

Métodos de identificación molecular para *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Cristian Molinares-Pacheco^{1,2}, Julieta Mariana Muñoz-Morales² , Adriana Carbajal-Armenta², Ana Laura Hernández-Tenorio², Alejandro Cueto-Becerra¹, Jesús Muñoz-Rojas^{2*} .

¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Libre seccional Barranquilla, Colombia.

² Grupo “Ecology and Survival of Microorganisms”, Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

*Email autor correspondiente: joymerre@yahoo.com.mx

Recibido: 2 diciembre 2020. **Aceptado:** 24 febrero 2021

RESUMEN

Los métodos para la identificación de microorganismos se valen de sus características morfológicas, fisiológicas, proteómicas y genómicas. En la identificación tradicional se emplean técnicas dependientes de cultivo que pueden presentar inconvenientes según el tipo de microorganismo a identificar, su capacidad de crecimiento, su parecido con algún otro microbio y el tiempo total para su identificación. El uso de PGPB en la agricultura ha repercutido positivamente reduciendo costos de producción, disminuyendo el impacto negativo sobre el medio ambiente y la salud humana. *G. diazotrophicus* es una bacteria diazótrofo-endofítica con características de PGPB que tiene un tiempo de crecimiento más extenso en comparación con otras bacterias, y presenta características fenotípicas y genéticas similares a bacterias fijadoras de nitrógeno de su mismo género, por tanto, su identificación empleando únicamente métodos tradicionales puede ser algo laboriosa e inespecífica. En la presente revisión se analizaron algunos de los métodos de identificación molecular utilizados para *G. diazotrophicus*.

Palabras clave: Identificación molecular, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, ARNr 16S, ARNr 23S, ITS 16S-23S.

ABSTRACT

The methods for identifying microorganisms are based on their morphological, physiological,

proteomic, and genomic characteristics. Under traditional identification, culture-dependent techniques are used, but they may present drawbacks depending on the type of microorganism to be identified, its growth capacity, its resemblance to some other microbe and the total time for its identification. The use of PGPB in agriculture has had a positive impact by reducing production costs, reducing the negative impact on the environment and human health. *G. diazotrophicus* is a diazotrophic-endophytic bacterium with PGPB characteristics that have a longer growth time compared to other bacteria, and it presents phenotypic and genetic characteristics like nitrogen-fixing bacteria of the same genus, therefore, its identification using only traditional methods can be somewhat laborious and unspecific. In this review, some molecular methods for identification of *G. diazotrophicus* were analysed.

Keywords: Molecular identification, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, rRNA 16S, rRNA 23S, ITS 16S-23S.

INTRODUCCIÓN

Para la identificación de un microorganismo nos valemos de sus características morfológicas, fisiológicas, proteómicas y genómicas, para ello existen una gran variedad de métodos dirigidos a una o a la combinación de estas características y varían en su especificidad, sencillez, sensibilidad y rapidez [1].

Las técnicas de identificación tradicional generalmente se enfocan en características morfológicas y fisiológicas y son dependientes de cultivo. Estas técnicas incluyen a las pruebas bioquímicas, la colorimetría, y pruebas de sensibilidad/resistencia antimicrobiana, la serotipificación y las denominadas técnicas de quimiotaxonomía (que analizan la composición de la pared celular, exopolisacáridos, ácidos

micólicos, análisis de proteínas celulares totales, etc.) [2]. El principal inconveniente con este tipo de métodos es el tiempo que se requiere para dar con la identidad del microorganismo en cuestión, sin mencionar las dificultades que surgen cuando se trata de un microbio de crecimiento lento, uno poco reactivo o muy similar a otro microorganismo [3]. El estudio de bacterias, estaba sujeto a técnicas dependientes de cultivo, sobre todo para su identificación, sin embargo, en los últimos años, han sido desplazadas por técnicas de identificación molecular para superar los inconvenientes de dichos métodos, ya que se obtiene una mayor precisión [2,4].

Las técnicas de biología molecular ayudan a esclarecer la identidad de un organismo en poco tiempo, estos métodos se valen de

procedimientos como la amplificación de genes conservados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) [5] y secuenciación de los genes [6,7]. Por ejemplo, la amplificación de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoB*, o el que codifica para el ARNr 16S, se han usado como pruebas rutina para la identificación molecular de las bacterias [6,8]. El análisis de fragmentos de restricción, la hibridación de ADN-ADN, son otras dos técnicas ampliamente usadas para la identificación molecular de bacterias [7,9]. En general, la aplicación de los métodos moleculares permite la obtención de resultados más rápidos y confiables [1]. En la presente revisión se analizaron algunos de los métodos de identificación molecular utilizados para *G. diazotrophicus*.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal

En respuesta a la búsqueda de alternativas para tener cultivos libres de fertilizantes químicos, plaguicidas, o cualquier agroquímico que pueda afectar contra el bienestar del medio ambiente o del ser humano y con el objetivo de abaratar costos de producción, la biotecnología se ha dispuesto a diseñar métodos para aprovechar las características favorables que pueden brindarles las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) a los cultivos. Tales características pueden ser muy variadas, dependiendo así del microorganismo

en cuestión y su interacción con la planta que se desea inocular [10]. Dentro de los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal, se pueden incorporar aquellos que permiten la biodisponibilidad de nutrientes como los fosfatos o el zinc, la fijación biológica de nitrógeno, producción de fitohormonas que intervienen en el desarrollo de la planta, la actividad antagonista contra fitopatógenos y la degradación de sustancias contaminantes (tóxicas para las plantas) [11,12].

