad nitrogenasa de *G. diazotrophicus* al oxígeno y nitrógeno combinado depende de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo (74). Una concentración del 10% de sacarosa favorece la expresión de la nitrogenasa aun en presencia de oxígeno, amonio y algunos aminoácidos. En el caso del nitrógeno combinado, la protección podría ser explicada por la baja asimilación de amonio que manifiestan las células de *G. diazotrophicus* cuando crecen con 10% de sacarosa. Este mecanismo resulta de gran interés considerando el habitat de *G. diazotrophicus*, normalmente rico en sacarosa, por lo que su nitrogenasa podría estar activa aún cuando la bacteria se encuentre rodeada de amonio (74). Algunas características del sistema respiratorio de *G. diazotrophicus* han sido analizadas (31). Se ha observado que al aumentar la aereación se provoca un fuerte efecto positivo sobre el crecimiento y la actividad de cultivos diazotróficos. Las células de estos cultivos poseen un sistema de transporte de electrones muy activo, unido a membrana, con deshidrogenasas para NADH, glucosa y acetaldehído como principales donadores de electrones. Se sugiere que la glucosa deshidrogenasa y la citocromo *ba* son componentes clave en el sistema respiratorio de *G. diazotrophicus* en la diazotrofia aeróbica (31). *G. diazotrophicus* posee una pirroquinolina quinona unida a la glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH), la cual parece desempeñar la función de proveer energía extra a las células durante el proceso de fijación de nitrógeno (36).

Levanosacarasa y su posible función biológica

Se ha observado que las células de *G. diazotrophicus* no son capaces de transportar la sacarosa a su interior, razón por la cual se sugirió que la bacteria debería tener una enzima extracelular con actividad sacarolítica que le permitiera metabolizar esta fuente de carbono (1). Posteriormente se demostró que *G. diazotrophicus* es capaz de producir y secretar una proteína con actividad de levanosacarasa, la cual se expresa en forma constitutiva (42, 43). Esta proteína representa mas del 70% de las proteínas totales secretadas por la cepa SRT4 de *G. diazotrophicus* (42). La levanosacarasa es una proteína de 58 kD con punto isoelectrico de 5.5, la cual expresa su actividad óptima a pH 5.0 (42). Esta enzima cataliza la transfructosilación de la sacarosa a una variedad de aceptores incluyendo agua (hidrólisis de sacarosa), glucosa (reacción de intercambio), fructano (reacción de polimerización) y sacarosa (síntesis de oligofructósidos). El gen que codifica para la levanosacarasa (*lsdA*) fue aislado a partir de una librería genómica construida con la cepa SRT4 de *G.*

diazotrophicus y detectada por complementación de una cepa mutante de *G. diazotrophicus* deficiente en la síntesis de levanosacarasa (2). La interrupción de este gen resultó en una mutante deficiente en la actividad levanosacarasa y en la capacidad de utilizar glucosa como única fuente de carbono, demostrando que la levanosacarasa es una enzima clave en el metabolismo de la sacarosa (2). El gen *lsdA* contiene 1751 pb y codifica para una proteína de 64.9 kD con punto isoeléctrico de 5.2, sugiriéndose que es una proteína precursora que se rompe para dar lugar a la proteína madura. La expresión del gen *lsdA* en *E. coli* con un promotor lac resultó en la producción de una proteína con actividad de levanosacarasa. En estudios de microscopia electrónica se observó que la LsdA, detectada mediante el uso de estrategias inmunológicas ("immunogold"), se acumula en el periplasma antes de su secreción (41). Las formas periplásmicas y extracelulares de la enzima fueron purificadas y ambas exhibieron características bioquímicas y físicas similares, indicando que la LsdA adopta su conformación final en el periplasma. En contraste con otras bacterias gram negativas, *G. diazotrophicus* secreta una levanosacarasa por un mecanismo dependiente del péptido señal (41). La estructura primaria de la levanosacarasa producida por esta bacteria ha sido caracterizada con el uso de la espectrometría de masas (10).

Considerando que la cepa SRT4 fue identificada como un miembro del tipo electroforético ET 1, esta cepa fue comparada en su actividad de levanosacarasa con cepas representativas de los diferentes tipos electroforéticos aisladas de la mayoría de los hospederos conocidos de *G. diazotrophicus* (43). Se observó que existe un alto grado de conservación de la levanosacarasa en las 14 cepas analizadas, las cuales representan 11 diferentes tipos electroforéticos de *G. diazotrophicus*. Sin embargo, fue observado que la producción de levanosacarasa es tres veces mas elevada en las cepas aisladas de plantas ricas en sacarosa (e.g. caña de azúcar y piña) que en las cepas aisladas de la planta del cafeto (43). Además, en este estudio se confirmó que la enzima levanosacarasa hidroliza la sacarosa y da origen a oligofruktanos y levana, los cuales pudieran prevenir la respuesta defensiva de la planta como se ha sugerido que ocurre con las bacterias patógenas *Erwinia amylovora* (38) y *Pseudomonas syringae* (50) y/o favorecer a la bacteria durante la colonización de la planta, como se ha observado con *Paenibacillus polymyxa* (4). Mediante microscopía electrónica en conjunto con el uso de anticuerpos de tipo policlonal dirigidos contra *G. diazotrophicus* ha sido observada la presencia de un exopolisacárido, el cual se sugiere está involucrado con la actividad sacarolítica o en señales clave en la interacción de *G. diazotrophicus* con su hospedero (47).

Colonización de hospederos por *G. diazotrophicus*

Aun cuando *G. diazotrophicus* sobrevive pobremente cuando se inocula artificialmente en suelo (6, 46) se ha logrado su aislamiento de la rizosfera del cafeto en frecuencias hasta del 40% cuando el pH del suelo es ácido (49). Se ha sugerido que la colonización de la rizosfera del cafeto se debe a la abundancia de materia orgánica presente en este ambiente, la cual contribuye con fuentes de carbono asimilables por *G. diazotrophicus* y además le protege de las condiciones fisicoquímicas adversas del suelo. Esto contrasta fuertemente con la pobreza de materia orgánica observada en los suelos cultivados con caña de azúcar debido a la quema que se lleva a cabo en este cultivo previo al corte. A pesar de que *G. diazotrophicus* no se ha logrado aislar de especies de plantas asociadas con la caña de azúcar o de especies de pastos, ni de plantas de arroz, maíz y sorgo cultivadas en el campo

(13, 55, 76), se ha observado que esta bacteria tiene la capacidad de colonizar tanto la región de la epidermis, así como el cortex y el interior de los vasos de xilema de raíces de maíz cuando es inoculada artificialmente (20).

Los estudios de colonización y localización de un microorganismo endófito asociado con su hospedero contribuyen a confirmar la naturaleza endófito del microorganismo, así como ubicar el sitio probable donde expresa algunas de sus funciones biológicas que pudieran contribuir con el desarrollo de la planta. Los estudios de colonización de los tejidos internos de las plantas por *G. diazotrophicus* se han llevado a cabo mayoritariamente con la caña de azúcar.

G. diazotrophicus es capaz de colonizar la superficie de raíces de caña de azúcar y de penetrar a través de los sitios de emergencia de las raíces laterales, así como a través de la región meristemática de las raíces (47). También se ha descrito que la entrada de *G. diazotrophicus* a la planta de caña de azúcar involucra estructuras similares a los hilos de infección formados por *Rhizobium* (8), sin embargo, estas observaciones no han sido confirmadas en ningún otro estudio posterior. Los sitios que coloniza *G. diazotrophicus* y su distribución en el interior de la planta de caña de azúcar han sido motivo de controversia entre los diferentes grupos que han investigado ésta asociación. Con el uso de estrategias diferentes, inmunológicas o moleculares y el auxilio de microscopía electrónica (Fig. 10), fue demostrado que *G. diazotrophicus* coloniza los espacios intercelulares de la raíz y los vasos del xilema de plántulas de caña de azúcar de 15-30 días de edad, obtenidas por micropropagación (47) o por propagación vegetativa del tallo (34). En contraste, los estudios de Dong y col. (27) señalan que *G. diazotrophicus* se localiza en los espacios intercelulares del tallo correspondientes al apoplasto de plantas adultas de caña de azúcar, obtenidas a través de la propagación vegetativa de tallos. Sin embargo, en este estudio la propuesta se basa en el hecho de haber aislado la bacteria en medios de cultivo inoculados con muestras de líquido obtenido del apoplasto, pero no se muestra ninguna evidencia que indique la presencia de *G. diazotrophicus* en el apoplasto. La pureza del líquido apoplástico usado ha sido cuestionada debido a las condiciones en que éste se obtuvo, ya que podría estar contaminado con savia del xilema (46). En apoyo a su propuesta, Dong y col. (27) argumentan contra la localización de *G. diazotrophicus* en los vasos del xilema, ya que la inoculación de la bacteria en la corriente de estos vasos provoca el taponamiento de los mismos debido a la producción abundante de "gomas" de color rojo. No obstante, en otros estudios no ha sido observada ninguna reacción de tipo patogénico en plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus* (34, 47, 75). La diferencia en la cantidad de células de *G. diazotrophicus* inoculadas y la forma de inoculación podría explicar la discrepancia entre observar o no una reacción de defensa de la planta.

La dispersión de *G. diazotrophicus* en el interior de la planta también ha sido motivo de controversia. En tanto que en algunos estudios se sugiere que *G. diazotrophicus* se dispersa en los tejidos internos de la planta a través de los vasos del xilema (34, 47, 75), en otro se objeta que estos vasos sean la vía de dispersión, argumentándose la existencia de barreras morfológicas que impiden la comunicación entre vasos del xilema de un internodo a otro (29). Una amplia argumentación a las diferencias de resultados sobre la localización de *G. diazotrophicus* en el interior de plantas de caña de azúcar se encuentran en los trabajos de Fuentes y col. (34) y James y col. (46). Consideramos que algunas de las discrepancias

podrían ser producto de los métodos y condiciones que se han usado en los estudios, muy particularmente debido al origen del material vegetal de experimentación (micropropagado por cultivo de tejidos o propagación vegetativa de plantas adultas), así como a la edad de las plantas al tiempo del análisis, es decir, plantas con 15-30 días de edad o en plantas adultas.

Factores que afectan a la asociación *G. diazotrophicus*-planta hospedera

El establecimiento de *G. diazotrophicus* en sus diferentes hospederos dependerá de los factores que influyen directamente en la interacción bacteria-hospedero. En uno de los primeros estudios desarrollados con el objetivo de conocer la presencia de *G. diazotrophicus* entre variedades de caña de azúcar cultivadas en México fue observado que la frecuencia de aislamiento de esta bacteria se encontraba en relación inversa con los niveles de fertilización nitrogenada aplicados a los cultivos (35). Con dosis de fertilización de 275 a 300 Kg de N/ha la frecuencia máxima de aislamiento de *G. diazotrophicus* es de 2% pero comúnmente no se logra su aislamiento, sin embargo, esta frecuencia se incrementa hasta el 65% con dosis de fertilización de 120 Kg de N/ha. Trabajos posteriores han confirmado que las dosis elevadas de fertilizantes nitrogenados aplicados a los cultivos de caña de azúcar afectan a la población de *G. diazotrophicus* encontrada en diferentes variedades cultivadas en Brasil y la India (63, 14). La capacidad de *G. diazotrophicus* para colonizar a la planta de caña de azúcar creciendo con diferentes dosis de nitrógeno fue evaluada bajo condiciones de invernadero (34). Se encontró que el nitrógeno aplicado en forma de NH_4NO_3 afecta la capacidad de *G. diazotrophicus* para colonizar a la planta. Aparentemente el nitrógeno no ejerce un efecto directo sobre la bacteria sino a través de la planta, debido a los cambios drásticos que ocasiona el nitrógeno sobre la fisiología de las mismas (30). Por ejemplo, se han observado cambios en la concentración de sacarosa en el interior de la planta de caña de azúcar, dependiendo de la variedad y de la forma de nitrógeno aplicado (70). El efecto causado por las altas dosis de nitrógeno que se aplican a los cultivos parece que afecta también a otras poblaciones endófitas fijadoras de N_2 (52). Aún cuando se desconoce el mecanismo por el cual el nitrógeno afecta al establecimiento de algunos endófitos fijadores de nitrógeno, se advierte que la alta fertilización nitrogenada aplicada a los cultivos es una amenaza para el mantenimiento natural de estas asociaciones (34).

Con el objetivo de conocer aquellos factores que influyen en la asociación *G. diazotrophicus*-caña de azúcar hemos desarrollado algunos experimentos de inoculación en plántulas micropropagadas. Los resultados revelan que la edad de la planta y la variedad de caña de azúcar influyen fuertemente sobre el establecimiento de *G. diazotrophicus* (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado; resultados no publicados). A medida que aumenta la edad de la planta el número de células de *G. diazotrophicus* en los tejidos internos disminuye drásticamente, lo cual parece reflejar los cambios fisiológicos que experimenta la planta durante su crecimiento. Es conocido que las características morfológicas y fisiológicas difieren entre las variedades de caña de azúcar (57), por lo que nos parece importante determinar cuáles son las diferencias que permiten la mejor interacción con *G. diazotrophicus* y con otros endófitos.

Efecto de la inoculación de *G. diazotrophicus* sobre el crecimiento de la caña de azúcar

Frecuentemente, desde hace más de 10 años, se ha referido en múltiples publicaciones a *G. diazotrophicus* como la bacteria responsable, o al menos una de las más importantes, de la fijación de nitrógeno detectada en la caña de azúcar. Sin embargo, desde el descubrimiento de *G. diazotrophicus* y a pesar de que ha sido encontrado en asociación endófito con diferentes plantas, son escasos los experimentos desarrollados para conocer su efecto sobre el crecimiento vegetal, determinándose éste, entre sus hospederos naturales, solo en la caña de azúcar.

