



Revista Industrial  
y Agrícola de  
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea  
1851-3018

Tomo 99 (1):  
29-36; 2022



ESTACION EXPERIMENTAL  
AGROINDUSTRIAL  
OBISPO COLOMBRES  
Tucumán | Argentina

Av. William Cross 3150  
T4101XAC - Las Talitas.  
Tucumán, Argentina.

## Evaluación de la capacidad de una cepa autóctona de *Gluconacetobacter sp.* para mejorar el crecimiento inicial del cultivo de la caña de azúcar

María L. Tortora\*, Micaela Eliana Jezabel Alderete\*, María A. Núñez\*, Eduardo R. Romero\* y Patricia A. Digonzelli\*.

\* Sección Caña de Azúcar; EEAOC. Email: ltortora@eeaoc.org.ar

### RESUMEN

Los biofertilizantes constituidos por bacterias promotoras del crecimiento vegetal son una alternativa sustentable para estimular el crecimiento e incrementar los rendimientos del cultivo de la caña de azúcar. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar una cepa endofítica del género *Gluconacetobacter* capaz de colonizar y promover el crecimiento del cultivo, y que presente además alta viabilidad y estabilidad en medios de cultivo de bajo costo para su propagación a escala piloto e industrial. A partir de tallos de caña de azúcar, se aisló la cepa endofítica OCG1 de *Gluconacetobacter* con capacidad potencial para fijar nitrógeno. Luego de inocular yemas aisladas de caña de azúcar de la variedad TUC 95-10, se observó que el aislamiento OCG1 fue capaz de colonizar el sistema radicular de las plántulas e incrementar el peso fresco y seco tanto del sistema aéreo como del radicular. Finalmente, OCG1 presentó capacidad para generar gran cantidad de biomasa y para producir y excretar exopolisacáridos (EPS) en el medio de cultivo industrial utilizado para su propagación a escala piloto. Además, conservó su viabilidad durante el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente (25°C).

De esta forma, la cepa *Gluconacetobacter* OCG1 podría emplearse en la formulación de un biofertilizante para obtener plantines de caña de azúcar con alto valor agregado a partir de la inoculación de las yemas aisladas.

**Palabras clave:** sustentabilidad, cañaveral, fijación biológica de nitrógeno.

### ABSTRACT

#### Evaluation of an autochthonous strain of *Gluconacetobacter sp.* ability to improve the initial growth of sugarcane crop

Biofertilizers constituted by plant growth promoting bacteria, are a sustainable alternative to stimulate sugarcane growth and development. The objective of this work was to isolate and characterize an endophytic *Gluconacetobacter* strain capable of colonizing and promoting crop growth. It also has a high viability and stability in low cost culture medium for its pilot and industrial scale propagation. From sugarcane stems, the endophytic strain *Gluconacetobacter* OCG1 with potential ability to fix nitrogen was isolated. After TUC 95-10 sugarcane buds inoculation, it was observed that OCG1 strain was able to colonize root system and to increase fresh and dry weight of both vegetative and root systems. Finally, OCG1 strain showed high ability to generate large amount of biomass and to produce and excrete exopolysaccharides (EPS) in the industrial culture medium used for the propagation at pilot scale. Also, it retained its viability during long storage at room temperature (25°C).

Hence, *Gluconacetobacter* OCG1 strain could be used as a biofertilizer to obtain high added value sugar cane seedlings from the inoculation of isolated buds.

**Key words:** sustainability, sugarcane field, biological nitrogen fixation.

Fecha de  
recepción:  
16/03/2021

Fecha de  
aceptación:  
07/05/2021

## ■ INTRODUCCIÓN

La producción de caña de azúcar es una de las actividades de mayor importancia económica y social en el noroeste argentino. Este cultivo es la principal fuente para la obtención de azúcar y es la materia prima más eficiente para la producción de bioetanol. Por su elevada capacidad de producción de biomasa y prolongada duración de su ciclo, la caña de azúcar tiene elevados requerimientos, tanto de nutrientes como de agua. Entre los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo, el nitrógeno (N) es considerado el más importante, ya que forma parte de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes orgánicos. Si bien la caña de azúcar puede asimilar gran parte del N disponible presente en el suelo, este no resulta suficiente para satisfacer los requerimientos del cultivo. Por esta razón, la fertilización nitrogenada constituye una práctica agronómica necesaria que en Tucumán se lleva a cabo, principalmente, mediante el uso de fertilizantes químicos sintéticos, entre los cuales el más utilizado es la urea (Romero *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando la urea se aplica en una cantidad mayor de la que puede absorber el cultivo, el resto no asimilado se pierde, generando un grave riesgo de contaminación ambiental. Además, desde un punto de vista microbiológico, el uso excesivo e inadecuado de fertilizantes nitrogenados sintéticos produce modificaciones en la composición de las poblaciones microbianas del suelo y del cultivo, afectando el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Anhita and Thangaraju, 2010).

