

MAESTRÍA EN AGROBIOTECNOLOGÍA

EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae* (BASYNYM: *Enterobacter* sp.) EN EL CULTIVO DE JITOMATE PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN AGROBIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Mariela Aguilar Linares

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María de Lourdes Velázquez Hernández

CODIRECTORA DE TESIS:

M.C. Daysi Navez González

Los Reyes de Salgado, Michoacán a 31, Enero, 2023



La presente tesis titulada “EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae* (BASONYM: *Enterobacter* sp.) EN EL CULTIVO DE JITOMATE PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL” realizada por la alumna: Mariela Aguilar Linares, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener grado de:

MAESTRA EN AGROBIOTECNOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR DE TESIS:



DRA. MARÍA DE LOURDES VELÁZQUEZ HERNÁNDEZ

ASESOR 1:



M.C. YOLANDA RUÍZ SUÁREZ

ASESOR 2:



M.C. PEDRO SANDOVAL ESTRADA

Los Reyes de Salgado, Michoacán a 27 de enero de 2023.

SÍNTESIS CURRICULAR

Mariela Aguilar Linares, originaria de Guadalajara, Jal., con fecha de nacimiento del 26 de octubre de 1998. En septiembre del año 2016 ingresó a la Universidad Autónoma de Guadalajara, en Guadalajara, Jalisco, México y egresó con el título Biólogo en abril del año 2020. De junio del 2020 a abril del 2021 laboró en la empresa Avoomex Natural Green S.C de C.V. y posteriormente en diciembre del 2021 a mayo del 2022 siguió con sus labores en la Junta Local de Sanidad Vegetal, en Tingüindín, Michoacán. De noviembre de 2022 a la actualidad desempeña sus labores en la empresa Normich A.C en la sección de laboratorio de ensayo del área de Química Agrícola. Realizó la Maestría en Agrobiotecnología en el Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes, Michoacán, desde 2020 hasta el 2022. Durante el periodo en que cursó sus estudios de posgrado fue ponente en dos eventos científicos: CienTec 2022, AgroEvento 2021 *On-Line*, y la presentación oral del proyecto de maestría en el V Congreso Nacional y III Congreso Internacional de Ciencias Agropecuarias del TECNM. La estudiante egresa con un promedio de 9.4.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Primeramente, expresar mi agradecimiento hacia el Posgrado del Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes, el cual me permitió una apertura de visión sobre los temas y oportunidades que se desarrollan dentro del área de la Agrobiotecnología; relaciones químicas y biológicas en constante interacción e interminable relación, todo un mundo fascinante, con un terreno relativamente virgen de investigación y aplicación, gracias por la guía y la enseñanza adquirida en el tiempo de estudio dentro de la institución. También agradecida ampliamente con mi directora de tesis, la cual tuve el honor de conocer mediante su guía y compañía durante la elaboración de pruebas y ensayos requeridos para el proyecto, la Dra. María de Lourdes Velázquez Hernández, por su apoyo tanto en información académica, de ensayo, así como conocimientos y fuentes personales que nos fueron de gran ayuda para la conclusión de este Proyecto y también a la M.C. Daysi Navez González, codirectora del presente proyecto, quien siempre se mantuvo atenta a los avances que se fueron generando y brindó excelentes sugerencias para la estructura de este escrito, así como puntos clave para su óptima redacción. A los M. C. Yolanda Ruíz Suárez y M. C. Pedro Sandoval Estrada por sus acertadas sugerencias para el gradual y constante mejoramiento del proyecto, tanto en los métodos que fueron aplicados, como en las interpretaciones resultados, así como en las sugerencias de literatura que hicieron posible complementar varias secciones del presente proyecto, decirles que personalmente me siento muy feliz y agradecida por sus aportaciones y colaboración.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Mariela Linares González y Ricardo Aguilar Sandoval, por su incomparable apoyo englobando todos los niveles desde que tengo uso de razón. Gracias por la confianza que depositan en mí y por todo el amor y compañía que siempre me han dado. Este proyecto y todo el crecimiento personal y profesional con el que cuento hasta el día de hoy es por y gracias a ustedes. Los amo, los admiro y les agradezco eternamente.

ÍNDICE

ÍNDICE	IV
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	28
1.3 HIPÓTESIS	29
1.4 OBJETIVOS	29
Objetivo general	29
Objetivos específicos	29
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	30
2.1 Ambiente Rizosférico	30
2.2 Interacción Planta-microorganismo.....	30
2.3 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.....	32
2.4 Bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal	33
2.5 <i>Kosakonia oryzae</i>	34
2.5.1 <i>Kosakonia</i> sp. como promotora de crecimiento vegetal	34
2.5.2 Producción de la enzima ACC deaminasa.....	35
2.5.3 Inoculación e influencia en la concentración de micro y macronutrientes	35
2.6 <i>Bacillus subtilis</i>	36
2.6.1 <i>Bacillus subtilis</i> como control biológico	36
2.6.2 Inducción de resistencia y promoción del crecimiento vegetal	37
2.6.3 Interacciones sinérgicas con la raíz vegetal	38
2.7 Proceso de colonización bacteriana en raíces.....	38
2.8 Bioproductos.....	39
CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS	41
3.1 Aislamiento de la bacteria <i>Bacillus</i> sp.....	41
3.2 Reidentificación de la bacteria <i>Bacillus</i> sp.....	41
3.4 Aislamiento <i>Kosakonia oryzae</i>	41
3.5 Identificación de <i>Kosakonia oryzae</i>	42
3.6 Tinción de Gram.....	42
3.7 Técnica para la prueba catalasa	43
3.8 Técnica para la prueba de la oxidasa	43
3.9 Antibiograma (detección de resistencia) y bioquímicas	44
3.10 Extracción de ADN para de <i>Bacillus</i> sp.	44
3.11 Extracción de ADN para <i>Kosakonia oryzae</i>	45
3.12 Caracterización molecular de los microorganismos aislados	46

3.15 Ensayos de Antagonismo.....	47
3.16 Ensayos de inoculación.	47
3.14 Cuantificación de Clorofila	48
3.15 Diseño experimental y análisis estadísticos	49
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1 Reidentificación del aislamiento de <i>Bacillus</i> sp.	50
4.2 Identificación de <i>Kosakonia oryzae</i>	51
4.5 Bioquímicas y antibiograma de <i>Kosakonia oryzae</i>	54
4.5 Identificación genética de los aislamientos	57
4.3 Ensayos de antagonismo.....	61
4.4 Ensayos de inoculación en plantas	62
CAPITULO V. CONCLUSIONES	67
CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68
CAPITULO VII. ANEXOS.....	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustración de los estriados en caja Petri para la elaboración de prueba de antagonismo. Azul rey representa a la bacteria 1 (●), mientras que el Azul claro representa a la bacteria 2 (●).....48
- Figura 2.** Fotografía de la morfología colonial de *Bacillus* sp. sembrada en Medio Agar-Nutritivo. Nótese los bordes ondulados y superficie rugosa, así como el aspecto mate y seco.51
- Figura 3.** Fotografías de *Bacillus* sp. en dos de las pruebas efectuadas. A) Tinción con resultado Gram positivo observado al microscopio óptico a 100X. B) Prueba de Catalasa positiva, nótese la efervescencia producida por *Bacillus* sp.....52
- Figura 4.** Visualización colonial con 48 horas de incubación en los medios LGIE, LGIA+glucosa, LGIA+sacarosa, LB y Agar nutritivo. Donde todos presentan una morfología colonial uniforme, con colonias circulares, elevación convexa; medios LGI con apariencia transparente y brillante mientras que los medios LB y Agar nutritivo dieron un aspecto cremoso. Nótese la producción de polisacáridos que *Kosakonia oryzae* genera en los medios LGIE y LGIA+glucosa respecto a LGIA+ sacarosa, LB y Agar nutritivo, donde, de forma contraria la separación colonial es evidente. Cajas con 48 horas de crecimiento.....53
- Figura 5.** Fotografía de *Kosakonia oryzae* observada al microscopio óptico a 100X. Obsérvese la coloración típica de bacteria Gram negativa.....54
- Figura 6.** Comparación en los medios LGIE, LGIA+glucosa y LGIA+sacarosa para la producción de ácido por parte de *Kosakonia oryzae*. Se observa el cambio gradual en la coloración respecto a la producción de ácido: 1) LGIP+sacarosa, coloración verde lo que indica baja de producción de ácido. 2) LGIE, con coloración amarillo pálido lo que indica producción de ácido. 3) LGIA+glucosa, con coloración amarilla más concentrada indicando una alta producción de ácido.....54
- Figura 7.** Análisis electroforético en agarosa al 0.8%. Amplificación por PCR con oligonucleótidos 16S-8f y 1492r. Carriles: 1, Marcador 1 Kb leader. 2-4 son amplificaciones de otras bacterias. 5, ADN del aislamiento de caña de azúcar. 6, ADN de *Bacillus* sp. 7. Control negativo de la reacción.....58
- Figura 8.** Secuencia del fragmento amplificado por PCR del gen 16S ribosomal de la bacteria *Bacillus* sp. Alineamiento en el software NCBI-BLAST de la secuencia amplificada con el oligonucleótido 16S8F en un rango de 760 pb con un 98% de identidad. Query es la bacteria *Bacillus* sp., de la base de datos de NCBI-BLAST y Sbjct es la bacteria aislada. Las líneas verticales representan identidad de las bases.....60

Figura 9. Secuencia del fragmento amplificado por PCR del gen 16S rRNA. Alineamiento en el software NCBI-BLAST de la secuencia amplificada con el oligonucleótido 16S8F en un rango de 1,026 pb con un 99% de identidad. Query es la bacteria *Kosakonia oryzae* de la base de datos de NCBI-BLAST y Sbjct es la bacteria aislada. Las líneas verticales representan identidad de las bases.....61

Figura 10. Fotografías del ensayo de antagonismo donde A representa *Kosakonia oryzae* y B a *Bacillus* sp. Obsérvese el desarrollo simultáneo de ambas bacterias y la ausencia de inhibición en el crecimiento. Crecimiento en cajas con Agar nutritivo después de una semana de incubación.63

