

Potencialidades de cepas autóctonas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Ana Margarita Manzano, Ana Rosa Casanova, Rina Pedrol y Jorge Martínez

Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

En este trabajo se realizó un estudio de 5 cepas autóctonas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en comparación con la cepa patrón Pal5. Se comprobó que las cepas estudiadas son capaces de fijar N₂ y producir ácido indolacético (AIA). Se evidenció, por primera vez, que esta especie es capaz de producir polihidroxialcanoatos (PHA). Los resultados obtenidos en este estudio hacen a estas cepas autóctonas promisorias, no sólo como nitro fijadoras y posibles biofertilizantes sino como productoras de PHA, biopolímeros de gran importancia por sus propiedades mecánicas similares a plásticos, por no ser tóxicos y por ser biodegradables.

Palabras claves: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, ácido indolacético, polihidroxialcanoatos y fijación biológica de nitrógeno.

ABSTRACT

Five different native strains of *Gluconacetobacter diazotrophicus* were compared to the standard strain Pal5. Results evidenced that the studied strains are nitrogen fixing and indolacetic acid producers. This paper constitutes the first report of the polyhydroxyalcanoates (PHA) production by this specie. These plastic-like biopolymers are very important because of their mechanical, not toxics and biodegradable characteristics.

Key words: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, indolacetic acid, polyhydroxyalcanoates and biological nitrogen fixation.

INTRODUCCION

En el mundo actual la agricultura constituye la base de la economía de muchos países y es clave en la alimentación de los pueblos. Los rendimientos de los cultivos dependen en gran medida de la nutrición nitrogenada de las plantas ya que el nitrógeno tiene una amplia participación en muchos procesos fisiológicos, formando parte del DNA, del RNA, algunas hormonas de crecimiento vegetal, vitaminas y proteínas (Armas & al., 1996). Por todo esto se ha intensificado el estudio y la utilización de los microorganismos fijadores de N₂ como biofertilizantes pues, a diferencia de los fertilizantes químicos nitrogenados, éstos no afectan la salud humana, el ambiente y resultan menos costosos. Además, muchos de los microorganismos que son capaces de fijar N₂ también producen fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Freeman & Wolford, 1996; Moller, 1997; Ortega & Rodés, 1998).

Para muchos países del mundo, la caña de azúcar representa un sector importante de la economía. Se han aislado numerosos microorganismos que fijan nitrógeno en este cultivo, entre los que se encuentran: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola* y *Paenibacillus polymyxa* (Rennie & al., 1982), *Azospirillum amazonense* (Magalhaes & al., 1983) y *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante & Döbereiner, 1988). Sin embargo, aunque se desconoce cual de éstas es la más importante en la fijación biológica de nitrógeno, *G. diazotrophicus* resulta de un interés especial pues es una

bacteria endófito que encuentra condiciones óptimas para su crecimiento en el interior de esta planta (Boddey & al., 1995), produce fitohormonas (Fuentes & al., 1993; Bastian & al., 1998), no consume nitratos y contribuye significativamente a la nutrición nitrogenada de la misma (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Li & Mac Rae, 1992).

Por otra parte, se ha comprobado que los microorganismos diazotróficos también suelen producir PHA (Bergensen & Turner, 1992; Itzigsohn & al., 1995), poliésteres que se acumulan como material de reserva en el interior de las bacterias. Estos polímeros son biodegradables y poseen propiedades de numerosos plásticos, incluyendo poliestireno, policarbonato y polipropileno (Ansejo & al., 1995) por lo que son empleados para elaborar materiales y envases de forma tal que su uso ayude a resolver el problema de la contaminación del medio ambiente por residuales plásticos no biodegradables. Además presentan propiedades interesantes de biocompatibilidad y no son tóxicos (Fuller & al., 1992), por lo que han sido empleados como materia prima en vendas e hilos para suturas (Lenz & Kim, 1990), el suministro de medicamentos de acción sostenida (Hocking, 1992), en la regeneración de tejidos y en el campo de la ortopedia (San Román & Guillén, 1992).

Los objetivos de este trabajo son:

Calcular la actividad nitrogenasa de las diferentes cepas mediante el estimado de la producción de hidrógeno.
Determinar la producción de ácido indolacético (AIA) de las diferentes cepas empleando métodos colorimétricos.