En condiciones de laboratorio, Sevilla y col. (80) observaron a los 30 días post-inoculación que tanto una cepa silvestre como una mutante no fijadora de nitrógeno (*nif*) de *G. diazotrophicus* promueven el crecimiento de plántulas micropropagadas de caña de azúcar en un medio con nitrógeno. Sin embargo, en ausencia de nitrógeno las plántulas inoculadas con la cepa silvestre tuvieron una altura significativamente mayor que las plántulas inoculadas con la cepa *nif* y que la mostrada por las plántulas testigo. Resultados similares fueron obtenidos a los 60 días después de la inoculación (79), pero además, el peso seco y el contenido de nitrógeno total de las plántulas inoculadas, tanto con la cepa silvestre como con la mutante, fueron significativamente mayores que el de las plántulas testigo crecidas en presencia de nitrógeno mineral. Estos autores consideran que *G. diazotrophicus* promueve el crecimiento de la caña de azúcar tanto a través de la fijación de nitrógeno como de otro mecanismo, sugiriendo la síntesis de ácido indol acético como el factor responsable.

En contraste con los datos publicados por Sevilla y col. (79, 80), los resultados de un experimento de invernadero llevado a cabo durante 6 meses, no revelaron ningún efecto sobre el crecimiento de plántulas micropropagadas de caña de azúcar inoculadas separadamente con 7 cepas diferentes de *G. diazotrophicus*, con la excepción de las plántulas inoculadas con una de las cepas (PAI 3) que mostraron mayor altura, estadísticamente significativa, en comparación con las plántulas testigo (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, resultados no publicados). Sin embargo, el peso seco de estas plántulas no mostró diferencias estadísticas significativas respecto al peso seco de las plántulas evaluadas como testigo. La discrepancia entre los resultados observados en los experimentos de inoculación descritos podría deberse a las condiciones de experimentación diferentes.

A pesar que los reportes sobre experimentos de inoculación con *G. diazotrophicus* son tan escasos y que aparentemente su efecto sobre el crecimiento de la caña de azúcar es limitado, nos parece que esta bacteria puede ser considerada como modelo de estudio que contribuya a un mejor entendimiento de la asociación entre los endófitos y sus hospederos.

TABLA 1. Características para diferenciar las especies de *Gluconacetobacter* fijadoras de N₂

	<i>G. diazotrophicus</i>	<i>G. johannae</i>	<i>G. azotocaptans</i>
Características fenotípicas			
Colonias café obscuro sobre agar papa con 5, 10 o 15% de azúcar	Si	No	No
Uso de fuentes de carbono:			
D-galactosa	+	+	±
D-xylosa	±/-	+	-
D-rafinosa	+	+/-	-
D-arabinosa	+	±/-	-
Melibiosa	±	±	±/-
Maltosa	±/-	+/-	±/-
Manosa	±	-	-
D-sorbitol	+	+/-	+/-
Glicerol	+	±/-	-
D-manitol	+	±/-	-
Etanol	±	+	+/-
Butanol	-	±	-
Uso de aminoácidos en presencia de sorbitol como fuente de carbono:			
L-cisteína	+	-	+
L-glutámico	+	-	+
L-prolina	+	-	-
L-triptófano	+	+	-

Crecimiento: (+) bueno; (±) pobre; (-) ausente; (/) ó.

Fig. 1



Figura 2. Morfología colonial de *G. diazotrophicus* en medio de cultivo LGI después de 7 días de crecimiento a 29°C.

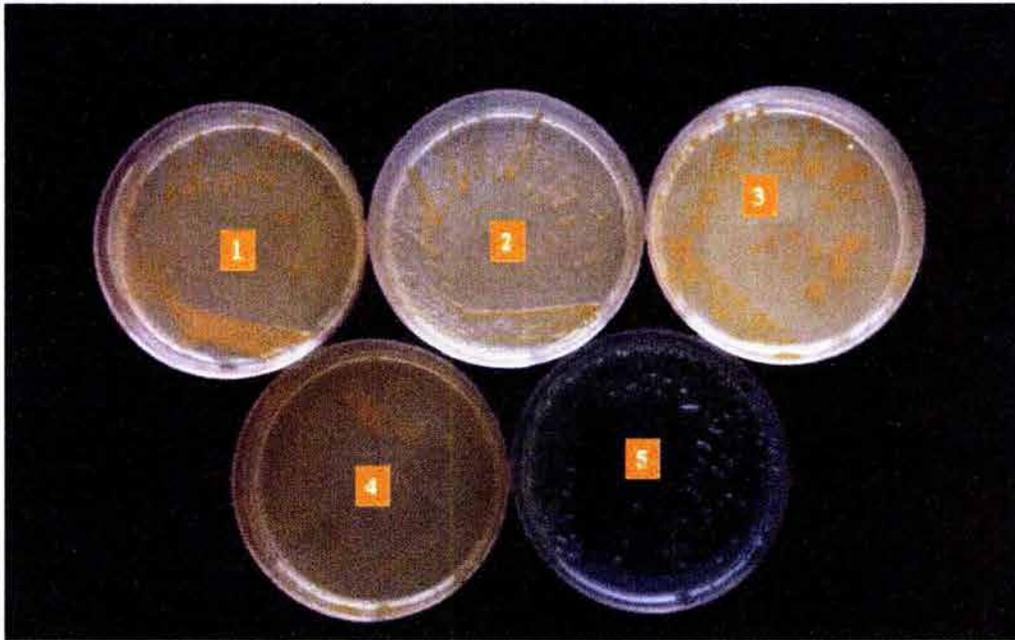


Figura 3. Morfología colonial de acetobacterias fijadoras de nitrógeno sobre placas LGI. 1 y 2) *G. diazotrophicus*; 3) *G. johannae*; 4) Aislado APL; 5) Cepa mucosa CFN-Cf 56. El color verde del medio LGI fue transformado a amarillo por los aislados productores de ácido. Modificado de Appl. Environ. Microbiol. 63:3676-3683 (49).



Figura 4. Crecimiento de *Gluconacetobacter* spp. fijadoras de nitrógeno en placas de medio agar papa después de 7 días de incubación a 29°C. A y B) *G. diazotrophicus*; C) *G. johannae*; D) *G. azotocaptans*.

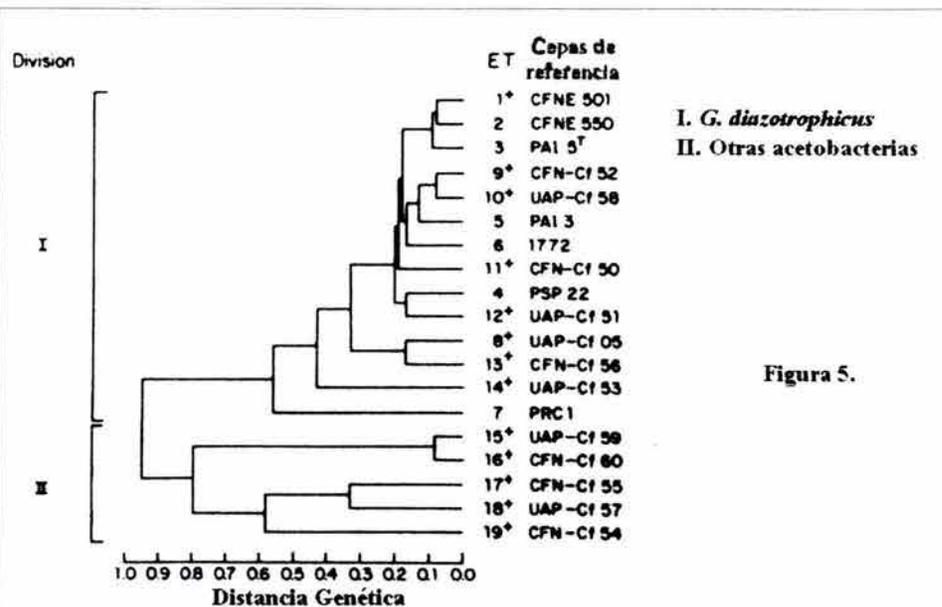


Figura 5.

Relación genética de ETs identificados entre los aislados de *G. diazotrophicus* recuperados de hospederos conocidos y acetobacters fijadores de nitrógeno asociados con plantas de café. + indica aislados representados por ETs que han sido aislados solamente de plantas de café, excepto para el ET 1. Modificado de Appl. Environ. Microbiol. 63:3676-3683 (49).

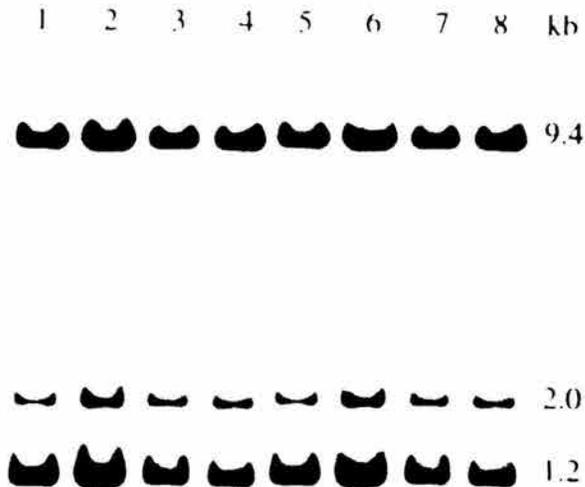


Figura 6. Autoradiografía de un Southern blot de DNA total digerido con *EcoRI* e hibridado con una sonda de los genes *nifHDK* de *R. etli* CFN 42. Carriles 1 a 8 representan cepas de *G. diazotrophicus*.

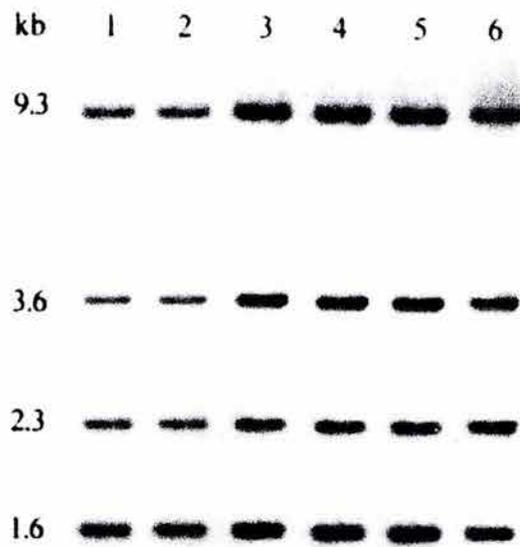


Figura 7. Autoradlografía de un Southern blot de DNA total digerido con *EcoRI* e hibridado con una sonda del gen 16S rDNA de *E. coli*. Carriles 1 a 6 corresponden a cepas de *G. diazotrophicus*.

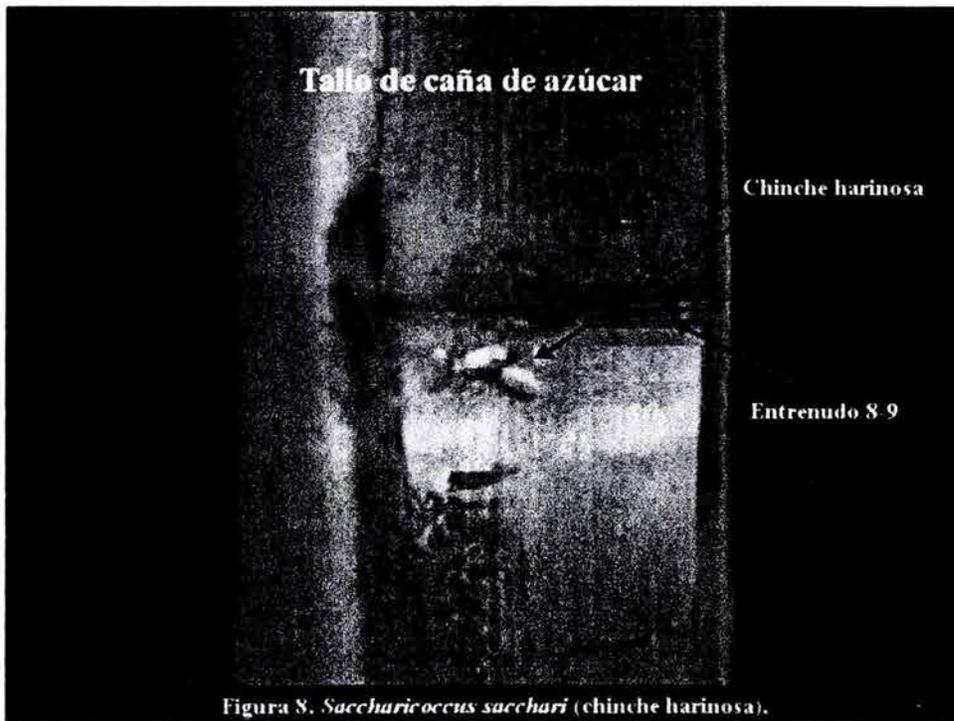


Figura 8. *Saccharicoccus sacchari* (chinche harinosa).

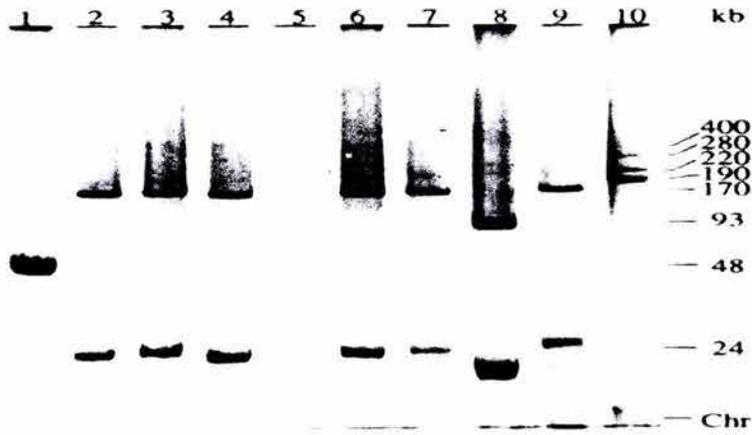


Fig. 9. Electroforesis de plásmidos de *G. diazotrophicus* usando el método de Hirsch. 1) *E. coli* HB101, conteniendo el plásmido pRK2013 (48 kb), usado como marcador de P.M. Carriles de 2 a 9 corresponden a cepas de *G. diazotrophicus*. 2) UAP 5701; 3) UAP 6925; 4) UAP 7936; 5) PAI 5^T; 6) PR 2; 7) UAP 5560; 8) UAP 5665; 9) UAP 5275; 10) *R. elli* CFN 42 conteniendo plásmidos a y b (190 kb), plásmido c (220 kb), plásmido d (280 kb), plásmido e (400 kb), usados como marcadores. Chr, cromosoma. Modificado de Appl. Environ. Microbiol. 60:1532-1537 (19).



