



ARTÍCULO ORIGINAL

## Aislamiento e identificación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* a partir de variedades de caña de azúcar cultivadas en Cuba

*Isolation and identification of Gluconacetobacter diazotrophicus from sugarcane varieties growing in Cuba*

Marcia Rojas, Julia Manzano y Mayra Heydrich

Dpto. Microbiología,  
Facultad de Biología  
Universidad de La Habana

\* Autor para correspondencia:  
marcia@fbio.uh.cu

### RESUMEN

La caña de azúcar constituye uno de los principales cultivos agrícolas para nuestro país y tiene gran importancia, desde los puntos de vista económico y ecológico, a nivel mundial. La presencia de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en diferentes cultivos de interés económico en el mundo sugiere que esta especie establece una interacción beneficiosa. La potencialidad de los microorganismos endófitos para su uso en la agricultura es muy promisorio, por lo cual la detección de la especie *Gluconacetobacter diazotrophicus* resulta fundamental para su futura utilización. En este trabajo se estudiaron 18 variedades de caña de azúcar cultivadas en Cuba mediante el aislamiento de la bacteria endófito *G. diazotrophicus*. Se detectó la presencia de esta especie en 13 de las variedades sobre la base de las características micro-morfológicas y culturales de los aislados obtenidos. Por primera vez se demostró la presencia del endófito en las variedades Cuba 1616-75, Cuba 751-75, Campos Brasil 44-52 y SP701143 cultivadas en Cuba. Se seleccionaron 46 aislados provenientes de las variedades Jaronú 60-5, Cuba 323-68 y Media Luna 318 y se identificaron mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas como pertenecientes a la especie en estudio.

**Palabras clave:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, caña de azúcar, aislamientos, identificación

### ABSTRACT

*Sugarcane is one of the most important commercial crops in Cuba and other countries in the world. The worldwide occurrence of G. diazotrophicus in sugarcane and other plants suggest a beneficial association between this species and grass species. The potentialities of endophytes in the agricultural biotechnology are very high, that is why the detection of this bacterium inside of sugarcane is so important. The aim of this work was to detect the occurrence of Gluconacetobacter diazotrophicus in 18 varieties of sugarcane growing in Cuba. This species was isolated in 13 varieties on the basis of micro-morphological and colonies characteristics. For the first time it was isolated G. diazotrophicus from varieties Cuba 1616-75, Cuba 751-75, Campos*

Recibido: 2008-09-23

Aceptado: 2008-12-20

*Brasil 44-52 and SP701143 cultivated in Cuba. The 46 isolates from the varieties Jaronú 60-5, Cuba 323-68 and Media Luna 318 were identified as G. diazotrophicus by morphological and biochemical test.*

**Keywords:** *Gluconacetobacter diazotrophicus, sugarcane, isolation, identification*

## INTRODUCCIÓN

Existen varias alternativas para el desarrollo de sistemas agrícolas que usan los microorganismos. Entre las principales acciones beneficiosas de las bacterias se incluyen la producción de hormonas promotoras del crecimiento (Sturz *et al.*, 1998), la solubilización de minerales, la fijación de nitrógeno (Gaskins *et al.*, 1984) y el control de patógenos (Mari *et al.*, 1996). Por su gran importancia, se ha previsto la utilización de los microorganismos endófitos en diferentes agroecosistemas.

A finales de los años ochenta se aisló de la caña de azúcar la especie *acetobacter diazotrophicus*, actualmente *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989). Esta bacteria tiene la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (10 mM), (Cavalcante y Döbereiner, 1988) y produce sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993). Además, *G. diazotrophicus* pudiera utilizarse como control biológico de patógenos ya que se han realizado experimentos *in vitro* demuestran que su potencialidad para inhibir el crecimiento de los hongos *Colletotrichum falcatum* Went. (Muthukumarasamy *et al.*, 2000) y la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Piñón *et al.*, 2004). En Cuba, esta especie bacteriana se aisló a partir de las variedades de caña de azúcar Jaronú 60-5 (Coego *et al.*, 1992) y Media Luna 318 (Dong *et al.*, 1994). Posteriormente se detectó su presencia en algunas variedades procedentes de Banco de Semilla (Pérez *et al.*, 2001) y de otras de uso comercial (Ortega *et al.*, 1996; 2002).