Definir si *G. diazotrophicus* es capaz de producir polihidroxialcanoatos y en caso afirmativo, calcular los niveles de producción de las diferentes cepas empleando un método espectrofotométrico.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Como patrón se empleó la cepa Pal 5 (ATCC 49037) (Cavalcante & Döbereiner, 1988). Se estudiaron 5 cepas autóctonas: C1 y T2, aisladas de caña de azúcar variedad Media Luna 318 (Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología), Me2, aislada del insecto Mealy bug (*Saccharococcus sacchari*), localizado en la caña de azúcar variedad Media Luna 318 (Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología) y P55, P5 (donadas por el Laboratorio de Microbiología de Suelos, Facultad de Biología).

Medios de cultivo

En este trabajo se emplearon los siguientes medios de cultivo: LGIP (Reis & al., 1994), SYP (Caballero & Martínez, 1994), medio papa (Cavalcante & Döbereiner, 1988), sacarosa triptona: sacarosa (20g.L⁻¹), triptona (1g.L⁻¹), extracto de levadura (1g.L⁻¹), NaCl (2g.L⁻¹), agar (15g.L⁻¹). En todos los casos la incubación se realizó a 30°C, y en los medios líquidos se agitó a 120 rev.min.⁻¹ en zaranda orbital BIOZART-2013.

Actividad nitrogenasa

A partir del crecimiento en tubos con agar papa se inocularon erlenmeyers de 200 mL con 40 mL de medio LGIP líquido y se incubaron durante 48 h. A partir de este cultivo se inocularon, con 100 mL, tres tubos de 65 mL con 15 mL de medio LGIP semisólido, por cepa, los cuales se incubaron durante 48 h.

La actividad nitrogenasa se estimó por la producción de H₂ en los cultivos siguiendo la metodología utilizada por Dong & al. (1995). El H₂ fue medido en un cromatógrafo de gases con una columna empacada con Porapak N y con un tiempo de retención para el hidrógeno de 9 s. y con un detector Taguchi de ionización de llama previamente calibrado con un patrón de hidrógeno elaborado a partir de hidrógeno puro generado por la reacción química entre el zinc y el ácido clorhídrico 0,1 M.

Para establecer la relación de producción de nanolitros de H₂ por cada 10⁶ unidades formadoras de colonias se empleó el método de dilución en carril (Jett & al., 1997) para el conteo de viables.

Determinación cuantitativa de AIA

A partir del crecimiento en cuñas de agar papa, se inocularon, erlenmeyers de 75 mL con 15 mL de medio LGIP modificado (Fuentes & al., 1993). Después de la incubación durante 24 h, se añadió 1,5 mL de este

crecimiento a erlenmeyers de 75 mL con 13,5 mL de medio LGIP modificado suplementado con 200 mg/mL de DL-triptófano y se incubaron durante 72 h. Se realizaron dos réplicas para cada cepa.

Los cultivos fermentados se centrifugaron a 12100 g durante 15 min y el sobrenadante fue usado para la extracción y cuantificación del AIA por el método colorimétrico de Salkowski (Pérez, 1996). La DO se midió a 540 nm en un espectrofotómetro Farmacia Biotech UV/Vis.

Para el cálculo del nivel de producción de AIA se realizó una curva patrón de éste con un rango de concentración entre 10 y 100 mg.L⁻¹ y para el cálculo de los rendimientos producto/biomasa una curva de DO contra peso seco de biomasa (mg.mL⁻¹).

Métodos para el análisis del PHA

Determinación cualitativa de PHA (Método en placa)

Se emplearon placas con medio LGIP, medio agar papa, SYP y sacarosa triptona con 1mL de Rojo Nilo (disuelto en acetona 0,1%) por mL de medio. Se sembró una estría de cada cepa, en cada una de las cuatro placas y se realizaron observaciones a las 16, 48 y 115 h con luz ultravioleta (λ= 340nm) en un transiluminador Vilber Lourmat para la detección de fluorescencia (Careaga, 1999).

Determinación cuantitativa de PHA

A partir del crecimiento en cuñas de agar papa, se inocularon erlenmeyers de 200 mL con 15 mL de caldo papa y se incubaron durante 24 h. Empleando este cultivo como preinóculo, se inocularon con 1,5 mL, erlenmeyers de 75 mL con 13,5 mL de caldo papa (tres réplicas por cepa) y se incubaron durante 48 h.