Figura 10. Colonización endófitas de plantulas de caña de azúcar por *G. diazotrophicus*.

REFERENCIAS

1. **Alvarez, B., and G. Martínez-Drets.** 1995. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* **41**:918-924.
2. **Arrieta, J., L. Hernández, A. Coego, V. Suárez, E. Balmori, C. Menéndez, M.-F. Petit-Glatron, R. Chambert, and G. Selman-Housein.** 1996. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* **142**:1077-1085.
3. **Ashbolt, N. J., and P. E. Inkerman.** 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugarcane mealybug, *Saccharicoccus sacchari*, and its environs. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:707-712.
4. **Aymerich, S.** 1990. What is the role of levansucrase in *Bacillus subtilis*? *Symbiosis* **9**:179-184.
5. **Balandreau, J.** 1983. Microbiology of the association. *Can. J. Microbiol.* **29**:851-859.
6. **Baldani, J. I., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goi, and J. Döbereiner.** 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil. Biol. Biochem.* **29**:911-922.
7. **Bastian, F., A. Cohen, P. Piccoli, V. Luna, R. Baraldi, and R. Bottini.** 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ y A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg.* **24**:7-11.
8. **Bellone, C. H., S. D. V. C. de Bellone, R. O. Pedraza, and M. A. Monzon.** 1997. Cell colonization and infection thread formation in sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biol. Biochem.* **29**:965-967.
9. **Bender, C. L., and D. A. Cooksey.** 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *J. Bacteriol.* **165**:534-541.
10. **Betancourt, L., T. Takao, L. Hernández, G. Padron, and Y. Shimonishi.** 1999. Structural characterization of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: identification of an N-terminal blocking group and a free-thiol cysteine residue. *J. Mass Spectrom.* **34**:169-174.
11. **Boddey, R. M., and J. Döbereiner.** 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research* **42**:241-250.
12. **Boddey, R. M., O. C. de Oliveira, S. Urquiaga, V. M. Reis, F. L. De Olivares, V. L. D. Baldani and J. Döbereiner.** 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plan Soil* **174**:195-209.
13. **Boddey, R. M., S. Urquiaga, V. Reis, and J. Döbereiner.** 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil* **137**:111-117.
14. **Bueno, dos Reis Jr. F., V. M. Reis, S. Urquiaga, and J. Döbereiner.** 2000. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant Soil* **219**:153-159.
15. **Bulygina, E. S., O. M. Gulikova, E. M. Dikanskaya, A. I. Netrusov, T. P. Tourova, and K. M. Chumakov.** 1992. Taxonomic studies of the

genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2283-2286.

16. **Caballero-Mellado, J., N. Cajal, and E. Martínez-Romero.** 1993. Small and large plasmids in *Acetobacter diazotrophicus*, p. 604. *In* R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

17. **Caballero-Mellado, J., L. E. Fuentes-Ramírez, V. M. Reis, and E. Martínez-Romero.** 1995. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3008-3013.

18. **Caballero-Mellado, J., T. Jiménez-Salgado, A. Tapia-Hernández, E. T. Wang, E. Martínez-Romero, and L. E. Fuentes-Ramírez.** 1999. Polyphasic taxonomy of nitrogen-fixing acetic bacteria isolated from the rhizosphere of coffee plants, p. 271-274. *In* E. Martínez and G. Hernández (ed.), *Highlights on nitrogen fixation research* Kluwer Academic Publisher. N.Y.

19. **Caballero-Mellado, J., and E. Martínez-Romero.** 1994. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1532-1537.

20. **Caballero-Mellado, J., E. Martínez-Romero, P. Estrada de los Santos, and L. E. Fuentes-Ramírez.** 1998. Maize colonization by *Acetobacter diazotrophicus*, p. 381-382. *In* C. Elmerich, A. Kondorosi, and W. E. Newton (ed.), *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht.

21. **Cavalcante, V. A., and J. Döbereiner.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**:23-31.

22. **Cojho, E. H., V. M. Reis, A. C. Schenberg, and J. Döbereiner.** 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**:23-31.

23. **Comai, L., G. Surico, and T. Kosuge.** 1983. Relation of plasmid DNA to indol acetic acid production in different strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2157-2163.

24. **De Ley J., M. Gillis, J. Swings.** 1984. Family VI. Acetobacteraceae, p. 267-278. *In* Krieg N. R., Holt J. G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore.

25. **Döbereiner, J.** 1993. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* **13**:1-13.

26. **Döbereiner, J., V. M. Reis, M. A. Paula, and F. L. Olivares.** 1993. Endophytes diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants, p. 671-676. *In* R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

27. **Dong, Z., M. J. Canny, M. E. McCully, M. R. Robredo, C. F. Cabadilla, E. Ortega, and R. Rodes.** 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiol.* **105**:1139-1147.

28. **Dong, Z., M. Heydrich, K. Bernard, and M. E. McCully.** 1995. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1843-1846.

29. **Dong, Z., M. E. McCully, and M. J. Canny.** 1997. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Ann. Bot.* **80**:147-158.
30. **Fernández, M. S., and R. O. P. Rosiello,** 1995. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. *Crit. Rev. Plant Sci.* **14**:111-148.
31. **Flores-Encarnación, M., M. Contreras-Zentella, L. Soto-Urzuá, G. R. Aguilar, B. E. Baca, and J. E. Escamilla.** 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL 5. *J. Bacteriol.* **181**:6987-6995.
32. **Franke, I. H., M. Fegan, C. Hayward, G. Leonard, E. Stackebrandt, and L. I. Sly.** 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1681-1693.
33. **Fuentes-Ramírez, L. E., R. Bustillos-Cristales, A. Tapia-Hernández, T. Jiménez-Salgado, E. T. Wang, E. Martínez-Romero, and J. Caballero-Mellado.** 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov., and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (En prensa).
34. **Fuentes-Ramírez, L. E., J. Caballero-Mellado, J. Sepúlveda, and E. Martínez-Romero.** 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**:117-128.
35. **Fuentes-Ramírez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Abarca-Ocampo, and J. Caballero-Mellado.** 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* **154**:145-150.
36. **Galar, M. L., and J. L. Boiardi.** 1995. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:713-716.
37. **García-de los Santos, A., S. Brom, and D. Romero.** 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**:119-125.
38. **Geier, G., and K. Geider.** 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **42**:387-404.
39. **Gillis, M., K. Kersters, B. Hoste, D. Janssens, R. M. Kroppenstedt, M. P. Stephan, K. R. S. Teixeira, J. Döbereiner, and J. De Ley.** 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:361-364.
40. **Herlache, T. C., A. D. Kent, P. Riggs, A. Iniguez, M. K. Chelius, and E. W. Triplett.** 2000. The *Gluconacetobacter diazotrophicus* genome project. 17th. North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation. Quebec, Canada. Abs. p. 82.
41. **Hernández, L., J. Arrieta, L. Betancourt, V. Falcón, J. Madrazo, A. Coego, and C. Menéndez.** 1999. Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Curr. Microbiol.* **39**:146-152.
42. **Hernández L., J. Arrieta, C. Menéndez, R. Vazquez, A Coego, V. Suárez, G. Selmán, M. F. Petit-Glatron, and R. Chambert.** 1995. Isolation and

enzymic properties levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* **309**:113-118.

43. **Hernández, L., M. Sotolongo, Y. Rosabal, C. Menéndez, R. Ramírez, J. Caballero-Mellado, and J. Arrieta.** 2000. Structural levansucrase gene (*lsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* **174**:111-119.

44. **Isopi, R., P. Fabbri, M. del Gallo, and G. Puppi.** 1995. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis* **18**:43-55.

45. **James, E. K.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* **65**:197-209.

46. **James, E. K., and F. L. Olivares.** 1998. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**:77-119.

47. **James, E. K., V. M. Reis, F. L. Olivares, J. I. Baldani, and J. Döbereiner.** 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.* **45**:757-766.

48. **Jiménez-Salgado, T., R. Aparicio Fabrè y J. Caballero-Mellado.** 1994. Detección de citocininas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de caña de azúcar. XVII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. La Habana, Cuba.

49. **Jiménez-Salgado, T., L. E. Fuentes-Ramírez, A. Tapia-Hernández, M. A. Mascarúa-Esparza, E. Martínez-Romero, and J. Caballero-Mellado.** 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3676-3683.

50. **Kassapis, S., E. R. Morris, M. Gross, and K. Rudolph.** 1994. Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. *Carbohydr. Polym.* **23**:55-64.

51. **Kirchhof, G., J. I. Baldani, V. M. Reis, and A. Hartmann.** 1998. Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. *Can. J. Microbiol.* **44**:12-19.

52. **Kirchhof, G., V. M. Reis, J. I. Baldani, B. Eckert, J. Döbereiner, and A. Hartmann.** 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant Soil* **194**:45-55.

53. **Kuhla, J., and J. Oelse.** 1988. Dependence of nitrogenase switch off upon oxygen stress on the nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **170**:5325-5329.

54. **Lee, S., A. Reth, D. Meletzus, M. Sevilla, and C. Kennedy.** 2000. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Bacteriol.* **182**:7088-7091.

55. **Li, R. P., and I. C. MacRae.** 1991. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* **23**:999-1002.

56. **Lima, E., R. M. Boddey, and J. Döbereiner.** 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N-aided nitrogen balance. *Soil Biol. Biochem.* **19**:165-170.

57. **Liu, M. C.** 1984. Sugarcane, p. 572-605. *In* W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato, Y. Yamada (ed). Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan Publishing, N. Y.
58. **Loison-Cabot, C.** 1992. Origin, phylogeny and evolution of pineapple species. *Fruits* 47:25-32.
59. **Loganathan, P., R. Sunlta, A. K. Parida, and S. Nair.** 1999. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. *J. Appl. Microbiol.* 87:167-172.
60. **Malik, K. A., B. Rakhshanda, S. Mehnaz, G. Rasul, M. S. Mirza, and S. Ali.** 1997. Association of nitrogen-fixing plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant Soil* 194:37-44.
61. **Martínez-Romero, E., and J. Caballero-Mellado.** 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:113-140.
62. **Merrick, M. J.** 1992. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria, p. 835-876. *In* G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, N. Y.
63. **Muthukumarasamy, R., G. Rebathi, and C. Lakshminarasimhan.** 1999. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biol. Fertil. Soils* 29:157-164.
64. **Muthukumarasamy, R., G. Rebathi, and M. Vadivelu.** 2000. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red-rot of sugarcane. *Curr. Sci.* 78:1063-1065.
65. **Nester, E. W., and T. Kosuge.** 1981. Plasmids specifying plant hyperplasias. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:531-565.
66. **Okon, Y., and C. A. Labandera-González.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil. Biol. Biochem.* 26:1591-1601.
67. **Orozco-Castillo, C., K. J. Chalmers, R. Waugh, and W. Powell.** 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87:934-940.
68. **Paula, M. A., V. M. Reis, and J. Döbereiner.** 1991. Interaccion of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol. Fertility Soils* 11:111-115.
69. **Paula, M. A., S. Urquiaga, J.O. Siqueira, and J. Döbereiner.** 1992. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biol. Fertil. Soils* 14:61-66
70. **Pelaez Abellan, I., R. De Armas Urquiza. M.-H. Valadier, and M. L. Champigny.** 1994. Short-term effect of nitrate on carbon metabolism of two sugar cane cultivars differing in their biomass production. *Phytochemistry* 36:819-833.
71. **Pieterse, C. M. J., and L. C. van Loon.** 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4:52-58.
72. **Quispel, A.** 1992. A search for signals in endophytic microorganisms, p. 471-491. *In* Verma, D. P. S. (ed.), Molecular signals in plant-microbe communications, CRC press. Boca Raton.

73. **Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek.** 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* **6**:139-144.
74. **Reis, V. M., and J. Döbereiner.** 1998. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* **171**:13-18.
75. **Reis, V. M., F. L. Olivares, A. L. Martinez de Oliveira, F. Buendós Reis Jr., J. I. Baldani and J. Döbereiner.** 1999. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant Soil* **206**:205-211.
76. **Reis, V. M., F. L. Olivares, and J. Döbereiner.** 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**:401-405.
77. **Rudnick, P., D. Meletzus, A. Green, L. He, and C. Kennedy.** 1997. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biol. Biochem.* **29**:831-841.
78. **Sevilla, M., D. Meletzus, K. Teixeira, S. Lee, A. Nutakki, I. Baldani, and C. Kennedy.** 1997. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biol. Biochem.* **29**:871-874.
79. **Sevilla, M., and C. Kennedy.** 1999. Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane, p. 737-760. *In* Triplett, E.W. (ed.), Prokaryotic nitrogen fixation. A model system for the analysis of a biological process. Horizon Scientific Press. Wymondham, U.K.
80. **Sevilla, M., A. De Oliveira, I. Baldani, and C. Kennedy.** 1998. Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition. A preliminary study. *Symbiosis* **25**:181-191.
81. **Sherestha R. K., and J. K. Ladha.** 1996. Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by nitrogen ¹⁵N dilution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **60**:1815-1821.
82. **Sievers, M., W. Ludwig, and M. Teuber.** 1994. Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodospila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the alpha-subclass of proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**:189-196.
83. **Sievers, M., H.-G. Schlegel, J. Caballero-Mellado, J. Döbereiner, and W. Ludwig.** 1998. Phylogenetic identification of two major nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. *System. Appl. Microbiol.* **21**:505-508.
84. **Sokollek, S. J., C. Hertel, and W. P. Hammes.** 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:935-940.
85. **Sprent, J. I. and E. K. James.** 1995. N₂-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation, p. 15-30. *In* I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, M. de Zamaroczy, (ed.), *Azospirillum* VI and related microorganism. Berlin, Springer-Verlag.
86. **Stackebrandt, E., and B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:816-849.