El presente trabajo tiene como objetivo pesquisar la presencia de la especie *Gluconacetobacter diazotrophicus* en variedades de caña de azúcar cultivadas en Cuba e identificar los aislados con vistas a su utilización en el mejoramiento de cultivos agrícolas de interés.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio fueron realizados aislamientos a partir de 18 variedades de caña de azúcar (*Saccharum sp.*)

utilizando dos métodos diferentes (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Dong *et al.*, 1994). En ambos casos, fueron sembrados en medio LGIP semisólido sin nitrógeno (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Los frascos fueron incubados durante un periodo de siete a diez días a 30°C.

A los aislados seleccionados les fueron realizadas pruebas morfológicas y fisiológico-bioquímicas haciendo uso de la cepa tipo de *G. diazotrophicus* PAI 5 (ATCC 49037) como patrón. Les fueron aplicadas las pruebas descritas en el *Manual de Bergey* (De Ley *et al.*, 1984) y las específicas para esta especie señaladas por Cavalcante y Döbereiner (1988). Para las observaciones de las células se empleó el microscopio electrónico de transmisión mediante tinción negativa con acetato de uranilo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivos microbianos con características similares a *G. diazotrophicus* en los frascos de medio LGI-P semisólido sin nitrógeno (144) mostraron, a los siete días de incubación, un crecimiento en forma de película amarillo-naranja en la superficie y un cambio en la coloración del medio. Cuando se sembraron en placas Petri con este mismo medio de cultivo, 117 aislados formaron colonias pequeñas, amarillo-naranja, de bordes regulares, y en medio Papa-agar tomaron una coloración carmelita. Estos aislados, además, respondieron negativamente a la tinción de Gram, mostraron forma bacilar y no formaron endosporas ni cápsulas, lo cual coincide con las características descritas para la especie *G. diazotrophicus* (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989). Los resultados de las observaciones con el microscopio electrónico corroboraron la similitud existente entre la morfología celular de todos los aislados y la cepa tipo PAI 5, así como la presencia de flagelación lateral o peritrica.

Estos resultados demuestran que *G. diazotrophicus* se encuentra presente en 13 de las 18 variedades

des de caña de azúcar estudiadas, de las cuales se obtuvieron 117 aislados de la especie en este estudio. No se encontró en las variedades Cuba 1751, Cuba 294-70, Jaronú 64-19, Cuba 8751 ni Cuba 120-78. En tal sentido, Pérez *et al.* (2001) señalaron la falta de interacción entre estas dos últimas variedades y *G. diazotrophicus*, lo cual podría estar relacionado con la capacidad de la caña de azúcar para seleccionar los endófitos mediante la unión de los microorganismos con determinadas glicoproteínas solubles presentes en el jugo (Legaz *et al.*, 2000). Se demuestra por primera vez la presencia de *G. diazotrophicus* en las variedades Cuba 1616-75, Cuba 751-75, Campos Brasil 44-52 y SP701143 cultivadas en Cuba (figura 1).

Tales resultados coinciden con los obtenidos por Ortega *et al.* (1996), que demostraron la presencia de *G. diazotrophicus* en las variedades Canal Point 5243, Cuba 323-68 y Cuba 266-70. No ocurrió así con las variedades Cuba 120-78 y Cuba 8751, lo cual pudo deberse a que las plantas muestreadas no estaban cultivadas en la misma localidad y, por tanto, estaban sometidas a condiciones ecológicas diferentes. Pérez *et al.* (2001) obtuvieron resultados similares al trabajar con estas mismas variedades, en las cuales el aislamiento de *G. diazotrophicus* estaba influenciado por

las condiciones edafoclimáticas.

Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado (2003) probaron que la relación entre *G. diazotrophicus* y la caña de azúcar depende del genotipo de ambos organismos. Aunque coincidimos con el criterio de los mencionados autores, consideramos que otros factores pueden influir sobre la interacción entre la variedad de la planta y el genotipo de la bacteria, como pueden ser las características del suelo, las condiciones climáticas, la edad del cultivo y la fertilización nitrogenada. Se ha demostrado que la presencia de *G. diazotrophicus* en las plantas puede estar determinada por el grado de fertilización nitrogenada a que estén sometidas las plantaciones (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993; Loganatan *et al.*, 1999), aspecto este último que también inhibe la colonización de la planta por la bacteria (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999).

Para continuar con nuestro estudio se seleccionaron 46 aislados de tres variedades de caña de azúcar teniendo en cuenta para los tres casos la alta frecuencia de aparición de la bacteria estudiada. Además, las variedades Jaronú 60-5 y Cuba 323-68 han sido las más utilizadas en la producción azucarera en el país durante los últimos cuarenta años (González *et al.*, 2004) y la variedad Media Luna 318 había sido cultivada durante

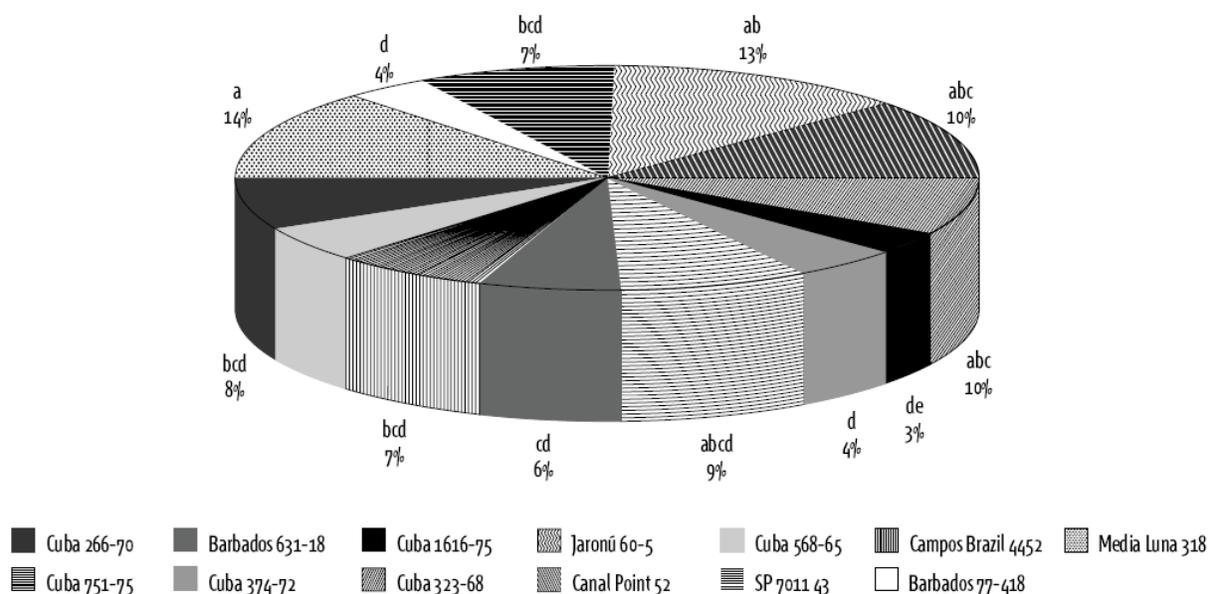


Figura 1. Distribución de 117 aislados con características típicas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* encontrados en 13 variedades de caña de azúcar cultivadas en Cuba.

Figure 1. Distribution of 117 isolates with typical characteristics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* found in 13 varieties of sugarcane growing in Cuba.

más de diez años sin fertilización nitrogenada, lo cual puede ser un factor fundamental en la presencia y las características de los microorganismos endófitos presentes.

