

## Traslocación *in vivo* de *Klebsiella variicola* PB02 y *Klebsiella quasipneumoniae* HPA43 en frutos de *Solanum lycopersicum* cultivar DT-22

Getzemany Nava-Faustino<sup>1</sup>  
Sergio Ramírez-Rojas<sup>2</sup>  
Francisco Palemón-Alberto<sup>3</sup>  
Diana Orbe Díaz<sup>1</sup>  
Ángela Victoria Forero-Forero<sup>4</sup>  
Jeiry Toribio-Jiménez<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental-Facultad de Ciencias Químico Biológicas-Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas núm. 88, El Centenario, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México. CP. 39000. Tel. 747 4725503. <sup>2</sup>Campo Experimental Zacatepec-INIFAP. Carretera Zacatepec-Galeana s/n, Centro Zacatepec de Hidalgo, Morelos. CP. 62780. Tel. 734 3433820. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales-Universidad Autónoma de Guerrero. Iguala-Teloloapan s/n, Ignacio Manuel Altamirano, Iguala de la Independencia, Guerrero. CP. 40040. Tel. 733 3334776. <sup>4</sup>Facultad de Ciencias-Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, Circuito exterior s/n, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, México. CP. 04510.

Autor de correspondencia: jeiryjimenez2014@gmail.com.

### Resumen

En actualidad la agricultura se han implementado biofertilizantes o compuestos orgánicos como abono para aumentar el rendimiento de los cultivos de interés comercial y restaurar la fertilidad del suelo. El uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal ha sido una de las mejores alternativas que aumentan el rendimiento y no ocasionan daños al ambiente. Su uso no es totalmente aceptado por los productores por el riesgo que pudieran tener a la salud del consumidor. Por ello en este trabajo se evaluó la efectividad de dos cepas *K. variicola* PB02, *K. quasipneumoniae* HPA43 en consorcio con *Trichoderma* en el rendimiento de *Solanum lycopersicum* cultivar DT22 una variedad comercializada en el mercado nacional, se observó el aumento significativo ( $p= 0.003$ ) respecto a otros biofertilizantes comerciales y al grupo testigo. Se evaluó la inocuidad microbiológica de los frutos, la traslocación de estas bacterias por el sistema vascular de la planta hasta llegar a fruto, por medio del perfil clonal de cada uno de los aislamientos, sin encontrar similitudes entre las cepas inoculadas y las cepas aisladas de tejidos endófitos del fruto; sin embargo, es necesario realizar estudios genéticamente para comprobar que estas bacterias no han desarrollado mecanismos que le permitan translocar a sitios anatómicos aéreos de las plantas y fruto, de esta manera garantizar frutos de calidad sin que representen un riesgo a la salud del consumidor y alto rendimiento en la producción de cultivos agrícolas de interés comercial.

**Palabras clave:** biofertilizante, inocuidad, perfil clonal, traslocación.

Recibido: marzo de 2022

Aceptado: junio de 2022

## Introducción

Las bacterias asociadas a la rizosfera, también llamadas promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) cumplen funciones específicas en los procesos biogeoquímicos, interactúan con las plantas, establecen protección contra fitopatógenos, aumentan la disponibilidad de nutrientes y nivel de fertilidad del suelo (Martínez-Romero *et al.*, 2018). Dentro de estas especies destaca el género *Klebsiella*, principalmente las especies de *K. variicola* y *K. quasipneumoniae*.

Cumplen mecanismos como la modulación del sistema radicular, promueven el fototropismo positivo, cumplen funciones específicas como la producción del ácido indol-3-acético, son fijadoras de nitrógeno atmosférico, solubilizadoras de fósforo (Wei *et al.*, 2013; Vega Celedón *et al.*, 2016), los cuales son esenciales para la formación de aminoácidos, compuestos nitrogenados para el metabolismo y parte estructural de la planta, vías de síntesis de fosfolípidos de membrana, elongación de la raíz, floración, parte del metabolismo para la obtención de energía, reparación y síntesis de ácidos grasos (Beltrán, 2014).

Otra de las funciones de las BPCV es estimular el desarrollo del sistema radicular de la planta y por ende aumentar la absorción de nutrientes, la principal vía de absorción se da por medio de los pelos radiculares presentes en las raíces primarias y secundarias, a través de los cuales ingresa una gran cantidad de compuestos y moléculas orgánicas para el metabolismo de la planta, se ha demostrado que existen microorganismos presentes en el suelo que han desarrollado la capacidad para internalizarse, translocar en el sistema vascular de la planta y persistir en el fruto como es el caso de *E coli* O157:H7 (Heaton *et al.*, 2008; Ocaña *et al.*, 2018).

La interacción y el metabolismo con otros microorganismos, permiten la asociación de comunidades microbianas que establecen simbiosis entre bacterias con hongos antagonistas que brindan protección a las plantas de fitopatógenos presentes del suelo. Entre los hongos antagonistas presentes, se encuentra *Trichoderma* comúnmente aislado del suelo, siendo ampliamente estudiado y comercializado como biopesticidas, biofertilizantes y enmiendas del suelo, que permiten el equilibrio del nicho ecológico. (Benítez *et al.*, 2004; Do Nascimento *et al.*, 2017; Hirpara *et al.*, 2017). Se han utilizado varias estrategias para identificar los factores moleculares implicados en esta compleja interacción de simbiosis, incluida la genómica, la proteómica y más recientemente, la metabolómica, con el fin de mejorar nuestra comprensión (Vinale *et al.*, 2008).

