

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Caracterización serológica y molecular de la cepa 8-INICA de *Azospirillum brasilense* utilizada en la biofertilización de la caña de azúcar

Molecular and Serological Characterization of *Azospirillum* strain 8-INICA employed in sugarcane biofertilization

Juana Mercedes Pérez Pérez^{1*}, Ana Nelis San Juan Rodríguez², María Laura Tortora³,
Lucia Vera³, Mario Casas González¹

¹ Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), km 2 ½, carretera a la CUJAE, Boyeros, La Habana, Cuba, CP 19390

² Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), UEB Bioprocesos Cuba 10, Pablo Noriega, Quivicán, Mayabeque, CP 33500

³ Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEOC), Av. William Cross 3150, Tucumán, Argentina, CP T4101XAC

*Autor para correspondencia: juanita@inica.azcuba.cu

RESUMEN

Las bacterias del género *Azospirillum* producen efectos beneficiosos en el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos, debido a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y de producir sustancias estimuladoras del crecimiento. En Cuba, se utiliza de manera satisfactoria en la biofertilización de la caña de azúcar y otros cultivos económicos la cepa 8-INICA de *Azospirillum* sp. Su caracterización morfológica y bioquímica, indicó similitud con la especie *A. brasilense*. Por la importancia de esta cepa en la continuidad de las labores de biofertilización que se ejecutan en el país, el objetivo del trabajo fue corroborar la identidad de la misma mediante el empleo de técnicas inmunológicas y moleculares.

Palabras clave: rizobacterias, identificación, *Saccharum* spp.

ABSTRACT

Azospirillum is a bacterium that produces growth and yields increments due to its capacity of fix atmospheric nitrogen and to produce phytohormones. In Cuba, the 8-INICA strain of *Azospirillum* sp. has been used successfully in sugarcane biofertilization and others economical crops. The morphological and biochemical characterization of this stain showed similarity with the species *A. brasilense*. Due to the importance of this strain in the biofertilization works

carried out in our country, the aim of this paper was to confirm the identity of this strain through immunoenzymatic and molecular techniques.

Keywords: rhizobacteria, identification, *Saccharum* spp.

INTRODUCCIÓN

Para evitar el riesgo ecológico que supone la diseminación de microorganismos es necesario identificar y rastrear las especies presentes en el interior de las plantas y la rizosfera de las mismas. Es por ello que se busca una correcta identificación de las cepas microbianas a través de técnicas clásicas y de avanzada (Bloemberg y Lugtenberg, 2001).

Azospirillum es el género de rizobacterias de vida libre más estudiado debido al gran interés agrícola existente por su capacidad de fijar nitrógeno biológico y producir fitohormonas (Sangoquiza *et al.*, 2018). El género contiene especies de bacterias muy versátiles, promotoras del crecimiento de las plantas (Cassán *et al.*, 2014), cuyos efectos beneficiosos se debe, además, al incremento de la toma de nutrientes y agua (Ardakani *et al.*, 2011) y la inducción de genes que confieren tolerancia al estrés (Fukami *et al.*, 2017; 2018). Estos mecanismos pueden ser útiles al disminuir el uso de fertilizantes y propiciar la implementación de un desarrollo sostenible y sustentable del suelo (Vital y Mendoza, 2014).

Las técnicas inmunológicas involucran la reacción de afinidad antígeno-anticuerpo. Entre las más empleadas se encuentran la aglutinación, la inmunofluorescencia, la inmunodifusión y los ensayos inmunoabsorbentes (Caballero-Mellado, 2000).

Conjuntamente con las serológicas, las técnicas de biología molecular resultan de gran utilidad en la identificación de las especies de *Azospirillum*. Entre ellas, el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del operon histidina y las sondas basadas en el gen 16S del ARNr son las más utilizadas por su rapidez, confiabilidad y reproducibilidad (de-Bashan *et al.*, 2007).

Para mejorar la sustentabilidad de la producción de los cultivos, la agricultura ha buscado alternativas biológicas que sean más económicas, mejoren la rentabilidad y eviten el deterioro del medioambiente, por lo cual pueden ser utilizadas para la sustitución parcial o total de fertilizantes químicos (Hernández *et al.*, 2015).