La diversidad de PGPB descritas es enorme, este grupo incluye bacterias que habitan en la rizósfera (área del suelo que abarcan los exudados de las raíces), y en el interior de las plantas (o endófitos). Estos últimos pueden encontrarse a nivel intercelular (entre los tejidos de las plantas) e intracelular (en el interior de la célula vegetal) [12].

Considerando las capacidades promotoras de crecimiento vegetal particulares de cada microorganismo, se pueden crear inoculantes para satisfacer distintas necesidades en los cultivos. Por ejemplo, *Azospirillum brasilense* es capaz de producir fitohormonas, de ejercer la fijación biológica de nitrógeno y de inhibir el crecimiento de fitopatógenos mediante sideróforos; *Bacillus* sp. LMA5 produce fitohormonas y solubiliza fosfatos; y diferentes especies de *Pseudomonas* se han visto implicadas en el antagonismo de fitopatógenos

y degradación de compuestos tóxicos para las plantas [13]. De igual manera, se han formulado multi-inoculantes que buscan potenciar su efecto sobre las plantas mediante interacciones sinérgicas que se dan entre los microorganismos que los componen [14,15].

Para desarrollar métodos que permitan utilizar los beneficios de las PGPB sobre los cultivos, es necesaria la identificación correcta del (los) microorganismo(s) presente(s) en los inoculantes, para afirmar con certeza que una bacteria o un grupo de ellas, es capaz de potenciar el crecimiento de una planta.

***Gluconacetobacter diazotrophicus*, una bacteria endófito con alto potencial biotecnológico**

G. diazotrophicus es una bacteria diazótrofo-endofítica con mecanismos promotores de crecimiento vegetal, lo que la clasifica como una PGPB [16–18]. Durante su colonización en plantas de caña de azúcar, esta bacteria contribuye significativamente a la demanda de nitrógeno de su huésped mediante el mecanismo de fijación biológica de nitrógeno [19]. Sin embargo, se han reportado diferentes mecanismos PGPB en *G. diazotrophicus* adicionales a la fijación biológica de nitrógeno, como la solubilización de compuestos insolubles de zinc como ZnO, ZnCO₃ y Zn₃(PO₄)₂, la producción de fitohormonas promotoras de crecimiento como ácido

indolacético, el aumento de la tolerancia al estrés por sequía, la solubilización de fosfatos y la actividad antagónica contra patógenos; de tipo fúngico (*Colletotrichum falcatum*, *Fusarium* spp.), bacteriano (*Xanthomonas albilineans*) y nemátodo (*Meloidogyne incognita*) [15,18,20]. Este microorganismo se ha aislado de diferentes plantas ricas en azúcares y almidón, como arroz, camote y caña de azúcar (de donde fue aislada inicialmente), y de otras plantas de las familias *Poaceae*, *Rubiaceae*, *Bromeliaceae*, *Rosaceae* y *Malphiaceae* alrededor de todo el mundo [18].

Las técnicas moleculares facilitan los estudios que buscan comprender los mecanismos de promoción de crecimiento, de colonización e interacción microorganismo-planta [7,19].

La identificación precisa de especies del grupo de las bacterias ácido acéticas (BAA), incluidas las especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter*, es difícil, pues presenta especies con un alto grado de similitud en su secuencia del ARNr 16S (de entre 91.7 a 99 %). Esto constituye un problema para discernir entre los integrantes de este grupo, sobre todo a nivel de especie, pues el gen que codifica para el ARNr 16S es una de las dianas moleculares más utilizadas para la identificación bacteriana [21]. En el género *Gluconacetobacter* se han identificado 3

especies fijadoras de nitrógeno (*G. johannae*, *G. azotocaptans* y *G. diazotrophicus*), éstas presentan un alto grado de similitud en la secuencia de su gen ARNr 16S [16]. No es recomendable basarse solo en pruebas fenotípicas para la identificación de especies de este grupo, por tanto, se ha recomendado emplear técnicas de identificación molecular para las BAA [22].