Se han evaluado biofertilizantes a base de soluciones microbianas en hortalizas, como *Solanum lycopersicum* conocido comúnmente como jitomate (SIAP, 2019). No obstante, es de vital importancia la vigilancia de la internalización, persistencia y translocación de estas bacterias en los tejidos internos de frutos con el fin de garantizar la sanidad del producto. Por ello, se analizó la translocación *in vivo* de *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* desde el sistema radicular al fruto de *S. lycopersicum* DT-22 en invernadero.

## Materiales y métodos

### Aislamiento de cepas bacterianas de diversos ambientes

Se seleccionaron muestras de raíces de plátano, maíz y jitomate, y diversas muestras aguas (río, laguna, planta de tratamiento de aguas residuales y de riego) de los municipios de Mochitlán, Acapulco, Chilpancingo y Tixtla respectivamente. Se realizó un lavado con agua estéril de la raíz

y se localizaron los nódulos. Las muestras de rizósfera se tomaron con hisopo de forma directa y se transportaron al laboratorio en solución salina estéril al 0.85% y en viales en tubo con agar MacConkey. De las muestras de aguase hicieron diluciones hasta  $1 \times 10^{-3}$ , siguiendo la metodología de Puerta *et al.* (2010). Después de 24 h a temperatura ambiente, se seleccionaron colonias características del género *Klebsiella*, colonias lactosa positivas, de borde irregular y sumamente mucoides en forma de cúpula, lisas y convexas. Se les realizó las pruebas de oxidasa, y se evaluó el perfil bioquímico convencional: en Kligler, MIO, citrato, urea, lisina para separar al género.

### **Diferenciación molecular de *K. variicola*, *K. pneumoniae* y *K. quasipneumoniae* mediante PCR multiplex**

Las cepas identificadas bioquímicamente del género *Klebsiella*, realizó la extracción de ADN por choque térmico, solubilizando tres colonias en 50  $\mu$ l de agua estéril y sometiendo a una temperatura de 96 °C por 10 min y rápidamente en hielo durante 5 min y posteriormente se centrifuga y se toman 10  $\mu$ l del sobrenadante y se resuspendió con 90  $\mu$ l de agua destilada estéril y se mantienen a -20 °C. La mezcla de reacción para la PCR-multiplex se llevó a cabo a un volumen final de 25  $\mu$ l, con una concentración 1X de buffer, 2 mM de dNTP's, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, final de 1X de buffer, 2 mM de dNTP's, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l de los oligonucleótidos de *K. variicola* 2006 a una concentración de 10 pmol DNA, 2  $\mu$ l de *K. quasipneumoniae* 10441 a una concentración de 5 pmol y 2  $\mu$ l de los oligonucleótidos de *K. pneumoniae* 13883 a una concentración final de 5 pmol, 0.5  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa y 3  $\mu$ l de la solución de ADN al 1%.

La mezcla de reacción estuvo sujeta a un paso de desnaturalización inicial de 2 min, a 92 °C, seguida por 30 ciclos de 30 s, a 92 °C, 30 s, a 60 °C, 40 s, a 72 °C y una extensión final de 3 min, a 72 °C. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 120 V por 1 h. Se utilizaron como controles un fragmento de 275 pb de *K. variicola* 2006, uno de 372 pb *K. quasipneumoniae* 10 441 y de 650 pb de *K. pneumoniae* 13 883 (Martínez *et al.*, 2018).

### **Detección de los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal: fijación de nitrógeno**

Las cepas se inocularon con palillo de madera estéril en medio Rennie modificado libre de N<sub>2</sub> (Rennie, 1986) y se incubaron a 30 °C por 24-48 h. El crecimiento es indicador de la fijación de nitrógeno. Como control positivo se utilizó a *K. variicola* PB y negativo *E. coli* DH5- $\alpha$ .

### **Solubilización de fosfato**

La capacidad de solubilizar fósforo inorgánico se evaluó en el medio National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) con fosfato tricálcico siguiendo la metodología de Nautiyal, (1999), se midió el diámetro del halo y de la colonia (mm) para el cálculo del índice de solubilización (IS), que relaciona la suma de los diámetros de halo y colonia, y el diámetro de la colonia. Como control positivo se empleó *K. variicola* PB y como control negativo *E. coli* DH5- $\alpha$ .

### **Cuantificación del ácido indol acético**

La producción de ácido indol acético (AIA), se evaluó en caldo soya tripticaseína suplementado con triptófano siguiendo la metodología e interpretación Lara *et al.* (2011). Para cuantificar la producción de AIA, en sobrenadantes de las cepas evaluadas, se realizó una curva patrón con

diferentes concentraciones de AIA comercial (4 a 140 µg ml<sup>-1</sup>) y el reactivo de Salkowski relación 2:1. Se midió la absorbancia a 542 nm en un lector Stat Fax-2100, empleando como control positivo *K. variicola* PB y como control negativo *E. coli* DH5-α.

### Producción de sideróforos

Se evaluó la producción de sideróforos creciendo las cepas en caldo F, adicionado con glicerol 10 ml L<sup>-1</sup>, a partir de un cultivo puro de 18-24 h, se incubó durante 24-72 h a 37 °C y se examinó el crecimiento bajo una luz ultravioleta ligera de 260 nm en un mini transiluminador BioRad. Se interpretó según Villa *et al.* (2017) empleando como control positivo *K. variicola* PB y control negativo caldo F sin inocular.