En Cuba se utiliza de forma satisfactoria la cepa 8-INICA de *Azospirillum* sp. en la biofertilización (Montero *et al.*, 2017). La caracterización morfológica y bioquímica de esta cepa, realizada por Pérez y Casas (2005) indicó que presenta similitudes con las descripciones plasmadas para la especie *A. brasilense* en el Manual de Clasificación de Bacterias de Berguey. Por la importancia de esta cepa para la continuidad de las labores de biofertilización que se ejecutan en el país, el objetivo del trabajo fue corroborar la identidad de la misma mediante el empleo de técnicas inmunológicas y moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización serológica

Las cepas utilizadas en el estudio proceden de la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) y fueron aisladas, caracterizadas e identificadas como *Azospirillum* spp. en estudios previos (Pérez y Casas, 2005). Además, fueron usados los patrones *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145) y *A. lipoferum* SpBr17 (ATCC 29709), procedentes del cepario del CNPAB/EMBRAPA de Brasil.

Se realizó la caracterización serológica de la cepa 8-INICA, la más utilizada en Cuba para la elaboración de inoculantes comerciales destinados a la caña de azúcar y otros cultivos económicos, seleccionada por sus significativas

posibilidades estimuladoras del crecimiento de las plantas. La cepa fue comparada con los patrones *A. brasilense* Sp7 y *A. lipoferum* SpBr17, además de las cepas 79-INICA y 11-INICA (presentes en la Colección del INICA). Cada cepa fue incubada en caldo Okon durante 48 horas, en agitación a 37 °C; posteriormente, las células se colectaron por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos y lavaron tres veces con buffer salino fosfato 10 mM, pH 7,4. Finalmente, se resuspendieron en 1 mL del buffer.

Para la obtención de los anticuerpos policlonales a partir de las cepas patrones Sp7 y SpBr17, la biomasa obtenida (utilizada como inmunógeno) se resuspendió en solución salina fisiológica estéril (NaCl 0,85 %), en concentraciones crecientes de densidad óptica (0,4, 0,6, 0,8 y 1,0) medidas en un espectrofotómetro SPEKOL11 (Carl Zeiss Jena, Alemania) y con estas suspensiones se inocularon por vía subcutánea conejos albinos de aproximadamente 2 kg de peso, obtenidos del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), siguiendo el esquema propuesto en la Tabla 1.

Los conejos fueron desangrados por punción intracardiaca 10 días después de finalizado el esquema de inmunización y los sueros obtenidos se conservaron a -20 oC. La titulación de los antisueros frente a sus antígenos homólogos se realizó a través de las técnicas de Inmunoprecipitación (IP) e Inmunodifusión doble (IDD). Las relaciones antigénicas entre las cepas patrones y las incluidas se determinaron según la técnica de IDD, en placas de agarosa al 1 % con solución PBS, las cuales difundieron en cámara húmeda a 37 oC durante 48 horas.

Caracterización molecular

Para la caracterización molecular de la cepa cubana 8-INICA se utilizaron las cepas autóctonas de *A. brasilense* TucH1, TucH2, TucL1, TucL2, TucL3 y la cepa de referencia *A. brasilense* Az39 (utilizada en Argentina para la formulación de bioproductos, procedente del cepario de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEOC), Tucumán, Argentina).

La extracción del ADN de cada cepa se realizó con el kit de extracción (Accuprep Genomic DNA kit), a partir de 1 mL de cultivo líquido incubado en medio Luria-Bertani por 48 horas. La PCR se realizó con los cebadores específicos 27f (5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 149r (5' CTACGGCTACCTTGTTACGA 3') que amplifican un fragmento del gen 16S ADNr. La mezcla de reacción para un volumen final de 25 µL fue: 2,5 µL Buffer Taq Pol 10 X, 2 µL MgCl₂ 25 mM, 1 µL dNTPs 10 mM, 1 µL mezcla de cebadores 27f + 149r 10 µM, 0,2 µL Taq Polimerasa 500 U (Thermo Scientific), 2 µL ADN molde y 15,3 µL agua miliQ estéril.