87. **Stephan, M. P., M. Oliviera, K. R. S. Teixeira, G. Martínez-Drets, and J. Döbereiner.** 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. **77**:67-72.
88. **Strobel, G. A., and D. M. Long.** 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. ASM News **64**:263-268.
89. **Swings, J.** 1992. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*, p. 2268-2286. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, Vol. III. Springer-Verlag, New York, N. Y.
90. **Tapia-Hernández, A., M. R. Bustillos-Cristales, T. Jiménez-Salgado, J. Caballero-Mellado, and L. E. Fuentes-Ramírez.** 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. Microb. Ecol. **39**:49-55.
91. **Teixeira, K. R. S., R. Galler, C. Kennedy, and J. I. Baldani.** 1994. Plasmid contents and *nif* genes detection in *Acetobacter diazotrophicus* strains, p. 273-281. In N. A. Hegazi, M. Fayez and Monib (ed.), Nitrogen fixation with non-legumes, The American University in Cairo Press.
92. **Teixeira, K. R. S., M. Wüiling, T. Morgan, R. Galler, E.-M. Zellermann, J. I. Baldani, C. Kennedy, and D. Meletzus.** 1999. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. **71**:521-530.
93. **Toukdarian, A., and C. Kennedy.** 1986. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: Isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. EMBO J. **5**:399-407.
94. **Urakami, T., J. Tamaoka, K.-I. Susuki, and K. Komagata.** 1989. *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomona methanolica* comb. nov. Intern. J. Syst. Bacteriol. **39**:50-55.
95. **Ureta, A., B. Alvarez, A. Ramón, M. A. Vera, and G. Martínez-Drets.** 1995. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. Plant Soil **172**:271-277.
96. **Urquiaga, S., K. H. S. Cruz, and R. M. Boddey.** 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. Soil Sci. Am. J. **56**:105-114.
97. **Yamada Y., K. Hoshino, and T. Ishikawa.** 1997. 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. Biotechnol. Biochem. **61**:1244-1251.
98. **Yamada, Y., K. Hoshino, and T. Ishikawa.** 1998. *Gluconoacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**:327-328.
99. **Yoneyama, T., T. Muraoka, T. H. Kim, E. V. Dacanay, and Y. Nakanishi.** 1997. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). Plant Soil **189**:239-244.

100. **Young J. P. W.** 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism, p. 43-86. *In* G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, New York.

ANEXO 2

BACTERIOCINAS: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano



16 de Mayo de 2003

JESÚS MUÑOZ ROJAS.
Presente.

Por este conducto me permito notificarle que su trabajo "BACTERIOCINAS: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano" está aceptado para publicación y aparecerá en línea en fecha próxima en la versión digital de Microbios en Línea de la que soy editora.

ATENTAMENTE.


DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO.
Investigador Titular "C" T.C.

BACTERIOCINAS: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano.

Jesús Muñoz-Rojas

Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal No. 565-A, Cuernavaca Morelos.

Los microorganismos poseen distintas formas para competir en su ambiente, una de ellas es la producción de sustancias antagónicas. Entre estas se incluyen antibióticos clásicos, algunos productos del metabolismo, agentes líticos, numerosos tipos de exotoxinas proteicas y bacteriocinas. La diversidad de estas sustancias inhibitorias es muy grande y muchas bacteriocinas han sido identificadas. No obstante, los orígenes evolutivos y la función que desempeñan en la mediación de las interacciones microbianas son aun poco conocidos. En esta revisión pretendemos dar un panorama global del conocimiento que se tiene sobre las bacteriocinas abarcando su purificación, diversidad, ecología, evolución y aplicaciones. Estas sustancias antagónicas son producidas tanto por bacterias como por arqueas y solo presentan capacidad antibiótica contra miembros de la misma especie que la produjo o especies muy relacionadas.

Introducción.

A través de la evolución los microorganismos han desarrollado distintas estrategias para competir por nutrientes en su medio ambiente, por ejemplo, algunos han mejorado sus sistemas de quimiotaxis (23, 74) y otros han elaborado compuestos antimicrobianos para inhibir a otros miembros del ambiente (48, 97, 104). Diversas son las sustancias antagónicas que los microorganismos producen para dominar en su hábitat, por ejemplo los antibióticos de amplio espectro (103), productos del metabolismo como ácidos orgánicos (64, 65), moléculas quelantes de hierro (sideróforos) (70) y bacteriocinas (116).

Las bacteriocinas son definidas como proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora (59, 116) **Figura 1.** En la naturaleza existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias (97). Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían ser producidas diferentes tipos de bacteriocinas (12). Se piensa que el 99% de todas las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (59). Las halobacterias, miembros del dominio Archaea, producen su propio tipo de bacteriocinas, las halocinas (123). Los microorganismos invierten una gran proporción de energía para la producción y elaboración de mecanismos

antimicrobianos. Aun cuando, no se sabe mucho de cómo la diversidad de estas sustancias aumenta y cual es la función que desempeñan las bacteriocinas en las comunidades microbianas, estas moléculas han servido como un modelo para tratar de responder algunas preguntas evolutivas y ecológicas.

Aislamiento y purificación de bacteriocinas.

La detección de cepas productoras de bacteriocinas de una especie bacteriana es el primer paso para los estudios de distribución y abundancia de la sustancia antimicrobiana, y es una etapa previa a la purificación de una sustancia antagonista. Un método para detectar la actividad antagonista de una cepa está esquematizado en la **figura 2**.

Debido a la naturaleza química extremadamente heterogénea de las bacteriocinas (59, 116) se ha requerido una amplia gama de metodologías para la purificación de estas moléculas. Hay pocos estudios que describen la estructura química de las bacteriocinas, debido a muchos problemas asociados con la purificación de estos péptidos antimicrobianos (12). Un aumento en la eficiencia del proceso de purificación contribuirá significativamente al entendimiento de la naturaleza química de las bacteriocinas. Algunos puntos importantes que se deben de considerar para la purificación de una bacteriocina serán comentados a continuación.

a) Producción de bacteriocinas.

Para propósitos de purificación es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes proporciones de cultivos antes de iniciar la purificación. La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento, por ejemplo las condiciones de incubación, como son la temperatura, el pH y el tiempo de incubación, influyen fuertemente en la producción de bacteriocinas activas (22, 29, 37, 61, 71, 79, 80). Las condiciones óptimas de producción deben ser determinadas para cada organismo productor (12).

La composición del medio de crecimiento también afecta grandemente a la producción de bacteriocinas (22, 116). En general los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de muchas bacteriocinas (130) como lo es para la producción de vitaminas en algunas bacterias (83). Por ejemplo la producción de bacteriocinas de bacterias lácticas se ve favorecida en medios que contienen cantidades significantes de péptidos con peso molecular en el rango de 3000 a 6000 Da. Sin embargo, el alto contenido de péptidos en estos medios ha interferido en el proceso de purificación dado que el peso molecular es semejante al de algunas bacteriocinas como por ejemplo con la lactocina B (2). Se ha demostrado que otros constituyentes de los medios también aumentan o interfieren en la producción y purificación de bacteriocinas (12), por ejemplo el Tween 80, un surfactante de medios complejos, interfiere en la purificación de bacteriocinas (72, 75, 126), además de que disminuye la actividad antimicrobiana de pediocina A (82) y lactocina S (72). El uso de

SDS ha contribuido en un incremento notable de la actividad de las bacteriocinas como la mesentericina 5 (19). La adición de NaCl al 4% permitió un aumento de actividad de plantaricina S y la detección de una segunda bacteriocina, llamada plantaricina T, en *Lactobacillus plantarum* (50).

En algunos casos el aumento de nutrientes no ocasiona un aumento en la producción de bacteriocinas (56). Se piensa que algunas cepas no producen más bacteriocina debido a que existe una inhibición por parte del producto final. La nisina producida por algunas bacterias es inhibida por altas concentraciones de nisina (55, 56). La concentración máxima de bacteriocina parece depender de la especie y aún de la cepa bacteriana (21, 56, 57). Desde este punto de vista, el medio ambiente y las modificaciones genéticas no cambiarían fácilmente la producción máxima de una bacteriocina por una cepa productora. Sin embargo, en diferentes estudios se ha demostrado que la producción de una bacteriocina puede ser aumentada. Usando un método de cultivo de dos fases donde la cepa productora de nisina fue removida de la fase acuosa (55), se permitió un aumento significativo de la cantidad de bacteriocina producida comparado con el método de cultivo convencional de una sola fase. Ha sido demostrado también que una cepa mutante espontánea resistente a eritromicina y productora de nisina, adquirió un aumento de resistencia a nisina y un aumento en la producción (86). En un estudio reciente la introducción de un plásmido pND300 dentro de una cepa productora de nisina tuvo como resultado el aumento en la concentración de esta bacteriocina (58). El plásmido pND300 acarrea 4 de 5 genes de resistencia/inmunidad y esos genes pudieron haber contribuido al aumento de nivel de nisina producida por una cepa productora. El análisis de la función de componentes individuales del sistema inmunidad/resistencia de una bacteriocina podrá permitir aumentos significativos en la tasa y nivel de producción de las bacteriocinas.

b) Técnicas de purificación.

Como se ha mencionado hay una gran diversidad de bacteriocinas, por tal razón no existe un método de elección o un protocolo general que nos permita purificarlas. Sin embargo una serie de pasos generales pueden servir de base para la purificación (figura 3). Algunos métodos tradicionales, como es el caso de la precipitación de proteínas por sulfato de amonio, han permitido concentrar algunas bacteriocinas a partir de los sobrenadantes de cultivos bacterianos (12). Sin embargo, esta metodología no ha resultado eficiente para todos los casos (75, 126). La extracción por solventes también ha sido reportada (108), aunque este es el método de elección para concentrar algunas bacteriocinas, no resulta óptimo para otras (82). La eficiencia de purificación debe ser medida en cada paso (anexo A), así se puede establecer cual es la ruta óptima de purificación.

Una vez que la muestra ha sido concentrada será necesario llevar a cabo un nivel de purificación mayor que difiere de acuerdo a la naturaleza química de la sustancia inhibitoria. En la Figura 3 se da un resumen que nos muestra de forma general las estrategias que se han seguido para purificar a las distintas bacteriocinas.

Diversidad de bacteriocinas

Bacteriocinas de bacterias Gram-negativas.

En bacterias Gram-negativas han sido descritas diferentes tipos de bacteriocinas (60, 106, 120). Las colicinas y las microcinas son las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas más reportadas (35, 38, 110, 113). Las microcinas son péptidos pequeños que alcanzan un tamaño hasta de 10 kD, en cambio las colicinas son proteínas relativamente grandes (110). Las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas más extensamente estudiadas son las colicinas que son producidas por *E. coli* y que comparten ciertas características entre ellas (4, 7, 16, 41, 49, 60, 85). Los grupos de genes que codifican a las bacteriocinas generalmente se localizan en plásmidos (38, 47, 110, 113), aunque también han sido descritas bacteriocinas codificadas en cromosoma (35). Los genes que codifican colicinas están compuestas por un gen de colicina, el cual codifica la toxina; un gen de inmunidad, el cual codifica una proteína que confiere inmunidad específica a la célula productora mediante unión e inactivación de la toxina; y un gen de lisis, el cual codifica una proteína involucrada en la liberación de la colicina mediante lisis de la célula productora. La producción de colicina es mediada por la respuesta del sistema SOS y por esta razón es principalmente producida en condiciones de estrés (30). Sin embargo, las condiciones específicas ambientales también influyen fuertemente en la producción de colicinas (62). La producción de la toxina es letal para la célula productora y para cualquier célula vecina reconocida por esa colicina; un dominio receptor en la proteína colicina que une un receptor de superficie de una célula específica determina el blanco de reconocimiento. Esta forma específica de reconocimiento propicia un rango filogenético relativamente estrecho de antagonismo frecuentemente referido para bacteriocinas. El modo de acción de las bacteriocinas varía desde la formación de poros en la membrana celular hasta la actividad de nucleasa contra blancos de ADN, ARN, y ARNt. Las colicinas formadoras de poro son proteínas grandes producidas por bacterias Gram-negativas cuyo tamaño varía desde 449 hasta 629 aminoácidos. Las colicinas con actividad de nucleasa tienen un tamaño más variable desde 178 hasta 777 aminoácidos (97).

Aún cuando las colicinas son representativas de bacterias Gram-negativas, éstas difieren de otras bacteriocinas. En *E. coli* las colicinas están codificadas exclusivamente en plásmidos (85) mientras que las piocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, han sido localizadas exclusivamente en el cromosoma (105). Las piocinas muestran similitud de secuencia a colicinas y otras bacteriocinas, aun no caracterizadas. Las bacteriocinas de *Serratia marcesens*, cercanamente relacionadas a la familia de colicina, se localizan tanto en plásmidos como en cromosomas (26, 33, 43).