### Material vegetal y diseño de los tratamientos

Las semillas de *S. lycopersicum* variedad Saladette cultivar DT-22, se germinaron en semilleros de 54 cavidades en diciembre de 2018, a una edad de 39 días posgerminación, se trasplantaron en invernadero sin ningún tipo de abono. Para su estudio, se realizó un diseño de bloques completos al azar con siete plantas cada uno de acuerdo con la NOM-032-SAG/FITO-2014, esto por cada tratamiento y distribuidos como se muestra en la (Figura 1) con un total de 252 plantas en un invernadero de 500 m<sup>2</sup> área, bajo condiciones de temperatura, humedad, y riego controladas (la temperatura se medía con un termómetro digital dentro del invernadero, cuando está llegando a 40 °C se tomaban medidas correctivas como abrir las alas del invernadero, lo mismo para la humedad y el riego estaba medido por dos tensiómetros que mide el esfuerzo que hacen las raíces para extraer la humedad del suelo, uno estaba a 60 cm y otro a 30 cm del suelo y estos encendían el riego por goteo cuando el de 30 cm rebasaba los 5 kPa (kilopascales) y se apagaba el riego cuando el de 60 cm llegaba a 0 kPa, todo esto era para no generar estrés hídrico en las plantas. Además, se agregó una cepa de *Trichoderma* sp., X2, proporcionada por el Dr. Sergio Ramírez del INIFAP, Zacatepec, Morelos, con la finalidad de evaluar en conjunto con las cepas de Klebsiellas. Cabe destacar que el T1 es el grupo testigo o control, el T6 un biofertilizante comercial como control positivo.

		Surco barrera							
		I	II	III	IV	V			
Surco barrera con lombric	Surco sin lombric	Surco + 33 % más lombric	T2	T4	T3	T1	T5	Surco barrera con lombric	T1 Testigo
			T1	T2	T4	T5	T6		T2 <i>Trichoderma</i>
			T6	T3	T5	T4	T2		T3 <i>K. variicola</i> + <i>K. quasipneumoniae</i>
			T4	T6	T1	T6	T3		T4 <i>Trichoderma</i> + <i>K. variicola</i> + <i>K. quasipneumoniae</i>
			T1	T2	T5	T1	T4		T5 <i>Trichoderma</i> + <i>K. quasipneumoniae</i>
			T3	T6	T2	T3	T5		T6 Biofertilizante comercial
		Surco barrera							

**Figura 1. Diseño de bloques completos al azar de las plantas expuestas a los tratamientos microbianos.**

Las pruebas de efectividad biológica y translocación a fruto se realizaron durante el ciclo agrícola comprendido de enero-junio de 2019. Las condiciones ambientales fueron monitoreadas durante todo el ciclo hasta finalizar la etapa de producción.

## **Preparación de los tratamientos microbianos**

La selección de las cepas PB02 y HPA43 utilizadas en este trabajo, fue de acuerdo con su previa caracterización como bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos, productoras de ácido indol-3-acético, identificadas molecularmente por secuenciación del gen *rpoB* como *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* respectivamente y evaluadas como promotoras de crecimiento radicular *in vitro* en *Solanum lycopersicum* (Gutiérrez *et al.*, 2017). Así, también a los resultados obtenidos al ser evaluadas *in vivo* en otros cultivos de interés comercial por este equipo de trabajo. Se realizó un pre-inóculo de las cepas de manera individual en caldo nutritivo, ajustando una densidad óptica de  $1.5 \times 10^8$  microorganismos y el inóculo en solución salina a un volumen final de 1.5 L por cada tratamiento, a la misma concentración de microorganismos.

## **Inoculación de los tratamientos microbianos en la raíz de *S. lycopersicum* cultivar DT-22**

Posterior al trasplante, se agregaron 50 ml del inóculo con jeringa estéril a nivel de raíz, esto fue a cada una de las plantas por bloque, se realizaron en total 3 inoculaciones por periodos de cada 30 días.

## **Rendimiento de producción de frutos de *S. lycopersicum* expuesto a los tratamientos microbianos**

Se cuantificó y clasificó el número de frutos producidos por clase en base al peso (g): los de primera clase, pesaron de 100 g o más, segunda clase, de 50 a 99 g y tercera clase con peso menor a 49 g, también se obtuvo el peso absoluto (kg) de la producción por bloque respecto a cada tratamiento; cabe mencionar, que dicha clasificación se realiza en base a la experiencia del productor; Ing. Rubén Ocampo Espín quien ha producido y colocado su producto por más de 15 años en el mercado nacional. Se analizaron como variables de respuesta el peso absoluto de producción, peso por clase (I, II y III). El análisis estadístico se realizó en el programa estadístico SAS versión 9.4. Una prueba de Anova bifactorial, comparación de medias por la prueba de Tukey.

## **Inocuidad microbiológica de los frutos de *S. lycopersicum* cultivar DT-22 expuestos a los diversos tratamientos microbianos**

Se realizó la recolección de tres frutos al azar por tratamiento en tres eventos distintos, con un total de 54 frutos por invernadero. La recolección y preparación de las muestras se realizó ejecutando las especificaciones de la NOM-109-SSA1-1994. Una vez que los frutos fueron transportados al laboratorio, se procedió a realizar la desinfección de la superficie de los frutos con yodo a una concentración de 0.5% en agua estéril durante 5 minutos, posterior a esto se retiró la cáscara del fruto.