La extracción y cuantificación de PHA se realizó mediante una modificación del método de Slepecky & Law (1960) informado por Careaga, (1999).

Para la determinación espectrofotométrica del PHA se resuspendieron las muestras secas en 1mL de solución de ácido sulfúrico al 80% y se calentaron en baño de agua a 90°C durante 30 min. Las soluciones se enfriaron y se leyeron a 214 nm en un espectrofotómetro Farmacia Biotech UV/VIS.

Los valores de PHA se obtienen mediante la siguiente fórmula: PHA = Abs x cot x Lpl, donde: Abs = absorbancia a 214 nm, Cot = 47,62 (cotangente de la curva patrón obtenida con polihidroxibutirato (PHB) y polihidroxivalerato (PHV) químicamente puros) y Lpl = longitud de paso de luz (ancho de cubeta).

Para calcular los rendimientos producto/biomasa se realizó una curva de DO contra peso seco de biomasa (mg/mL).

Análisis estadísticos

Antes del procesamiento estadístico de los datos, se comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de varianza por la prueba de Bartlett. Para el análisis estadístico de los rendimientos de la producción de AIA, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y la de Student Newman Keuls (SNK) para comparar la suma de rangos. Para el análisis estadístico de la actividad nitrogenasa y de los rendimientos de la producción de PHA, se empleó un análisis de varianza de clasificación simple modelo de efectos fijos y una prueba de rangos múltiples de Duncan, para comparar las medias (Sigarrosa, 1987). Se utilizó el paquete de programas estadísticos STATISTICS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad nitrogenasa

Los resultados obtenidos al estimar los niveles de fijación biológica de N por las cepas se muestran en la Tabla I. Para el análisis estadístico, fue necesario transformar los datos. No se encontraron diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,05$), lo que es muy importante pues esto indica que las cepas autóctonas son tan buenas nitrificadoras como la cepa patrón Pal5, aislada por Cavalcante & Döbereiner (1988).

TABLA I

Nanolitros de H₂ por hora, producidos por cada 10⁶ unidades formadoras de colonias.

CEPAS	n.L H ₂ /h 10 ⁶ UFC
Pal 5	0,03
P55	0,06
P5	0,12
C1	0,05
Me2	0,06
T2	0,06

Detección de la producción de ácido indolacético (AIA)

Los informes previos de diferentes autores confirman la existencia de cepas de *G. diazotrophicus* capaces de producir AIA (Fuentes & al., 1993; Bastian & al., 1998). Como las cepas de trabajo tienen un efecto estimulador en las plantas de las cuales son endófitas, se valoró la posibilidad de que este efecto no se debiera exclusivamente a la actividad nitrificadora, sino que en esto estuviera también involucrada la producción de AIA.

Para evitar que las diferencias de crecimiento afecten la comparación, se estimó el rendimiento de la producción de AIA con respecto a la biomasa, (para el cálculo de la biomasa se realizó una curva de DO contra peso seco (representada por la ecuación: $y = 0,1283 + 0,7842x$ ($r^2 = 0,974$, $n = 9$)). Los resultados se muestran en la Tabla II.

Los valores obtenidos demuestran que las cepas probadas son capaces de producir AIA aunque son inferiores a los

alcanzados por Fuentes & al. (1993), trabajando con 18 cepas de esta especie crecidas durante 24 h a 220 rev/min, en el mismo medio de cultivo y utilizando el mismo método colorimétrico. Los niveles de producción más bajos en nuestro caso, pueden depender de las características de las cepas o a que en las condiciones establecidas para el crecimiento hayan ocurrido reacciones de degradación de AIA, que pueden ocurrir en el medio de cultivo durante la fase de agotamiento del sustrato, ya sea por compuestos de bajo peso molecular que se pueden unir covalentemente al AIA y lo inactivan, o debido al pH que alcanza el medio (valores de 2-2,5, debido a la liberación de ácido acético por las bacterias), lo que puede acelerar la oxidación del AIA (Mc Milland, 1980; Pérez, 1996).

TABLA II

Niveles de producción de AIA por las cepas de *G. diazotrophicus*

CEPAS	AIA(mg.mL ⁻¹)	Yp/x (%)
PAL5	5.58	3.84
P55	3.70	1.68
P5	2.90	2.49
C1	5.04	5.41
Me2	5.84	3.63
T2	3.97	1.78

El análisis estadístico de los rendimientos promedio de la producción de AIA por las diferentes cepas, no detectó diferencias significativas entre éstos valores ($p < 0,05$).