Dianas moleculares para la identificación bacteriana

Existen diferentes genes que han sido utilizados como dianas moleculares para la clasificación taxonómica de las bacterias, siendo el ARNr 16S el más empleado, llegando a obtener identificaciones precisas en muchas ocasiones. Sin embargo, presenta inconvenientes por la alta homología en la secuencia que comparten ciertos géneros bacterianos, diversas copias con polimorfismos dentro de una cepa o su reciente reclasificación taxonómica, lo que impide utilizar este marcador para la identificación a nivel de especie o de género en aquellos casos [23]. Es por ello, que se han propuesto otros genes o secuencias como dianas moleculares para clasificación taxonómica de las bacterias [5,24].

rrs (ARNr 16S). Es el gen que codifica el polirribonucleótido ARNr 16S, que forma parte estructural de la subunidad menor del ribosoma

bacteriano. Tiene una distribución universal en organismos procariotas por ser un componente esencial para su maquinaria celular, al estar implicado en la síntesis de proteínas. Este gen es útil como un “cronómetro molecular” por su alta conservación y presencia de regiones variables (V1 a V9) que contienen polimorfismos que pueden ser específicos para las especies [5]. En su secuencia se pueden encontrar sitios para la unión de oligonucleótidos específicos para un grupo filogenético, lo que permite realizar marcadores moleculares para la identificación en todos los niveles taxonómicos (con diferente especificidad). La secuencia de este gen contiene aproximadamente 1500 pb, tamaño suficiente para proporcionar polimorfismos interespecíficos para establecer diferencias estadísticamente significativas. La base de datos GenBank almacena más de 2 millones de secuencias de este gen. El análisis de la secuencia completa no es necesaria en todos los casos, pues se pueden analizar fragmentos de 500 pares de bases (pb) para abaratar costos, logrando una identificación correcta, aunque se pierde especificidad, ya que al ser una secuencia más corta, disminuye su diversidad de polimorfismo [24].

El número de copias del operón ribosómico (*rrn*), por genoma bacteriano puede ser muy variable (entre 1 y 15). Al existir varias copias

del ARNr 16S en un genoma, se puede intuir que existe un pequeño grado de heterogeneidad (microheterogeneidad), debido a mutaciones en las secuencias, que puede verse reflejado en una identificación bacteriana incorrecta [25].

ARNr 16S-23S. Es el espaciador transcribible interno (ITS) entre los genes codificantes del ARNr 16S y 23S, ha sido utilizado en estudios de relaciones filogenéticas. Al existir un número variable de copias del operón *rrn* al que pertenece, pueden encontrarse varias de estas ITS en el genoma de una bacteria, que pueden variar a nivel de especies, esto es lo que permite su uso para identificación bacteriana [23], filogenia y tipificación [5,24].

ARNr 23S. Es poco preferido para estudios filogenéticos en comparación con el ARNr 16S debido a los costos. Sin embargo, los avances en las técnicas de Secuenciación de Nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) han logrado reducir sus costos. Su mayor longitud (3000 pb), en comparación con el ARNr 16S, contribuye a una mejor resolución debido a una mayor variación en su secuencia, inserciones y/o deleciones únicas [26].

***rpoB*.** Es el gen codificante de la subunidad β de la ARN polimerasa, enzima que se encarga del proceso de transcripción de ARNt, ARNm y ARNr, tiene una distribución universal en bacterias y posee un buen potencial para ser utilizado como cronómetro molecular. Puede

tener una longitud de entre 3411 pb (*Staphylococcus aureus*) a 4185 pb (*Neisseria meningitidis*), su secuenciación ha sido muy utilizada en identificación de bacterias por su alta robustez, por ser un gen monocopia, por la calidad de las secuencias depositadas en las bases de datos (debido a que han sido secuenciadas con técnicas de nueva generación) [27], sustituyendo en algunos casos el ARNr 16S para diferenciar especies del género *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, entre otras. Permite la identificación a nivel de género, especie y en ocasiones a nivel de subespecie [28,29]. En la figura 1 se indican recomendaciones para el análisis del gen *rpoB* y ARNr 16S en la identificación bacteriana.

***gyrB*.** Es otro de los genes que se utilizan para identificación bacteriana, sobre todo para grupos de bacterias estrechamente relacionados como por ejemplo aquellas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Mycobacterium*, entre otras (donde llega a tener mejor fidelidad que el ARNr 16S). Codifica la subunidad β de la ADN girasa o también llamada topoisomerasa II, es imprescindible para la duplicación del ADN y es un gen monocopia y presente en todas las bacterias [5,30]. Tiene una longitud de alrededor de 2.400 pb en bacterias de tipo ácido acético [21].

***recA*.** Codifica una proteína recombinasa que funciona en la reparación del ADN

recombinacional en las bacterias [31]. Es empleado como diana molecular para la identificación bacteriana y también es utilizado para tipificación molecular cuando el ARNr 16S no otorga la información necesaria para dar con una identificación precisa, sobre todo en

niveles inferiores a la especie donde es utilizado, por ejemplo, para distinguir genomovares de *Burkholderia cepacia*, en estos genomovares la longitud de este gen es de alrededor de 1050 pb [32].