Muchas bacteriocinas aisladas de bacterias Gram-negativas parecen haber sido creadas por recombinación entre regiones de ADN (del dominio estructural) que codifican las bacteriocinas existentes (7, 90, 100). En colicinas, el dominio central comprende alrededor del 50% de la proteína y está involucrado en el reconocimiento de receptores

específicos de superficie celular. El dominio N-terminal (aproximadamente 25% de la proteína) es responsable de la traslocación de la proteína dentro de la célula blanco. El resto de la proteína alberga el dominio tóxico y la región de inmunidad, la cual es una secuencia corta involucrada en la unión a una proteína de inmunidad. Aun cuando las piocinas producidas por *P. aeruginosa* forman un dominio estructural similar, los dominios de traslocación y reconocimiento del receptor están cambiados (105). La estructura de los dominios de esas toxinas es responsable en gran medida de la diversidad de bacteriocinas que encontramos en la naturaleza.

Bacteriocinas de bacterias Gram-positivas.

Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son abundantes y mas diversas que aquellas descritas a la fecha en bacterias Gram-negativas (48, 116). Ellas difieren de las bacteriocinas Gram-negativas en dos aspectos fundamentales. Primero, la producción de bacteriocinas no es necesariamente el evento letal como ocurre en bacterias Gram-negativas. Esta diferencia crítica se debe a que las bacterias Gram-positivas poseen mecanismos de transporte para la liberación de la bacteriocina (48) y algunas poseen un sistema de transporte específico de bacteriocinas, mientras otros emplean la vía de exportación dependiente de *sec*. En segundo término, las bacterias Gram-positivas han desarrollado una forma de regulación más compleja que el de las bacterias Gram-negativas. Además las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son en su mayoría péptidos (48).

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son capaces de producir distintos tipos de bacteriocinas. Klaenhammer propuso tres clases de bacteriocinas LAB (59). La clase I son los lantibióticos, llamados así porque ellos son modificados post-traduccionalmente. Estas sustancias contienen aminoácidos como lantionina y B-metillantionina, y muchos aminoácidos dehidratados (44, 104). Con base a las características estructurales y su modo de acción, los lantibióticos han sido subdivididos en dos subgrupos: A y B. Los lantibióticos tipo A inhiben a las células sensibles por despolarización de la membrana citoplasmática (3, 109), estos son mas grandes que los lantibióticos tipo B y su tamaño varía entre 21 y 38 aminoácidos. La nisina es un lantibiótico de tipo A y es la bacteriocina mejor estudiada de bacterias Gram-positivas (42). Los lantibióticos de tipo B tienen una estructura secundaria más globular y no exceden los 19 aminoácidos de longitud. Los lantibióticos de tipo B funcionan a través de inhibición enzimática. Un ejemplo es la mersacidina, la cual interfiere con la biosíntesis de pared celular (9).

Las bacteriocinas de las LAB de clase II son también pequeñas, con una variación de tamaño de 30 a 60 aminoácidos, son estables al calor y no contienen lantionina en los péptidos (59). Estas se subclasifican en 3 grupos: La clase IIa es el grupo más grande y sus miembros se distinguen por tener una secuencia amino terminal conservada (YGNGVXaaC) y una actividad compartida contra *Listeria*. Semejante a los lantibióticos de tipo A, las bacteriocinas de clase II actúan a través de la formación de poros en la membrana citoplasmática, algunos ejemplos incluyen la pediocina AcH (5), la sakacina A

(107) y la leucocina A (46). Las bacteriocinas de clase IIb así como la lactacina F (75, 76), la lactococcina G (78) y la lactococcina M (1), forman poros en las membranas de sus células blanco y están compuestas por dos proteínas que funcionan complementariamente. Un tercer subgrupo (IIc) ha sido propuesto, el cual consiste de bacteriocinas que son *sec*-dependientes (como la acidocina B) (66). La clase III de bacteriocinas son proteínas grandes y sensibles al calor, por ejemplo las helveticinas J y V (51, 127) y la lactocina B (2). Una clase adicional de bacteriocinas ha sido propuesta (IV), esta clase se caracteriza por incorporar grupos como carbohidratos o lípidos en la molécula para tener actividad. Poco es conocido acerca de la estructura y función de esta clase propuesta, algunos ejemplos incluyen la leuconocina S (10) y la lactocina 27 (124).

Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas y en particular los lantibióticos requieren mucho más genes para su producción de lo que requieren las bacterias Gram-negativas. Por ejemplo, la agrupación de genes necesarios para la síntesis de nisina incluyen un gen para el prepéptido (*nisA*), genes para enzimas que modifican aminoácidos (*nisB*, *nisC*), un gen para el rompimiento del péptido líder (*nisP*), un gen para la secreción (*nisT*), genes para la inmunidad (*nisI*, *nisFEG*) y genes para la regulación de expresión (*nisR*, *nisK*) (11, 27, 28, 52, 63, 87, 125). Estos grupos de genes se localizan generalmente en plásmidos, pero ocasionalmente son encontrados en el cromosoma. Muchas bacteriocinas de bacterias Gram-positivas, incluyendo la nisina, están localizadas en transposones (24).

Es conocido que el rango de acción inhibitoria de las bacteriocinas Gram-positivas se restringe a bacterias Gram-positivas. Sin embargo, el rango de acción puede variar significativamente, desde un rango relativamente estrecho como en el caso de lactococcinas A, B, y M, las cuales solamente inhiben a *Lactococcus* (99), hasta un rango extraordinariamente amplio. Por ejemplo, algunos lantibióticos de tipo A así como la nisina A y la mutacina B-Ny266 son capaces de aniquilar un amplio rango de organismos incluyendo *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (73). Contrario a lo que se conoce para otras bacteriocinas, la nisina A y la mutacina B-Ny266 son también activas contra un número de bacterias Gram-negativas de importancia médica incluyendo *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* y *Neisseria* (73). La producción de bacteriocinas en bacterias Gram-positivas está generalmente asociada con el cambio de la fase log a la fase estacionaria. La producción de nisina inicia durante la fase media logarítmica y aumenta a un máximo cuando las células entran a la fase estacionaria (11). La regulación de expresión no es dependiente del ciclo celular, sino de la densidad del cultivo. Ha sido demostrado que la nisina A actúa como una feromona proteica en la regulación de su propia expresión, lo cual es controlado por un sistema típico de transducción de señales de dos componentes de

muchos sistemas que censan el quórum (quorum sensing). Los genes involucrados son *nisR* (el regulador de respuesta) y *nisK* (la kinasa sensora) (20).

Bacteriocinas de Archaea

El dominio Archaea produce su propia familia de compuestos antimicrobianos conocidos como archaeocinas. La familia de halocinas producidas por halobacterias es la única caracterizada y pocas halocinas han sido descritas en detalle (14, 98). La primera halocina descubierta, S8, es un péptido hidrofóbico corto de 36 aminoácidos, cuya proteína precursora es de 34 kD (84). La halocina S8 es codificada por un megaplásmido y es muy resistente; esta puede ser desalinada, hervida, sujeta a solventes orgánicos y almacenada a 4°C por periodos extensos sin pérdida de actividad. El mecanismo de acción ha sido establecido unicamente para la halocina H6 (un inhibidor antiporter Na^+/H^+) y el mecanismo de inmunidad es aun desconocido (122). Cuando las fuentes de nutrientes son limitadas las células productoras lisan a las células sensibles y enriquecen de nutrientes al medio ambiente local, así las proteínas estables pueden permanecer en el medio ambiente el tiempo necesario para inhibir a sus competidores en subsecuentes condiciones de flujo de nutrientes.

Evolución de bacteriocinas.

Los estudios evolutivos de bacteriocinas son de gran relevancia para entender su diversidad, generación de nuevas formas y su impacto ecológico. Algunos estudios de evolución detallados han sido realizados con las colicinas y las klebicinas.

Los estudios evolutivos de colicinas han revelado dos formas principales de su evolución (119), la diversificación por recombinación y la diversificación por selección. Los dos modos principales de acción de las colicinas, la formación del poro y la actividad nucleasa, representan las formas de evolución de estas moléculas antagónicas (92). Los estudios realizados han incluido la comparación de secuencia de ADN y proteínas (7, 90), el análisis del polimorfismo de la secuencia de ADN en aislados naturales (81, 96, 118), la evolución experimental (40, 117) y la modelación matemática (39).

Las colicinas mas abundantes formadoras de poro son generadas por el intercambio de dominios, lo cual esta regulado por recombinación (7, 119). Se ha observado que existen altos niveles de similaridad de secuencia entre una o más regiones de las colicinas formadoras de poro. La existencia de secuencias compartidas y divergentes en las colicinas sugiere una recombinación frecuente. Por ejemplo la klebicina nucleasa posee dominios compartidos con la secuencia de una colicina formadora de poro denominada "A-like" y una piocina nucleasa denominada "S1-like" (95). Dicho intercambio de dominios entre bacteriocinas es responsable en gran parte de la variabilidad observada entre bacteriocinas Gram-negativas. Se ha observado que la diversificación por recombinación no está limitada a las bacteriocinas de bacterias entéricas relacionadas cercanamente. Por ejemplo la piocina

S de *P. aeruginosa* es el resultado de recombinación entre muchas colicinas formadoras de poro y con actividad de nucleasa con otras bacteriocinas (105, 106).

Un modo alternativo de evolución es propuesto para las colicinas de tipo nucleasa. Este tipo de colicinas comparten un ancestro común reciente y poseen funciones de ARNasa y ADNasa. Sus secuencias de ADN son muy similares, en el rango de 50 a 97% de identidad. Sin embargo, algunas colicinas con actividad nucleasa tienen más altos sus niveles de divergencia en la región de inmunidad. Para explicar este patrón de divergencia se ha propuesto un proceso de dos pasos de mutación y selección (90, 91, 119). En la hipótesis de diversificación por selección se propone la acción de una selección positiva muy fuerte que actúa sobre mutaciones que generan nueva inmunidad y funciones antagónicas. El primer evento de este proceso es una mutación del gen de inmunidad que resulta en una función de inmunidad ampliada. La célula productora resultante es ahora inmune a la versión ancestral de la colicina y ha ganado inmunidad sobre algunas colicinas similares. Esta nueva función de inmunidad aumenta el éxito de la cepa productora en poblaciones donde existen múltiples colicinas, como es el caso de las poblaciones de *E. coli* muestreadas (40, 94). Posteriormente acontece una segunda mutación, esta vez en el gen de colicina. Estas dos mutaciones producen una nueva colicina que no será reconocida por la proteína de inmunidad ancestral. Por tal motivo la bacteria con la nueva colicina rápidamente eliminará al linaje ancestral y se convertirá en la cepa productora más abundante. Esta cepa bacteriana que posee una colicina evolucionada posteriormente será remplazada por otra cepa con una nueva colicina, repitiéndose el mismo ciclo indefinidamente. Las colicinas formadoras de poro Y (93) y U (110) están cercanamente relacionadas y tienen un patrón de substitución de ADN idéntico al observado entre las colicin nucleasas, con un elevado nivel de substitución en la región de inmunidad. Esta observación sugiere que el proceso de diversificación por selección no está restringido a colicinas de tipo nucleasa (97). Sin embargo, los procesos evolutivos pueden ser más complejos de lo que estas dos teorías sugieren.

Un modelo de evolución de diversificación de colicinas que involucra dos etapas ha sido desarrollado por Riley (92). Cuando las colicinas no son abundantes, como es actualmente el caso de la mayoría de las colicinas tipo nucleasa, la frecuencia de mutaciones puntuales que alteran la función de inmunidad puede ser la manera principal para la generación de nuevos fenotipos de bacteriocinas. Las nuevas funciones de inmunidad y actividad antagónica son rápidamente seleccionadas y permiten a la célula sobrevivir en presencia de otras bacteriocinas. Esas nuevas bacteriocinas son mantenidas hasta que nuevas funciones de inmunidad o de antagonismo emergen. Cuando las colicinas son abundantes, como es el caso de muchas colicinas formadoras de poro, el intercambio de dominios puede ser la forma mas frecuente de diversificación.

Algunas bacteriocinas entéricas no tienen similaridad con aquellas caracterizadas previamente, un ejemplo es la colicina Js (111). Esta bacteriocina plasmídica tiene una

agrupación típica de genes de colicina, con genes de toxicidad, inmunidad y lisis. Sin embargo, la organización de los grupos de genes es única ya que el gen de lisis es transcrito 5' al gen de toxina. Los genes en si no muestran similitud a otros genes de bacteriocinas conocidas y la toxina codificada es de 94 aminoácidos lo cual es más pequeño que cualquier otra colicina descrita. Entre mas se explore la diversidad de bacteriocinas, el modelo de evolución de estas sustancias será mas variado y complejo (97).

Función ecológica de las bacteriocinas

Se han realizado pocos estudios experimentales sobre la función ecológica de las bacteriocinas (31, 45, 53, 112), y sus resultados no han sido del todo concluyentes. Se piensa que las bacteriocinas podrían servir como antagonistas que impiden o limiten la invasión de una cepa dentro de una comunidad microbiana establecida. Cuando las fuentes de nutrientes son limitadas las células productoras lisan a las células sensibles y enriquecen de nutrientes al medio ambiente local. Una función adicional ha sido recientemente propuesta para bacteriocinas de Gram-positivas, en la que ellas median señales de “quorum sensing” (55). Es posible que las funciones de una bacteriocina cambien como consecuencia de cambios bióticos o abióticos del medio ambiente. Recientemente ha sido establecida una base teórica y empírica que ha definido las condiciones que favorecen el mantenimiento de bacterias productoras de toxinas tanto en las poblaciones como en las comunidades. Modelando la acción de las colicinas Chao y Levin mostraron que la invasión de una cepa productora de colicinas fue favorecida en un medio ambiente estructurado espacialmente comparado con uno no estructurado (13). En un medio ambiente no estructurado, una pequeña población de productoras no podrá invadir una población establecida de células sensibles. Esto ocurre porque las productoras pagan un precio por la elaboración de la toxina (los costos energéticos de acarrear un plásmido y producción de letalidad) pero los beneficios, las fuentes disponibles para matar a los organismos sensibles, son distribuidos al azar. Por esta razón, cuando las productoras son raras, la reducción de la tasa de crecimiento experimentada por la cepa sensible (debido a antagonismo) es mas pequeña comparada con la reducción sufrida por la cepa productora (debido a sus costos), y la población de la cepa productora de esta forma se extingue. En un medio estructurado físicamente, como en la superficie de una placa de agar las cepas crecen como colonias separadas. Las toxinas difunden fuera de una colonia de productoras, matando a las vecinas sensibles. Las fuentes disponibles se acumulan más cercanamente a la colonia productora y de esta forma el antagonismo puede aumentar en frecuencia aun cuando inicialmente haya sido raro.