Para el procesamiento de las muestras se tomaron 10 g del tejido interno del fruto y se diluyó en 90 ml de H<sub>2</sub>O peptonada con NaCl estéril al 0.85%, el procesamiento se realizó en base a las NOM-113-SSA1-1994 y NOM-210-SSA1-2014, de la suspensión resultante se tomaron 100  $\mu$ l y se inocularon en placas Petri (superficie cultivable 100 mm) en agar Mac Conkey, utilizando la técnica de dispersión con perlas de vidrio en condiciones de esterilidad para el recuento de UFC g como se indica en NOM-110-SSA1-1994. Para la interpretación de resultado se tomaron los valores de referencia establecidos en la NOM-113-SSA1-1994, la cual indica que el límite máximo

permisible (LMP) para mesofílicos anaerobios es de 150 000 UFC g<sup>-1</sup> y para coliformes fecales de 100 000 UFC g<sup>-1</sup> en muestras de alimentos, en conjunto con la ISO 21528-2:2017. Los aislamientos fueron identificados bioquímicamente por el sistema Api20E<sup>®</sup> Biomerix siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Determinación de la colonización de raíz de las plantas de *S. lycopersicum* DT-22**

Una vez terminada la etapa de producción se procedió a sacrificar las plantas de *S. lycopersicum* para obtener la raíz, fueron transportadas al laboratorio para su análisis microbiológico, se realizó la desinfección de la superficie radicular con una solución Tween al 20% durante 10 min (modificado de Bueno *et al.*, 2007). Se tomó 1 cm<sup>3</sup> del tejido interno de meristemo apical de la raíz primaria. Se maceró con una varilla de vidrio estéril y se diluyó en 9 ml de agua peptonada con NaCl al 0.85% estéril y se vortexearon a 3 500 rpm durante 1 min. Posteriormente se hicieron diluciones hasta 10<sup>-8</sup>, en un tiempo no mayor a 20 min, se plaquearon 100 µl de cada dilución en placas de agar Mac Conkey por duplicado, incubando a 25-30 °C por 18 h. Posterior al tiempo de incubación se realizó el recuento de UFC g. Los aislamientos fueron identificados por morfología colonial característica y bioquímicamente.

### **Evaluación de la translocación por huella genómica de cada aislamiento de *Klebsiella***

Al total de cepas identificadas como *Klebsiella*, se les extrajo ADN genómico por choque térmico y se identificaron en base a patrones genéticos por PCR de secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC) para evidenciar su origen clonal. Los oligonucleótidos utilizados fueron: ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido por 30 ciclos de (93 °C por 45 s, 50 °C por 1 min, 65 °C por 8 min) y una extensión final a 65 °C por 16 min (Versalovic *et al.*, 1991). Los productos del ERIC-PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% a 75 V por 2 h y teñidos con bromuro de etidio (3 µl 100 ml<sup>-1</sup> de agarosa) y visualizados bajo luz UV (365/302 nm). El patrón genómico de las cepas aisladas del fruto y raíz fueron comparados con las cepas tipo de *K. variicola* PB02 y *K. quasipneumoniae* HPA43. Finalmente, la interpretación de los patrones obtenidos se realizó de acuerdo con los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995).

## **Resultados y discusión**

Se recolectaron un total de 13 cepas aisladas de la rizosfera de diversos cultivos agrícolas (plátano, maíz, y jitomate) y agua. Las especies de *K. variicola*, *K. pneumoniae* y *K. quasipneumoniae* se diferenciaron molecularmente. Obteniendo 37.5% (3/13) confirmadas como *K. pneumoniae* las cepas RS10, GN7 y KA2, 6.5% (1/13) *K. variicola* PB02 y 12.5% (2/13) identificadas como *K. quasipneumoniae* HPA4-3 y PB06. *K. quasipneumoniae* y *K. variicola* han tenido un gran impacto, sin embargo, un mal enfoque, la falta recursos, el desconocimiento de la diversidad entre las especies, la falta de actualización de las bases de datos de los equipos utilizados para la identificación bacteriana en los centros hospitalarios, dificultan su diferenciación y diagnóstico.

Por ello, hay que emplear métodos moleculares para confirmar la identificación y diferenciación de las especies dentro de la rutina microbiológica, dado que estudios de Garza- Ramos *et al.* (2015) menciona que no es posible diferenciar a *K. quasipneumoniae* y *K. variicola* de *K. pneumoniae* por pruebas bioquímicas y fenotípicas, si no por métodos moleculares (Figura 2).



**Figura 1. Diferenciación de las cepas de *Klesiella* sp.** Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA; carril 2= control positivo; DNA *K. variicola*, *K. quasipneumoniae*, *K. pneumoniae*; carril 3= DNA *K. variicola* 2006 (control); carril 4= DNA *K. quasipneumoniae* 10442 (control); carril 5= DNA *K. pneumoniae* 13883 (control); carril 6= control negativo (agua destilada); carril 7= DNA cepa KC1; carril 8= DNA cepa KC2; carril 9= DNA cepa KC3; carril 10= DNA cepa RS10; carril 11= DNA cepa PB02 (*K. variicola*); carril 12= DNA cepa HPA4-3 (*K. quasipneumoniae*); carril 13= DNA cepa PB06 (*K. variicola*).

Bernabé (2016) reporta a *K. quasipneumoniae* de la rizósfera de *Opuntia ficus* identificada por metagenómica dirigida al gen del ARNr16S. Siendo este el primer reporte de *K. quasipneumoniae* en área ambiental, la cepa HPA4-3 aislada de agua del río azul y la cepa PB06 localizada en la rizosfera de maíz. Cabe mencionar que 43.75% (7/13) de los aislados no amplificaron para ninguna especie, pero si para el género.