Figura 11. Gráfica de las alturas totales de los cuerpos vegetales. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Nótese que los inóculos del bacilo y ambas bacterias se mantuvieron similares a diferencia del endófito que se mantuvo 10 unidades por debajo.....64

Figura 12. Gráfica del grosor del tallo. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Nótese que los resultados entre los inóculos y el testigo se mantuvieron similares

.....65

Figura 13. Gráfica del total de brotes. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Obsérvese que las plantas con el inóculo de ambas bacterias, tuvo una mayor producción frente a los inóculos individuales y testigo.65

Figura 14. Gráfica del total de frutos. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Nótese la diferencia entre *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae*, donde el primero tuvo una producción del doble, respecto al segundo. El inóculo con ambas bacterias se mantuvo similar al testigo.....66

Figura 15. Gráfica de las clorofilas A, B y Totales obtenidas de las hojas del cuerpo vegetal. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Nótese la diferencia en la producción de clorofila A del inóculo con ambas bacterias respecto al testigo que fue el doble de su producción. Mismo caso en la Clorofila B donde *Bacillus* sp. y testigo produjeron el doble que *Kosakonia oryzae* y bacterias en conjunto. La producción de clorofilas totales no mostró diferencias significativas de los inóculos respecto al testigo.....66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación de las actividades llevadas a cabo durante el Ensayo de Inoculación. Se menciona la actividad en relación la semana en que se dio inicio.....	49
Tabla 2. Pruebas realizadas a la bacteria <i>Bacillus</i> sp. junto a los resultados obtenidos....	52
Tabla 3. Síntesis de los resultados obtenidos a partir de las pruebas efectuadas a <i>Kosakonia oryzae</i> . Se muestra la prueba seguida se su resultado.....	55
Tabla 4. Resultados de las 47 pruebas realizadas a <i>Kosakonia oryzae</i> con la placa VITEK 2 AST-GN70. en la sección de anexos se encuentran los análisis que corresponden a cada abreviatura.....	56
Tabla 5. Resultados de las bioquímicas efectuadas a la bacteria <i>Kosakonia oryzae</i> con la placa VITEK 2 AST-GN70.....	57
Tabla 6. Resultados de <i>Kosakonia oryzae</i> a través del antibiograma llevado a cabo con equipo automatizado VITEK® 2 y kit VITEK 2 GN.	58

Resumen

Se sabe que la agricultura está posicionada como una de las actividades más importantes y practicadas del país, sin embargo, no es secreto que en la actualidad se está presentando una contaminación y desequilibrio ecológico en los suelos debido al uso constante e indiscriminado de los agroquímicos convencionales. En el presente proyecto se analizó el aislamiento de dos bacterias de género distinto que forman parte del grupo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) con las cuales sea posible que, al inocularlas en las plantas, estas promuevan su crecimiento, protección a los distintos tipos de estrés biótico y abiótico, así como su desarrollo. Para esto se llevaron a cabo distintas pruebas básicas bioquímicas para su primera identificación, así como su consecuente extracción de ADN para cada una, PCR's, electroforesis, uso de kits de purificación de ADN y secuenciación para su identificación molecular. Dando como resultados la obtención de las bacterias *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae* (basonym: *Enterobacter* sp.); las cuales se inocularon por un periodo de 10 semanas en plantas de jitomate variedad Rio Grande, y se obtuvieron los siguientes resultados: dentro de las variables de altura, grosor, brotes y número de frutos no se presentaron diferencias significativas, sin embargo no fue así en la producción de clorofila dado que las plantas que fueron inoculadas con ambas bacterias presentaron mayor producción en Clorofila A y Totales. Así pues, es posible posicionarlas como candidatas para su uso práctico dentro de los cultivos de la región y de este modo eficientizar la producción de clorofila en la planta y, por ende, junto con ello, el desarrollo general de la planta.

Palabras clave: Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, Clorofila A, Proceso Fotosintético, Kosakonia

ABSTRACT

“EFFECT OF THE INOCULATION OF *Bacillus* sp., AND *Kosakonia oryzae* (BASYNYM: *Enterobacter* sp.) IN THE TOMATO CROP TO PROMOTE PLANT GROWTH”

It is known that agriculture is positioned as one of the most important and practiced activities in the country, however, it is no secret that pollution and ecological imbalance are currently occurring in the soil due to the constant and indiscriminate use of conventional agrochemicals. In the present project, the isolation of two bacteria of different genera that are part of the group of plant growth promoting bacteria (PGPB) with which it is possible that, when inoculated into plants, they promote their growth, protection to the different types of biotic and abiotic stress, as well as their development. For this, different basic biochemical tests were carried out for their first identification, as well as their consequent DNA extraction for each one, PCR's, electrophoresis, and the use of DNA purification kits for their molecular identification. Resulting in the obtaining of the bacteria *Bacillus* sp., and *Kosakonia oryzae* (basonym: *Enterobacter* sp.); These were inoculated for a period of 10 weeks in Rio Grande variety tomato plants, from which the following results were obtained: within the variables of height, thickness and number of fruits there were no significant differences, however it was not so in the production of chlorophyll since the plants that were inoculated with both bacteria had higher production in Chlorophyll A and Totals. Thus, it is possible to position them as candidates for their practical use within the crops of the region and thus make the production of chlorophyll in the plant more efficient, which improves the production of carbon sources and along with it, the general development of the plant.

Keywords:* Plant Growth Promoting Bacteria, Chlorophyll A, Photosynthetic Process, *Kosakonia

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las actividades más importantes y antiguas practicadas por el ser humano. Los cultivos resultan ser la base de alimento en la población y actualmente también cuenta con un lugar importante en la economía mundial. Sin embargo, la creciente demanda de la población requiere un aumento en la producción de alimentos y, por tanto, en la utilización de fertilizantes y productos químicos sintéticos para el control plagas y enfermedades que puedan llegar a presentarse; los cuales, benefician al cultivo y también favorecen la obtención de mayor masa y eficiencia de producción. El problema del uso de este tipo de productos químicos para la producción agrícola deriva en los subproductos que quedan de éstos una vez aplicados al suelo o la planta, los cuales con su continua y constante acumulación comienzan a generar desequilibrios ecológicos, tanto en el suelo como en la propia planta. Es por esto por lo que actualmente la búsqueda de nuevas alternativas se ha vuelto enfoque de estudio. Actualmente existe gran variedad de bioproductos los cuales son elaborados a base de microorganismos, ya sea a partir de sus exudados, toxinas, proteínas, partes de estos o hasta el microorganismo propio. Estos cuentan con la capacidad de lograr resultados cercanos a los propios productos químicos y suelen utilizarse en conjunto para aminorar el consumo de productos sintéticos y al mismo tiempo mejorar la producción y estado del suelo que se cultiva.

Microorganismos como las bacterias propias del suelo, han demostrado un desempeño benéfico una vez que se encuentran en contacto con la planta. Son llamadas Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) y consiste en una gama de bacterias de distintas especies con la capacidad de interactuar y comunicarse de manera simbiótica con la planta, de modo que ambas partes son capaces de beneficiarse una de la otra al momento que se lleva a cabo una interacción. Cada una de ellas cuenta con su respectivo modo de acción, colonización y comunicación con la planta. Actualmente se sabe que este grupo de bacterias también son capaces de aportar en el área de la biorremediación; esto gracias a que una vez que los microorganismos son inoculados, demuestran ser un gran apoyo en la germinación y sobrevivencia de su hospedero ya que estimula su rápido crecimiento, generan mayor acumulación de masa radicular y son excelentes determinantes en el equilibrio de la producción de etileno de la planta gracias a su capacidad de consumo del ácido amino-

ciclopropano carboxílico (ACC) el cual es precursor inmediato de etileno (debido a su síntesis de ACC deaminasa), entre otros beneficios más (Guo *et al.*, 2004; Hall, 2002).

Bacillus sp. y *Kosakonia oryzae* son bacterias que se encuentran dentro del grupo de promotoras; la primera es facultativa ya que es capaz de vivir tanto fuera como dentro de la planta (Moreno Reséndez *et al.*, 2018) mientras que la segunda es un endófito obligado por su necesidad de permanecer dentro de su hospedero (Gaiero *et al.*, 2013); ambas cuentan con la capacidad de llevar a cabo una quimiotaxis específica con la planta de la cual deriva la producción de metabolitos, hormonas, bacteriocinas y un conjunto de procesos más, de los cuales resultan de gran beneficio para la planta. Por lo tanto el presente proyecto busca encontrar alternativas eficaces, de las cuales puedan obtenerse resultados factibles y funcionales, de este modo se aminora el uso de productos convencionales y se hace uso de una alternativa libre de residuos y específica a la demanda de la planta.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación y desequilibrio ecológico de los suelos es uno de los problemas que mayor repercusión tienen en la producción agrícola. Este problema se ha ido generando por el constante y excesivo uso de agroquímicos que tienen como objetivo el aumento en la producción de los cultivos. Sin embargo, a largo plazo dan como resultado más daño y desgaste que el beneficio que se obtuvo a corto plazo.

Es aquí cuando surge la búsqueda de alternativas biológicas que sean capaces de acercarse a la efectividad de los productos sintéticos, teniendo la garantía que se evitarán daños secundarios, gracias a la naturaleza de su origen. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son un grupo de microorganismos capaces de producir una serie de moléculas que benefician en gran medida a la nutrición y crecimiento de la planta. Sin embargo, cabe mencionar que no todas tienen los mismos efectos sobre todas las plantas, y es por esto por lo que comienzan a surgir ciertos cuestionamientos por parte de los usuarios, acerca de si realmente están haciendo su trabajo promotor y nutricional o, dicho de otra forma, si funcionan o no estos microorganismos.

Especies de los géneros *Bacillus* sp., y *Kosakonia* sp., son bacterias promotoras de crecimiento vegetal, por lo que se busca aislar cada una de ellas en plantaciones dentro de la región de Los Reyes, Mich. Para eventualmente evaluar su interacción bacteria- bacteria y posteriormente su aportación benéfica a los cultivos de la región.