Determinación cualitativa de PHA (Método en placa)

Teniendo en cuenta la posible relación que la producción de PHA puede tener con la nitrificación, la gran importancia de estos polímeros para la industria y en general para la conservación del medio ambiente (Bergersen & Turner, 1992; Madison & Huisman, 1999) decidimos, aún cuando no existen informes previos en la literatura de que esta especie produzca PHA, analizar la capacidad de las cepas en estudio de producir estos polímeros.

En este método la producción de PHA se detecta por la aparición de fluorescencia en presencia de luz ultravioleta (340 nm), en las células crecidas con Rojo Nilo en el medio. Esto es debido a que este colorante se incorpora en los gránulos de PHA, de manera que existe una proporcionalidad directa entre los niveles de fluorescencia detectados y la acumulación de este producto intracelularmente. En las Figuras 1 y 2, se muestra la fluorescencia emitida cuando las placas se irradiaron con luz ultravioleta en el transiluminador, a las 48 y 115 h respectivamente.

A las 115 h la fluorescencia se mantiene con gran intensidad, lo que indica que el microorganismo no ha

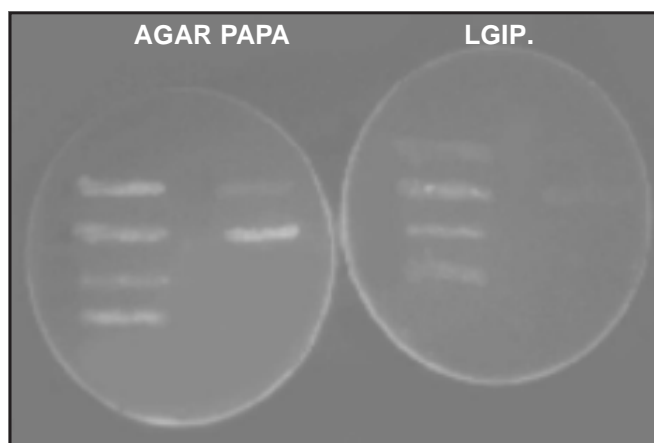


Fig. 1. Fluorescencia de las diferentes cepas de *G. diazotrophicus*, crecidas durante 48 h en los medios agar papa y LGIP.

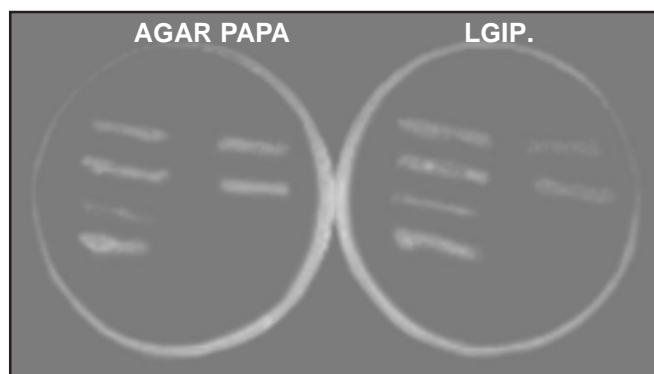


Fig. 2. Fluorescencia de las diferentes cepas de *G. diazotrophicus*, crecidas durante 115 h en los medios agar papa y LGIP.

Lee (1996), propuso una clasificación de las bacterias productoras de PHA en dos grupos, el 1 formado por bacterias que requieren la limitación de un nutriente esencial como nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio o azufre, para la síntesis eficiente de PHA a partir de un exceso de fuente de carbono y el 2 formado por bacterias que no requieren de limitaciones de nutrientes para la síntesis de PHA y pueden acumular el polímero durante el crecimiento. Nuestros resultados permiten ubicar a las cepas de *G. diazotrophicus* de este trabajo en el grupo 1, ya que es en los medios LGIP y agar papa (los cuales tienen gran desbalance C/N) donde se sintetizan cantidades apreciables de PHA, a diferencia de los medios SYP y sacarosa-triptona, en los cuales no se detecta, en las condiciones de crecimiento establecidas, la presencia de éstos polímeros.