### Fijación biológica del nitrógeno

Las cepas identificadas como *K. variicola* PB02 y *K. quasipneumoniae* HPA4-3 son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en 100%, ya que presentan una actividad del complejo nitrogenasa a las 24 h, evaluadas *in vitro*. Esto último se confirma con el estudio de Fouts *et al.* (2008) que reporta que *K. pneumoniae* presenta en su genoma el regulón (KPK.1696-KPK.1715) de la fijación de nitrógeno, indicando que en las cepas se encuentra presente la enzima nitrogenasa la cual cataliza la conversión de  $N_2$  a  $NH_4$ . Carcaño *et al.* (2006) reportan a *Klesiella* sp con una actividad nitrogenasa en un rango de 42-122.46 nmol de etileno por ml donde al comparar con el género *Azospirillum* sp. (8.62-70.08 nmol) presenta una significativa diferencia en la actividad nitrogenasa de etileno por ml, esto indica que el género *Klesiella* sp., cuenta con un gran potencial como bacteria fijadora de nitrógeno.

### Solubilización de fosfatos

El 100% de las cepas son solubilizadoras. La de mayor índice fue *K. quasipneumoniae* PB06 con índices de 10.7 mm, seguida por *K. pneumoniae* KA-2 con 9.66 mm y *K. quasipneumoniae* HPA-4-3 con 7.97 mm Tereja *et al.* (2013) evaluó cepas de *Bacillus* sp., en donde 29.31% son solubilizadoras de fosfatos, esto pone a *Klesiella* como un género con gran potencial para efectuar este fenómeno. La liberación del fósforo soluble es esencial para el desarrollo de las plantas; desempeña un papel fundamental en la síntesis de DNA. Lara *et al.* (2011), reporta índice de

solubilización con rango máximo entre 3 y 4.2 mm de diámetro de un total de 20 cepas entre las que se encuentran *P. putida*, *P. luteola*, *E. sakasaki* y *E. cloacae*, evaluadas en las mismas condiciones de este documento de trabajo. La diferencia de estos resultados está relacionada con la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. Se han registrado altas tasas de solubilización en presencia de amonio como fuente de nitrógeno lo cual se relaciona con el porcentaje de fijación en las cepas evaluadas en nuestro trabajo (Beltrán, 2014).

### **Producción de ácido indol acético**

En la producción de AIA se observó que 100% de las cepas son productoras de AIA entre las que destacan: *K. pneumoniae* RS10 y *K. quasipneumoniae* PB06 con una elevada concentración de 3.241 y 2.738  $\mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente que es estadísticamente significativo con respecto al control positivo *K. variicola* PB con 2.169  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . La concentración de AIA en la planta es responsable de incrementar el sistema radicular y follaje de la planta (Taiz-Zeiger, 2013). Además, esta fitohormona se relaciona con la inducción a la elongación de tallos y desarrollo de frutos.

Los resultados obtenidos en este estudio en comparación con los de Bautista-Gallardo (2008) son inferiores. Ellos trabajaron con *A. vinelandii* y obtuvieron alta producción de AIA. Carcaño *et al.* (2006) reportan cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* con una producción de hasta 26.55  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , lo cual confirma que las especies del género *Klebsiella* son productoras de esta auxina, no obstante en este estudio se pueden comparar que las cepas de *Klebsiella* sp., que no tienen actividad nitrogenasa presentan una mayor producción de indoles y viceversa, esto confirma los resultados obtenidos dado que en las cepas fijadoras de nitrógeno se obtiene una producción de AIA en bajas concentraciones. Vega *et al.* (2016) mencionan que las cepas productoras de AIA presentan un mayor efecto promotor de crecimiento, aumentando la elongación de la raíz primaria y el número de raíces secundarias. No obstante, las que no producen AIA retardan la elongación de las raíces.

### **Producción de sideroforos**

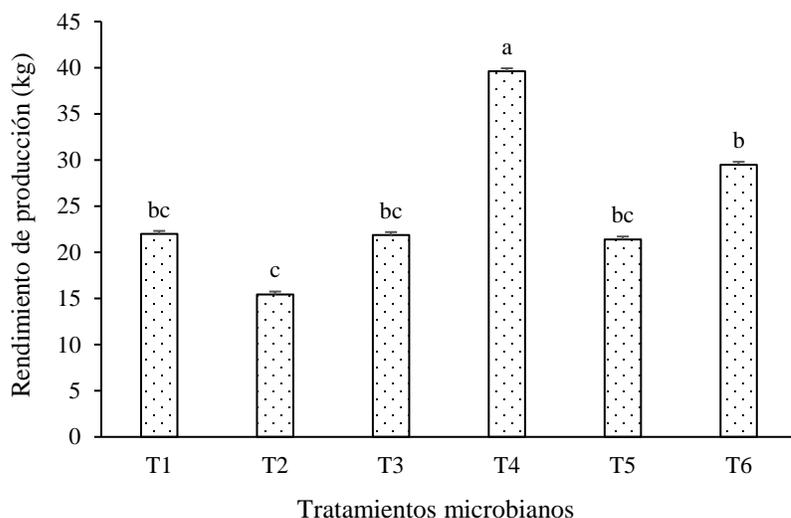
La producción de sideroforos se realizó a las cepas identificadas molecularmente: el 100% de las cepas evaluadas son productoras de sideroforos que concuerda con lo mencionado por Arena *et al.* (2015) donde demuestra que *K. pneumoniae* produce sideróforos: enterobactina y aerobactina. Esto le confiere ventajas competitivas en la colonización de la raíz, brindando protección mediante el biocontrol que establece, debido a la captación del hierro por los sideroforos, siendo atraídos a la membrana bacteriana limitando así la disponibilidad del hierro para microorganismos que carezcan del sistema de asimilación. Esto es concordante con lo mencionado por Molina *et al.* (2015) en relación al antagonismo entre *B. altitudinis* y *T. cucumeris*.