Dando lugar a nuevas alternativas para el tratamiento y nutrición agrícola, sin la repercusión de posibles residuos secundarios que dañen o desequilibren el área de cultivo y al mismo tiempo garantizando su efectividad de acuerdo con los resultados que se obtengan en la interacción planta-bacteria.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El presente proyecto busca implementar el uso de productos biológicos aplicables al campo agrícola, esto con el fin de encontrar alternativas biológicas eficientes que logren promover el crecimiento y nutrición de los cultivos con bacterias nativas de la región de Los Reyes Michoacán. Actualmente, la calidad de los suelos cultivables va en caída por la gran cantidad de químicos que se han implementado para acrecentar la eficiencia del cultivo y en este punto es importante aceptar que la solución no es dejar de aplicarlos, ya que a estas alturas resultaría casi imposible. Lo que sí sería factible, y actualmente se está llevando a cabo, es la búsqueda de alternativas que logren resultados parecidos a los productos convencionales sin los notables impactos negativos y excesivos junto al consiguiente desequilibrio ecológico provocado por estos al momento y después de su aplicación. El hecho de aislar las bacterias de *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae*, así como que se haga dentro de la región de Los Reyes, puede llegar a generar un impacto benéfico para la producción de la región, ya que una vez que se lleve a nivel práctico no habrá porqué preocuparse de desequilibrios ecológicos, contaminación o la temida introducción de nuevas especies, dado que éstas ya pertenecían a la microecología del suelo, o dicho de otro modo, nativas de la región. Esto lleva a una nueva alternativa para el mercado y consumidor; los beneficios de hacer uso de productos biológicos para la promoción y protección del cultivo son innumerables, y conforme avanza la investigación se siguen encontrando cada vez más. Por último, es necesario recordar que estos bioproductos no generan bioacumulación ni residuos secundarios y por lo tanto, el riesgo que compete para el ser humano y el suelo es mínimo. Por lo tanto, se espera que el presente proyecto sea de gran apoyo tanto en el campo académico: para complementar otros o nuevos proyectos del área de investigación; como a nivel económico, dado que servirá de impulso para la elaboración de nuevos productos e ideas para implementar en el campo.

1.3 HIPÓTESIS

Las bacterias de los géneros *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae*, aisladas de los suelos de la región de Los Reyes son una fuente de bacterias nativas promotoras del crecimiento vegetal.

1.4 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae* en planta de jitomate variedad Río Grande como promotoras de crecimiento vegetal.

Objetivos específicos

1. Reidentificar la bacteria del género *Bacillus* sp., aislada en el suelo de región de Los Reyes.
2. Aislar a *Kosakonia oryzae* en tejido de la caña de azúcar de la región de Los Reyes.
3. Analizar la interacción entre *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae* para identificar efectos sinérgicos o antagónicos entre ambas.
4. Realizar ensayos de inoculación en plantas de jitomate variedad Río Grande.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Ambiente Rizosférico

Dentro del suelo se encuentra un sistema que es sumamente complejo, lleno de interacciones tanto químicas, físicas y biológicas conocido como el sistema radical (Goudaa *et al.*, 2017). Ahí, existe una gran variedad de microorganismos, muchos de los cuales forman parte de un grupo complejo que utiliza gran cantidad nutrientes que son liberados por la planta: los llamados rizodepósitos; los cuales pueden estar compuestos por exudados, mucílagos o células fronterizas de la planta. Esta es la razón por la que se dice que los organismos vegetales son capaces de modular el microbioma de la rizósfera mediante la estimulación de organismos o microorganismos que beneficien tanto su nutrición como su desarrollo. Cabe mencionar que existen tres diferentes grupos de microorganismos dentro de la rizósfera, los cuales son clasificados en: benéficos, fitopatógenos y patógenos de humanos (Mendes *et al.*, 2013). De aquí deriva la importancia para el ser humano de contar con suelos cultivables sanos, ya que estos patógenos fácilmente pueden entrar a la raíz, hoja o fruto que es consumido por el hombre y, por lo tanto, correr el riesgo de enfermarse. Por esto es indispensable el mantener un suelo cultivable sano; que no solo es benéfico para la óptima producción y crecimiento vegetal, sino que también beneficia a los seres humanos, mejorando su calidad de vida, alimentación, salud, desarrollo y economía.

2.2 Interacción Planta-microorganismo

Las plantas son la principal fuente de carbono en el suelo, lo que las convierte en uno de los principales determinantes del microbioma rizosférico y del suelo, dicho esto, no sería extraño pensar que en la propia planta recae el cómo se mantenga la ecología de suelo (Bakker *et al.*, 2013). Ella, como todo ser vivo, constantemente se encuentra en actividad, por lo tanto, genera exudados que se encargan de atraer a ciertos tipos de bacterias benéficas que se encuentran en el suelo, siendo más puntual, en el área de la rizósfera. Esta atracción e interacción resulta del constante intercambio de beneficios tanto por parte de la planta como de la bacteria u otros microorganismos. Ya que la bacteria puede nutrirse de las moléculas o sustancias que excreta la planta y por otro lado la planta adquiere nutrición y protección por

parte de la bacteria contra patógenos oportunistas que puedan dañarla; esto es posible ya sea de forma directa, con las mismas secreciones de la bacteria; como indirecta: cuando esta genera competencia y/o una especie de barrera que hace que no logre entrar ningún tipo de microorganismo externo (Goudaa *et al.*, 2017). Dentro de este grupo, se encuentra una alta gama de microorganismos, principalmente bacterias, hongos y algunos protozoarios que tienden a generar interrelaciones benéficas junto a la raíz de las plantas, como pueden ser los fijadores de Nitrógeno, solubilizadores de fósforo y demás nutrientes, así como degradadores de materia orgánica o los que son promotores de resistencia a los distintos tipos de estrés. Sin embargo, dentro de este mismo ecosistema también se pueden presentar las interrelaciones negativas causadas por los patógenos y los competidores de nutrientes (Vivanco, 2011).

Las plantas, ante esto, tienen la capacidad de, a partir de diversos genes codificantes, generar moléculas exógenas pequeñas llamados inductores, los cuales forman parte de los mecanismos de autodefensa, ya sea disminuyendo o impidiendo el ataque de dichos microorganismos. Así es como se da la resistencia sistémica en su estado fisiológico. Este mecanismo de defensa inducido implica dos fenómenos: la resistencia sistémica inducida (RSI) y la resistencia sistémica adquirida (RSA). La primera se encuentra asociada con las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, las cuales, son las que protegen a la planta con sus distintas formas de acción (directa e indirecta), mientras que la segunda se asocia a las respuestas vegetales que resultan ante la presencia o contacto con los patógenos. Cabe destacar que ésta presenta cuatro características muy peculiares como son: 1) su efectividad contra una amplia gama de microorganismos (dependiendo la especie vegetal tratada), 2) suele continuar durante un largo plazo, 3) se dispersa a través de toda la planta, de forma apical en general, y, por último 4) son capaces de moverse hacia las yemas injertadas (en caso de que se cuente con ellas) (Moreno Reséndez *et al.*, 2018). Sin embargo, y en desventaja con la primera, es muy probable que al primer ataque del patógeno o patógenos, la planta sufra alguna lesión necrótica y por tanto muerte celular por la interacción incompatible que resulta con éste, situación que será muy poco probable en el caso de la RSI, ya que las bacterias detectarían y actuarían en contra del invasor, de forma anticipada, sin embargo, ambas respuestas muestran gran importancia y resultan necesarias para el buen crecimiento y desarrollo de la planta lo que resulta más conveniente contar con la presencia de ambas.

2.3 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son los microorganismos que habitan el suelo y que brindan un beneficio al desarrollo la planta, su término fue acuñado por Kloepper y Schroth en 1978. Estas a su vez tienen la capacidad de colonizar el área de la rizósfera y representan entre el 2 % y 5 % del total de las bacterias rizosféricas; también cuentan con distintos mecanismos tanto de colonización, como de acción benéfica vegetal (Moreno-Reséndez et al., 2018).

Estas bacterias tienen la capacidad de producir ácido indolacético y citoquininas, las cuales son fitohormonas que aceleran y potencializan el crecimiento vegetal, así como enzimas que logran solubilizar los fosfatos y factores que ayudan a la absorción de oligoelementos (Vivanco, 2011). También logran influir en el crecimiento de la planta ya sea mediante fitoestimulación, la cual consiste en la síntesis de moléculas como: 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, la cual ayuda a la planta a reducir el estrés abiótico ya que logra equilibrar la producción del nivel de etileno de la planta; debido a que sus niveles elevados pueden inhibir la división celular, síntesis de ADN y por lo tanto crecimiento de raíces y/o brotes (Kpombrekou-A et al., 2003). Por otro lado, también está la producción de hormonas como es el indol-3-acético (IAA) que actúa como promotor de la biomasa vegetal, ya sea de forma directa o indirecta (Chen *et al.*, 2017). Estos actúan como mensajeros químicos que influyen en la capacidad de la planta para reaccionar al entorno, regulan la expresión de genes que sintetizan las diferentes estructuras de la planta y también suelen ser parte de las vías de represión catabólica y la regulación de formación de biopelículas (Moreno-Reséndez et al., 2018). Otra forma mediante la cual pueden actuar son como biofertilizantes, lo cual se lleva a cabo gracias a que varias bacterias tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, aumentar la disponibilidad del fósforo mediante su solubilización, así como disminuir el peso molecular de los ácidos que permiten la quelación de otros elementos necesarios para el nutrimento de la planta (Kpombrekou-A et al., 2003). Por último y no menos importante, como biocontrol. Este cuenta con la producción de sideróforos, los cuales consisten en moléculas pequeñas que se producen frente a condiciones limitantes de Fe^{+2} que incrementan su entrada a la célula. Este proceso suele llevarse a cabo una vez que se secuestró el Fe^{+2} del medio, el complejo sideróforo- Fe es reconocido por receptores de la membrana (mediante interacciones específicas), que le permiten entrar a la

célula, posteriormente se dirige a un sitio específico mediante un proceso que involucra el intercambio de ligandos seguido o no por la reducción del Fe^{+2} o la misma hidrólisis del sideróforo. Esto resulta como una gran ventaja para el microorganismo en comparación a sus competidores ya que es una forma fácil y ventajosa de adquirir el Fe^{+2} del medio en que se encuentran (Moreno Reséndez et al., 2018). La pioquelina, así como el ácido salicílico son ejemplos de los principales sideróforos que producen estas bacterias para competir contra los patógenos; así como metabolitos antimicrobianos como el 2,4-diacetilfloroglucinol, el cual mejora la supresión de enfermedades en la planta (Duffy et al., 1999).