Los parámetros para la PCR fueron: un ciclo a 95 °C (5 min), 55 °C (1 min) y 72 °C (2 min); 30 ciclos a 94 °C (45 s), 50 °C (2 min) y 72 °C (50 s) y un ciclo final a 72 °C durante 10 min. Los resultados de la reacción (5 µL) fueron analizados en gel de agarosa 1,5 %, utilizando buffer Tris-ácidobórico-EDTA (TBE) 0,5X como buffer de corrida. Para la visualización de los productos amplificados se agregó 1 µl de GelRed 10.000X (Biotium) por cada 5 µl de muestra. El gel fue visualizado a través de luz UV (320 nm) con un transiluminador Vilber Lourmat TFX-20M. Las imágenes se tomaron con una cámara fotográfica digital (Kodak Digital Science).

Tabla 1 - Esquema de inmunización

Días	0	7	14	21	28
D. O.	0,4*	0,4	0,6	0,8	1,0

D.O. - Densidad Óptica, * Células inactivadas por calor

El análisis de restricción del ADNr 16S amplificado (ARDRA) se realizó mediante la digestión de los productos amplificados con la enzima de restricción AluI (Thermo Scientific). La mezcla de reacción fue: 10 µL producto PCR, 18 µL de agua miliQ estéril, 2 µL de Buffer Tango 10X y 1 µL Enzima AluI (5 U/µL) (Thermo Scientific). La mezcla se incubó a 37 °C durante 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación, la enzima se inactivó por calentamiento a 65 °C durante 20 min. La separación de los fragmentos obtenidos fue mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) utilizando buffer Tris-ácidobórico-EDTA (TBE) 0.5X, como buffer de corrida. Para la visualización de los productos, se agregó 1 µL de GelRed 10.000X (Biotium) por cada 5 µL de muestra. Una vez finalizada la corrida, el gel fue visualizado y las imágenes según la metodología descrita anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización serológica

Al enfrentar las diferentes diluciones de los antisueros de las cepas patrones Sp7 y SpBr17 con sus antígenos homólogos mediante la técnica de IP, se obtuvieron títulos de 1:2048 y

1:1024 y con la IDD de 1:64 y 1:8, respectivamente.

La relación cualitativa entre los antisueros (As) de las cepas patrones con los antígenos de las cepas 8-INICA, 11-INICA y 79-INICA, a través de la técnica de IDD (Tabla 2), mostró la formación de bandas de precipitación por la existencia de determinantes antigénicos comunes entre ellas. Esta técnica está basada en el principio de que el antígeno y el anticuerpo difunden a través de un medio semisólido y forman complejos inmunitarios estables, que aparecen como líneas o bandas de precipitación insoluble en el “Punto de Equivalencia”, sitio donde alcanzan las proporciones óptimas (Licea *et al.*, 2016).

La completa identidad existente entre el Ac Sp7 y su Ag homólogo, se corresponde con la formación de diferentes bandas de precipitación, asociadas a la presencia de un mayor número de determinantes antigénicos. Todos los aislamientos formaron arcos de precipitación comunes con los anticuerpos de las cepas patrones, debido a la existencia entre ellas de determinantes antigénicos de origen genérico, resultado similares al obtenido por Pazos *et al.* (2000) al realizar una caracterización serológica de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de arroz.

Tabla 2 - Relación cualitativa del enfrentamiento de los antisueros de *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145) y *A. lipoferum* SpBr17 (ATCC 29709) con las de *Azospirillum* spp. 8-INICA, 11-INICA y 79-INICA

Cepas	As <i>A. brasilense</i> Sp7	As <i>A. lipoferum</i> SpBr17
Sp7	+++	-
SpBr17	-	+
8-INICA	++	+
79-INICA	+	++
11-INICA	+	-

AS - antisuero, (+) reacción positiva, (-) ausencia de reacción
Cada signo positivo representa una banda de precipitación

La experiencia serológica de los estudios con *A. brasilense* y *A. lipoferum* arrojaron que los anticuerpos policlonales producidos directamente contra *A. brasilense* poseen una alta especificidad, con bajos niveles de reacciones cruzadas respecto a otras cepas; sin embargo, reacciones cruzadas aparecen entre los sueros obtenidos para cepas de *A. lipoferum* (Kirchhof *et al.*, 1997).