*K. quasipneumoniae* HPA4-3 y PB06 y *K. variicola* PB02 las seleccionamos como candidatas en conjunto con el *Trichoderma* sp para ser inoculadas en *S. lycopersicum* Saladette cultivar DT-22, aunque la cepa de *K. pneumoniae* RS10 presenta varias características de promoción vegetal, se descartó por diversos estudios publicados donde demuestran las alteraciones en la salud humana.

### **Rendimiento de producción en Saladette cultivar DT-22**

Se hicieron 11 cosechas (una por semana) en total se tomaron al azar de cinco cosechas en eventos distintos para analizar el rendimiento. La cosecha total de producción estimada fue de: 1 392 kg por todos los tratamientos. Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos evaluados, no

presentan el mismo efecto en la producción de jitomates de primera clase, el análisis comparativo Anova nos da un valor de  $p= 0.0008^*$ , los datos completos se observan en la (Figura 3) donde se clasifica de acuerdo con el agrupamiento de Tukey, tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas en su efecto, el T4 tiene el valor promedio más alto ( $p= 0.0007^*$ ) en producción (39.618 kg) por cosecha, respecto grupo testigo (T1). A diferencia de los tratamientos donde fueron evaluados de manera individual, T2 que no presenta diferencia significativa respecto al testigo ( $p= 0.464$ ), el T3 tiene una menor producción ( $p= 0.999^*$ ) en comparación con los demás tratamientos y el testigo (T1), por otro lado, en el T5, no presenta diferencia significativa ( $p= 0.999$ ) respecto al grupo testigo (T1), este último consorcio se realizó por que la cepa HPA43 fue capaz de promover el crecimiento radicular *in vitro* de *S. lycopersicum* L. (Gutiérrez *et al.*, 2017).



**Figura 3. Gráfico de comparación de medias del rendimiento de la producción (kg) jitomate Saladette cultivar DT-22.** En las gráficas se muestra la barra del error estándar y la clasificación de acuerdo con el agrupamiento de Tukey que indica que los tratamientos con las mismas letras no presentan diferencias significativas.

Además de los consorcios microbianos se evaluó un biofertilizante comercial T6, ya estandarizado y se comprobó que, sí aumenta el rendimiento de producción de los cultivos respecto al T1; sin embargo, no es significativo en comparación con nuestro T4. Estos microorganismos son capaces de establecer una asociación mutualista (bacteria-hongo-planta) y potencializar el rendimiento de la producción, estimulan el desarrollo del sistema radicular de la planta influyendo en la diferenciación celular a nivel del meristemo, internalizándose a la zona de diferenciación e influyen en la diferenciación de las células de acuerdo a las necesidades de la planta y las condiciones ambientales, por lo tanto hay mayor número de pelos radiculares los cuales permiten el ingreso de nutrientes y minerales al sistema vascular de la planta (Scharf *et al.*, 2016; Calzavara *et al.*, 2018).

### **Análisis microbiológico de los frutos expuestos a los tratamientos microbianos**

En el Cuadro 1 se muestra el recuento microbiológico de los frutos por tratamiento, se observan las medias y desviaciones estándar del Log de UFC  $g^{-1}$  de tres repeticiones en tres eventos distintos, se reporta el número de microorganismos  $g^{-1}$  presentes en la muestra, como la ISO 21528-2:2017, los valores obtenidos del recuento están en los límites máximos permisibles.

**Cuadro 1. Recuento microbiológico en frutos de *S. lycopersicum* DT-22 en cada tratamiento.**

Tratamiento	Recuento microbiológico Log de UFC/g (X ±DS)	N (microorganismos g <sup>-1</sup> )	(Pr >F)	Referencia
T3	2.6 ±2.5	3262 a	p= 0.469	NOM-113-SSA1-1994, ISO 4833-1:2013, ISO 21528-2:2017
T4	2.2 ±2.1	1595 a		
T5	2.5 ±2.5	2828 a		
T1	2.2 ±2	1545 a		

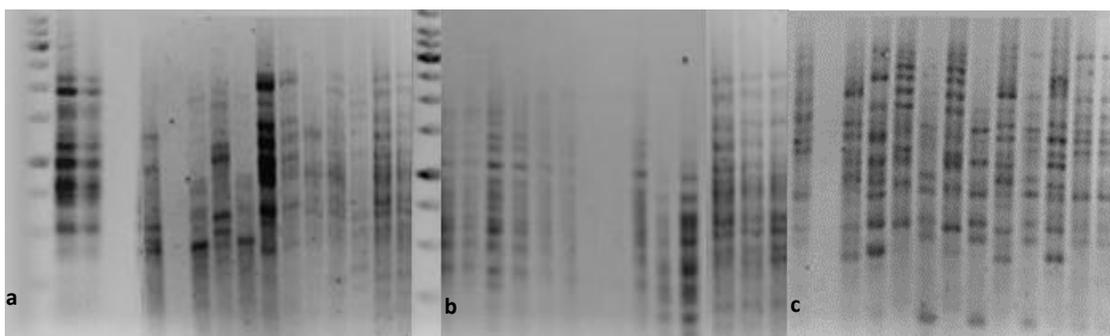
X= media; DS= desviación estándar; N= número; T3= *K. variicola* y *K. quasipneumoniae*; T4= *K. variicola*, *K. quasipneumoniae*, *Trichoderma* sp.; T5= *K. quasipneumoniae*, *Trichoderma* sp.; T1= testigo. El subíndice a en cada valor, pertenece al agrupamiento de Tukey, letras iguales indican que no existe diferencia estadística entre los tratamientos.