Durante los últimos años, la creciente necesidad de implementar sistemas sustentables en el manejo de los cañaverales ha llevado a la utilización de los biofertilizantes como alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos. Los biofertilizantes están constituidos por bacterias promotoras del crecimiento de las plantas o bacterias PGPB (por sus siglas en inglés de “plant growth promoting bacteria”), capaces de mejorar la nutrición, la sanidad y el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos tales como la FBN, la producción de fitohormonas (auxinas, citoquinas y ácido indol acético, entre otros) y la solubilización de fosfatos (Muthukumarasamy *et al.*, 2002; Saharan and Nehra, 2011). Entre las bacterias PGPB más estudiadas asociadas a la caña de azúcar se encuentra el género *Gluconacetobacter*, capaz de colonizar de forma endofítica los tallos y raíces de la planta, estimulando directamente el crecimiento y desarrollo del cultivo. *G. diazotrophicus* es capaz de excretar más del 50% del N fijado en una forma asimilable por la planta, ejerciendo un efecto directo sobre ella, a diferencia de lo que ocurre con las bacterias rizosféricas (Cojho *et al.*, 1993). La asociación planta-bacteria está fuertemente influenciada por la fertilización nitrogenada. Se ha demostrado que *Gluconacetobacter* presenta baja frecuencia de aislamiento a partir de caña fertilizada con elevadas dosis de fertilizantes nitrogenados (275-300 kg N/ha) (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993). Por el contrario, cuando los niveles de fertilización son menores (50-60 kg N/ha), se ha reportado que la colonización de los tejidos por esta bacteria es más activa (Döbereiner, 1992). A nivel local, se han realizado grandes avances en el uso de biofertilizantes constituidos por bacterias rizosféricas como *Azospirillum* para mejorar el crecimiento de la caña de azúcar. Sin em-

bargo, las bacterias endófitas como *Gluconacetobacter* desempeñan un papel fundamental en la promoción del crecimiento; por un lado, por la estrecha interacción que presentan con la planta; y por otro, debido a que el interior de la planta, por tener un bajo contenido de oxígeno (O<sub>2</sub>), proporciona un ambiente protegido y favorable para llevar a cabo la FBN (Döbereiner, 1992; James *et al.*, 2001). La elevada estabilidad que presenta esta bacteria endofítica al colonizar los espacios intracelulares de los tallos de la caña de azúcar ha permitido su utilización en la inoculación de vitroplantas de caña de azúcar, aumentando el valor agregado de la caña semilla obtenida (Casas *et al.*, 2015). Durante los últimos años, el subprograma Agronomía de Caña de Azúcar de la EEAOC ha desarrollado un nuevo sistema de multiplicación de caña semilla de alta calidad a partir de yemas aisladas, obteniendo plantines de alta calidad agronómica. La posibilidad de inocular el material vegetal inicial y obtener plantines inoculados que alcancen un rápido establecimiento en el campo representa una mejora de gran impacto productivo y económico en este nuevo esquema de multiplicación de caña semilla de alta calidad.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar una cepa autóctona de *Gluconacetobacter*, adaptada a las condiciones agroecológicas de nuestra región y que sea capaz de colonizar el cultivo y promover el crecimiento inicial de yemas saneadas de caña de azúcar. Y finalmente, evaluar la posibilidad de propagar el aislamiento seleccionado, utilizando medios de cultivo industriales de bajo costo, formulados a partir de subproductos de la industria azucarera.

## ■ MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de cepas autóctonas de *Gluconacetobacter*

Se tomaron muestras de los tejidos internos de tallos de plantas de la variedad LCP 85-384, en edad de soca 1, provenientes de lotes comerciales ubicados en la localidad de Amberes, departamento Monteros. Esta región agroecológica pertenece al pedemonte cañero y presenta suelos de textura franco-arenosa con presencia, en algunos casos, de gravas en el perfil del suelo, y un clima subtropical húmedo. Una vez colectados, los tallos de las plantas fueron lavados con agua destilada y se secaron en papel absorbente. Con ayuda de un bisturí estéril, los tallos se pelaron y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm. Las bacterias del género *Gluconacetobacter* se aislaron siguiendo la técnica descrita por Döbereiner *et al.* (1993). A partir de cada muestra se realizaron diluciones sucesivas en agua destilada estéril y se tomaron alícuotas de 100 µl, que fueron sembradas en el medio de cultivo LGI-P semisólido libre de N cuya composición es: sacarosa 100 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2g/l; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,02 g/l; NaMo<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,002 g/l; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,01 g/l; azul de bromo timol (solución 0,5% p/v en 0,2 N KOH) 5 ml; agar 15 g/l; pH 5,5, ajustado con ácido acético glacial. Los viales se incubaron durante siete días a 30°C. Los cultivos que presentaron crecimiento bacteriano en forma de una película superficial densa de color amarillo, típica de *Gluconacetobacter*, se picaron en el medio de cultivo LGI-P sólido, adicio-

nado con extracto de levadura (0,02 g/l) como fuente nitrogenada, para la identificación de colonias planas e irregulares de color naranja intenso; y en el medio de cultivo Agar papa glucosado (APG-G) sólido, cuya composición es: extracto de papa 200 g/l, glucosa 20 g/l; agar 15 g/l, en el cual se observa la formación de colonias cremosas color marrón con bordes claros, luego de cinco a siete días de incubación a 30°C.

#### Caracterización molecular del aislamiento obtenido

Se llevó a cabo utilizando la técnica ARDRA (del inglés, "Amplified rDNA Restriction Analysis") (Malik *et al.*, 2008; Sklarz *et al.*, 2009), que permite diferenciar los productos de PCR sobre la base de la digestión con enzimas de restricción. Para ello se realizó la amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S ADN-ribosomal utilizando los cebadores 27f y 1492r (Biodynamics, Argentina), y posterior digestión durante 8 h a 37°C con las enzimas *AluI* y *BsuRI*. Las enzimas fueron inactivadas a 80°C durante 20 minutos (Thermo Scientific, USA). Los fragmentos obtenidos se sembraron en un gel de agarosa al 2% (p/v). El perfil de restricción obtenido se comparó con el de la cepa de referencia *G. diazotrophicus* PAL5.