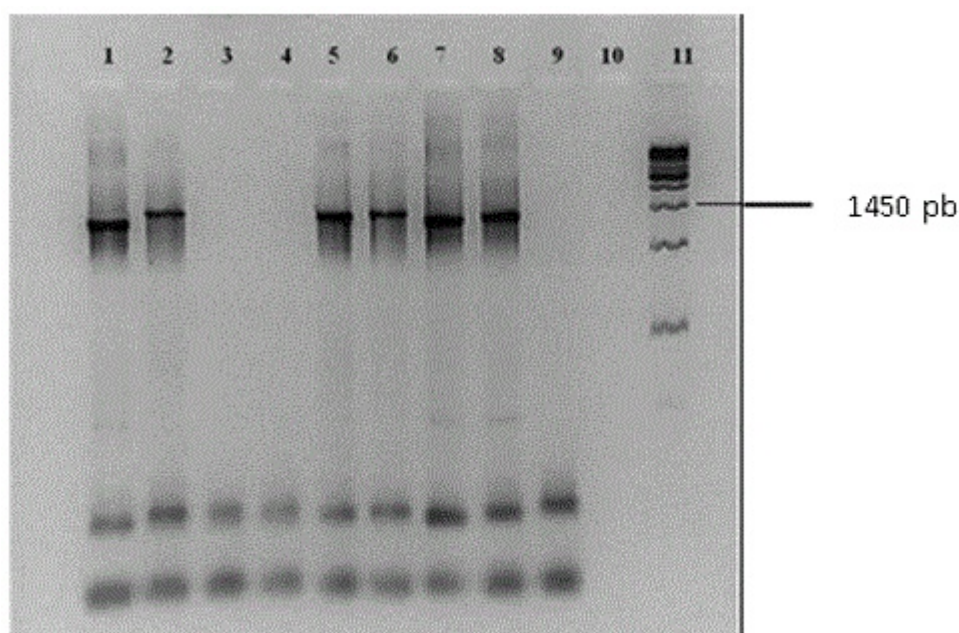
La cepa 8-INICA formó dos arcos de precipitación con el antisuero *A. brasilense* Sp7, lo que indica una mayor proximidad antigénica entre ellas, mientras que 79-INICA compartió un mayor número de determinantes antigénicos con el antisuero *A. lipoferum* SpBr17. No se observó identidad entre 11-INICA y el antisuero SpBr17. La presencia de distintas bandas de precipitación en el gel de agarosa, cuando se emplea la técnica de IDD, se debe a la divergencia en la velocidad de migración de los diferentes antígenos y anticuerpos en el agar, por lo que, si los

microorganismos estudiados poseen varios antígenos comunes, forman diversas bandas de precipitaciones, lo que facilita la determinación de las relaciones antigénicas entre ellos.

La identificación de microorganismos a través del uso de anticuerpos ha sido ampliamente empleada por ser una técnica simple y rápida que se puede automatizar y ser usada para trabajar con varias muestras al mismo tiempo (Rodríguez-Herrera *et al.*, 2009).

Caracterización molecular

Los resultados de la amplificación de un fragmento de 1450 pb del gen ADNr 16S, de la cepa de referencia *A. brasilense* Az39 (carriles 1 y 7), de los aislamientos autóctonos TucH1, TucH2, TucL1, TucL2 y TucL3 (carriles 2 a 6) y de la cepa 8-INICA (carril 8) se muestran en la Figura 1. El control negativo (carril 9) es la mezcla de reacción sin ADN. No se observó amplificación para las cepas TucH2 y TucL1 lo



Carriles 1 y 7 - cepa de *A. brasilense* Az39, carriles 2 al 6 - aislamientos autóctonos TucH1, TucH2, TucL1, TucL2 y TucL3, carril 8 - cepa 8-INICA, carril 9 - control negativo, mezcla de reacción sin ADN, carril 11 - patrón de peso molecular 100 pb Promega

Figura 1 - Amplificación de un fragmento de 1450 pb del gen ADNr 16S

que puede estar dado a problemas con la muestra de ADN inicial usada como molde en la reacción de PCR.