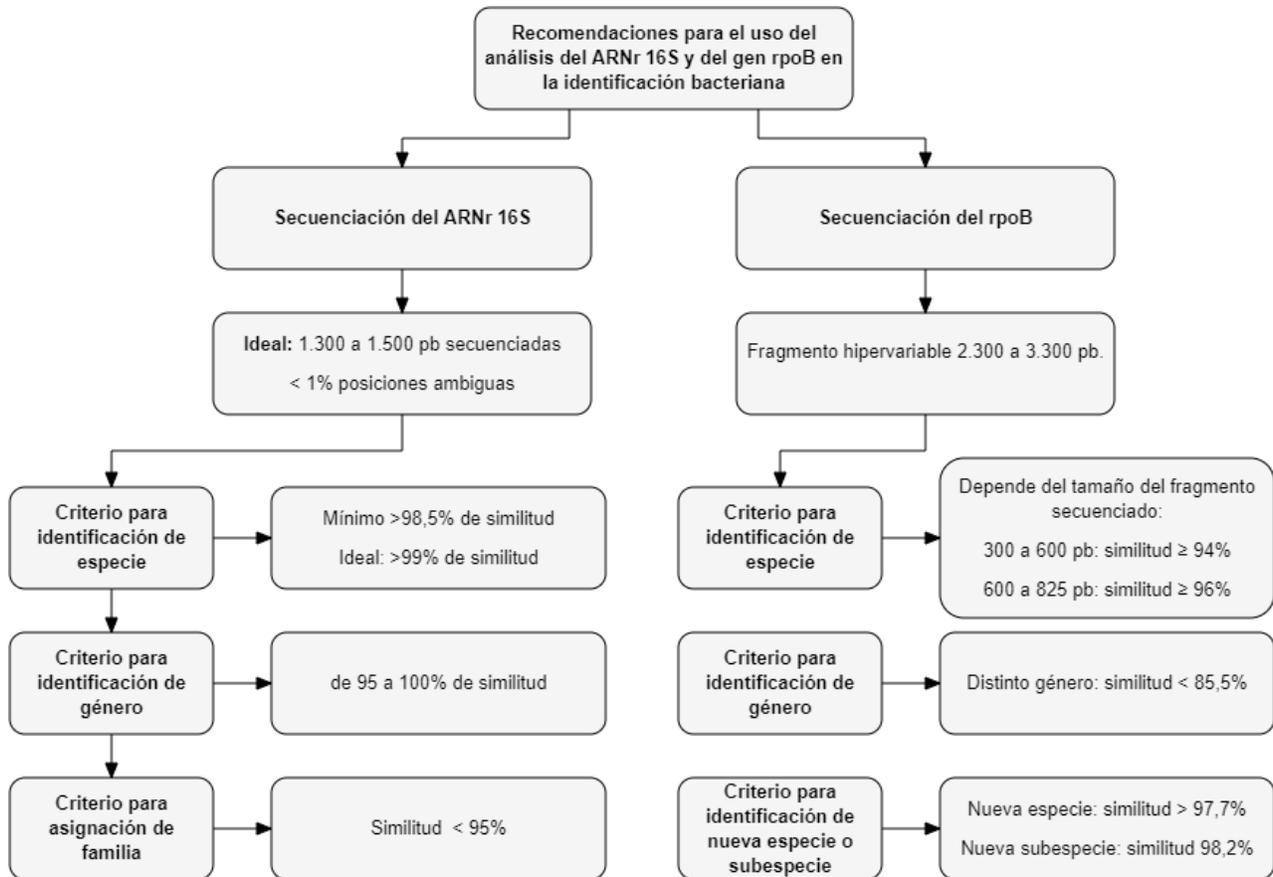


Figura 1. Recomendaciones para la utilización del análisis del ARNr 16S y del gen *rpoB* en la identificación bacteriana [5].

Métodos para la identificación molecular para el género *Gluconacetobacter*

La secuenciación es una técnica que permite conocer el orden específico de los nucleótidos que componen una secuencia de ADN, esto se

logra mediante la previa amplificación de alguna de las secuencias diana mencionadas anteriormente [24].

Las técnicas NGS, han sido muy útiles para los análisis metagenómicos y poblacionales de

comunidades bacterianas del medio ambiente e incluso endófitos como *G. diazotrophicus* [33]. Los avances en la plataforma de secuenciación Illumina han logrado adquirir una longitud de lectura mayor y a bajo costo, lo que ha permitido caracterizar comunidades microbianas relacionadas con plantas, por ejemplo, se ha caracterizado la microbiota endófito de raíces y tallos de arroz secuenciando la región V3-V4 de ARNr 16S [34], de la misma manera, se ha logrado conocer la comunidad bacteriana endófito en 4 especies del género *Allium* [35].

Zhang y colaboradores [36] identificaron a *Gluconacetobacter xylinus* mediante taxonomía polifásica, a partir de aislados de Kombucha, “un té japonés en el que se desarrollan levaduras y bacterias del tipo ácido acético”, esclareciendo que se trataba de esta especie al encontrar una alta homología en sus secuencias de ARNr 16S al realizar alineamientos en ClustalX y la relación filogenética que exhibió al comparar la secuencia con las de las bases de datos. De igual manera, se aislaron 5 cultivos de *G. diazotrophicus* de caña de azúcar en Perú, que fueron identificadas por su secuencia de ARNr 16S, su posterior análisis en bases de datos y perfil bioquímico que coincidía con el de la cepa de referencia [17]. Asimismo, se usó la secuenciación del ARNr 16S para identificar 3

cepas del género *Gluconacetobacter* aisladas de diferentes frutas, realizando el análisis de la secuencia en BLAST y utilizando el algoritmo de Neighbor joining para establecer relaciones filogenéticas [37]. Torija y colaboradores [38] elaboraron pruebas para la identificación de dos especies de *Gluconacetobacter* a partir de la secuencia de su ARNr 16S. Estos autores encontraron que una de las pruebas arrojaba un falso positivo al identificar otras 4 especies del mismo género (con una homología del 100%) que no hacían parte de su objetivo, resaltando la alta similitud que tiene la secuencia de este gen para este género de bacterias.