En un modelo reciente se ha introducido el concepto de una tercera especie que es resistente a la bacteriocina pero que es incapaz de producirla (18, 54). La resistencia puede ser conferida a través de mutaciones tanto en el sitio de unión o en la maquinaria de traslocación requerida por una bacteriocina para entrar a la célula blanco. La adquisición de

un gen de inmunidad también conferirá resistencia a su bacteriocina afín. En estos estudios se asume razonablemente que hay un costo de resistencia, y que este costo es menor que el costo de producción de la bacteriocina requerido por la célula antagonista (32). Con este tercer miembro, las interacciones entre las cepas asemejan un juego de piedra, papel o tijeras Fig. 4 (54, 67). La cepa productora derrota a la cepa sensible, debido al efecto de la bacteriocina sobre la última. La cepa sensible vence a la cepa resistente (no productora) porque solamente en la última hay costos energéticos para mantener la resistencia, y la cepa resistente gana contra la cepa productora porque la última enfrenta los altos costos de producción y liberación de la toxina mientras la otra paga solamente los costos de resistencia. En un medio ambiente no estructurado, este juego permite periodos cíclicos, en los cuales los tres tipos coexisten indefinidamente pero cada uno con fluctuaciones de abundancia. En un medio ambiente estructurado, este juego permite un equilibrio global casi estable, en el cual las tres cepas pueden persistir con una abundancia global casi constante (18).

Recientemente se han incorporado algunos efectos evolutivos dentro del modelo de Czárán y colaboradores (2002). Esto ha permitido que muchos sistemas distintos de producción de toxinas, sensibilidad y resistencia como el de Craven y colaboradores (1971) (17), se integren junto con los procesos de mutación y recombinación genética (18). Las permutaciones de esos sistemas permiten la existencia de muchas cepas diferentes. De esta complejidad inicial emergen dos condiciones distintas de cuasi-equilibrio, los estados de “congelación” y de “hiperinmunidad”. En el estado congelado, todas las toxinas son mantenidas globalmente, pero la mayoría de colonias son productoras de una sola toxina. Esto es, cada colonia produce una bacteriocina a la cual es también inmune. En contraparte, en el estado de hiperinmunidad, muchas colonias no producen toxinas, muchas otras hacen una, aún otras producen muchas toxinas, pero solo unas pocas producen la mayoría de toxinas disponibles. Cual de esos dos resultados es obtenido dependerá de las condiciones iniciales. El estado de congelamiento resulta cuando los sistemas inician la evolución con la población entera sensible a las bacteriocinas. El estado de hiperinmunidad es alcanzado si el sistema inicia con suficiente diversidad en donde la mayoría de colonias existentes tienen características de antagonismo y resistencia múltiples. Diversos ensayos de producción de colicinas en ambientes naturales sugiere que las poblaciones de *E. coli* pueden acercarse a las predicciones del modelo de Czárán (40, 94). En *E. coli*, las cepas productoras son encontradas en el rango de frecuencias de 10-50%. Las cepas resistentes son más abundantes en el rango de 50-98%, de hecho la mayoría de las cepas son resistentes a todas las colicinas existentes. No obstante, hay una pequeña población de células sensibles (40). El modelo de Czárán predice esta distribución de resultados de frecuencia de transferencia horizontal de resistencia y el costo significativo de producción de colicinas (18).

Finalmente es necesario hacer una reflexión. Nosotros asumimos que las bacteriocinas desempeñan un papel importante en la mediación de la dinámica dentro de las

especies (o a nivel de las poblaciones). Esta suposición está basada en el rango estrecho de acción exhibido por la mayoría de las bacteriocinas. Sin embargo, se ha cuestionado esta suposición debido a que en algunos trabajos se ha explorado el antagonismo entre cepas de la misma especie que la productora o bien un rango muy estrecho de la población. Además el rango de antagonismo varía significativamente para diferentes bacteriocinas. Si el objetivo es entender la función que desempeñan esas toxinas en la naturaleza, nuestros experimentos deben incorporar comunidades microbianas más complejas y medios ambientes más diversos (97).

Aplicación de bacteriocinas.

Aplicaciones en alimentos

Un amplio rango de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (LAB por sus siglas en inglés) han sido investigadas intensamente permitiendo su caracterización química detallada (99). Debido a que las LAB han sido usadas por siglos para comidas fermentadas, ellas son generalmente consideradas como seguras por la FDA (Food and drug administration) de US. Esto permite su uso en la fermentación de alimentos sin una aprobación adicional. La nisina fue la primer bacteriocina en ser aislada y aprobada para ser usada en alimentos específicamente para prevenir el brote de esporas de *Clostridium botulinum* en quesos distribuidos en Inglaterra (15). El uso de nisina tiene una larga historia y actualmente es usada como preservativo seguro de comida en alrededor de 48 países diferentes siendo aprobada por la FDA en 1988 (99).

La atención de los investigadores de bacteriocinas se enfocó en la bacteria *Lysteria monocytogenes*, agente causal de listeriosis, debido a que la frecuencia de brotes de esta infección aumentó combinada con la resistencia natural del agente causal. Además el estudio de esta bacteria fue interesante debido a su capacidad de crecer a temperaturas cercanas a la refrigeración que se utilizan para la preservación tradicional de comida. Esto condujo al aislamiento de un gran número de bacteriocinas de clase IIa, las cuales son altamente activas contra *L. monocytogenes* (29). Las bacteriocinas también han sido usadas en carne curada, leche, queso y pasta de soya (97). Se ha desarrollado gelatina de pediodicina, una bacteriocina de clase IIa hecha por bacterias productoras de ácido láctico, que protegen a los hot-dogs de la contaminación bacteriana (88). Una cepa productora de pediodicina también ha sido adicionada a embutidos y se ha encontrado una reducción del número de bacterias unas 10 000 veces respecto al número en embutidos no tratados. Además la pediodicina activa fue encontrada en los embutidos dos meses después de la refrigeración. Otro ejemplo de una bacteriocina que podría usarse en la industria alimenticia es la piscicolina, una bacteriocina de otra bacteria productora de ácido láctico (88). La piscicolina ya ha sido patentada y pronto será usada en productos de carne y para lavar ensaladas verdes (88).

Una preocupación acerca del uso de bacteriocinas para la preservación de comida es la selección de cepas resistentes. Estudios con LAB han mostrado la generación de cepas resistentes a la actividad de bacteriocinas después de haber expuesto la cepa sensible a 25 ciclos de crecimiento sucesivo en presencia de la bacteriocina (25). El tratamiento con una combinación de bacteriocinas, por ejemplo nisina y bacteriocina de clase IIa, podrían reducir teóricamente la incidencia de resistencia (6, 128). Un problema adicional es si la resistencia a una clase de bacteriocina LAB puede resultar en una resistencia cruzada con otra clase de bacteriocina (6, 114). Sin embargo, la naturaleza química muy diversa de las bacteriocinas propone modos de acción diferentes, lo que conduce a pensar que una resistencia cruzada es más difícil de obtener. No obstante, ha sido reportada una resistencia cruzada entre diferentes bacteriocinas dentro de la clase IIa (89).

Aplicaciones biomédicas

Aunque en la medicina veterinaria se han usado tradicionalmente los antibióticos para el tratamiento profiláctico y terapéutico, las bacteriocinas ofrecen un tratamiento alternativo que puede tener algunas ventajas (99). La idea de usar bacteriocinas en el área de veterinaria surgió en los años 1940's, desde entonces la nisina fue evaluada como una alternativa en el tratamiento de mastitis. Aun cuando la nisina ofreció resultados positivos en el tratamiento de la mastitis, algunos problemas de irritación fueron encontrados, lo cual fue debido posiblemente a impurezas en las preparaciones de nisina (121). Ha sido demostrado recientemente que la nisina es inhibitoria de los principales patógenos Gram-positivos involucrados en la mastitis como cepas de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* (8). La lacticina 3147 también posee actividad bactericida contra la mayoría de las bacterias responsables de la mastitis (102). La lacticina 3147 ha sido investigada en su potencial para inhibir a patógenos humanos resistentes a diversos antibióticos (36) como es el caso de *S. aureus*, resistente a meticilina; *Enterococcus faecalis*, resistente a vancomicina; *Pneumococcus*, *Propionibacterium acne* y *Streptococcus mutans*, resistentes a penicilina. Una población de alrededor de 10^4 células fue eliminada en las primeras dos horas usando una solución de 20,000 UA/ml de lacticina 3147. Estudios posteriores serán requeridos para confirmar el potencial de esta bacteriocina.

El aumento y diseminación rápida de bacterias patógenas multiresistentes ha forzado la consideración de métodos alternativos para combatir infecciones (77, 101). Una de las limitaciones de usar antibióticos de amplio espectro es que ellos matan a casi cualquier especie bacteriana sensible. Debido al amplio espectro de los antibióticos y al uso inmoderado se ha provocado una presión de selección muy fuerte para la evolución de resistencia a antibióticos tanto en bacterias comensales como con patógenas (129). Las soluciones actuales a este dilema involucran el desarrollo de métodos más racionales de uso de antibióticos, lo cual involucra reducción de la prescripción de drogas para cualquier otra enfermedad que no sean infecciones, el uso alternado de diferentes drogas en un periodo corto de tiempo y la educación de la población acerca de los antibióticos (68, 115). Las

bacteriocinas podrían ofrecer una solución alternativa. Con su espectro relativamente reducido de actividad antagónica, las bacteriocinas pueden ser consideradas “drogas diseñadas” cuyos blancos específicos serían bacterias patógenas (97). Dada la diversidad de estas moléculas en la naturaleza, será una tarea relativamente sencilla encontrar bacteriocinas activas contra patógenos específicos de humanos. El desarrollo y uso de dichos antimicrobianos de espectro reducido no solamente aumentará el número de drogas de uso farmacéutico, sino además, prolongará su vida. Esta última característica emerge debido a que con una droga diseñada, cada antibiótico será usado con una frecuencia muy baja, lo cual conllevará a una reducción en la intensidad de selección de resistencia. Desde un punto de vista ecológico y evolutivo, el uso de antimicrobianos de espectro reducido representa una redirección de la abundancia de los patógenos bacterianos multiresistentes (97). Esto permitirá una reducción de la muerte colateral de no patógenos, como las especies comensales, con un cambio que permitirá una disminución en niveles de infección nosocomial. Esto también disminuirá la intensidad de selección de resistencia a antibióticos. Así con pocas especies de bacterias antagonizadas por cada droga diseñada, la resistencia a antibióticos evolucionará y se ampliará más lentamente. Aún falta mucho por investigar con relación al uso de bacteriocinas y no se debe perder en ningún momento de vista que la mayoría de bacteriocinas son proteicas por lo que será necesario evaluar en cada caso si producen respuesta inmunológica en los humanos.

Conclusiones.

Las bacteriocinas representan uno de los sistemas de defensa microbiana mejor estudiados. Aun cuando no se conoce mucho acerca de sus relaciones evolutivas y sus papeles ecológicos, es claro que su abundancia y diversidad denotan que son el armamento de elección microbiana. El humano puede aprovechar esta gran diversidad de moléculas para usarlas como inhibidores de microorganismos patógenos en los alimentos y como antibióticos alternativos de rango reducido en medicina humana y veterinaria, sustituyendo a los antibióticos de espectro amplio. Evitando de esta forma la aparición de cepas multiresistentes.

Agradecimientos.

Agradezco a la Doctora Esperanza Martínez-Romero por sus valiosos comentarios sobre este trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-México y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP)-UNAM por el apoyo económico que otorgaron durante mis estudios doctorales.

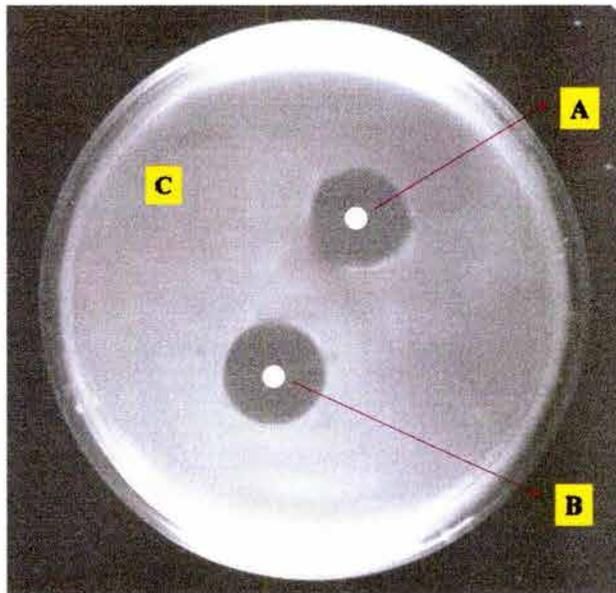


Figura 1. Efecto antagónico observado entre cepas del género *Gluconacetobacter*. A y B representan las cepas que fueron ensayadas como productoras y que inhiben la cepa ensayada como sensible (C).