También está la producción de antibióticos, lo cual es uno de los mecanismos más importantes y conocidos para limitar e inhibir el crecimiento de los patógenos. Este proceso consiste en la inhibición del desarrollo del microorganismo a partir de la producción de metabolitos secundarios o moléculas de amplio espectro. Entre los mecanismos de acción que suelen tener estos metabolitos están: la inhibición de síntesis de la pared celular, la desestabilización de la membrana celular, así como la inhibición de la formación del complejo de iniciación de traducción del patógeno. Sin olvidar que la producción de enzimas líticas, que tienen la capacidad de degradar la pared de ciertos microorganismos gracias a la producción de enzimas hidrolíticas como β -glucanasas, celulasas, deshidrogenasas, endo y exo poligalacturonasas, fosfatasas, hidrolasas, lipasas, pectinoliasas, proteasas y quinasas que actúan con mayor eficacia en organismos como los hongos (Moreno-Reséndez et al., 2018). Por último, está la producción de compuestos volátiles, los cuales cuentan con la capacidad de propagarse a larga distancia y crear un ambiente bacteriostático alrededor de las comunidades antagónicas; como ejemplo está el cianuro de hidrógeno, el cual es uno de los compuestos más importantes y conocidos en la agroindustria.

2.4 Bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias endófitas son un grupo de microorganismos que se encuentran dentro de la planta sin causar el menor daño a su hospedero. Estudios recientes las definen como un conjunto de genomas que interactúan constantemente con el de la propia planta, siendo un apoyo para la expresión de genes según sea requerido, gracias a que prácticamente se consideran parte del microbioma de la planta. Éstas a su vez se dividen en tres categorías de

acuerdo con sus estrategias de vida como son: los obligados, los cuales no pueden sobrevivir fuera de la planta; los facultativos, que entran a ella en cuanto surge la oportunidad (grupo donde se encuentra el mayor número de promotores de crecimiento); y por último, los pasivos, que no colonizan el interior de la planta a menos que ocurra alguna herida (Gaiero et al., 2013).

A continuación, se presentan las bacterias diana del proyecto, *Kosakonia oryzae* que forma parte de la categoría de obligados y *Bacillus* sp., que se encuentra en los facultativos, ambas promotoras de crecimiento vegetal, con sus distintas características y mecanismos de acción.

2.5 *Kosakonia oryzae*

Anteriormente clasificada filogenéticamente dentro del género *Enterobacter*, ahora considerada un nuevo género dentro del complejo Enterobacteria, el cual es un grupo grande y diverso conformado por bacilos. *Kosakonia* sp. se encuentra en el dominio Bacteria, Phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Enterobacteriales (Inoue et al., 2000). Se trata de una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, quimio-organotrófica y no formadora de esporas. Sus células son varillas rectas y cuentan con flagelos peritricos; su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 28°C y los 30°C, no obstante, también logran crecer a los 40°C. Sus colonias son de color blanco a beige, redondas, convexas y con márgenes lisos (Peng et al., 2009). El nitrato lo reduce a nitrito y fermenta la glucosa con producción de ácido y gas (Kämpfer et al., 2005).

2.5.1 *Kosakonia* sp. como promotora de crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) cuentan con ciertos rasgos como son producción de sideróforos, ácido indol acético (IAA), 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, solubilidad de fosfatos, fijación de nitrógenos, entre otras características que promuevan el crecimiento vegetal. Para el género *Kosakonia* no se han llevado a cabo muchos estudios en su relación con las plantas, sin embargo, se tiene evidencia de especies que se han aislado y detectado en la rizósfera de las plantas, principalmente en maíz y trigo; junto con ensayos que demuestran que cuentan con capacidades y rasgos propios de grupo de BPCV, lo cual hace posicionarlas dentro de este

grupo, especialmente por su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. La especie de *K. oryzae* ha demostrado una buena producción de la enzima ACC deaminasa así como la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico para su hospedero. (Schlemper et al., 2018).

2.5.2 Producción de la enzima ACC deaminasa

Es sabido que la hormona vegetal etileno juega un papel importante en la práctica agrícola dado que su aumento como respuesta a algún trauma infligido por productos químicos, daños por insectos, enfermedades, heridas mecánicas, entre otras, este se convierte en un inductor de defensa para la supervivencia de la planta a tales condiciones adversas (Abeles, 1973). La regulación de su producción incluye varios factores como la temperatura, luz y otras hormonas vegetales (Deikman, 1997). La enzima ACC deaminasa, con la cual cuentan algunas bacterias del grupo BPCV, consiste en una enzima que puede escindir el precursor del etileno ACC de la planta y por lo tanto reducir su nivel cuando la planta se encuentra en desarrollo o momentos de estrés. Esto lo hace catalizando la escisión de ACC lo cual incluye la fragmentación del anillo ciclopropano y la desaminación de ACC para formar a acetobutirato y amoniaco (Ose et al., 2009). Por último, mencionar que la ACC desaminasa no es una enzima secretada, sino que se encuentra dentro del citoplasma del microorganismo que lo produce (Bernard, 2005).

2.5.3 Inoculación e influencia en la concentración de micro y macronutrientes

En un estudio hecho por Leite y colaboradores (2021), en el cual se hizo uso de la ingeniería de microbiomas radiculares; probaron los efectos de seis cepas bacterianas aisladas de tallos de la caña de azúcar, entre ellas *K. oryzae*, donde demostraron que, una vez inoculadas sin ningún tipo de aporte de N, estas aumentaron brote y masa seca de la raíz e influyeron en la concentración y acumulación de importantes micro y macronutrientes. Sin embargo, el aporte de nitrógeno redujo el impacto de la inoculación, la codependencia entre los microbios del suelo, la biomasa y los nutrientes de la caña de azúcar. Por lo tanto, es innegable la contribución que tienen estos microorganismos en la eficiencia de la toma de nutrientes de la planta, así como su factibilidad de intensificar la productividad del cultivo y a la par, la disminución de la fertilización. De este modo se demuestra que la fertilización reducida no

solo es deseable sino también esencial para un mayor impacto en el microbioma, en este caso, de la caña de azúcar.

2.6 Bacillus subtilis

Bacteria Gram positiva reconocida como una de las más renombradas especies microbianas que producen sustancias benéficas para la planta y compuestos de interés a nivel industrial. Consiste en uno de los géneros de bacterias promotoras con mayor predominancia en el suelo rizosférico. Tiene la capacidad de producir esporas, las cuales las benefician en gran medida al encontrarse en ambientes agresivos, lo cual les permite su posterior germinación una vez que las condiciones se vuelven favorables. Estas esporas también les confieren capacidad de almacenamiento a largo plazo, lo que las vuelve convenientes y eficiente para la elaboración de productos biológicos en la industria.

También, suele llevar a cabo la formación biopelículas muy finas en las raíces jóvenes del cuerpo vegetal lo que les permite una colonización rápida y eficaz; estas estructuras consisten en toda una comunidad de bacterias cubiertas por una matriz que es autosecretada y, una vez formada en la raíz, la planta comienza a volverse dependiente de los genes que se mantienen en contacto desde un inicio con ella. Sin embargo, para que todo este proceso se lleve a cabo de forma esperada, es necesario una quimiotaxis específica, la cual se logra mediante la presencia de varios genes quimiorreceptores (establecen una conexión beneficiosa y estable entre la planta y la bacteria) que ambas partes poseen y que, junto a otros genes, regulan tanto la diferenciación celular como la relación mutua con otros organismos vivos. Otros estudios demuestran que estas señales suelen activarse de 4 a 8 h una vez inoculada la planta y que los exudados por parte de la planta juegan un papel crucial para el acercamiento de *B. subtilis* (Hashem et al., 2019). Recordando también que esta bacteria puede producir metabolitos antimicrobianos que pueden servir de complemento para los bioplaguicidas y biofertilizantes, en el control y tratamiento de los cultivos.

2.6.1 Bacillus subtilis como control biológico

B. subtilis cuenta con la capacidad de producir enzimas que son hidrolíticas tales como celulasas, proteasas y β -glucanasas. Ahora, es importante que para que esta bacteria genere los resultados esperados de su actividad biológica se tomen en cuenta 3 factores importantes:

1) que el anfitrión presente vulnerabilidad, 2) virulencia patogénica y 3) las características del entorno al que se expone (Mendes et al., 2013).

Otro tipo de enzimas producidas por estos microorganismos son las que cuentan con la capacidad de degradar la pared celular y los metabolitos antibióticos que limitan el crecimiento de otros organismos. Por ejemplo, la síntesis de lipopéptidos (compuestos de bajo peso molecular con características anfífilas) que son antibióticos como la fengicina, iturina y surfactina; estos compuestos son capaces de brindarle protección a la planta ya sea en condiciones previas o posteriores a la cosecha gracias a que suprimen de forma directa a los patógenos o también por la de resistencia sistémica inducida que estos generan a las plantas. Estudios sugieren el compuesto iturina A, es el encargado de controlar a *Fusarium oxysporum* y *Rosellinia necatrix*, gracias a su actividad antifúngica. Sin embargo, también existen moléculas de antibióticos no peptídicos que suelen clasificarse como peptídicos ribosómicos y no ribosómicos, sin embargo, no son tan comunes en la producción de estas bacterias.

2.6.2 Inducción de resistencia y promoción del crecimiento vegetal

La activación de resistencia sistemática inducida por *B. subtilis* es conocida por inducir la síntesis de ácido jasmónico (AJ), etileno y el gen regulador *npr1* en plantas; respuestas que son activadas aun cuando el patógeno se encuentra a una distancia considerable del cuerpo vegetal. Esta activación es asociada con la degradación de la pared celular junto con la producción de proteínas glucanasas y quinasas, así como la síntesis de fitoalexinas ligadas a la resistencia de enfermedades.