#### Análisis de la fijación biológica de nitrógeno (FBN)

La FBN se analizó según la capacidad del aislamiento obtenido de crecer en el medio de cultivo LGI-P semisólido libre de nitrógeno y por amplificación por PCR de un fragmento de 700 pb del gen *nifD* de la nitrogenasa, enzima involucrada en el proceso de FBN. Para ello se utilizaron los cebadores *nifDf* y *nifDr* (Sigma-Aldrich, EE.UU) (Potrich *et al.*, 2001) y la cepa *G. diazotrophicus* PAL5 como control positivo.

#### Bioensayo sobre caña de azúcar

##### • Colonización

Se inocularon yemas extraídas de la porción central de tallos saneados de la variedad TUC 95-10. La extracción se realizó con una pinza sacabocado desinfectada previamente con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 1% (p/v). Inmediatamente después de la extracción de las yemas, estas se inocularon por inmersión durante 20 minutos con una suspensión bacteriana de la cepa seleccionada en una concentración de  $10^8$  UFC/ml, por ser la concentración recomendada para este género bacteriano (James, 2000). Como control se utilizaron yemas sin inocular sumergidas en agua destilada. Por cada tratamiento se sembraron 15 yemas en bandejas de plástico utilizando una mezcla de sustrato, arena y perlome en proporciones 3:2:1 (p/p/p). Luego de la inoculación, las bandejas se conservaron en invernáculo bajo condiciones controladas de humedad (90% HR) y temperatura (35°C). Se trabajó con tres repeticiones (bandejas) por tratamiento en un diseño experimental en bloques completamente aleatorizados. A los 60 días posteriores a la inoculación (DPI) se tomaron muestras de raíces y tallos para realizar los recuentos bacterianos en el medio de cultivo LGI-P semisólido, siguiendo la técnica del Número Más Probable (NMP) y utilizando la Tabla de Mc Crady para tres repeticiones (Döbereiner *et al.*, 1995).

##### • Promoción del crecimiento

Para el ensayo se siguió el mismo procedimiento que el descrito anteriormente. A los 30 DPI se determinó altura y número de hojas verdes, y a los 60 DPI se evaluó peso fresco y seco tanto del sistema aéreo como del radicular. Los datos fueron analizados con el programa InfoStat (Software Estadístico, 2010) para Windows mediante el test LSD-Fisher con  $p \leq 0,10$ .

##### • Crecimiento de la cepa seleccionada y evaluación de su estabilidad en un medio de producción

- **Preparación del medio de cultivo de propagación:** se realizó un preinóculo donde se sembró una colonia pura de la cepa seleccionada en el medio de cultivo LGI-P líquido que contenía extracto de levadura (0,05 g/l) como fuente nitrogenada. El cultivo se incubó con agitación a 30°C y 180 rpm durante 48 h.

- **Determinación de la viabilidad y estabilidad de la cepa seleccionada:** se inocularon 25 ml del preinóculo en un medio de producción industrial, formulado a partir de subproductos de la industria azucarera, cuya composición es:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1,32 g/l; N total de levadura torula (*Torulopsis utilis*) 0,73 g/l; melaza 235,8 g/l; pH 5,5 - 6. Se incubó en baño termostatzado con agitación a 30°C y 180 rpm. Este ensayo se realizó por triplicado.

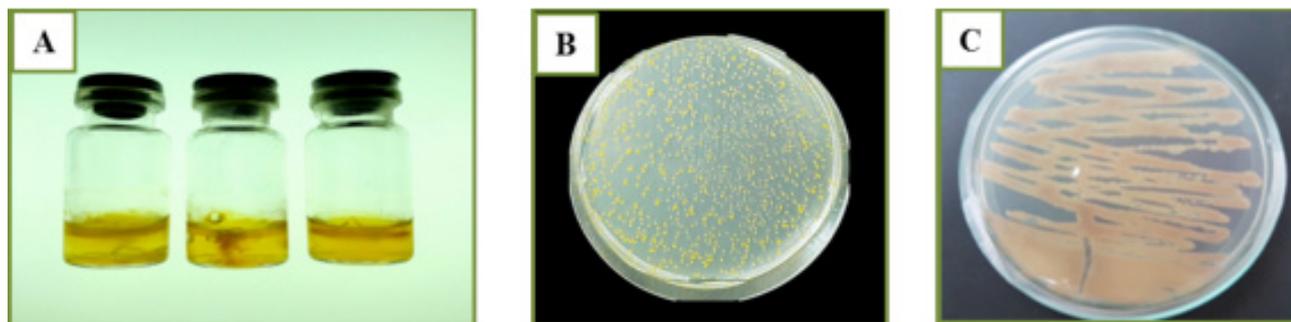
Para evaluar la viabilidad de la cepa OCG1 en el medio de producción se tomaron muestras del cultivo a los 7, 14 y 30 días y se determinó el número de (UFC/ml), siguiendo la metodología descrita por Döbereiner *et al.* (1995) en el medio de cultivo LGI-P sólido. Además, se evaluó la estabilidad del cultivo mediante recuentos en el medio de cultivo LGI-P semisólido, siguiendo la técnica del Número Más Probable (NMP) (Döbereiner *et al.*, 1995) y mediante observaciones de sus características morfológicas en microscopio óptico.