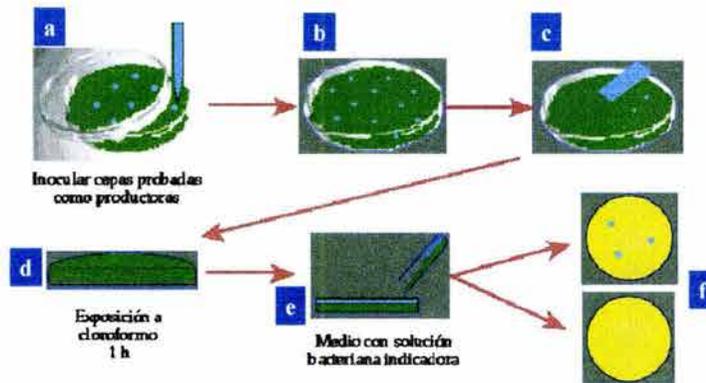


Figura 2. Protocolo de búsqueda de cepas productoras de sustancias inhibitorias. La cepa que se desea probar como productora es inoculada en un medio de cultivo en placa (a) y se incuba bajo las condiciones y tiempos adecuados de acuerdo con el tipo de bacteria. Una vez que las colonias han crecido (b), las colonias son removidas del medio de cultivo con ayuda de un portaobjetos estéril (c) e inmediatamente después las placas son invertidas en vapores de cloroformo para eliminar a las cepas ensayadas como productoras (d). Después de 1 hr las placas son nuevamente invertidas para evaporar el exceso de cloroformo y es colocada una segunda capa de bacterias que se desean ensayar como indicadoras (e). Las placas se incuban bajo las condiciones y tiempos adecuados para cada especie bacteriana. Si después del tiempo de incubación es observado un halo de inhibición entonces las bacterias ensayadas como productoras son capaces de elaborar una o más sustancias antagónicas contra la cepa ensayada como indicadora a la cual se le denominará sensible. Este método es denominado método de agar en doble capa.

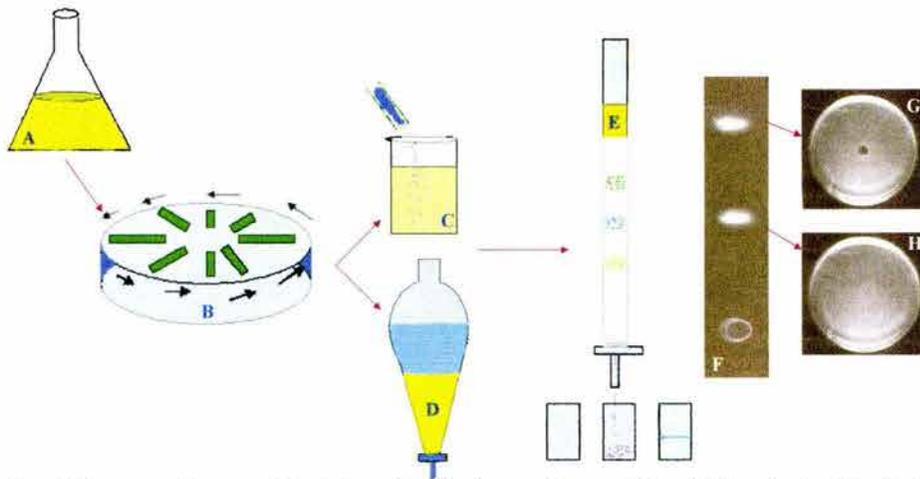


Figura 3. Representación esquemática de la purificación de sustancias antagonistas. A) El medio de cultivo líquido debe contener un crecimiento bacteriano de 10^8 UFC/ml aproximadamente. B) El cultivo bacteriano es centrifugado para separar el sobrenadante del paquete celular. Las sustancias inhibitorias son concentradas a partir del sobrenadante, por ejemplo mediante la precipitación por sulfato de amonio (C) o mediante extracción por solventes (D). La purificación de la sustancia se realiza por cromatografía (E). El tipo de cromatografía utilizada dependerá de la naturaleza química de la sustancia inhibitoria. En cada paso de la purificación deberá corroborarse la actividad antagonista de la sustancia inhibitoria goteando la sustancia purificada sobre un tamiz de bacteria sensible. La fracción purificada debe conservar las características antagonistas sobre la cepa sensible (Anexo 1). En esta figura se muestra un cromatograma en sílica donde un extracto ha sido purificado parcialmente (F). Observe que una banda posee actividad antagonista (I) y la otra no (H).

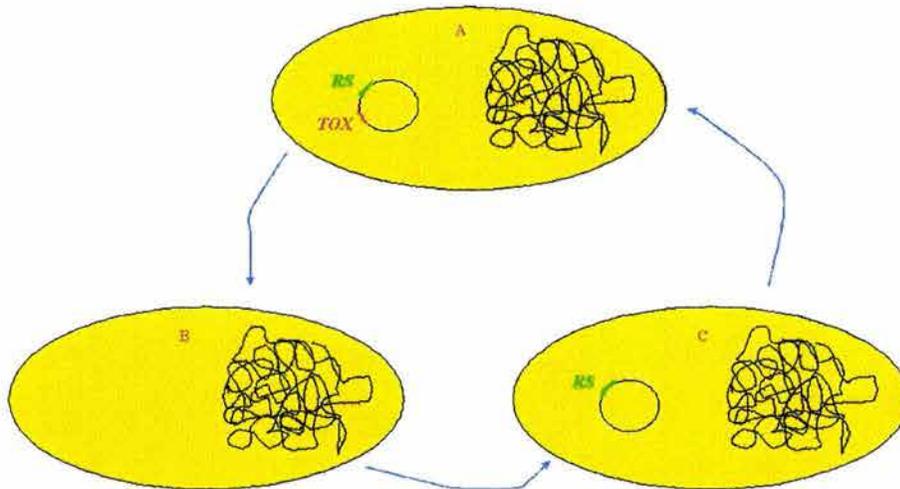
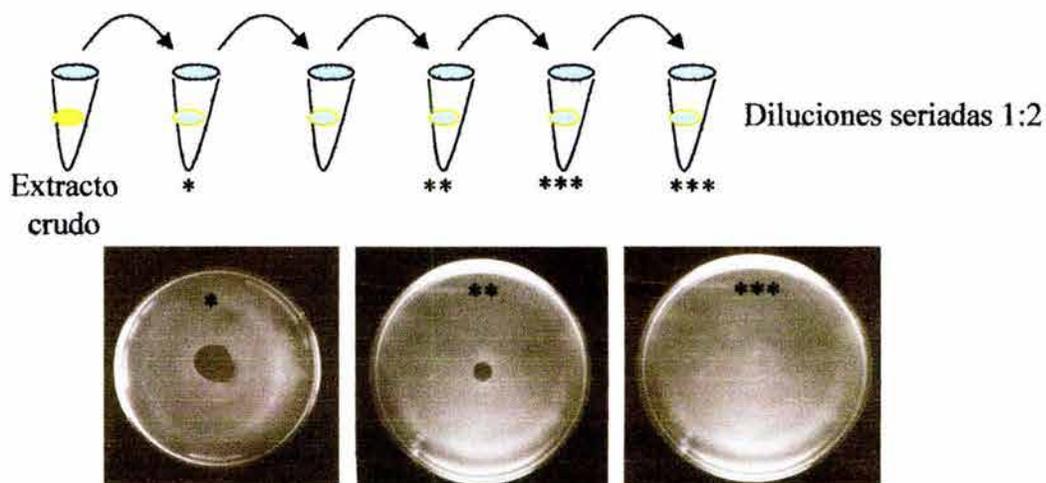


Figura 4. Esquema que representa la interacción entre un grupo de cepas de la misma especie bacteriana con diferentes características de antagonismo. La interacción asemeja el juego de piedra papel o tijeras. La cepa A es productora de bacteriocina e inhibe a la cepa B que es sensible a dicha actividad. La cepa B es más competitiva que la cepa C ya que esta no porta genes de resistencia ni plásmidos por lo tanto su gasto energético es menor. La cepa C a su vez es más competitiva que la cepa A porque no tiene que gastar energía para producción de toxina y a su vez es resistente a la toxina que produce A. *RS* (genes de resistencia a la toxina), *TOX* (genes de producción de toxina).

Anexo A.

Para medir la eficiencia en cada paso de purificación de una bacteriocina es necesario determinar la actividad antagonica de dicha molécula. El ensayo clásico consiste en realizar diluciones seriadas 1:2 a partir de la muestra original o extracto crudo. 10µl de cada dilución son colocados en placas de agar suave, conteniendo el medio de cultivo adecuado. Posteriormente es colocada una segunda capa de agar, antes de gelificar, conteniendo a las cepas sensibles. Después del tiempo adecuado de crecimiento de la cepa indicadora (sensible) se llevan a cabo las lecturas correspondientes y se define la actividad inhibitoria en unidades arbitrarias. Una unidad arbitraria es el recíproco de la dilución más alta que causa una zona de inhibición visible sobre la capa de la bacteria indicadora. Parente y col. (1994) compararon dos métodos para la medición de la actividad de 4 bacteriocinas (enterocina 1146, lactococcina 140, leucocina F10 y nisina). Los ensayos fotométricos ofrecieron estimados más reproducibles que los obtenidos por ensayos de difusión en pozos. Los estimados de actividad de los ensayos cuantitativos fotométricos estuvieron en acuerdo con los ensayos de dilución para bacteriocinas. El método fotométrico es mas rápido, ya que se elimina la necesidad de diluir la muestra y se evita que las lecturas sean realizadas hasta que una cepa indicadora crece. Si embargo un método fotométrico solo puede ser llevado a cabo cuando conocemos la longitud de onda en la que la molécula absorbe, lo cual generalmente se conoce cuando la sustancia ha sido purificada.



Las fotos representan la actividad antagonica de algunas de las diluciones de un purificado. Mostrando una actividad de alrededor de 800 UA/ml. Este valor se obtuvo ya que se multiplicó el recíproco de la dilución mas alta con actividad antagonica (8) por el recíproco de la última dilución (100), la cual fue debida a que solo fueron examinados 100 µl de muestra.

REFERENCIAS

- 1) **Abee, T.** 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters* **129**:1-10.
- 2) **Barefoot, S. F., y T. R. Klaenhammer.** 1984. Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**:328-334.
- 3) **Belkum, M. J., B. J. Hayema, A. Geis, J. Kok, y G. Venema.** 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1187-1191.
- 4) **Benedetti, H., y V. Geli.** 1996. Colicin transport, channel formation and inhibition. *Hand. Biol. Phys.* **2**:665-691.
- 5) **Bhunia, A. K., M. C. Johnson, y B. Ray.** 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* **2**:319-322.
- 6) **Bouttefroy, A., y J. Milliere.** 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.* **62**:65-75.
- 7) **Braun, V., H. Pils, y P. Groß.** 1994. Colicins: structures, modes of actions, transfer through membranes, and evolution. *Arch. Microbiol.* **161**:199-206.
- 8) **Broadbent, J. R., C. Chou, K. Guillies, y J. K. Kondo.** 1989. Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* **72**:3342-3345.
- 9) **Brotz, H., G. Bierbaum, A. Markus, E. Molitor, y H. G. Sahl.** 1995. Mode of action of the lantibiotic mersacidin-inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:714-719.
- 10) **Bruno, M. E. C., y T. J. Montville.** 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3003-3010.
- 11) **Buchman, G., S. Banerjee y J. Hansen.** 1998. Structure, expression and evolution of gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**:16260-16266.
- 12) **Carolissen-Mackay, V., G. Arendse, y J. W. Hastings.** 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* **34**:1-16.
- 13) **Chao, L., y B. R. Levin.** 1981. Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:6324-6328.
- 14) **Cheung, J., K. Danna, E. O'Connor, L. Price, y R. Shand.** 1997. Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *J. Bacteriol.* **179**:548-551.
- 15) **Chung, K., J. Dickson, y J. Creouse.** 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1329-1333.
- 16) **Cramer, W. A., J. B. Heymann, S. L. Schendel, B. N. Deriy, y F. S. Cohen.** 1995. Structure-function of the channel-forming colicins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**:611-641.
- 17) **Craven, J. A., O. P. Miniats, y D. A. Barnum.** 1971. Role of colicins in antagonism between strains of *Escherichia coli* in dual-infected gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* **32**:1775-1779.
- 18) **Czárán, T. L., R. F. Hoekstra, y L. Pagie.** 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:786-790.
- 19) **Daba, H., S. Pandian, J. F. Gosselin, R. E. Simard, J. Huang, y C. Lacroix.** 1991. Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3450-3455.
- 20) **De Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, y W. M. de Vos.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3662-3667.

- 21) **De Vuyst L.** 1994. Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains. *Biotechnol. Lett.* **16**:287-292.
- 22) **De Vuyst, L.** 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:28-33.
- 23) **De Weert, S., H. Vermeiren, I. H. Mulders, I. Kuiper, N. Hendrickx, G. V. Bloemberg, J. vanderleyden, R. De Mot, y B. J. Lugtenberg.** 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**:1173-1180.
- 24) **Dodd, H. M., N. Horn, y M. J. Gasson.** 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **136**:555-566.
- 25) **Dykes, G. A., y J. W. Hastings.** 1998. Fitness cost associated with class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* b73. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**:5-8.
- 26) **Enfedaque, J., S. Ferrar, J. F. Guasch, J. Tomas y M. Regue.** 1996. Bacteriocin 28b from *Serratia marcescens* N28b: identification of *Escherichia coli* surface components involved in bacteriocin binding and traslocation. *Can. J. Microbiol.* **42**:19-26.
- 27) **Engelke, G., Z. Gutowski-Eckel, M. Hammelman, y K. D. Entian.** 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the nisb protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3730-3743.
- 28) **Engelke, G., Z. Gutowskieckel, P. Kiesau, K. Siegers, M. Hammelman, y K. D. Eltian.** 1994. Regulation of nisin byosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:814-825.
- 29) **Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, y A. Ishizaki.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:85-106.
- 30) **Eraso, J. M., M. Chidambaram, y G. M. Weinstock.** 1996. Increased production of colicin E1 in stationary phase. *J. Bacteriol.* **178**:1928-1935.
- 31) **Feldgarden, M., S. Golden, H. Wilson, y M. A. Riley.** 1995. Can phage defense maintain colicin plasmids in *Escherichia coli*? *J. Microbiol.* **141**:2977-2984.
- 32) **Felgarden, M., y M. A. Riley.** 1998. The phenotypic and fitness effects of colicin resistance in *Escherichia coli* K-12. *Evolution* **53**:1019-1027.
- 33) **Ferrer, S., M. B. Viejo, J. F. Guasch, J. Enfedaque, y M. Regue.** 1996. Genetic evidence for an activator required for induction of colicin-like bacteriocin 28b production in *Serratia marcescens* by DNA-damaging agents. *Am. Soc. Microbiol.* **178**:951-960.
- 34) **Franz, CMAP., U. Schillinguer, y W. H. Holzapfel.** 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. food Microbiol.* **29**:255-270.
- 35) **Gaggero, C., F. Moreno, y M. Lavina.** 1993. Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* **175**:5420-5427.
- 36) **Galvin, M., C. Hill, y R. P. Ross.** 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**:355-358.
- 37) **Geisen, R., B. Becker, y W. H. Holzapfel.** 1993. Bacteriocin production of *Leuconostoc carnosum* LA54A at different combinations of pH and temperature. *J. ind. Microbiol.* **12**:337-340.
- 38) **Gonzalez-Pastor, J. E., J. L. San Millan, M. A. Castilla, y F. Moreno.** 1995. Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *J. Bacteriol.* **177**:7131-7140.
- 39) **Gordon, D., y M. A. Riley.** 1999. A theoretical and empirical investigation of the invasion dynamics of colicinogeny. *Microbiology* **145**:655-661.