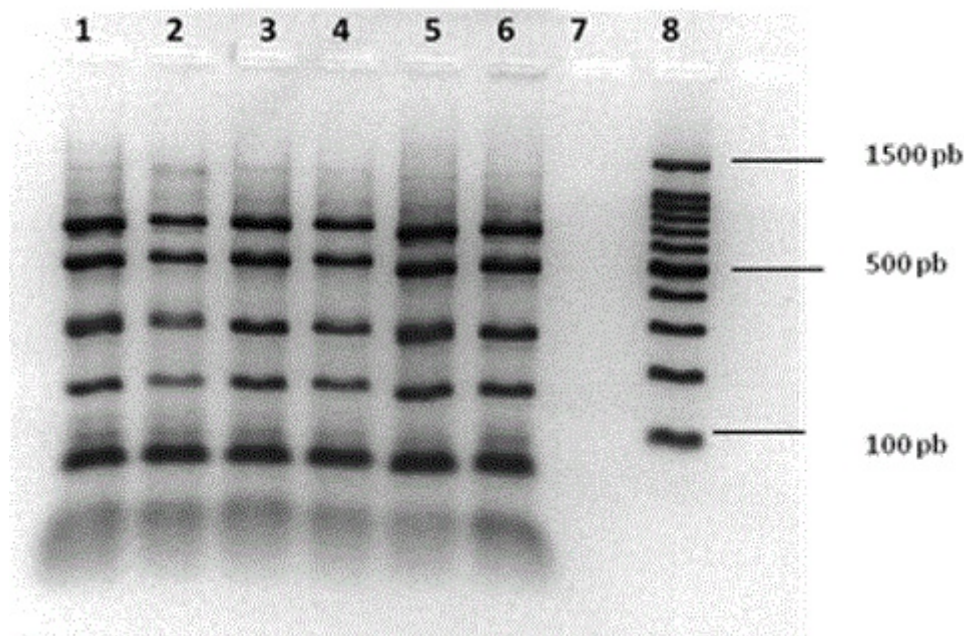
El análisis electroforético de los productos amplificados utilizados como molde, usando la endonucleasa *AluI*, generó un perfil de restricción para 8-INICA que coincide con el control *Az39* y los aislamientos de la colección del EEOC pertenecientes a la especie *A. brasilense* (Figura 2). La similitud entre los diferentes perfiles de restricción permite confirmar que 8-INICA pertenece al género *Azospirillum* especie *brasilense*.

Los estudios moleculares confirmaron los resultados obtenidos por métodos microbiológicos tradicionales y serológicos que ubican a 8-INICA dentro de la especie *A. brasilense*.

La asignación de las categorías taxonómicas (especie y/o cepa) de microorganismos estuvo durante muchos años basada en la distinción de características bioquímicas y/o antigénicas, y en el mejor de los casos, en aspectos

fisiológicos detectables por análisis químicos o bioquímicos; sin embargo, con el desarrollo de las técnicas genómicas, primero se tomaron en cuenta algunas características químicas y fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y posteriormente, se llegó a la comparación de secuencias de fragmentos relativamente cortos o un par de genes (Valenzuela *et al.*, 2015). Los métodos de biología molecular se han desarrollado y utilizado ampliamente para la determinación sistemática correcta de cepas de *Azospirillum* (Pedraza y Díaz, 2000).

El ARNr 16S además de ser conveniente para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas (Fernández *et al.*, 2010). El análisis de las secuencias de los genes que codifican para las sub unidades 16S, 23S y 5S del RNAr, en particular los genes del 16S RNAr, se han convertido en una importante herramienta



1 (*Az39* cepa de referencia), 2, 3, 4 (cepas autóctonas TucH1, TucL2 y TucL3), 5 (*Az39*), 6 (cepa cubana 8-INICA), 7 (control negativo, mezcla de reacción sin ADN), 8 (patrón de peso molecular 100 pb Promega)

Figura 2 - Análisis de restricción del ADNr 16S amplificado (ARDRA) de las cepas de *Azospirillum*

para la identificación de bacterias (Kanimozhi y Panneerselvam, 2010).

CONCLUSIONES

Se corroboró mediante el uso de la técnica inmunológica de Inmunodifusión Doble, las técnicas moleculares de PCR del gen 16S y de análisis de restricción del ADNr 16S que la cepa 8-INICA, de amplio uso en la biofertilización de la caña de azúcar y otros cultivos económicos, pertenece al género *Azospirillum* especie *brasiliense*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de trabajo de la Sección Caña de Azúcar del laboratorio de Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEOC), Tucumán, Argentina, por el apoyo en la caracterización molecular. Este trabajo pudo realizarse gracias al financiamiento del Proyecto internacional Pérez Guerrero “*Protein Enrichment of Lignocellulose Residues for Animal Feed from Sugar Industry Effluents*”.