## ■ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

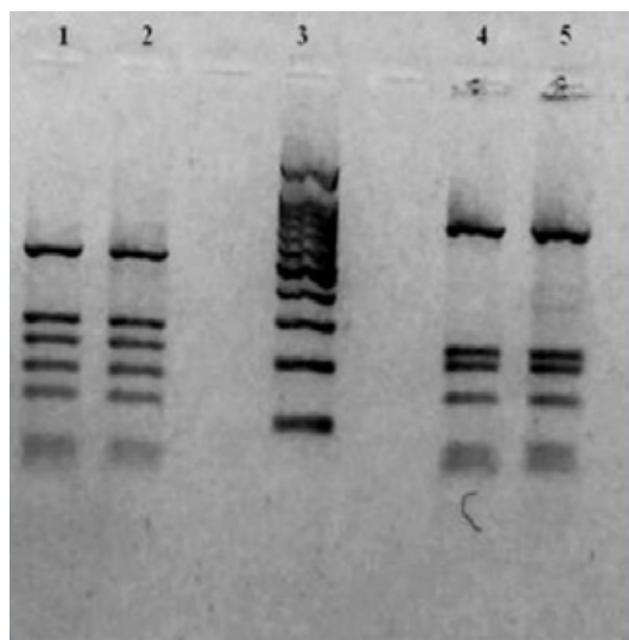
A partir de tallos de la variedad LCP 85-384, en edad de soca 1 se obtuvo un aislamiento denominado OCG1 con características similares a *G. diazotrophicus*, según su crecimiento en medios de cultivo selectivos para este microorganismo. La cepa aislada fue capaz de crecer en el medio de cultivo semisólido LGI-P libre de N, formando una película amarilla superficial típica del género *Gluconacetobacter*, y en los medios de cultivos sólidos: LGI-P formando pequeñas colonias amarillas cremosas y APG-G con formación de colonias color marrón cremosas con bordes claros (Figura 1a, b y c). En cuanto a la caracterización morfológica por microscopía óptica, el aislamiento seleccionado se observó como bacilos cortos que presentan movilidad de forma vibroide mediante la presencia de flagelos polares que no forman endosporas ni cápsulas, lo cual coincide con lo reportado para el género *Gluconacetobacter* (Cavalcante and Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989).

A fin de realizar la caracterización molecular de la cepa OCG1, se realizó la amplificación por PCR del gen 16S del ADNr y su posterior digestión con las enzimas de restricción *AluI* y *BsuRI*. La cepa PAL5 de *G. diazotrophicus* fue utilizada como cepa de referencia para la comparación de los perfiles de restricción (Figura 2).

Se observó que el aislamiento OCG1 presentó



**Figura 1.** Crecimiento *Gluconacetobacter* cepa OCG1 en (a) medio de cultivo LGI-P semisólido libre de N, (b) en medio LGI-P sólido y (c) en medio APG-G sólido. Tucuman, año 2020.



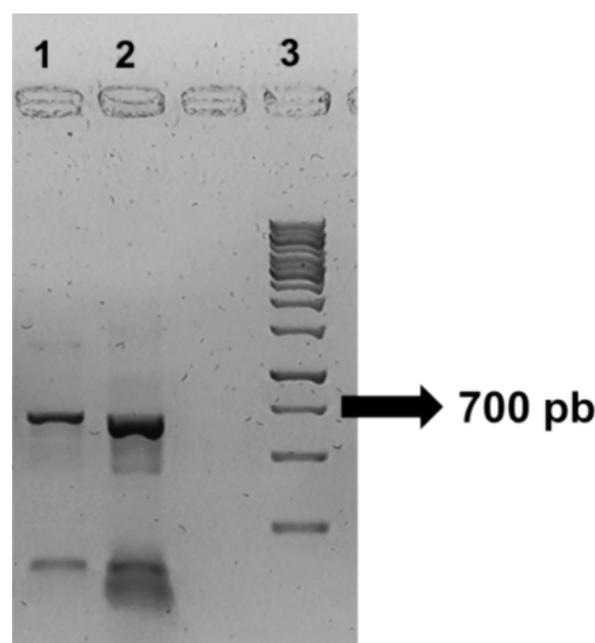
**Figura 2.** Perfil de electroforesis de los fragmentos obtenidos luego de la restricción del ADNr 16S con las enzimas de restricción *BsuRI* y *AluI*. Los patrones de restricción para *BsuRI* corresponden a la cepa PAL5 usada como referencia (calle 1) y la cepa OCG1 (calle 2). La calle 3 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (ThermoScientific). Los patrones de restricción para *AluI* corresponden a la cepa PAL5 (calle 4) y la cepa OCG1 (calle 5).

los mismos perfiles de restricción que la cepa de referencia PAL5 de *G. diazotrophicus*, tanto en la digestión con la enzima *BsuRI* como con *AluI*, por lo que se infiere que podría corresponder a dicho género bacteriano.