La identificación específica para las especies fijadoras de nitrógeno del género *Gluconacetobacter* (*G. johannae*, *G. azotocaptans* y *G. diazotrophicus*), es posible mediante la amplificación del gen ARNr 16S utilizando los oligonucleótidos AC (5'-CTGTTTCCCGCAAGGGAC-3') y D1 (5'-GCGCCCCATTGCTGGGTT-3'), que generan un producto de 445 pb [39], estas especies crecen de manera idéntica en medio LGI (exhibiendo colonias de color naranja intenso después de 5 días de incubación a 30 °C). Sin embargo, *G. diazotrophicus* forma colonias de color café oscuro con bordes claros al sembrarla en un medio de cultivo a base de extracto de papa adicionado con 10% de sacarosa (5 a 7 días de incubación a 30 °C), *G.*

johannae y *G. azotocaptans* exhiben colonias de color beige o crema incluso después de 10 días de incubación [16].

La secuenciación de la región ITS 16S-23S también ha sido utilizada para la identificación de BAA. Esta región no es demasiado larga en este grupo de bacterias, tiene una longitud de entre 759 y 778 pb, posee elementos conservados, pero también segmentos variables con menor similitud entre especies estrechamente relacionadas que la secuencia del ARNr 16S (que tiene una similitud de entre 91,7 a 99 % en BAA), como resultado de una mayor tasa evolutiva [21]. La secuenciación de esta región ITS puede permitir la distinción de bacterias a niveles inferiores de especie, y parece que las copias de esta región espaciadora (se han reportado un mínimo de 4 copias del locus *rrn* en especies del género *Gluconacetobacter*) no difieren tanto en longitud y en secuencia en las BAA, pues en el estudio realizado por Ruiz y colaboradores [40], se obtuvo solo una banda al amplificar la ITS 16S-23S de varias cepas del grupo BAA (incluyendo algunas del género *Gluconacetobacter*). Además, al sumar las longitudes de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir estas secuencias con 8 endonucleasas de restricción (*TaqI*, *CfoI*, *HaeIII*, *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *MspI* y *RsaI*), se observó que la longitud era equivalente a la

secuencia amplificada por PCR, lo que confirma que las copias de estas ITS dentro de cada cepa tienen secuencias muy similares.

Al amplificar el gen que codifica para el ARNr 23S de *G. diazotrophicus*, se puede lograr su identificación, empleando los oligonucleótidos 1440 (5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3') y AD (5'-TGCGGCAAAGCCGGAT-3'), los cuales generan una banda de 411 pb [41]. Sin embargo, es necesario determinar si tales oligonucleótidos permiten diferenciar a *G. diazotrophicus* de *G. johannae* y *G. azotocaptans*. La secuencia complementaria al oligonucleótido AD ha sido empleada como sonda de hibridación para la identificación de *G. diazotrophicus* [16]. Los oligonucleótidos 1440 (que también es nombrado como HerbaGd) y AD han sido utilizados en diferentes estudios para la identificación molecular de *G. diazotrophicus* [41–43].

Mehnaz y colaboradores [44] emplearon diferentes métodos para la identificación de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de maíz, entre ellos, la secuenciación del ARNr 16S, el análisis de restricción de ADN amplificado (ARDRA) y análisis bioquímicos. Para la secuenciación utilizaron los cebadores U475 (5'-AATGACTGGGCGTAAAG-3') y L923Ga (5'-AATGCTCAATCTGAACA-3'), obteniendo una secuencia de 469 pb que presentó una homología del 100% (con una

identidad de secuencia de 467/467 posiciones) con *G. azotocaptans*, 99,1% con *G. johannae* (identidad 467/461 posiciones) y para *G. diazotrophicus* presentó una identidad de 448/449 posiciones. El ARDRA se llevó a cabo empleando los cebadores FGPS4-281 bis (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y FGPS1509'-153 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), obteniendo un producto de 1500 nucleótidos que fue sometido a digestión enzimática por *RsaI*, obteniendo 4 fragmentos de restricción que variaron entre 500 y 150 pb. La secuenciación, el ARDRA y las pruebas bioquímicas, indicaron que los aislados eran cepas de *G. azotocaptans*. Este trabajo es un ejemplo de que se requiere de diferentes métodos para dar con la identificación precisa de un microorganismo, pues con solo uno, se pueden obtener resultados inconcluyentes.