- 40) Gordon, D., M. A. Riley, y T. Pinou. 1998. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiology* **144**:2233-2240.
- 41) Gouaux, E. 1997. The long and short of colicin action: the molecular basis for the biological activity of channel-forming colicins. *Structure* **5**:313-377.
- 42) Gross, E., y J. L. Morell. 1971. Structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**:4634-4635.
- 43) Guasch, J., J. Enfedaque, S. Ferrer, D. Gargallo, y M. Regue. 1995. Bacteriocin 28b, a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcescens* biotypes. *Res. Microbiol.* **146**:477-483.
- 44) Guder, A., I. Wiedemann, y H. G. Sahl. 2000. Posttranslationally modified bacteriocins –the lantibiotics. *Biopolymers* **55**:62-73.
- 45) Hardy, K. G. 1975. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.* **39**:464-515.
- 46) Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas, y M. E. Stiles. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Appl. Bacteriol.* **173**:7491-7500.
- 47) Hirsch, P. R. 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **113**:219-228.
- 48) Jack, R. W., J. R. Tagg, y B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **59**:171-200.
- 49) James, R., C. Kleantous, y G. R. Moore. 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology* **142**:1569-1580.
- 50) Jiménez-Díaz, R., R. M. Rios-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruis-Barba, y J.-C. Piard. 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1416-1420.
- 51) Joerger, M. C., y T. R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**:439-446.
- 52) Kaletta, C., y K-D. Entian. 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nis A* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* **171**:1597-1601.
- 53) Kelstrup, J. y R. J. Gibbons. 1969. Inactivation of bacteriocins in the intestinal and oral cavity. *J. Bacteriol.* **99**:888-890.
- 54) Kerr, B., M. A. Riley, M. W. Feldman, y B. J. M. Bohannan. 2002. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* **418**:171-174.
- 55) Kim, W. S. 1997. Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**:169-171.
- 56) Kim, W. S., R. J. Hall, y N. W. Dunn. 1997a. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:449-453.
- 57) Kim, W. S., R. J. Hall, y N. W. Dunn. 1997b. Host specificity of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.* **19**:1235-1238.
- 58) Kim, W. S., R. J. Hall, y N. W. Dunn. 1998. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:429-433.
- 59) Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie* **70**:337-349.
- 60) Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**:125-144.
- 61) Krier, F., A. M. Revol-Junelles, y P. Germain. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:359-363.

- 62) **Kuhar, I., y D. Žgur-Bertok.** 1999. Transcription regulation of the colicin K *cka* gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *J. Bacteriol.* **181**:7373-7380.
- 63) **Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, R. J. Siezen, y W. M. Devos.** 1993. Characterization of the nisin gene-cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis* –requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* **216**:281-291.
- 64) **Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, y M. Gobbetti.** 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4084-4090.
- 65) **Lavermicocca, P., F. Valerio, y A. Visconti.** 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:634-640.
- 66) **Leer, R. J., J. Vandervossen, M. Vangiezen, J. M. Vannoort, y P. H. Pouwels.** 1995. Genetic-analysis of acidocin-B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* **141**:1629-1635.
- 67) **Lenski, R. R., y M. A. Riley.** 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc. Natl. Acad. USA* **99**:556-558.
- 68) **Lipsitch, M., C. T. Bergstrom, y B. R. Levin.** 2000. The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: paradoxes and prescriptions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1938-1943.
- 69) **Miller, M., y B. Bassler.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:165-199.
- 70) **Mirleau, P., S. Delorme, L. Philippot, J.-M. Meyer, S. Mazurier, y P. Lemanceau.** 2000. Fitness in soil land rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine sythesis and uptake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:35-44.
- 71) **Mortvedt-Abildgard C. I., J. Nissen-Meyer, B. Jelle, B. Grenov, M. Skaugen, y I. F. Nes.** 1995. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:175-179.
- 72) **Mørtvedt, C. I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, y I. F. Nes.** 1991. Purification and aminoacid sequence of lactocin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1829-1834.
- 73) **Mota-Meira, M., G. Lapointe, C. Lacroix, y M. C. Lavoie.** 2000. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:24-29.
- 74) **Munoz Aguilar, J. M., A. M. Sabih, A. J. M. Richards, G. J. Loake, M. D. Watson, y C. H. Shaw.** 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2741-2746.
- 75) **Muriana, P. M., y T. R. Klaenhammer.** 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:114-121.
- 76) **Muriana, P. M., y T. R. Klaenhammer.** 1991b. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J. Bacteriol.* **173**:1779-1788.
- 77) **Neu, H. C.** 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**:1064-1073.
- 78) **Nissenmeyer, J. H., L. S. Havarstein, K. Sletten, y I. F. Nes.** 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of 2 peptides. *J. Bacteriol.* **174**:5686-5692.
- 79) **Parente, E., y A. Ricciardi.** 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**:12-15.

- 80) Parente, E., A. Ricciardi, y G. Addario. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:388-394.
- 81) Pinou, T., y M. Riley. 2001. Nucleotide polymorphism in microcin V plasmids. *Plasmid* **46**:1-9.
- 82) Piva, A., y D. R. Headon. 1994. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiol.* **140**:697-702.
- 83) Philips D. A., E. Martínez-Romero, G.-P. Yang, y C. M. Joseph. 2000. Release of nitrogen: a key trait in selecting bacterial endophytes for agronomically useful nitrogen fixation, p. 205-217. In J. K. Ladha and P. M. Reddy (eds.), *The Quest for nitrogen fixation in rice*. IRRI, Philippines.
- 84) Price, L., y R. Shand. 2000. Halocin S8: a 36-amino acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J. Bacteriol.* **182**:4951-4958.
- 85) Pugsley, A. 1984. The ins and outs of colicins. *Microbiol. Sci.* **1**:168-175.
- 86) Quiao, M., M. J. Omaetxebarria, R. Ra, I. Oruetxebarria, y P. E. J. Saris. 1997. Isolation of a *Lactococcus lactis* strain with high resistance to nisin and increased nisin production. *Biotech. Lett.* **19**:199-202.
- 87) Ra, R., M. Beerthuyzen, W. M. de Vos, P. E. J. Saris, y O. P. Kuipers. 1999. Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology* **145**:1227-1233.
- 88) Raloff, J. 1998. Staging germ warfare in foods. *Sci. News* **153**:89-90.
- 89) Rekhif, N., A. Atrih, y G. Lefebvre. 1994. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Current Microbiol.* **28**:237-241.
- 90) Riley, M. 1993. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Mol. Biol. Evol.* **10**:1380-1395.
- 91) Riley, M. A. 1993. Positive selection for colicin diversity in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **10**:1048-1059.
- 92) Riley, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.* **32**:255-278.
- 93) Riley, M., L. Cadavid, M. Collett, M. Neely, y M. Adams. 2000. The newly characterized colicin Y provides evidence of positive selection in pore-former colicin diversification. *Microbiology* **146**:1671-1677.
- 94) Riley, M. A., y D. M. Gordon. 1992. A survey of col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of col-plasmid lineages. *J. Microbiol.* **138**: 1345-1352.
- 95) Riley, M. A., T. Pinou, J. E. Wertz, Y. Tan, y C. M. Valleta. 2001. Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. *Plasmid* **45**:209-221.
- 96) Riley, M. A., Y. Tan, y J. Wang. 1994. Nucleotide polymorphism in colicin E1 and Ia plasmids from natural isolates of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11272-11280.
- 97) Riley, M. A., y J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:117-137.
- 98) Rodriguez-Valera, F., G. Juez, y D. J. Kushner. 1982. Halocins: Salt dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can. J. Microbiol.* **28**:151-154.
- 99) Roos, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twommey, W. J. Meaney, y C. Hill. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:337-346.
- 100) Roos, U., R. E. Harkness, y V. Braun. 1989. Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Mol. Microbiol.* **3**:891-902.
- 101) Roy, P. H., 1997. Dissemination of antibiotic resistance. *Med. Sci.* **13**:927-933.

- 102) Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross, y C. Hill. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2287-2290.
- 103) Saadoun, I., F. al-Momani, H. I. Malkawi, y M. J. Mohammad. 1999. Isolation, identification and análisis of antibacterial activity of soil streptomycetes isolates from north Jordan. *Microbios* **100**:41-46.
- 104) Sahl, H.-G., y G. Bierbaum. 1998. LANTIBIOTICS: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:41-79.
- 105) Sano, Y., M. Kobayashi, y M. Kageyama. 1993. Functional domains of S-type pyocins deduced from chimeric molecules. *J. Bacteriol.* **175**:6179-6185.
- 106) Sano, Y., H. Matsui, M. Kobayashi, y M. Kageyama. 1993. Molecular structures and functions of pyocins S1 and S2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**:2907-2916.
- 107) Schillinger, U., y F-K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1901-1906.
- 108) Schripsema, J., K. E. E. De Rudder, T. B. van Vliet, P. P. Lankhorst, E. De Vroom, J. W. Kijne, y A. A. N. van Brussel. 1996. Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of N-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. *J. Bacteriol.* **178**:366-371.
- 109) Schuller, F., R. Benz, y H. G. Sahl. 1989. The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. *Eur. J. Biochem.* **182**:181-186.
- 110) Smajs, D., H. Pils, y V. Braun. 1997. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J. Bacteriol.* **179**:4919-4928.
- 111) Smajs, D., y G. Weinstock. 2001. Genetic organization of plasmid colJ, encoding colicin Jc activity, immunity, and release genes. *J. Bacteriol.* **183**:3949-3957.
- 112) Smith, D. R., y M. Dowrkin. 1994. Territorial interactions between two *Myxococcus* species. *J. Bacteriol.* **176**:1201-1205.
- 113) Solbiati, J. O., M. Ciaccio, R. N. Farias, y R. A. Salomón. 1996. Genetic análisis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J. Bacteriol.* **178**:3661-3663.
- 114) Song, H. J., y J. Richard. 1997. Antilisterial activity of three bacteriocins used at subminimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.*
- 115) Stewart, F. M., R. Antia, B. R. Levin, M. Lipsitch, y J. E. Mittler. 1998. The population genetics of antibiotic resistance. II: analytic theory for sustained populations of bacteria in a community of host. *Theoret. Popul. Biol.* **53**:152-165.
- 116) Tagg, J. R., A. S. Dajani, y L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bact. Rev.* **40**:722-756.
- 117) Tan, Y., y M. A. Riley. 1996. Rapid invasion by colicinogenic *Escherichia coli* with novel immunity functions. *Microbiology* **142**:2175-2180.
- 118) Tan, Y., y M. A. Riley. 1997a. Nucleotide polymorphism in colicin E2 gene clusters: evidence for nonneutral evolution. *Mol. Biol. Evol.* **14**:666-673.
- 119) Tan, Y., y M. A. Riley. 1997b. Positive selection and recombination: major molecular mechanisms in colicin diversification. *Trends Ecol. Evol.* **12**:348-351.
- 120) Tapia-Hernández, A., M. A. Mascarua-Esparza, y J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* **64**:73-83.
- 121) Taylor, J.L., A. Hirsh, y T. R. Mattick. 1949. The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *The Vet Record* **61**:197-198.

- 122) **Torreblanca, M., I. Meseguer, y F. Rodríguez-Valera.** 1989. Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *J. Gen. Microbiol.* 135:2655-2661.
- 123) **Torreblanca, M., I. Meseguer, y A. Ventosa.** 1994. Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:201-205.
- 124) **Upetri, G. C., y R. D. Hinsdill.** 1975. Production and mode of action of lactocin 27-bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:139-145.
- 125) **Vandermeer, J. R., J. Polman, M. M. Beerthuyzen, R. J. Siezen, O. P. Kuipers, y W. M. Devos.** 1993. Characterization of the *Lactococcus-lactis* nisin-a operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175:2578-2588.
- 126) **Van Laeck, R. L. J. M., U. Schillinger, y W. H. Holzapfel.** 1992. Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconoctoc carnosum* LA44A. *Int. J. Food Microbiol.* 16:183-195.
- 127) **Vaughan, E. E., C. Daly, y G. F. Fitzgerald.** 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* 73:299-308.
- 128) **Vignolo, G., J. Palacios, M. E. Farias, F. Sesma, y U. Schillinger.** 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41:410-416.
- 129) **Walter, E. S., y F. Levy.** 2001. Genetic trends in a population evolving antibiotic resistance. *Evolution* 55:1110-1122.
- 130) **Yang, R., y B. Ray.** 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 11:281-291.