Por el recuento de UFC g<sup>-1</sup> encontrada se infiere que se trata de la microflora endémica que está asociada a los sitios anatómicos del fruto, que tienen afinidad por sitios específicos de la planta de acuerdo con la composición nutricional de cada sitio anatómico (Ottesen *et al.*, 2013). Es de vital importancia la vigilancia microbiológica y el estudio de la ecología microbiana de estos cultivos de interés comercial, como el jitomate DT-22 que se comercializa directamente al mercado y es altamente consumido en fresco, debido que los desinfectantes utilizados son de uso superficial en el fruto, no ejercen un efecto sobre los tejidos internos (Barak *et al.*, 2012). Debemos vigilar que los frutos no representen un riesgo para la salud del consumidor.

**Análisis molecular de la huella genómica de *K. variicola* PB02 y *K. quasipneumoniae* HPA43**

Se obtuvieron en total 114 cepas (12 de frutos y 102 raíz), identificados fenotípica y bioquímicamente como *Klebsiella* sp. Los perfiles obtenidos en base al ERIC-PCR permitió clasificar clonas (38) y subclonas (16) de las cepas de *K. variicola* PB02 y *K. quasipneumoniae* HPA43, todas a partir de raíz, de las cepas aisladas de frutos no se determinó ningún aislamiento con el mismo patrón de bandas similar al de las cepas control, como se observa en la (Figura 4).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



**Figura 4. Se observan los patrones de clonalidad de las secuencias intergénicas repetitivas de enterobacterias.** a) M= marcador de peso molecular de 1Kb; 1= cepa *K. variicola* PB02; 2= *K. quasipneumoniae* HPA43; 3= control negativo. Cepas de frutos; 4= T5R3, 5= S2, 6= R4, 7= V4, 8= P3, 9= Z3, 10= T3R2, 11= R3, 12= N3. Cepas de raíz; 13= T5R5, 14= T5R1, 15= T3R4; b) M= marcador de peso molecular de 1Kb; 1= 3R1, 2= 3R2, 3= 3R4, 4= 3R4, 5= 3R5, 6= 5R1, 7= 5R2, 8= 5R3, 9= 5R4, 10= 5R5, 11= T5R3, 12= T5R4, 13= T3R2, 14= V5, 15= W5, 16= T5, 17= T3R1, 18= T3R4, 19= T3R5, 20= T3R, 21= 5R1, 22= A1, 23= A6, 24= B6, 25= C6, 26= D6, 27= E6.

Este método se ha utilizado principalmente para la determinar brotes hospitalarios con el objetivo de comprobar si los aislamientos similares fenotípicamente tienen una relación genética, dado a la alta tasa de variabilidad genética en procariontes ocasionada por factores ambientales, se amplifican secuencias intergénicas conservadas en enterobacterias que permitan identificar por medio de su huella digital que se derivan de un ancestro en común, en un mismo sitio y en un periodo definido (Tenover *et al.*, 1995). Estos perfiles son útiles para analizar la propagación y distribución de las bacterias en el ambiente, como es que se mueven de un lugar a otro y las condiciones a las cuales persisten.

En los resultados obtenidos, se encontró similitud genética entre las cepas *Klebsiella* aisladas de raíz y las cepas *K. variicola* PB02, *K. quasipneumoniae* HPA43 inoculadas; no obstante, hacen falta estudios moleculares específicos que permitan confirmar que estas bacterias u otras BPCV no traslocan a los frutos, que no han intregado mecanismos de adaptación, por transferencia horizontal que permitan la traslocación al fruto como es el caso de *E. coli*, en respuesta a los factores ambientales, genéticos o ambientales (Ottesen *et al.*, 2013). Para comprender mejor la interacción de la ecología microbiana en el fruto y determinar si la colonización de estas bacterias es un factor determinante para desarrollar un problema de salud a los consumidores.

## Conclusiones

El uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en consorcios con hongos antagonistas potencializa el rendimiento de producción de cultivos agrícolas de interés comercial ayudando a satisfacer las demandas de consumo y reduciendo los costos de producción en un tiempo menor en comparación con la agricultura convencional. Se requieren más estudios sobre los efectos de la cantidad de inóculo usado en el rendimiento de los frutos y usar herramientas moleculares más finas de las cepas aisladas de los frutos para corroborar en el patrón clonal, y proponerlos con mayor certeza para el estudio de translocación de BPCV desde la rizosfera a los frutos.

## Agradecimientos

Se agradece la participación de la Dra. Yanet Romero Ramírez, Dr. Arturo Ramírez Peralta, Dr. Ulises Garza Ramos García, Q. Alejandro Sánchez y la QBP. Brenda Celeste Rodríguez Chacón en la revisión y apoyo técnico del proyecto.

## Literatura citada

- Arena, F.; Henrici De Angelis, L.; Pieralli, F.; Di Pilato, V.; Giani, T.; Torricelli, F. and Rossolini, G. M. 2015. Draft genome sequence of the first Hypermucoviscous *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* Isolate from a Bloodstream Infection. *Genome Announc.* 3(5):e00952-15. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00952-15>.
- Barak, D. J. and Schroeder, K. B. 2012. Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants. *Annual Review Phytopathol.* 50(1):241-266. DOI:10.1146/annurev-phyto-081211-172936.
- Bautista, L. X. C. y Gallardo, I. R. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. 159 p.