De acuerdo con distintos estudios se documenta que la aplicación de *B. subtilis* puede actuar de forma distinta de acuerdo con el organismo vegetal al que se exponga.

Algunos ejemplos son:

- En hojas de arroz, genera aumento en la producción de hospedadores de fenilalanina amonialasa, peroxidasa y de síntesis de proteína novo.
- Inducción de secreciones de respuesta relacionadas con ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ) en melones.
- Mejora en la síntesis de enzimas y proteínas PR en el tabaco, confiriendo resistencia al virus del mosaico.

- Reducción de la actividad de nemátodos en plantas de tomate.
- Y, por último, ha demostrado ser gran productor de enzimas como la peroxidasa, polifenol oxidasa y superóxido dismutasa, así como varias hormonas que ayudan con el tratamiento del tizón tardío en tomate (Lakshman et al., 2015).

Por lo tanto, *B. subtilis* es clasificado como uno de los mayores activadores de IRS en una amplia variedad de plantas gracias a sus mecanismos de síntesis de producción de sustancias antimicrobianas y de promoción, así como confiriendo resistencia a distintos tipos de estrés ya sean de naturaleza biótica o abiótica, dejando a esta bacteria como punto blanco en la utilización de productos de biocontrol.

2.6.3 Interacciones sinérgicas con la raíz vegetal

El primer resultado entre la interacción de la bacteria con la raíz del cuerpo vegetal da como resultado el nódulo; esto debido a un intercambio específico de señales celulares. Sin embargo, si se tuviera el caso de que la raíz de la planta ya cuente con un número importante de rizobios, puede dar como resultado una menor nodulación.

Se ha informado que *B. subtilis* se involucra directamente con la solubilización del fósforo, así como exhibir sinergismo con hongos arbusculares; también, es capaz de mostrar un efecto positivo en la nodulación de la raíz, una vez inoculada con otras especies como son *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*. Mencionando, de igual manera, su gran capacidad de sintetizar hormonas como AJ, GA3 y IAA propias del crecimiento vegetal (Bloemberg et al., 2001).

Estudios sugieren que la aplicación de *B. subtilis*, en conjunto con hongos micorrícicos arbusculares, dan como resultado un efecto positivo en el crecimiento de la planta; esto debido al aumento en la producción de enzimas, antioxidantes y la nodulación de la raíz.

2.7 Proceso de colonización bacteriana en raíces

Un factor clave e inherente para un tratamiento eficiente es la capacidad de colonización. Ahora, es importante mencionar algunos de los elementos fundamentales que se requieren para que esta se lleve a cabo correctamente una vez que los microorganismos bacterianos son inoculados. El primero, consiste en la sobrevivencia seguido de su posterior crecimiento en

la espermósfera, luego deben llevarse a la tarea de fijarse en la superficie de las raíces primeras y posteriormente la colonización de todo el sistema radicular.

Esta colonización de la raíz, la cual es llevada por los microorganismos endófitos, consta de 4 etapas: 1) atracción, 2) reconocimiento, 3) adhesión y 4) invasión. Hay que tomar en cuenta que cada una de estas etapas está constantemente predispuesta a verse afectada tanto por los factores bióticos como abióticos y que siempre será necesario aplicar la mejor técnica de inoculación dependiendo el microorganismo, tipo de suelo y planta a la que se quiere tratar (Moreno Reséndez et al., 2018).

2.8 Bioproductos

Los biofertilizantes consisten en aquellos productos que cuentan con microorganismos vivos con la capacidad de colonizar la rizósfera y posteriormente el interior de la planta, dependiendo el microorganismo utilizado. Esto se logra a través de la correcta inoculación de estos, y así puedan mantenerse en simbiosis con las plantas, ayudándoles en su nutrición y protección (Moreno-Reséndez et al., 2018). Una diferencia importante entre los fertilizantes sintéticos u orgánicos, en comparación con los biológicos, es que con estos últimos no suministran ningún tipo de elemento directamente al cultivo, sino que el mismo microorganismo va actuando conforme se va dando la comunicación con la planta.

A continuación, se mencionan algunas de las ventajas y desventajas sobre el uso de los biofertilizantes (Mishra et al., 2014).

Ventajas:

- Los elementos nutritivos suministrados son balanceados y por tanto mantienen la salud de la planta.
- Incrementan la actividad biológica de suelo, dando como resultado el mejoramiento de la movilización de elementos nutritivos y descomposición de sustancias tóxicas.
- Favorece el crecimiento radicular (estructura del suelo).
- La capacidad de intercambio catiónico mejora, así como la retención de humedad, formación de agregados y amortiguan los cambios ya sea de acidez, alcalinidad, salinidad, pesticidas o metales pesados tóxicos gracias al aumento del contenido de materia orgánica (MO).

- Baja la disponibilidad de parásitos y enfermedades derivadas por organismos nativos del suelo y favorecen el crecimiento de macro y microorganismos benéficos del suelo.

Desventajas:

- Es necesario emplear grandes volúmenes, ya que, al presentar bajo contenido de elementos nutritivos, se tiene que cubrir la demanda del cultivo.
- La velocidad en que liberan los compuestos nutritivos suele ser lenta, por lo que da la posibilidad de enfrentar una deficiencia nutritiva.
- Es posible que no haya suficiente cantidad de macroelementos primarios y por lo tanto no se de soporte al máximo crecimiento del cultivo.

Es importante estar al tanto de estas ventajas y desventajas que se pueden presentar una vez que se hace uso de este tipo de bioproductos, no como una limitante, sino como una oportunidad de mejorar la investigación, la elaboración y mercado, así como las técnicas de aplicación de este tipo de productos.

También es necesario tomar en cuenta que la principal eficacia del biocontrol microbiano (o antagonismo) deriva de su capacidad de colonización de nichos ecológicos ya ocupados por patógenos, la cuales, generalmente, utilizan su flagelo u otros apéndices para moverse por el ambiente; también existen otro tipo de bacterias aeróbicas las cuales cuentan con la ventaja de producción de esporas que les permiten resistir condiciones ambientales adversas (Grobelaka et al., 2018). Cabe resaltar que es necesario considerar el biocontrol como un comportamiento enteramente dependiente de las condiciones que predominan en el espacio inoculado y no como una actividad ya definida de la cepa bacteriana. Actualmente, gracias al desarrollo de algunas de las técnicas moleculares, se han logrado construir herramientas de reconocimiento genético para el estudio y análisis del comportamiento de las bacterias en el suelo dentro de su comunidad bacteriana (Moreno Reséndez et al., 2018).

Hoy en día, es necesario que las nuevas tecnologías se lleven a la tarea de enfocarse en el mantenimiento y la sostenibilidad del sistema de producción mediante el uso racional de los recursos naturales y la aplicación de medidas pertinentes. Así es como la inoculación y el manejo de microorganismos se sugiere como práctica innovadora y prometedora en la actividad

CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Aislamiento de la bacteria *Bacillus* sp.

La bacteria de *Bacillus* sp. fue aislada por la residente Julissa Guadalupe Pimentel Ramos durante sus residencias de la Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable en el periodo de febrero- agosto del 2021. El bacilo aislado fue originario del suelo de una huerta orgánica de aguacate ‘Hass’, con una superficie de 2.5 ha, ubicada en la carretera Peribán-Uruapan en la localidad de Peribán de Ramos Michoacán con clima predominante es semicálido, subhúmedo con lluvias, con una temperatura media anual de 20 °C, la máxima promedio es de 34.8 °C y la mínima promedio de 17.1 °C; una latitud de 19.5216° y una longitud de -102.41719°, 31°18′Norte, 102°25′1″ Oeste. El método utilizado para la extracción del *Bacillus* del suelo fue el reportado por Chak y colaboradores (1994).

3.2 Reidentificación de la bacteria *Bacillus* sp.

Se ejecutaron las pruebas Tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa. La identificación molecular se llevó a cabo mediante la extracción del ADN 16S ribosomal PCR punto final y secuenciación.

3.4 Aislamiento *Kosakonia oryzae*

Se hizo la cosecha de 5 plantas de caña de azúcar de la variedad MEXICANA ITV 92-1424, con una edad de 5 meses en la ubicación de San Gerónimo, ejido San Sebastián, municipio de Los Reyes de Salgado, Michoacán. Estas fueron llevadas a laboratorio ese mismo día y fueron utilizados 10 cm de hoja, 5 cm de raíz y 1 cm de tallo de cada una de las 5 muestras. Teniendo en total una sola muestra para cada parte vegetal.

El procesamiento de extracción de endófitos se llevó a cabo tal como señala Cavalcante (1988) en su método de aislamiento para *Gluconacetobacter*; exceptuando el uso de jugo de la caña de azúcar. En el cual se hizo uso de las tres partes de la planta (hojas, tallo y raíz) cada una por separado.

Estas fueron lavadas con agua de grifo y después maceradas en licuadora para después inocularlas en dos medios distintos como fueron:

1. Medio LGI sólido con un pH de 6.0. (K_2HPO_4 , 0,2 g; KH_2PO_4 , 0,6 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,002 g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,01 g; solución de azul de bromotimol al 0,5 % en KOH 0,2 N, 5 ml, agar, 15 g; azúcar de caña cristalizada, 100 g; por litro).
2. Medio LGI sólido (medio 1), agregando 0,02 g de extracto de levadura y 15 g de agar. El agar se preparó de acuerdo con Döbereiner (1980) pero omitiendo el malato y aumentando la concentración de azúcar a 100 g por l.

Para la selección de las colonias positivas se tomó en cuenta la coloración que presentaron; las que fueron amarillo anaranjadas se esparcieron en medio incoloros sobre placas LGI dejándolas crecer de 7 a 10 días. Pasado este tiempo, se seleccionaron las colonias que presenten un color anaranjado oscuro y se transfirieron de nuevo al medio acético LGI para posteriormente, ser purificadas en placas de agar. Las pruebas bioquímicas de caracterización de la bacteria fueron realizadas de acuerdo con el Manual de bacteriología sistemática de Bergey (1984) para la caracterización de los géneros *Frateuria*, *Gluconobacter* y *Acetobacter* (Cavalcante et al., 1988).