Determinación cuantitativa de PHA

Para cuantificar los niveles de producción de PHA de las cepas, se tomaron cultivos crecidos en el medio caldo papa durante 48 h porque en este tiempo se detectaron mayores diferencias en la fluorescencia (Fig. 1).

Previamente, para verificar la pureza de las muestras tratadas con H_2SO_4 concentrado, durante la cuantificación, se realizó un espectro de absorción de dos de ellas

tomadas al azar (Fig.4) en comparación con el del producto comercial (Fig. 3). Como se puede apreciar, los espectros de las muestras son similares al espectro obtenido con PHB comercial. No obstante, como no se puede afirmar que en nuestras extracciones haya sólo polihidroxibutirato, todo el tiempo nos referimos a los polihidroxialcanoatos que es un término más general.

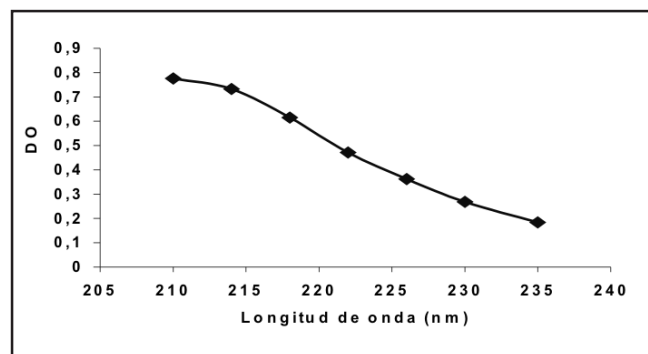


Fig. 3. Espectro de absorción del PHB comercial.

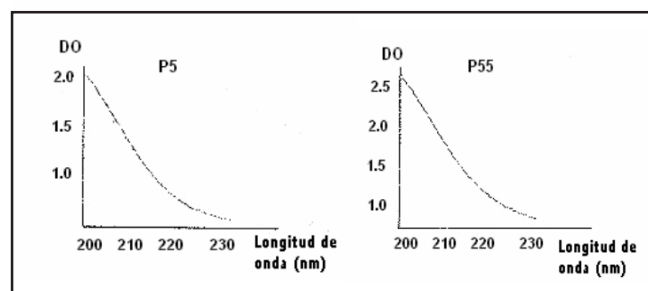


Fig. 4. Espectros de absorción de las muestras de PHA de dos cepas de *G. diazotrophicus*: P55 y P5.

Para realizar la cuantificación se elaboró una curva de calibración, con PHB y PHV comerciales, representada por la recta $y = 0,021x$. ($r^2 = 0,890$, $n = 15$). En la Tabla III se muestran los resultados.

TABLA III

Niveles de producción de PHA por las cepas de *G. diazotrophicus*.

CEPAS	PHA(mg.L ⁻¹)
Pa15	981,4
P55	1025,2
P5	897,6
C1	1047,1
Me2	1025,0
T2	1138,1

Los niveles de producción de las cepas oscilan entre los 0,898 y 1,138 g.L⁻¹. Manchak & Page (1994), obtuvieron cepas productoras de PHA con los siguientes niveles: *Azotobacter vinelandii*, 5,5 g.L⁻¹ a las 48 h; *Azotobacter beijerinckii*, 2,4 g.L⁻¹ a las 24 h y *Alcaligenes eutrophus*, 3,6 g.L⁻¹ a las 48 h, con glucosa como fuente de carbono.

La cepa 3 de *Rhizobium tropici* es capaz de producir niveles de PHA superiores a los 3 g.L⁻¹, usando manitol como fuente de carbono (Careaga, 1999). Ambos estudios se realizaron a escala de frasco. Las cepas estudiadas en este trabajo no logran estos niveles de producción, pero sin haber sido optimizado este proceso, los valores obtenidos son superiores a los de la cepa de *Sinorhizobium meliloti* M5N1, que alcanza el valor más alto de PHB, aproximadamente de 1 g.L⁻¹, a las 112 h de incubación a escala de frasco, empleando fructosa como fuente de carbono (Tavernier & al., 1997) y a los valores máximos de PHA obtenidos, a escala de frasco, con la cepa 4 de *Pseudomonas mendocina* y la cepa 63 de *Bacillus cereus*, 0,6 y 0,654 g.L⁻¹ respectivamente, usando glucosa como fuente de carbono (Iglesias, 1999).