La capacidad potencial del aislamiento seleccionado de fijar N atmosférico fue evaluada mediante amplificación por PCR de un fragmento del gen *nifD* de la nitrogenasa (Sevilla *et al.*, 1998). Según se puede observar en la Figura 3, tanto la cepa OCG1 (calle 1) como la cepa PAL5 utilizada como referencia (calle 2) presentaron una banda de 700 pb correspondiente al fragmento del gen *nifD* de la nitrogenasa. Diferentes autores han confirmado la capacidad de *G. diazotrophicus* para fijar N y convertirlo en  $\text{NH}_3$  con posterior oxidación a  $\text{NH}_4^+$ , mediante la expresión de la enzima nitrogenasa en condiciones microaerobias (Patriquin *et al.*, 1983; Gillis *et al.*, 1989; Stephan *et*

*al.*, 1991; Gallon, 1992; Baldani *et al.*, 1997). La presencia de la bacteria es una condición para la FBN y la eficiencia del sistema de FBN depende de diversos factores, entre ellos un óptimo suministro de agua y nutrientes, las condiciones ambientales, la edad de la planta y el grado de asociación entre la variedad de la caña de azúcar utilizada y la bacteria (Lima *et al.*, 1987; Urquiaga *et al.*, 1992; Da Silva *et al.*, 1993).

Teniendo en cuenta que la colonización es un factor clave para que la bacteria pueda llevar a cabo la promoción del crecimiento, se evaluó si la cepa seleccionada OCG1 es capaz de colonizar raíces y tallos de la variedad TUC 95-10. Para ello, se realizó un bioensayo de inoculación en invernáculo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Según se puede observar, a los 60 DPI tanto las raíces como los tallos presentaron crecimiento en el medio LGI-P semisólido, indicando la presencia de bacterias fijadoras de N capaces de utilizar sacarosa como fuente de C, como las del género *Gluconacetobacter* (Ruschel *et al.*, 1975; Patriquin *et al.*, 1980).



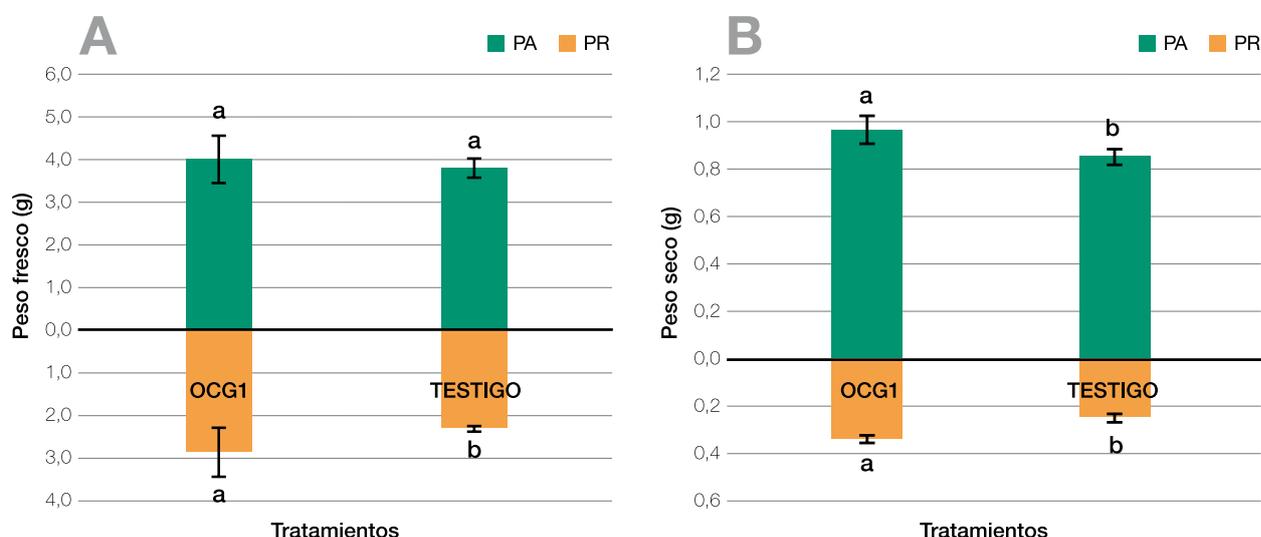
**Figura 3.** Amplificación por PCR del gen *nifD* (700 pb) para la cepa OCG1 (calle 1) y la cepa control *G. diazotrophicus* PAL5 (calle 2). La calle 3 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (ThermoScientific).

Sólo las raíces de las plántulas inoculadas con la cepa OCG1 presentaron un aumento estadísticamente significativo de UFC/g respecto a las plantas control sin inocular. Estos resultados podrían indicar la presencia endofítica de la cepa OCG1 colonizando el sistema radicular de las plantas inoculadas. Esto coincide con lo reportado por Bellone *et al.* (1997), quienes lograron aislar *Gluconacetobacter* a partir de raíces de caña de azúcar de dos variedades diferentes de la provincia de Tucumán, lo cual indicaría que esta bacteria está asociada al sistema radicular y podría beneficiar el desarrollo inicial de las plantas de caña de azúcar (Cavalcante and Döbereiner, 1988; Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003). En cuanto a los resultados de tallo, no se observaron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y el control (Tabla 1). Esto indicaría la presencia natural de las bacterias de este género colonizando los tallos de las plántulas de caña de azúcar, independientemente de la inoculación realizada.