3.5 Identificación de *Kosakonia oryzae*

Para la identificación de la bacteria *Kosakonia oryzae* se llevaron a cabo las pruebas Tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa. Pruebas bioquímicas y detección de resistencia con el equipo automatizado VITEK® 2. La identificación molecular se hizo a partir de la extracción del ADN 16S ribosomal, PCR punto final y secuenciación.

3.6 Tinción de Gram

Para trabajar con cultivo sólido se preparó la lámina portaobjetos, colocando dos gotas, de agua destilada. Cada colonia que se tomó con el asa de platino y se disolvió en el agua destilada colocada previamente en el portaobjetos, haciendo movimientos circulares desde el centro hasta la periferia, para que, de este modo, se distribuyera de forma homogénea la

colonia. Posteriormente se dejó secar al aire y una vez logrado se fijó flameando la lámina portaobjetos con el mechero, teniendo cuidado de no quemar el material. Una vez hecho esto se prosiguió con la técnica de coloración Gram, en la cual se colocó el frotis sobre el puente de coloración, se cubrió la lámina completamente con el cristal violeta por 1 min y a continuación, se lavó con agua (sin secar). Después se cubrió la lámina con solución lugol, nuevamente dejando actuar por 1 minuto seguido de su respectivo lavado. Hecho esto se colocó la lámina en posición vertical y se dejaron caer gotas de alcohol cetona sobre la superficie hasta que arrastró el sobrante de cristal violeta no retenido y nuevamente se lavó con agua. Se volvió a colocar la lámina sobre el puente de decoloración y esta vez se cubrió por 30 s con safranina y se lavó con agua. Por último, se dejó secar espontáneamente al aire en posición vertical y una vez logrado esto, se colocó una gota de aceite de inmersión para observarlo bajo el objetivo de 100X en el microscopio óptico.

3.7 Técnica para la prueba catalasa

Se tomó con un palillo de madera una cantidad suficiente de la colonia a estudiar cuidando no tocar el agar de donde proviene. Posteriormente se colocó la colonia sobre un portaobjeto previamente lavado, seco y desinfectado con alcohol. Hecho esto se agregó una gota de H_2O_2 al 30 % e inmediatamente se pudo observar si se desprendieron burbujas o no. Lo cual en los casos que fueron visibles indicó que se trataba de una reacción positiva debido al desprendimiento de gas y cuando no automáticamente se interpretaron como negativas.

3.8 Técnica para la prueba de la oxidasa

Se crecieron los cultivos en 15 ml medio líquido nutritivo durante 48 h y posteriormente se utilizaron las tiras de prueba de oxidasa BACTIDENT OXIDASE ®. Se sumergieron en el medio por un tiempo aproximado de 2 s y se esperó algún cambio de color en la tira de prueba. La coloración azul-violeta indicó un resultado positivo mientras que la coloración blanquecina inicial indicaba un resultado negativo.

3.9 Antibiograma (detección de resistencia) y bioquímicas

Se llevaron a cabo mediante el equipo automatizado VITEK® 2 Advance expert system el cual cuenta con una combinación de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos con resultados MIC. Utiliza tarjetas de identificación y AST (sensibilidad a los antibióticos) que constan de 64 orificios con sustratos colorímetros las cuales permiten una amplia gama de pruebas disponibles. El equipo automáticamente proporciona la validación de la prueba sin ningún tipo de intervención. Uso del kit VITEK 2 AST-GN70 para la ejecución de bioquímicas y VITEK 2 GN para el antibiograma.

3.10 Extracción de ADN para de *Bacillus* sp.

Se llevó a cabo según Akamatsu, (2000) con algunas modificaciones; las bacterias fueron inoculadas en 20 ml de caldo nutritivo y se incubaron y agitaron a temperatura ambiente durante 48 h. Posteriormente se recolectaron mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min, luego se llevaron a baño María con una temperatura de 40 °C por un tiempo de 15 min en 1 ml de solución SMM con pH de 6.5 (sacarosa, malato y MgCl₂) junto a 4 mg de lisozima. Después los protoplastos fueron sometidos a centrifugación nuevamente durante 5 min a 8,000 rpm y luego resuspendidos en 500 µl de buffer TNBS (Tris-HCl pH 8, NaCl y docecilsulfato sódico), la cual fue incubada a 65 °C por 5 min. Continuando ahora con la extracción de proteínas se le adicionaron 0.5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), la cual fue mezclada gentilmente y separando la parte acuosa por centrifugación durante un tiempo de 15 min a 10,00 rpm. La fase acuosa fue colocada en un tubo nuevo y se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío, invirtiendo gentilmente varias veces hasta observar las cadenas de ADN y para luego centrifugar nuevamente a 10,000 rpm durante 10 min. Hecho esto se lavó la pastilla con etanol frío al 70 % y nuevamente se hizo la centrifugación. Finalmente, el alcohol fue retirado, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril y conservada en refrigeración hasta su posterior uso.

3.11 Extracción de ADN para *Kosakonia oryzae*

Las bacterias crecieron en caldo nutritivo e incubadas a temperatura ambiente y con poca luz durante 48 h para luego recuperarlas mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min. Las células se lavaron dos veces con 2 ml de NaCl 5 M y se colectaron por centrifugación en cada lavado. Hecho esto, el paquete celular se resuspendió suavemente en 2 ml de TE 50/20 (Tris 50 mM pH 8 y EDTA 20 mM) y se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min, repitiendo este paso una vez más. Luego el paquete celular se resuspendió en 500 µl de TE 50/20 y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml, adicionando 50 µl de lisozima e incubando posteriormente a 37 °C por un periodo de 30 min. A continuación, se adicionaron 40 µl de proteinasa K y 25 µl de SDS al 20%, incubando durante 60 min a una temperatura de 50 °C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 50 µl de acetato de sodio 3M y 550 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1; saturado con Tris 0.1 M, pH 8). Se mezclaron las fases por agitación de inversión suave y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. La extracción con fenol fue repetida hasta que desapareció la parte blanca de la muestra. Luego fue extraída la parte acuosa con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1; saturado con Tris 0.1 M, pH 8). La fase acuosa fue mezclada con 2.5 volúmenes (1375 µl) de etanol absoluto frio, mezclando suavemente por inversión y luego mantenida a -20°C durante 30 min. El precipitado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante para la obtención de la pastilla. Se agregó 1 ml de etanol frio al 70%, se resuspendió agitándolo suavemente y se centrifugó nuevamente. Finalmente, el alcohol fue decantado y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en agua destilada estéril y se guardó en refrigeración para su posterior uso (Ureta et al, 1995).

3.12 Caracterización molecular de los microorganismos aislados

De acuerdo a los géneros aislados e identificados por crecimiento en medios de cultivo específicos y su caracterización fenotípica y bioquímica se seleccionaron los oligonucleótidos iniciadores para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) y su respectiva amplificación de las regiones conservadas del 16S ribosomal, una vez amplificados fueron preparados y enviados para su secuenciación y así poder identificar las bacterias aisladas a nivel molecular (Weisburg *et al.*, 1991).

En los casos de *Bacillus subtilis* y *Kosakonia oryzae* se hizo uso de los siguientes oligos:

- 16S 8f con la secuencia de AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y,
- 1492r con la secuencia de GGTTACCTTGTTACGACTT,

Los cuales fueron elegidos de acuerdo lo mencionado según Weisburg: cuentan con la capacidad de amplificar una amplia variedad de taxones bacterianos Grampositivos y proteobacterias.

Se hizo uso de una Taq DNA polimerasa recombinante de la marca Invitrogen la cual cuenta con los componentes de: Taq DNA Polimerasa 1U, buffer 1x, y dNTPs. De este modo lo único que faltó por agregar para la llevar a cabo la reacción fueron los oligonucleótidos, el agua y el ADN blanco.

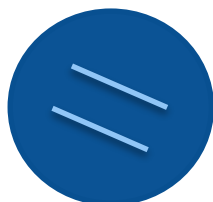
La reacción de PCR fue llevada a cabo en el termociclador Applied Biosystems con temperaturas de 95 °C para la desnaturalización inicial durante 5 min, después a 95 °C durante 30 s de desnaturalización para comenzar con el ciclo, cambio a 42 °C durante 30 s en la etapa de alineamiento y 72 °C durante 1 min para la polimerización, termina el ciclo el cual se repite 30 veces y al final 10 min más a 72 °C para completar polimerización.

El producto de la PCR se analizo en gel de agarosa y luego fue purificado con el kit ZYMO RESEARCH “*Extracción de PCR de gel de agarosa*”. Se cuantifico en el NanoDrop2000 (Thermo SCIENTIFIC) y se mandó a secuenciar con un volumen final de 16 µL: la mezcla contuvo 10 pmolar de oligo y 120 ng del producto de DNA.

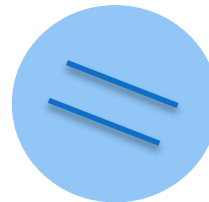
3.15 Ensayos de Antagonismo

Bacillus sp. y *Kosakonia oryzae* fueron inoculadas en 10 mL de caldo nutritivo y a la par, sembradas en placas con agar nutritivo. Tanto las cajas como los caldos se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h y se llevaron a cabo los siguientes estriados:

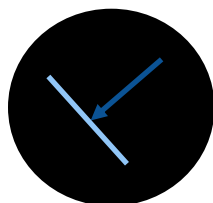
Estriado 1:



Estriado 2:



Estriado 3:



Estriado 4:

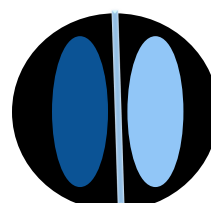


Figura 1. Ilustración de los estriados en caja Petri para la elaboración de prueba de antagonismo. Azul rey representa a la bacteria 1 (●), mientras que el Azul claro representa a la bacteria 2 (●).

3.16 Ensayos de inoculación.

El ensayo constó de un total de 60 plantas de jitomate: 15 fueron inoculadas con *Bacillus* sp., 15 con la bacteria *Kosakonia oryzae*, 15 se inocularon con *Bacillus* sp. y *Kosakonia oryzae* y, por último, los 15 restantes permanecieron sin inóculo (plantas testigo).