Se han llevado a cabo trabajos que buscan oligonucleótidos “acetiespecíficos” basados en genes diferentes a los convencionales, tal como el gen *adhA* (que codifica la subunidad deshidrogenasa de la quinohemoproteína alcohol deshidrogenasa o ADH), que está presente en la mayoría de las BAA (excepto en el género *Asaia* que exhibe poca o nula actividad de este gen) y que presenta regiones conservadas y variables que le permite ser un candidato para la clasificación a nivel de este

grupo [45].

Técnicas de tipificación molecular en *G. diazotrophicus*

La tipificación molecular consiste en comparar los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos para conocer sus polimorfismos genéticos. La tipificación molecular comprende diferentes técnicas que se fundamentan en estudios del ADN cromosómico y extracromosómico, el análisis del número de copias en secuencias de inserción o secuencias que se repiten en el genoma, al igual que de regiones entre secuencias de inserción y secuencias repetitivas adyacentes (como REP-PCR, ERIC-PCR y BOX-PCR), o amplificación aleatoria de secuencias (como AP-PCR) [2,46]. Este grupo de técnicas permiten conocer la relación existente entre un grupo de microorganismos para ser empleadas en su distinción e identificación rápida [46,47].

El análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) es útil para la diferenciación de cepas [19], consiste en amplificar la secuencia de un gen para someterlo a digestión por enzimas de restricción determinadas, y posteriormente visualizar el patrón de bandas obtenido empleando una electroforesis en gel de agarosa. Se le conoce como ARDRA al RFLP del ARNr 16S [1]. El RFLP de la región espaciadora 16S-

23S puede afiliarse directamente a una bacteria al grupo de las BAA [45], además, ha permitido identificar nuevas especies de este grupo de bacterias [21].

Ruiz y colaboradores [40] obtuvieron el mismo grado de diferenciación a nivel de especie luego de comparar los RFLP del ARNr 16S y de la ITS 16S-23S en bacterias del género *Gluconacetobacter*. Estos autores afirmaron

que el ARDRA con las enzimas TaqI y RsaI permite la diferenciación de colonias de BAA (al observar que éstas distinguieron el mayor número de especies BAA, pero sin variaciones intraespecíficas). Además, reportaron los tamaños de los RFLP obtenidos del ARNr 16S de *G. diazotrophicus* DSM 5601 exhibidos en la figura 2.

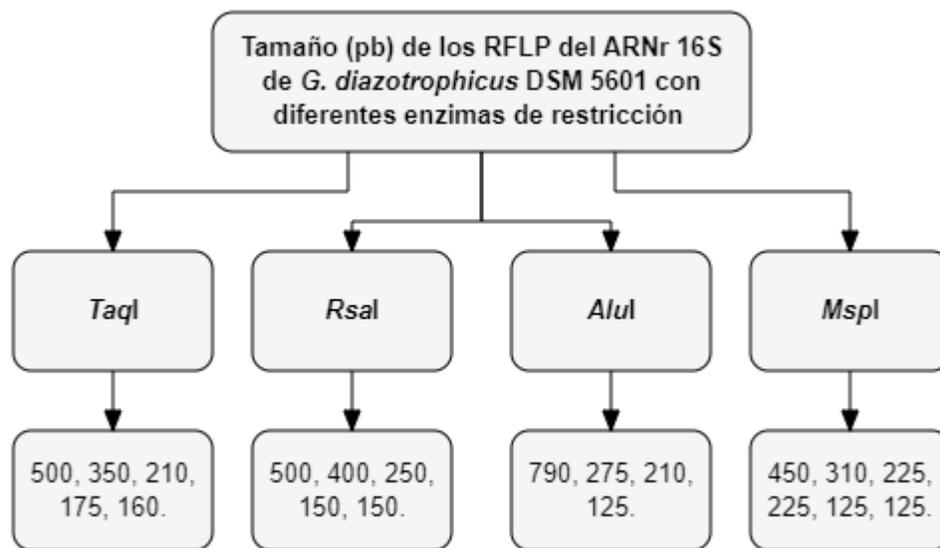


Figura 2. Tamaño (pb) de los RFLP del ARNr 16S de *G. diazotrophicus* DSM 5601 con diferentes enzimas de restricción. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen fueron: Directo (16Sd, 5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3') y Reverso (16Sr, 5'-GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3') [40].

Se han realizado análisis de cepas de *G. diazotrophicus* donde se obtienen dos grupos con 68% de similitud al hacer un análisis filogenético con información obtenida a partir de los RFLP del ARNr 16S y del ITS 16S-23S, revelando una variabilidad intraespecífica en 35 cepas de esta bacteria, que fueron aisladas de diferentes variedades de caña de azúcar en

distintos países [48]. En el mismo estudio se observó una diferencia en el uso de carbohidratos como fuente de carbono, lo que puede permitir la selección de cepas con mayor potencial biotecnológico.