- Beltrán, M. E. 2014. Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth, *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecuaria*. 15(1):101-113.
- Benítez, T.; Rincón, A. M.; Limón, M. C. y Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology: the official J. Spanish Soc. Microbiol.* 7(4):249-260.
- Bernabé, S. L. 2016. Identificación molecular de bacterias cultivadas y no cultivadas asociadas a la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* (L.) mil. (cactácea) en ecosistemas áridos. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Tumbes. 31-33 pp. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/186>.
- Calzavara, A. K.; Godoy, P. P. H.; Cavanha, G. L.; Martínez, O. L. A.; Milanic, K.; Caixeta, O. H.; Bianchini, E.; Pimenta, J. A.; Neves, O. M. C.; Dias, P. J. and Stolf, M. R. 2018. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology, and root anatomy under different nitrogen levels. *Plant Biol.* 20(5):870-878. doi:10.1111/plb.12841.
- Carcaño, M. M. G.; Ferrera, C. R.; Pérez, M. J.; Molina, J. D. and Bashan, Y. 2006. Nitrogenase activity, production of phytohormones, siderophores and antibiosis in strains of *Azospirillum* and *Klebsiella* isolated from Maize and Teosintle. *Terra Latinoam.* 24(4):493-502.
- do Nascimento, M. O.; de Almeida, S. R.; dos Santos, G. R.; de Oliveira, C. A. and de Sousa, D. J. 2017. Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *J. Basic Microbiol.* 57(8):699-704. doi: 10.1002/jobm.201600755.
- Fouts, D. E.; Tyler, H. L.; Deboy, R. T.; Daugherty, S.; Ren, Q.; Jonathan, H. and Methe, B. A. 2008. Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.* 4(7):e1000141. 1-8 pp. doi: 10.1371/journal.pgen.1000141.
- Garza, R. U.; Silva, S. J.; Martínez, R. E.; Tinoco, P.; Pina, G. M. and Barrios, H. 2015. Development of a multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola*. *BMC Microbiol.* 15(64):1-24. doi: 10.1186/s12866-015-0396-6.
- Gutiérrez, I. G. y Nava, C. G. 2017. Evaluación de *Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasipneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* como reguladoras de crecimiento radicular de *Solanum lycopersicum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. 22-45 pp.
- Heaton, J. C. and Jones, K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a Review. *J. Appl. Microbiol.* 104(3):613-26. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03587.
- Hirpara, D. G.; Gajera, H. P.; Hirapara, J. G. and Golakiya, B. A. 2017. Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Infection, genetics, and evolution. J. Mol. Epidemiol. Evol. Gen. Infectious Dis.* 55(29):75-92. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.029>.
- Lara-Celia, C.; Oviedo, L. y Alemán, A. 2011. Aislados nativos con potencial en la producción de Ácido Indol Acético para mejorar la agricultura. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 9(1):17-23.
- Martínez-Romero, E.; Rodríguez-Medina, N.; Beltrán-Rojel, M.; Toribio-Jiménez, J. and Garza-Ramos, U. 2018. *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* with capacity to adapt to clinical and plant settings. *Salud Pública de México.* 60(1):29-40. <https://doi.org/10.21149/8156>.
- Muñoz-Rojas, J.; Molina-Romero, D.; Bustillos-Cristales, M. R.; Rodríguez-Andrade, O.; Morales-García, E.; Santiago-Saenz, Y., y Castañeda-Lucio, M. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *17(2):24-34.*

- Nautiyal-Shekhar, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Microbiology Letters*. 170:265-270.
- Ottesen, A. R.; González-Peña, A.; White, J. R.; Pettengill, J. B.; Li, C.; Allard, S.; Rideout, S.; Allard, M.; Hill, T.; Evans, P.; Strain, E.; Musser, S.; Knight, R. and Brown, E. 2013. Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiology*. 13(114):1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-114>.
- Puerta-García, E. A. and Mateos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. *Medicine*. 10(1):3426-3431.
- Rennie, R. J. 1986. Advantages and disadvantages of nitrogen-15 isotope dilution to quantify dinitrogen fixation in field-grown legumes. A critique. *In*: Hauck R. D. and Weaver, R. W. Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification. Soil Science. Society of America, Madison, Wisconsin, USA. Special Publication 8. (Ed.). 43-58 pp.
- Scharf, B. E.; Hynes, M. F. and Alexandre, G. M. 2016. Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations. *Plant Mol. Biol.* 90(6):549-559. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0432-4>.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2013. *Fisiología Vegetal*. 5<sup>th</sup> Edition. Artmed, Porto Alegre. 918 p.
- Tereja-Hernández, R. B. 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos. *Agron. Mesoamer.* 24(2):357-364.
- Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H. and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clinical Microbiol.* 33(9):2233-2239. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995>.
- Versalovic, J.; Koeuth, T. and Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic. Acids. Res.* 19(24):6823-6831.
- Vega-Celedón, P.; Canchignia-Martínez, H.; González, M. y Seeger, M. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales.* 37(1):33-39.
- Villa, P. M.; Frías, A. y González, G. 2017. Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp. para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar.* XXXIX(3): 40-44.
- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; Marra, R.; Woo, S. L. and Lorito, M. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40(1):1-10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>.
- Wei, C.; Lin, L.; Luo, L.; Xing, Y.; Hu, C.; Yang, L.; Li, Y. and An, Q. 2013. Endophytic nitrogen fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Biology and Fertility of Soils.* 50(1):657-666. Doi:10.1007/s00374-013-0878-3.