Es de destacar que *G. diazotrophicus* es capaz de producir PHA, usando azúcar comercial, una fuente de carbono mucho más barata que las reportadas en los medios tradicionales, lo que disminuiría el costo de producción.

Mediante la curva de peso seco contra DO representada por la ecuación $y = -0,0373 + 0,7967x$ ($r^2 = 0,985$, $n = 9$), pudimos calcular los rendimientos de la producción de PHA por las cepas, en este experimento, los cuales se muestran en la Fig. 5.

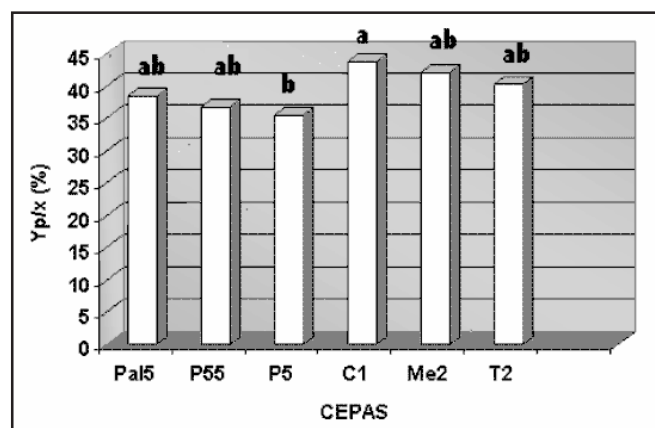


Fig. 5. Rendimiento producto/biomasa de las cepas de *G. diazotrophicus*.

El estudio de las características analizadas en las cepas autóctonas de *G. diazotrophicus* ha permitido determinar que ninguna difiere grandemente de la cepa patrón Pal5, lo que indica que cualquier diferencias entre ellas no involucra estas importantes producciones.

Por otra parte, se confirma en estas cepas que los miembros de esta especie son productores de AIA (Bastian & al., 1998), aún cuando los niveles aquí obtenidos son inferiores a los informados para otras cepas (Fuentes & al., 1993).

Por último se determina por primera vez que la especie *G. diazotrophicus* es capaz de producir PHA, lo que hasta estos momentos había sido informado para otros

diazotrófos de los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (Page, 1992; Nakamura & al., 1992; Itzigsohn & al., 1995) pero no para *Acetobacter* o los miembros del nuevo género *Gluconacetobacter*.

Esto hace a estas cepas autóctonas muy promisorias, no sólo como nitrificadoras y posibles biofertilizantes sino como productoras de estos biopolímeros que son importantes por sus propiedades mecánicas similares a plásticos, por no ser tóxicos y por ser biodegradables (Ansejo & al., 1995; Madison & Huisman, 1999).

BIBLIOGRAFÍA

- Ansejo, J. A., Schmidt, A. S., Anderson, P. R. & Andrews, B. A. 1995. Effect of single nutrient limitation on poly-b-hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. – *Biotechnol. Bioeng.* 46: 497-502.
- Armas, R., Ortega, E. & Rodés, R. 1988. Fisiología, Capítulo 4. (ed.), Pueblo y Educación, La Habana: 118-127.
- Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, V. & Bottini, R. 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 Regulation.* 24: 7-11.
- Bergersen, F. J. & Turner, G. L. 1992. Supply of O₂ regulates O₂ demand during utilization of reserves of poly-b-hydroxybutyrate in N₂-fixing soybean bacteroids. – *Proc. R. Soc. London Ser.B.* 249: 143-148.
- Boddey, R. M., de Oliveira, O. C., Urquiaga, S., Reis, V. M., de Olivares, F. L., Baldani, V. L. D. & Döbereiner, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. – *Plant Soil*, 174: 195-209.
- Caballero, J. M. & Martínez, E. R. 1994. Limited genetic diversity in the endophytic sugar cane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. – *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (5): 1532-1537.
- Careaga, Z. 1999. Producción de poli-(3-hidroxibutirato) en un medio simple por una cepa de *Rhizobium tropici*. Trabajo de Diploma. Fac. Biología. UH. Cuba.
- Cavalcante, V.A. & Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. – *Plant Soil.* 108: 23-31.
- Dong, Z., Heydrich, M., Bernard, K. & Mc. Cully, M. E. 1995. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugar cane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. – *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1943-1946.
- Freeman, L. & Wolford, R. W. 1996. Methemoglobinemia secondary to cleaning solution ingestion. – *J-Emerg-Med.* 14: 599-601.
- Fuentes, L. E., Jimenez, J., Albarca, I. R. & Caballero, J. 1993. Auxin production by *Acetobacter diazotrophicus*, an indol-acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. – *Plant Soil*, 154: 145-150.
- Fuller, C. R., O'Donnell, P. J., Sauenier, J., Redlinger, E. T., Foster, J. & Lenz, W. R. 1992. The supramolecular architecture of the polyhydroxialkanoate inclusions in *Pseudomonas oleovorans*. – *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 279-288.