Planta de jitomate. Las semillas de jitomate se germinaron en charolas con sustrato y fueron regadas únicamente con agua, posterior a esto se plantaron en bolsas plásticas color negro las cuales contenían 50 % arena y 50% sustrato humedecidos y mezclados perfectamente (2.7 kg de mezcla cada una). Fueron etiquetadas y rotuladas de acuerdo con la bacteria o bacterias con las que fueron inoculadas, y de igual forma las que quedaron como testigos.

Preparación de los inóculos. Tanto *Bacillus* sp. como *Kosakonia oryzae* se crecieron en 300 ml de caldo nutritivo e incubaron durante 48 h. Se midió su nivel de absorbancia y se llevaron a cabo aplicaciones de 6 ml de bacteria (inóculo) con 4 ml de agua de riego a cada planta. La duración del ensayo constó de 18 semanas y únicamente se le aplicó agua de riego mediante

goteo. Se hicieron un total de dos inóculos: el primero en la novena semana mientras que el segundo se hizo en la treceava.

Las variables que se tomaron en cuenta en cuanto a fisiología y rendimiento fueron: altura y grosor de la planta, índice de contenido de clorofila, rendimiento y número de tubérculos, tal como sugiere Leal y colaboradores (2018) para la evaluación de parámetros en BPCV. La siguiente tabla sintetiza las actividades y tiempo en que se llevaron a cabo durante el ensayo.

Tabla 1. Relación de las actividades llevadas a cabo durante el Ensayo de Inoculación. Se menciona la actividad en relación la semana en que se dio inicio.

Planta de jitomate variedad: Rio GRande	
Actividad	Semana
Germinación	1
Plantación	8
1 ^a inoculación	9
2 ^a inoculación	13
Término	18

3.14 Cuantificación de Clorofila

Se llevó a cabo mediante un protocolo modificado de Hiscox e Israelsta (1979), en el que se pesó 0.1 g de hojas verdes frescas, de las cuales se maceró el tejido foliar con nitrógeno líquido junto a 2 ml de acetona al 80%. Posteriormente se transfirió el macerado a un tubo de 1.5 ml aforando con acetona y llevó centrifugar durante 5 min a 14000 rpm. Se guardó el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 y se midió la absorbancia a λ 633 y λ 645 para la cuantificación de clorofilas A, B y Totales. Para lo cual se hizo uso de las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila A} = (10.81) (\text{Abs } 663) - (0.75) (\text{Abs } 645)$$

$$\text{Clorofila B} = (19.09) (\text{Abs } 645) - (3.99) (\text{Abs } 663)$$

$$\text{Clorofilas Totales} = (6.83) (\text{Abs } 663) + (18.2) (\text{Abs } 645)$$

3.15 Diseño experimental y análisis estadísticos

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar simple con tres tratamientos, el área experimental útil constó de 2 m² y 15 repeticiones por tratamiento (al azar). Se contaron con 60 unidades experimentales. La siembra constó de una semillas-planta por bolsa de sustrato, cada cama separada por 1.5 m. Las plantas contaron con riego semanal y por goteo.

Para determinar el efecto de los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y para establecer la diferencia de las medias se utilizó una prueba de Tukey ($p < 0.05$), con el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) v.9.1 (SAS, 2019).

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Reidentificación del aislamiento de *Bacillus* sp.

La morfología colonial de *Bacillus* sp. en Agar nutritivo se mostró plana, con forma rizoide, bordes ondulados y una superficie rugosa, mate y seca (Fig. 2), características que coinciden con las descripciones de Calvo y Zúñiga (2010), quienes llevaron a cabo el aislamiento de varias especies de *Bacillus* spp. en la rizósfera de un cultivo de papa, donde encontraron que el 84% de las 43 cepas aisladas, mostraron características de propias de *Bacillus subtilis*. Del mismo modo, McSpadden (2004) menciona que entre las especies más comúnmente halladas en suelo están *B. subtilis* y *B. cereus* sin embargo, no se ha ratificado que una u otra especie de *Bacillus* esté relacionada más a un tipo de suelo que a otro. La tinción de Gram indicó la presencia de un bacilo Gram positivo (Fig. 3 A), tuvo una reacción positiva en la prueba de Catalasa (Figura 3B) y la prueba Oxidasa resultó negativa.



Figura 2. Fotografía de la morfología colonial de *Bacillus* sp. sembrada en Medio Agar-Nutritivo. Nótese los bordes ondulados y superficie rugosa, así como el aspecto mate y seco.

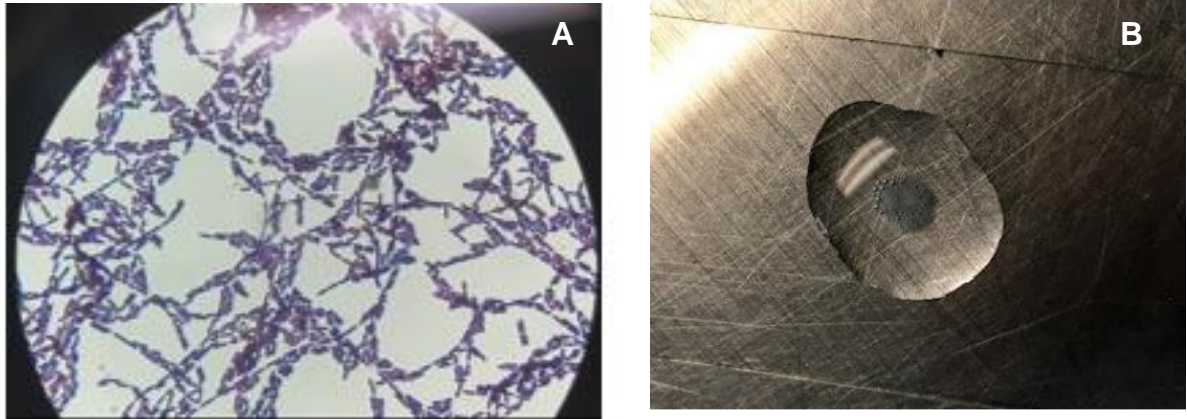


Figura 3. Fotografías de *Bacillus* sp. en dos de las pruebas efectuadas. **A)** Tinción con resultado Gram positivo observado al microscopio óptico a 100X. **B)** Prueba de Catalasa positiva, nótese la efervescencia producida por *Bacillus* sp.

La siguiente tabla muestra los resultados de *Bacillus* sp. obtenidos a través de la Tinción de Gram, Prueba de Catalasa y Oxidasa.

Tabla 2. Pruebas realizadas a la bacteria *Bacillus* sp. junto a los resultados obtenidos.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	Gram positiva
Prueba de Catalasa	Positiva
Prueba de Oxidasa	Negativa

4.2 Identificación de *Kosakonia oryzae*

De forma general, en todos los medios, la bacteria presentó una morfología colonial uniforme: colonias circulares y elevación convexa; en los medios LGIE, LGIA+sacarosa y LGIA+glucosa se mostraron transparentes y brillantes, mientras que en los medios LB y Agar nutritivo adquirió una apariencia cremosa (fig. 4). La tinción de Gram indicó la presencia de una bacteria Gram negativa (fig. 5). y tanto la prueba de Catalasa como de Oxidasa arrojaron resultados negativos. Estos resultados coinciden con la morfología de *Kosakonia oryzae* aislada de una especie de arroz salvaje (*Oryza latifoli*) en china, según lo reportado por Li *et al.*, (2017) y Peng *et al.*, (2009) donde describen las colonias de la bacteria Gram negativa como circulares, convexas y con márgenes lisos en agar nutritivo. Por otro lado, a través de los medios LGIA+sacarosa y LGIA+glucosa (carentes de nitrógeno) demostró la habilidad

tomar nitrógeno atmosférico (N₂) y transformarlo en amonio para la asimilación de nutrientes y síntesis de productos esenciales tales como ácidos nucleicos y proteínas; esto confirma lo que menciona Peng *et al.*, (2009), que categoriza a la bacteria *Kosakonia oryzae* como anaerobia facultativa, fijadora de Nitrógeno. A la par, con los mismos medios, pudo comprobarse la habilidad de la bacteria para crecer en medios con altas concentraciones azúcar, lo que sugiere que, al igual que la bacteria *Gluconacetobacter* sp. que cuenta con una enzima llamada levansacarasa que le confiere una adaptabilidad y capacidad de metabolizar estos oligosacáridos (Saravanan *et al.*, 2007), así también *Kosakonia oryzae* posiblemente cuente con alguna enzima afín que le confiera tal adaptabilidad. En la producción de polisacáridos, ésta se vio favorecida únicamente por los medios LGIE y LGI+glucosa (fig. 6), así como en la producción de ácido que fue más evidente en estos mismos medios lo cual corrobora con Brady *et al.*, (2013), donde menciona que *Kosakonia oryzae* fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, situación que no se presentó con el medio LGIA+sacarosa, donde la producción de polisacáridos se vio ausente y el medio se mantuvo con la coloración original del medio (verde) (fig. 6). Esto confirmó que, tal como señala Calvancante (1988) y Reis (1994) en sus estudios sobre el aislamiento de acetobacterias con el medio en particular LGI, *Kosakonia oryzae* no forma parte del grupo, ya que éstas cuentan con la característica distintiva de generar ácido a partir sacarosa y la bacteria no fue capaz de producirlo.