BIBLIOGRAFÍA

ARDAKANI, M.R., MAZAHARI, D., MAFAKHERI, S. y MOGHADDAM, A. 2011. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 17:181-192. doi:10.1007/s12298-011-0065-7.

BLOEMBERG, G.V. y LUGTENBERG, B.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 343-350.

CABALLERO-MELLADO, J. 2000. El Género *Azospirillum*. Capítulo 10. En: Microbios. ed: MARTÍNEZ ROMERO, E. y MARTÍNEZ ROMERO, J.C. 20 p. ISBN: 968-36-8879-9.

CASSÁN, F., VANDERLEYDEN, J. y SPAEPEN, S. 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plantgrowth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.*, 33: 440-459. doi:10.1007/s00344-013-9362-4.

de-BASHAN, L.E., HOLGUIN, G., GLICK, B.R. y BASHAN, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. Capítulo 8. En: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. ed: FERRERA-CERRATO, R. y ALARCÓN, A. Trillas, México City, México, 161-215.

FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, C., SAÉZ, J.A. y VALDEZATE, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. ed: CERCENADO, E. y CANTÓN, R., 52 p. ISBN 978-84-614-7932-0.

FUKAMI, J., de la OSA, C., OLLERO, F.J., et al. 2018. Coinoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Funct. Plant Biol.*, 45: 328-339. doi:10.1071/FP171-67.

FUKAMI, J., OLLERO, F.J., MEGÍAS, M. y HUNGRIA, M. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7: 153-165. doi: 10.1186/s13568-017-0453-7.

- HERNÁNDEZ, M., TERRY, C. y ALMOGUEA, M. 2015. Uso de *Azospirillum* en la agricultura. *Revista Agroecosistemas*, 3 (1): 401- 413.
- KANIMOZHI, K. y PANNEERSELVAM, A. 2010. Studies on molecular characterization of *Azospirillum* spp. isolated from thanjavur district. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 1 (3): 1209-1219.
- KIRCHHOF, G., SCHOTER, M., ABMUS, B. y HARTMAN, A. 1997. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. *Soil Biol. Biochem.*, (29): 852-857.
- LICEA, J., MENDOZA, M., ÁLVAREZ, M., CRUZ, T., et al. 2016. Inmunología Veterinaria (Manual de prácticas). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México, 152 p.
- MONTERO, L., RODRÍGUEZ, B. y SAN JUAN, A. 2017. Nitrofix (2017), “Una alternativa económica y ambiental para la fertilización de los cultivos”. En: Memorias del XIV Congreso Internacional sobre azúcar y sus Derivados (DIVERSIFICACIÓN), La Habana, Cuba.
- PAZOS, M., HERNÁNDEZ, A., PANEQUE, M. y SANTANDER, J. L. 2000. Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. *Cultivos Tropicales*, 21 (3): 19-23.
- PEDRAZA, R. y DIAZ RICCI, J. 2000. *Azospirillum amazonense*: su presencia en el área cañera de la provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología*, 32: 199-210.
- PÉREZ, J. y CASAS, M. 2005. Estudio de la interacción planta-*Azospirillum* en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.). *Cultivos Tropicales*, 26 (4): 5-11.
- RODRÍGUEZ-HERRERA, R., AGUILAR-GONZÁLEZ, C. N., AYALA-LABARRIOS, L. A., ROCHA-REVILLA, J.C., et al. 2009. Detección de Microorganismos Mediante Métodos Moleculares. Publicación de la Coordinación de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Coahuila, AQM *Revista de Divulgación Científica*, 1 (1): 16.
- SANGOQUIZA CAIZA, C.A., VIERA TAMAYO, Y. y YÁNEZ GUZMÁN, C.F. 2018. Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a diferentes tipos de estrés. *Revista Centro Agrícola*, 45 (1): 40-46.
- VALENZUELA, F., CASILLAS, R., VILLALPANDO, E. y VARGAS, F. 2015. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41 (4): 297-313.
- VITAL, L. y MENDOZA, A. 2014. *Azospirillum*: habitante de las gramíneas. *Revista la Ciencia y el Hombre*, 27 (2): 4.

Recibido el 22 de mayo de 2018 y Aceptado el 27 de febrero de 2019