Las secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP), pueden ser amplificadas por PCR (REP-PCR), empleando oligonucleótidos

diseñados según las secuencias repetidas en el genoma. Tales secuencias se encuentran en distintas localizaciones en el cromosoma, cuando dos secuencias están lo suficientemente cerca, la secuencia en su interior es amplificada, dado que el número y localización de estas repeticiones entre cepas son variables, los productos de la REP-PCR también variarán, el polimorfismo obtenido es útil para la diferenciación de especies [46]. Se ha estudiado este método con el cebador (GTG)₅ para la identificación y clasificación de una amplia gama de BAA, incluyendo la identificación precisa de géneros como *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* [49]. De manera similar, se ha estudiado la técnica de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), por su alta reproducibilidad, se obtuvo una precisa identificación y clasificación de BAA a nivel de especie, empleando las enzimas de restricción *Apa I*, *Taq I* y la combinación de cebadores A03 y T03, parece ser muy útil para determinar la diversidad genética intraespecífica, esta técnica puede considerarse valiosa para la taxonomía de BAA [22].

CONCLUSIONES

Existe una gran variedad de métodos moleculares que permiten la identificación de *G. diazotrophicus*, cada uno con diferentes grados de reproducibilidad, robustez, fidelidad

y costos. El análisis del ARNr 16S es el más empleado en la identificación de esta bacteria a pesar de la similitud en la secuencia con *G. azotocaptans* y *G. johannae*. En cuanto a las técnicas de tipificación molecular, se destacan las que analizan la secuencia o polimorfismos mediante los RFLP del gen ARNr 16S e ITS 16S-23S. Se recomienda la selección del método según las necesidades y recursos con los que cuente el laboratorio y en medida de lo posible, el uso de más de un método para la confirmación de los resultados.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al apoyo de VIEP-BUAP para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1]. Merchán MA, Torres Caicedo MI, Díaz Torres AK. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Rev Habanera Ciencias Médicas. 2017;16(5).
- [2]. Raina V, Nayak T, Ray L, Kumari K, Suar M. A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel

Microbial Species [Internet]. Microbial Diversity in the Genomic Era. Elsevier Inc.; 2019. 137–152 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00009-5>

[3]. Pascual Hernández Á, Balleztero-Téllez M, Galán-Sanchez F, Rodríguez Iglesias M. Aplicación de la espectrometría de masas en la identificación de bacterias. In: Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 2016. p. 8–18.

[4]. Wajswol Martella S. Efecto de la aplicación de vinaza en cultivos de caña de azúcar. Estudio de la comunidad bacteriana. 2018.

[5]. Bou G, Fernández-Olmos A, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In: Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 2011. p. 601–8.

[6]. Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Aragón-Hernández C, Mascarua-Esparza MA, Bustillos-Cristales MR, Fuentes-Ramírez LE, *et al.* Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2011;43(4):287–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22274827>

[7]. Rilling JI, Acuña JJ, Nannipieri P, Cassan

F, Maruyama F, Jorquera MA. Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. Soil Biol Biochem. 2019;130:205–19.

[8]. Rocha G, Le Queré A, Medina A, Cuéllar A, Contreras J-L, Carreño R, *et al.* Diversity and phenotypic analyses of salt- and heat-tolerant wild bean.pdf. Arch Microbiol. 2019;16.

[9]. Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales M del R, *et al.* Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. PLoS One. 2017;12(11):1–21.

[10]. Meza RFR. Biodiversidad de ecotipos de *Moniliophthora roreri* en cacao (*Theobroma cacao*) clon ccn-51 y la actividad antagonista de PGPR [Internet]. 2018. Available from: <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3319>

[11]. Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2017;33(11):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

[12]. Rivera-Urbalejo AP, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Muñoz-Morales JM, Carbajal-Armenta A, *et al.*

Inoculación de plántulas micropropagadas de caña de azúcar con bacterias benéficas para potenciar su producción. Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]. 2017;2(7):15–26. Available from:

<https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.mxf d0hkky3l3>

[13]. Pazos-Rojas LA, Marín-Cevada V, Elizabeth Y, García M, Baez A., *et al.* Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. Rev Iberoam Ciencias. 2016;3(7):72–85.

[14]. Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Y.E. M-G, V. Q-H, A. M-H, A. B-R, *et al.* Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. Alianzas y Tendencias [Internet]. 2016;1(April):9–19. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.26a6 2fnd2t88>.

[15]. Molina Romero D. Diseño de inoculante de segunda generación tolerante a condiciones de desecación. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2017.

[16]. Muñoz Rojas J, Caballero Mellado J. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. Microbios en línea. 2001;157–76.

[17]. Paredes-Villanueva J, Del Rosario J, Urcia M, Zavaleta-Armas J. Plant growth promoter collection of *Gluconacetobacter*

diazotrophicus from the northern coast of Peru. Sci Agropecu. 2020;11(1):15–21.

[18]. Saravanan V, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa T. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. Microb Ecol. 2008;55(1):130–40.

[19]. Ahmad I, Altaf M, Sharma J, Al-thubiani A. Diversity, Quorum Sensing, and Plant Growth Promotion by Endophytic Diazotrophs Associated with Sugarcane with Special Reference to *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plant-Microbe Interact An Approach to Sustain Agric. 2016;(495–509).