- Gillis, M. K., Kersters, B., Hoste, B., Janssens, D., Kroppens, M. & De Loy, J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 361-364.
- Hocking, J. 1992. The clasification, preparation, and utility of degradable polymer. – *Rev. Macromol. Chem. Phys.* 32(1): 34-35.
- Iglesias, Y. 1999. Obtención de polímeros bacterianos a partir de cepas marinas. Trabajo de Diploma. Fac. de Biología. UH. Cuba.
- Itzigsohn, R., Yarden, O. & Okon, Y. 1995. Polyhydroxyalkanoate analysis in *Azospirillum brasilense*. – *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1): 73-76.
- Jett, B. D., Hatter, K. L., Huycke, M. N. & Gilmore, M. S. 1997. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. – *BioTechniques*, 23: 648-650.
- Lee, S. Y. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. – *Trends Biotechnol.*, 14: 98-105.
- Lenz, R. W. & Kim, B. W. 1990. Funtionalized poly (3-hydroxyalkanoates) produced for bacteria. *Novel. Biodegradable. Microbial. Biopolymer.* (ed.) E. A. Dawes. Kluwer, Dordrecht: 23-25.
- Li, R. & Mac Rae, I. C. 1992. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane. – *Soil Biol. Biochem.* 24: 413-419.
- Madison, L. L. & Huisman, G. W. 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. – *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Mar: 21.
- Magalhaes, F. M.; Baldani, J. I.; Souto, S. M.; Kuykendall, J. R. & Döbereiner, J. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. – *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 55: 417-430.
- Manchak, J. & Page, W. J. 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. – *Microbiol.* 140: 953-963.
- Mc Milland, J. 1980. Hormonal regulation of development and molecular aspects of plant hormones. *Encyclopedia of plant physiology*, Springer Verlag, Berlín.
- Moller, H. 1997. Work in agriculture, childhood residence, nitrate exposure and testicular cancer risk: a case-control study in Denmark. – *Cancer-Epidemiol-Biomarkers-Prev.* 6: 141-144.
- Nakamura, K. & al. 1992. Biosynthesis of poli(3-hydroxyalkanoate) from aminoacids. – *Int. J. Biol. Macromol.* 14: 321-325.
- Ortega, E. & Rodés, R. 1998. Nutrición nitrogenada, biofertilización, salud y medio ambiente. *ATAC*, 2: 28-30.
- Page, W. J. 1992. Production of polyhydroxyalcanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS – Microbiol. Rev.*, 103: 149-158.
- Pérez, L. 1996. Producción de ácido indolacético (AIA) por *Rhizobium meliloti*. Trabajo de Diploma. Fac. Biología. UH. Cuba.
- Reis, V. M., Olivares, F. L. & Döbereiner, J. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. – *Word J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 401-405.
- Rennie, R. J., de Freitas, J. R., Ruschel, A. P. & Vose, P. B. 1982. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp). – *Can. J. Microbiol.* 28: 462-467.
- San Román, J. & Guillén, P. 1992. Biomateriales poliméricos compuestos para aplicaciones quirúrgicas: composites para la cirugía ortopédica y remodelación ósea. – *Rev. Plásticos Modernos.* 438: 674-688.
- Sigarroa, A. 1987. Manual de Prácticas de Biometría y Diseño Experimental, (ed.) Pueblo y Educación, La Habana.
- Slepecky, R. A. & Law, J. H. 1960 A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta hydroxy acids. – *Anal. Chem.* 32: 1697-1699.
- Tavernier, P. 1997. Exopolysaccharide and Poly-b-Hydroxybutirate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. – *Appl. Environ. Microbiol.* 63(1): 21-26.

Recibido: 2004

Direcc. de los autores: Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Calle 25, # 455 Vedado. E-mail: manzale@fbio.uh.cu