**Tabla 1.** Recuento de bacterias fijadoras de N en el medio de cultivo LGI-P semisólido (expresado como UFC/g tejido).

Tratamiento	Raíz	Tallo
<i>Gluconacetobacter</i> cepa OCG1	3,55 ± 0,43 a	3,67 ± 0,37 a
Control sin inocular	2,67 ± 0,27 b	3,66 ± 0,48 a

Los resultados obtenidos al evaluar la altura y el número de hojas verdes a los 30 DPI no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas y las testigo sin inocular (datos no mostrados). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos al evaluar el peso fresco y seco del sistema aéreo y radicular a los 60 DPI. En este caso, las plantas inoculadas con la cepa OCG1 presentaron un incremento en el peso fresco aéreo de 0,200 g y un incremento significativo de 0,560 g en el sistema radicular, frente al testigo; mientras que en el peso seco, el incremento observado fue de 0,111 g y 0,088 g en la parte aérea y radicular, respectivamente, en comparación al testigo sin inocular (Figura 4 a y b).



**Figura 4.** Evaluación del efecto promotor del crecimiento de *Gluconacetobacter* cepa OCG1 a los 60 DPI. Cuantificación del peso fresco (a) y seco (b) tanto del sistema aéreo (PA) (barras verdes) como radicular (PR) (barras naranjas). Tucuman, año 2020.

Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que *Gluconacetobacter* es capaz de aumentar el peso aéreo y radicular de la caña de azúcar, posiblemente debido a que la bacteria produce fitohormonas como el ácido indol acético y giberelinas (Fuentes Ramírez *et al.*, 1993; Jiménez-Salgado *et al.*, 1997; Bastián *et al.*, 1998), que inducen la elongación celular de la planta (Döbereiner, 1989; Rayle and Cleland, 1992).

A fin de propagar la cepa OCG1 en un medio de cultivo de bajo costo, y que permita obtener grandes cantidades de células metabólicamente activas para una posible formulación de un biofertilizante, la cepa OCG1 se inoculó en un medio formulado con subproductos de la industria sucroalcoholera. Como control se utilizó la cepa *G. diazotrophicus* PAL5, considerando que esta cepa se emplea en formulaciones de biofertilizantes comerciales de segunda generación, como el EMMIM-1 patentado por el Instituto Mexicano de Propiedad Intelectual y comercializado por la empresa BioAgro; y el INOCREP desarrollado por la Universidad de Puebla, México (Hernández Vargas, 2017; Morales-García *et al.*, 2020). A los siete días de incubación, se determinó el número de UFC/ml. Según los resultados, la cepa OCG1 fue capaz de crecer hasta alcanzar un valor promedio de  $9,33 \times 10^7$  UFC/ml en el medio de cultivo formulado, utilizando como única fuente de C un sustrato complejo como la melaza. Además, presentó mayor capacidad para multiplicarse y adaptarse a la composición del medio de cultivo, en comparación con la cepa de referencia PAL5, la cual creció hasta alcanzar un valor promedio de  $1,50 \times 10^4$  UFC/ml.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad y la conservación de la viabilidad de la cepa OCG1 en el medio de producción. Los resultados se muestran en la Figura 5. Según puede observarse, la cantidad de bacterias viables se mantuvo en el orden de  $10^7$  UFC/ml hasta los 30 DPI, cuando el medio de cultivo se almacenó a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ).

Por otro lado, durante el crecimiento de la cepa OCG1 en el medio de cultivo de producción se observó la formación de una película de biofilm que permaneció adherida a la pared del erlenmeyer (Figura 6a). Existen antecedentes que indican que *G. diazotrophicus* es capaz de

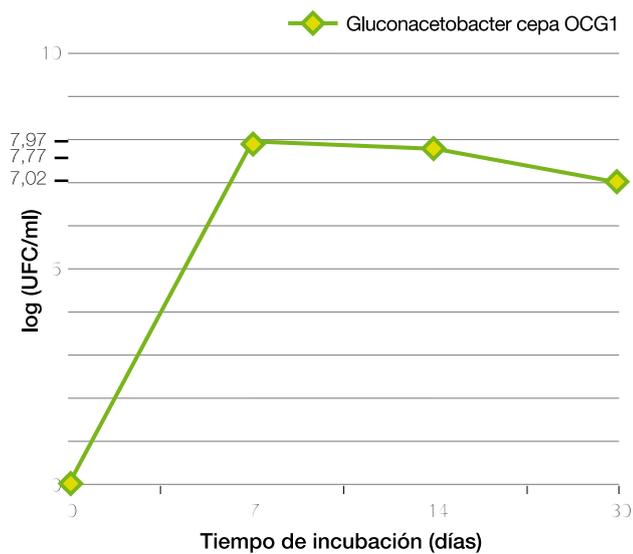


Figura 5. Viabilidad de la cepa OCG1 en el medio de producción.

producir y excretar al medio exopolisacáridos (EPS) que le permiten formar biopelículas y adherirse a superficies inertes, características típicas de las bacterias de este género (Danese *et al.*, 2000; Laue *et al.*, 2006; Russo *et al.*, 2006; Jaramillo *et al.*, 2014). *G. diazotrophicus* posee el gen *gumD*, el cual es esencial para la producción de EPS, determinante para la formación de biopelículas y para la colonización de diferentes cultivos, entre ellos la caña de azúcar (Meneses *et al.*, 2011; Idogawa *et al.*, 2014; Meneses *et al.*, 2017). La producción de EPS por la cepa OCG1 observada en el medio de cultivo utilizado resulta de fundamental importancia, no solo porque los produce utilizando melaza como única fuente de C, sino también porque los EPS protegen a las bacterias frente a condiciones de estrés osmótico y desecación. El EPS bacteriano también ayuda al proceso de colonización creando un microambiente favorable, aunque los mecanismos involucrados en este proceso aún son desconocidos (Dow *et al.*, 2000; Rinaudi and Giordano, 2010). La morfología de *Glucona-*