[20]. Silva R, Filgueiras L, Santos B, Coelho M, Silva M, Estrada-Bonilla G, *et al.* *Gluconacetobacter diazotrophicus* Changes The Molecular Mechanisms of Root Development in *Oryza sativa* L. Growing Under Water Stress. Int J Mol Sci. 2020;21(1):333. [21]. Trcek J, Barja F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. Int J Food Microbiol. 2015;196:137–44.

[22]. Cleenwerck I, De Wachter M, González Á, De Vuyst L, De Vos P. Differentiation of

species of the family Acetobacteraceae by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;58(7):1771–86.

[23]. Sabat A, van Zanten E, Akkerboom V, Wisselink G, van Slochteren K, de Boer R, et al. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification-increased discrimination of closely related species. Sci Rep. 2017;7(1):1–12.

[24]. Fernández Olmos A, García de la Fuente C, Sáez Nieto JA, Valdezate Ramos S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiol Clínica. 2010;5–9.

[25]. Rodicio M del R, Mendoza M del C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22:238–45.

[26]. Law J, Tan K, Wong S, Ab Mutalib N, Lee L. Taxonomic and Characterization Methods of Streptomyces: A Review. Prog Microbes Mol Biol. 2018;1(1).

[27]. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol. 2009;17(1):37–45.

[28]. Kenna D, Fuller A, Martin K, Perry C, Pike R, Burns P, et al. rpoB gene sequencing highlights the prevalence of an *E. miricola* cluster over other *Elizabethkingia* species among UK cystic fibrosis patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018;90(2):109–14.

[29]. Pandey C, Neigi Y, Maheshwari D, Rawat D, Prabha D. Potential of native cold tolerant plant growth promoting bacilli to enhance nutrient use efficiency and yield of *Amaranthus hypochondriacus*. Plant Soil. 2018;428(1–2):307–20.

[30]. Bunpa S, Nishibuchi M, Thawonsuwan J, Sermwittayawong N. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* strains, and design of a PCR-based identification method using *gyrB* gene sequence. Can J Microbiol. 2018;64(1):1–10.

[31]. Cox MM. Regulation of bacterial RecA protein function. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2007;42(1):41–63.

[32]. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, et al. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. Vol. 38, Journal of Clinical Microbiology. 2000. p. 3165–73.

- [33]. Proença D, Schwab S, Baldani J, Morais P. Diversity and function of endophytic microbial community of plants with economical potential. In: Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. 2017. p. 209–43.
- [34]. Wang W, Zhai Y, Cao L, Tan H, R Z. Endophytic bacterial and fungal microbiota in sprouts, roots and stems of rice (*Oryza sativa* L.). Microbiol Res. 2016;188–9.
- [35]. Huang Y. Illumina-based Analysis of Endophytic Bacterial Diversity of four *Allium* species. Sci Rep. 2019;9(1):1–11.
- [36]. Zhang W, Wang X, Qi X, Ren 'L, Qiang T. Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. Food Sci Biotechnol. 2018;27(3):705–13.
- [37]. Numata Y, Kono H, Mori A, Kishimoto R, Tajima K. Structural and rheological characterization of bacterial cellulose gels obtained from *Gluconacetobacter* genus. Food Hydrocoll. 2019;92:233–9.
- [38]. Torija M, Mateo E, Mas A. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. Food Microbiol. 2010;27(2):257–65.
- [39]. Eskin N, Vessey K, Tian L. Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. Int J Agron. 2014;2014.
- [40]. Ruiz A, Poblet M, Mas A, Guillamón J. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50(6):1981–7.
- [41]. Arencibia A, Vinagre F, Estevez Y, Bernal A, Perez J, Cavalcanti J, et al. *Gluconoacetobacter diazotrophicus* elicitate a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. Plant Signal Behav. 2006;1(5):265–73.
- [42]. Casas M, Pérez J, Piñón D, Bernal A, de los Ángeles Zadrón M, Estrada M, et al. Colonización e interacción del endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* en vitro plantas de caña de azúcar. Rev Cuba Caña. 2015;(1):26–32.
- [43]. Arencibia A, Bernal A, Yang L, Cortegaza L, Carmona E, Perez A, et al. New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). Plant Sci. 2008;175(4):487–96.
- [44]. Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. Syst Appl Microbiol. 2006;29(6):496–501.

- [45]. Trcek J. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Syst Appl Microbiol.* 2005;28(8):735–45.
- [46]. Domínguez M, Coll P, Coque T, Vázquez J, Villa J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos en Microbiol Clínica.* 2005;9–31.
- [47]. Morales García YE, Rodríguez-Andrade O, Hernández-Tenorio A, Juárez Hernández D, Castañeda-Antonio D, Molina-Romero D, *et al.* Caracterización molecular de cepas contenidas en un inoculante multiespecies. In: XI encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. 2014. p. 5.
- [48]. Guedes H, Santos S, Perin L, Teixeira K, Reis V, Baldani J. Polyphasic characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolates obtained from different sugarcane varieties. *Brazilian J Microbiol.* 2008;39(4):718–23.
- [49]. De Vuyst L, Camu N, De Winter T, Vandemeulebroecke K, Van de Perre V, Vancanneyt M, *et al.* Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int J Food Microbiol.* 2008;125(1):79–90.