En las tres variedades muestreadas se detectó *G. diazotrophicus* tanto en el tallo como en la raíz, resultado coincidente con los obtenidos por otros autores (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Muthukumarasamy *et al.*, 2000). Ello reafirma la importancia de la propagación vegetativa de la caña de azúcar, que es una de las formas de diseminación de *G. diazotrophicus* (Muñoz-Rojas, 2005), con lo que se garantiza la transmisión de la bacteria de una generación a otra en este cultivo.

Los resultados de la caracterización fenotípica (anexo 1) mostraron que los aislados estudiados presentan características similares a la cepa tipo PAI 5 (ATCC 49037) utilizada como patrón. Tales aislados son catalasa positiva y oxidasa negativa, que tienen las capacidades de sobreoxidar la glucosa al 1 y al 30 %, tolerar acidez extrema, crecer en sacarosa al 1 y al 30 %, oxidar el etanol a ácido acético, no reducir el nitrato y fijar nitrógeno, todo lo cual coincide con la respuesta de la cepa tipo y difiere de las características descritas para otras especies fijadoras de nitrógeno del género *Gluconacetobacter*, de acuerdo a lo expresado por Fuentes-Ramírez *et al.* (2002).

Es importante destacar que, a pesar de los avances en el campo de la biología molecular, los métodos fenotípicos son considerados la línea base de la taxonomía polifásica. En este sentido, Vandamme *et al.* (1996) señalaron que cualquier esquema taxonómico filogenético tiene que presentar una consistencia fenotípica. La identidad fenotípica mostrada por los aislados obtenidos, en comparación con la cepa tipo PAI 5 (ATCC 49037) y los resultados de estas pruebas de Cavalcante y Döbereiner (1988) y de Gillis *et al.* (1989), indica que los 46 aislados seleccionados pertenecen a la especie *G. diazotrophicus*. Sería necesario de corroborarlo posteriormente mediante pruebas moleculares.

Como proponen Saravanan *et al.* (2008), una interrogante importante es cómo la colonización de la planta puede ser afectada por la expresión de genes dependientes de la densidad celular en esta bacteria, por lo cual los estudios de estos mecanismos pueden revelar la importancia de los procesos de transducción de señales en el estilo de vida endofítico de *G. diazotrophicus*.

## LITERATURA CITADA

- Cavalcante, V. A. and J. Döbereiner (1988): A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant and Soil*, 108: 23-31.
- Coego, A. *et al.* (1992): Isolation and characterization of nitrogen-fixing bacteria associated to sugarcane. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 34: 189-195.
- De Ley, J., J. Swings and F. Gasselé (1984): Genus I. *Acetobacter* Beijerinck (1898). En: N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. The Williams and Willkins Co. Baltimore, USA.
- Dong, Z. *et al.* (1994): A nitrogen-fixing endophytic of sugarcane stems: A new role for the apoplast. *Plant Physiol.*, 105: 1139-1147.
- Fuentes-Ramírez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Abarca-Ocampo and J. Caballero-Mellado (1993): *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivares of México. *Plant and Soil*, 154: 145-150.
- Fuentes-Ramírez, L. *et al.* (1999): Colonization of sugar cane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 29: 117-128.
- Fuentes-Ramírez LE *et al.* (2002): Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(4):1305-14.
- Gaskins, M. M., S. L. Albrecht and D. A. Hubbell (1984): Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 12: 99-116.
- Gillis, M. K., B. Kersters and J. de Ley (1989): *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. *Int. J. Syst. Bact.*, 39: 361-364.
- González R. M., R. Almeida, H. Jorge e I. Jorge (2004): Principales variedades de caña de azúcar empleadas en Cuba con fines comerciales en los últimos 40 años. 40 Aniversario del INICA.
- Legaz, ME; de Armas, R; Barriguete, E; Vicente C. (2000): Binding of soluble glycoproteins from sugarcane juice to cells of *Acetobacter diazotrophicus*. *Int. Microbiol.* 3(3): 177-182.
- Loganathan, P., Sunitha, R., Parida, A.K., Nair, S. (1999): Isolation and characterisation of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from new host plant (*Eleusine coracana* L.). *J. Appl. Bacteriol.* 86, 1053-1058.
- Mari, N., M. Guissardi and G. Pratella (1996): Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biological Control*, 7 (1): 30-37.