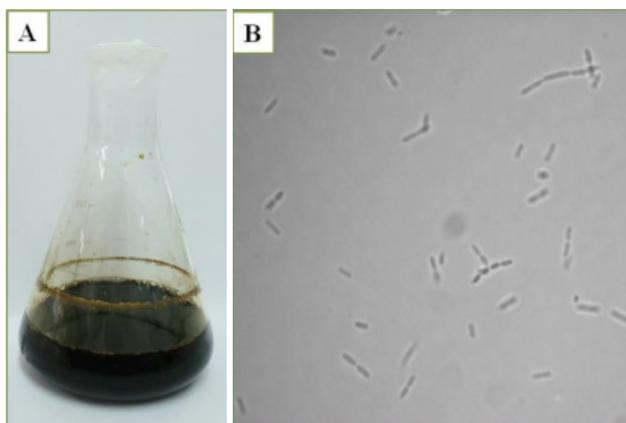


Figura 6. (A) Medio de cultivo de producción con formación de biofilm adherido a la pared del erlenmeyer. (B) Observación en microscopio óptico (aumento 100x) de la morfología de *Gluconacetobacter* cepa OCG1, luego del crecimiento en el medio de producción. Tucumán, 2020.

*cetobacter* cepa OCG1A presentó una leve disminución en la movilidad bacilar cuando se observó en microscopio óptico a los 30 DPI, luego del crecimiento en el medio de producción, comparado con la observación realizada en el mismo medio a los 7 DPI (Figura 6b).

## CONCLUSIONES

En este trabajo se logró aislar y caracterizar en forma morfológica y molecular una cepa endofítica de *Gluconacetobacter* denominada OCG1, a partir de tallos de caña de azúcar de la variedad LCP 85-384. Esta cepa demostró tener capacidad potencial para fijar N atmosférico debido a la presencia del gen *nifD* de la nitrogenasa, característica promotora del crecimiento típica de las bacterias PGPB.

La cepa OCG1 fue capaz de colonizar el sistema radicular de plantines de caña de azúcar de la variedad TUC 95-10 y promover el crecimiento inicial observado por el incremento del peso fresco y seco, tanto del sistema aéreo como del radicular. Por lo tanto, los plantines obtenidos a partir de yemas inoculadas con la cepa OCG1 podrían tener una mejor adaptación y mayor crecimiento en el campo, permitiendo un rápido establecimiento del cañaveral.

Por último, la cepa OCG1 presentó elevada viabilidad y estabilidad en el medio de cultivo de producción, luego de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente, y fue además capaz de producir y excretar EPS. Este medio de cultivo, de bajo costo por estar formulado a partir de subproductos de la agroindustria azucarera, podría ser utilizado para la propagación a gran escala de la cepa OCG1.

Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo indican que la cepa *Gluconacetobacter* OCG1 aislada y seleccionada en nuestro laboratorio tiene potencial para ser utilizada en la inoculación de yemas aisladas de caña de azúcar, a fin de obtener plantines inoculados de alto valor agregado. Si bien los resultados preliminares obtenidos hasta el momento son satisfactorios, es necesario continuar con las investigaciones.

## AGRADECIMIENTOS

Parte de este trabajo fue realizado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) (Proyecto FITR Agroindustria 2014 – Tecnocaña N° 29). Se agradece al personal de las Secciones Microbiología y Fitopatología de la EEAOC por proporcionar los equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Anhita, K. V. and M. Thangaraju. 2010. Influence of N fertilization on colonization and activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane. *Agro. Crop Sci.* 1 (1): 6-11.
- Baldani, J.; L. Caruso; V. L. Baldani; S. R. Goi and J. Döbereiner. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29 (5-6): 911-922.
- Bastián, F. A.; P. Cohen; V. Piccoli; R. Luna; S. Baraldi and R. Bottini. 1998. Production of indole 3-ace-