Muñoz-Rojas, J. (2005): La interacción *Gluconacetobacter diazotrophicus*-caña de azúcar como modelo para el estudio de la transmisión de bacterias benéficas. *Elementos*, 57: 57-62.

Muñoz-Rojas, J. and J. Caballero-Mellado (2003): Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effects on plant growth. *Microb. Ecol.*, 46: 454-464

Muthukumarasamy, R., G. Rebathi, and M. Vadivelu. (2000): Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red-rot of sugarcane. *Curr. Sci.* 78:1063-1065.

Ortega, E., L. Fernández, R. Rodés and P. Ortega (2002): Hydrogen and nitrogen-fixing endophytes in sugarcane. In: Nitrogen Fixation: Global Perspectives. Finan, T., M. O'Brian, D. Layzell, J. K. Vessey and W. Newton (eds.), CAB International, pp. 469.

Ortega, E., R. Rodés, F. Morales y G. Gálvez (1996): Detección de *Acetobacter diazotrophicus* en variedades cubanas de caña de azúcar. III Taller de Biofertilización en los Trópicos, X Seminario del INCA, La Habana, Cuba. pp.81.

Pérez, J. et al. (2001): Evaluación de *Acetobacter diazotrophicus* en tallos y meristemas de variedades de caña de azúcar cubanas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 32 (3):139-141.

Piñón, D. et al. (2004): *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces bacteriocins against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology*, 153: 345-351.

Saravanan, V.S. et al. (2008): Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. *Microbial Ecology*, 55; 130-140.

Sturz, A. V., B. R. Christie and B. C. Matheson (1998): Association of bacterial endophyte populations from red glover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Can. J. Microbiol.*, 44 (2): 162-167.

Vandamme, P. et al. (1996): Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbial. Reviews* 60(2): 407-438.



Anexo 1. Características fisiológico-bioquímicas de los aislados en comparación con la cepa tipo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 (ATCC 49037).

*Fisiological—biochemical characteristics of isolates in comparison to Gluconacetobacter diazotrophicus PAI 5 type (ATCC 49037).*

+: reacción positiva, -: negativa

1: Catalasa, 2: Oxidasa, 3: Pigmentos carmelitas en YGC, 4: Oxidación del D-lactato, 5: Sobreoxidación de glucosa al 1%, 6: Sobreoxidación de glucosa 30%, 7: Crecimiento en sacarosa al 30%, 8: Oxidación del etanol, 9: Fermentación de la glucosa, 10: Fermentación de la lactosa, 11: Producción de H<sub>2</sub>S, 12: Producción de gas de glucosa, 13: Reducción de NO<sub>3</sub>, 14: Fijación de nitrógeno, 15: Formación de ácido a partir de glucosa, 16: sacarosa, 17: glicerol, 18: manitol, 19: xilosa, 20: inositol, 21. fructosa.

Aislados	Pruebas																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
PAI 5	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
JaP-1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaP-2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaP-3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaP-4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaP-5	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
JaR-6	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
JaR-9	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
JaR-11	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
JaR-30	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaT-13	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaT-15	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaT-17	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaT-27	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
JaT-29	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
8-03	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
1-05	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-E	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-7	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-5	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-6	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-8	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-9	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-10	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-12	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MLT-13	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MLT-15	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
4-02	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
17B	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
1-06	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
12B	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323T-1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323T-4	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C323T-5	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323T-7	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323T-8	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323T-9	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323T-10	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323R-1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323R-4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323R-7	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323R-8	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
C323R-10	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+