- tic acid and gibberellins A1 y A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*. 24: 7-11.
- 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 (5-6): 965-967.
- Casas, M. A.; J. Pérez; D. Piñón; A. Bernal; M. Zardón y J. R. Torres. 2015.** Resultados de colonización e interacción del endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* en vitroplantas de caña de azúcar. *Fitosanidad*. 19 (2): 101-101.
- Cavalcante, V. A. and J. Döbereiner. 1988.** A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*. 108: 23-31.
- Cojho, E. H., V. M. Reis; A. C. G. Schenberg; J. Döbereiner. 1993.** Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 106 (3): 341-346.
- Da Silva, P. M.; S. M. Tsai and R. Bonetti. 1993.** Response to inoculation and N fertilization for increased yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: *Enhancement of Biological Nitrogen Fixation of Common Bean in Latin America*. Springer, Dordrecht, 1993, pp. 123-130.
- Danese, P. N.; L. A. Pratt and R. Kolter. 2000.** Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 182 (12): 3593-3596.
- Döbereiner, J. 1989.** Isolation and identification of root associated diazotrophs. In: *Nitrogen fixation with non-legumes*. Springer, Dordrecht, 1989, pp. 103-108.
- Döbereiner, J. 1992.** Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Ciênc. Cult.* 44 (5): 310-313.
- Döbereiner, J.; V. M. Reis; M. A. Paula and F. D. Olivares. 1993.** Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: *New horizons in nitrogen fixation*. Springer, Dordrecht, 1993, pp. 671-676.
- Döbereiner, J.; V. L. D. Baldani e J. I. Baldani. 1995.** Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília-DF: EMBRAPA-SPI. ISBN 85-85007-65-6.
- Dow, M.; M. A. Newman and E. Von Roepenack. 2000.** The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38 (1): 241-261.
- Fuentes-Ramírez, L.; T. Jimenez-Salgado; I. R. Abarca-Ocampo and J. Caballero Mellado. 1993.** *Acetobacter diazotrophicus* an indole acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil*. 154 (2): 145-150.
- Gallon, J. R. 1992.** Tansley Review No. 44. Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. *New Phytol.* 571-609.
- Gillis, M.; K. Kersters; B. Hoste; D. Janssens; R. M. Kroppenstedt; M. P. Stephan and J. De Ley. 1989.** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 39 (3): 361-364.
- Hernández Vargas, M. 2017.** Escalamiento y estrategias de co-cultivo para la producción de un inoculante de segunda generación. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Idogawa, N.; R., Amamoto; K. Murata and S. Kawai. 2014.** Phosphate enhances levan production in the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *Bioengineered* 5 (3): 173-179.
- James, E. K.; F. L. Olivares; A. L. de Oliveira; F. B. dos Reis Jr; L. G. da Silva and V. M. Reis. 2001.** Further observations on the interaction between sugarcane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J. Exp. Bot.* 52 (357): 747-760.
- James, E. K. 2000.** Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res.* 65: 197-209.
- Jaramillo, R. D.; O. Perna; L. E. Ríos y J. Escobar. 2014.** Efecto de la melaza de caña tratada con ácido sulfúrico en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693. *Rev. Colomb. Quim.* 43 (2): 25-31.
- Jiménez-Salgado, T.; L. E. Fuentes-Ramírez; A. Tapia-Hernández; M. A. Mascarua-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 (9): 3676-83.
- Laue, H.; A. Schenk; H. Li; L. Lambertsen; T. R. Neu; S. Molin and M. S. Ullrich. 2006.** Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* 152 (10): 2909-2918.
- 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 (2): 165-170.
- Malik, S.; M. Beer; M. Megharaj and R. Naidu. 2008.** The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ. Int.* 34 (2): 265-276.
- Meneses, C. H.; T. Gonçalves; S. Alquéres; L. Rouws; R. Serrato; M. Vidal and J. I. Baldani. 2017.** *Gluconacetobacter diazotrophicus* exopolysaccharide protects bacterial cells against oxidative stress in vitro and during rice plant colonization. *Plant Soil* 416 (1-2): 133-147.
- Meneses, C. H.; L. F. Rouws; J. L. Simões-Araújo; M. S. Vidal and J. I. Baldani. 2011.** Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24 (12): 1448-1458.
- Morales-García, Y. E.; D. Juárez-Hernández; A. L. Hernández-Tenorio; J. M. Muñoz-Morales; A. Baez y J. Muñoz-Rojas. 2020.** Inoculante de segunda generación para incrementar el crecimiento y salud de plantas de jardín. *Revista Alianzas y Tendencias BUAP (AyTBUAP)*. 5 (20): 136-154.
- 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. Revathi; S. Seshadri and C.**

- Lakshminarasimhan. 2002.** *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Curr. Sci.* 137-145.
- Patriquin, D. G.; L. A. Gracioli and A. P. Ruschel. 1980.** Nitrogenase activity of sugar cane propagated from stem cuttings in sterile vermiculite. *Soil Biol. Biochem.* 12 (4): 413-417.
- Patriquin, D. G.; J. Döbereiner and D. K Jain. 1983.** Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29 (8): 900-915.
- Potrich, D. P.; L. M. P. Passaglia and I. S. Schrank. 2001.** Partial characterization of *nif* genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (9): 1105-1113.
- Rayle, D. and R. Cleland. 1992.** The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.
- Rinaudi, L. V. and W. Giordano. 2010.** An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 304 (1): 1-11.
- Romero, E. R.; L. G. Alonso; S. Casen; M. F. Leggio Neme; J. Tonatto; J. Scandaliaris; P. A. Digonzelli; J. Giardina y J. Fernandez de Ullivarri. 2009.** Fertilización de la caña de azúcar: criterios y recomendaciones. En: Romero, E. R.; J. Scandaliaris y P. Digonzelli (eds.), *Manual del cañero*, EEAOC, Tucumán, R. Argentina, pp. 75-84.
- Ruschel, A. P.; Y. Henis and E. Salati. 1975.** Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugarcane seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 7: 181-182.
- Russo, D. M.; A. Williams; A. Edwards; D. M. Posadas; C. Finnie; M. Dankert and A. Zorreguieta. 2006.** Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 188 (12): 4474-4486.
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *LSMR.* 21: 1-30.
- 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.
- Sklarz, M. Y.; R. Angel; O. Gillor and M. I. M. Soares. 2009.** Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96 (4): 659.
- Stephan, M. P.; M. Oliveira; K. R. S. Teixeira; G. Martinez-Drets and J. Döbereiner. 1991.** Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77 (1): 67-72.
- Urquiaga, S.; K. H. Cruz and R. M. Boddey. 1992.** Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56 (1): 105-114.