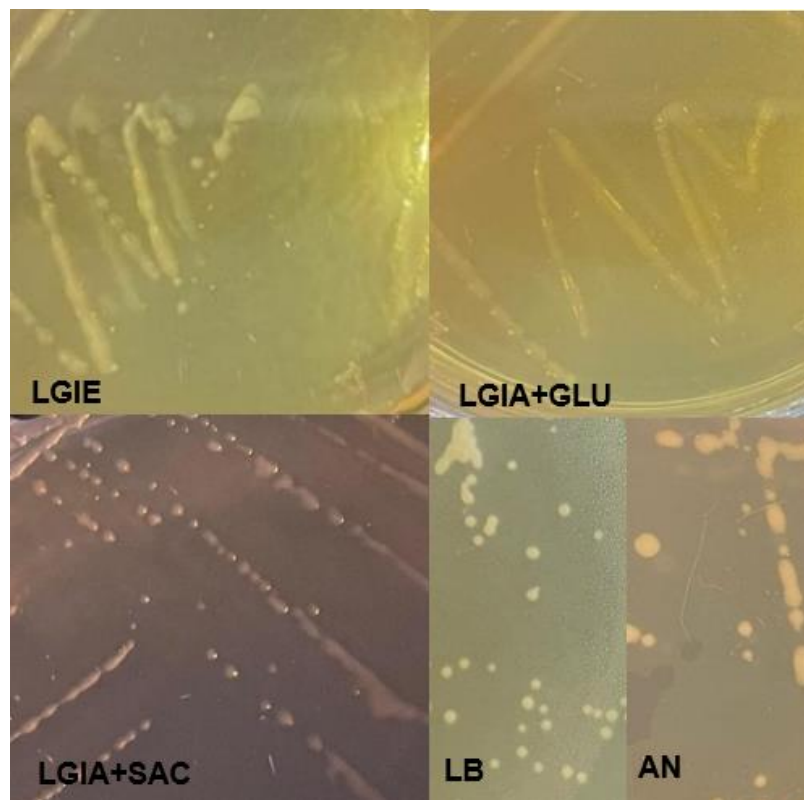


Figura 4. Visualización colonial con 48 horas de incubación en los medios LGIE, LGIA+glucosa, LGIA+sacarosa, LB y Agar nutritivo. Donde todos presentan una morfología colonial uniforme, con colonias circulares, elevación convexa; medios LGI con apariencia transparente y brillante mientras que los medios LB y Agar nutritivo dieron un aspecto cremoso. Nótese la producción de polisacáridos que *Kosakonia oryzae* genera en los medios LGIE y LGIA+glucosa respecto a LGIA+ sacarosa, LB y Agar nutritivo, donde, de forma contraria la separación colonial es evidente. Cajas con 48 horas de crecimiento.

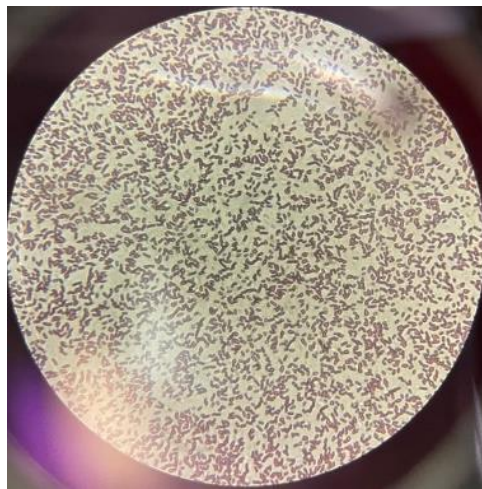


Figura 5. Fotografía de *Kosakonia oryzae* observada al microscopio óptico a 100X. Obsérvese la coloración típica de bacteria Gram negativa.

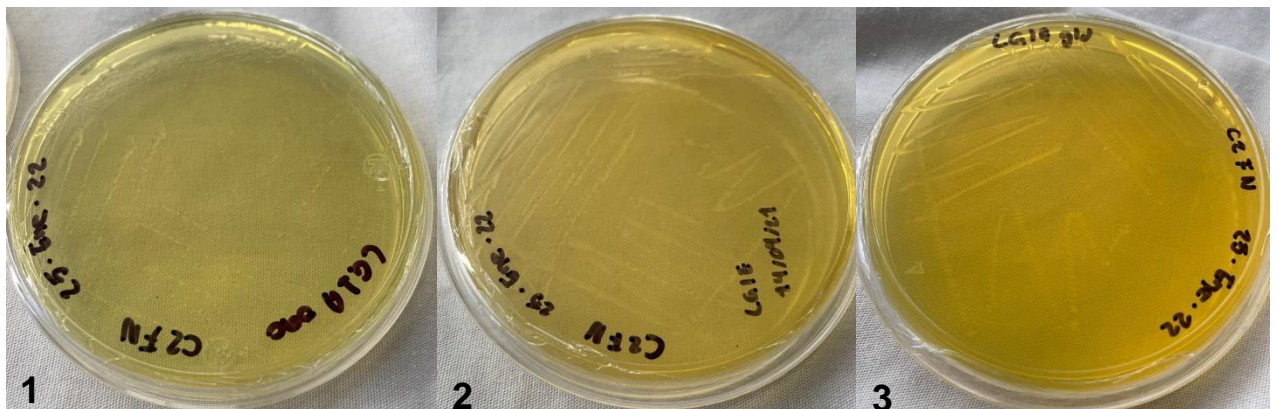


Figura 6. Comparación en los medios LGIE, LGIA+glucosa y LGIA+sacarosa para la producción de ácido por parte de *Kosakonia oryzae*. Se observa el cambio gradual en la coloración respecto a la producción de ácido: 1) LGIP+sacarosa, coloración verde lo que indica baja de producción de ácido. 2) LGIE, con coloración amarillo pálido lo que indica producción de ácido. 3) LGIA+glucosa, con coloración amarilla más concentrada indicando una alta producción de ácido.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en las pruebas efectuadas a la bacteria *Kosakonia oryzae*.

Tabla 3. Síntesis de los resultados obtenidos a partir de las pruebas efectuadas a *Kosakonia oryzae*. Se muestra la prueba seguida de su resultado.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	Gram negativa
Prueba de Catalasa	Negativa
Prueba de Oxidasa	Negativa
Productora de polisacáridos	Positivo
Producción de ácido	Positiva
Fijadora de nitrógeno	Positiva
Crecimiento en fuente de sacarosa	Positivo
Crecimiento en fuente de glucosa	Positivo

4.5 Bioquímicas y antibiograma de *Kosakonia oryzae*.

En este estudio se realizaron 47 pruebas bioquímicas para la identificación de *Kosakonia oryzae*. Brady et al., (2013) menciona que el género *Kosakonia* generalmente se muestra positivo para arginina dihidrolasa y negativo para lisina descarboxilasa e indol, mientras que la reacción a la ornitina descarboxilasa se muestra variable. También menciona la capacidad de oxidar Tween 40 y Tween 80, N-acetil-D-glucosamina, l-arabinosa, d-celobiosa, d-fructosa, d-galactosa, d-glucosa, lactosa, maltosa, d-manitol, d-manosa, l-ramnosa, d-sorbitol, sacarosa, d-trealosa, éster monometílico del ácido succínico, ácido cis-aconítico, ácido d-glucónico, ácido d-sacárico, glicerol, d-glucosa-1-fosfato y d-glucosa-6-fosfato; indica que no genera reacción con el ácido p-hidroxi-fenilacético, ácido itacónico, ácido propiónico, la l treonina, el 2-aminoetanol y 2,3-butanodiol; y también que produce reacción variable con N-acetil-d-galactosamina, d-arabitol, m-inositol, d-melibiosa, d-rafinosa, turanosa, l-alaninamida, l-prolina y d-serina. Del mismo modo Peing et al., (2009), agrega

que la especie *Kosakonia oryzae* muestra una reacción positiva a lisina descarboxilasa; negativo para ureasa y corrobora que reduce nitrato a nitrito; indica que puede utilizar como única fuente de carbono a Adonitol, ácido L-aspártico, dulcitol, oxalato de sodio, ácido vanílico, benzoato de sodio, D-fructosa, malato, manitol, maltosa y sorbitol.

Por lo tanto, de las 47 pruebas efectuadas 12 coincidieron con lo ya portado: reacciones positivas a d-trealosa, sacarosa, d-sorbitol, d-manosa, d-manitol, d-maltosa, d-glucosa, y reacciones negativas a ureasa, L-Prolina-Arilamidasa Lisina descarboxilasa, Ornitina descarboxilasa y L-Arabitol. Adonitol, contrario a lo que sugiere Peing se obtuvo un resultado negativo.

Los resultados obtenidos con el ensayo de bioquímicas también agregan como reacción positiva a Beta-glucosidasa, Resistencia O/129, D-celobiosa, Beta-acetil-glucosaminidasa, Gamma-glutamyl-transferasa, Beta-galactosidasa, Palatinosa, Fermentación glucosa (como se corroboró con el medio LGIA+glucosa), D-trealosa, alcalinización de succinato, 5-keto-D-gluconato y Fosfatasa. Así como reacciones negativas a Ala-Fe-Pro-arilamidasa, L-PirrolidoniL-arilamidasa, l-arabitol, producción de H₂S, Glutamyl Arilamidasa pNA, b-xilosidasa, beta-alanina arilamidasa pNA, lipasa, tirosina arilamidasa, d-tagatosa, alcalinización l-lactato, alfa-glucosidasa, glicina arilamidasa, l-histidina, cumarato, beta-glucoronidasa, glu-gly-arg-arilamidasa, l-malato, l-lactato y ELLMAN.

A continuación, se muestra la tabla 4 con las 47 pruebas realizadas y sus resultados positivos y negativos; seguida de la tabla 5 que menciona las 12 pruebas que coinciden con lo ya reportado a *Kosakonia oryzae*.

Tabla 4. Resultados de las 47 pruebas realizadas a *Kosakonia oryzae* con la placa VITEK 2 AST-GN70. en la sección de anexos se encuentran los análisis que corresponden a cada abreviatura.

Detalles Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	d CEL	+	9	BGAL	+
10	H ₂ S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	d GLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	d MAL	+	19	d MAN	+	20	d MNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	-	31	URE	-	32	d SOR	+
33	SAC	+	34	d TAG	-	35	d TRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	+
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Tabla 5. Resultados de las bioquímicas efectuadas a la bacteria *Kosakonia oryzae* con la placa VITEK 2 AST-GN70.

Análisis	Resultado	Análisis	Resultado
D-trealosa	+	Sacarosa	+
D-sorbitol	+	Ureasa	-
D-manosa	+	L-Prolina-Arilamidasa	-
D-manitol	+	Lisina descarboxilasa	-
D-maltosa	+	Ornitina descarboxilasa	-
D-glucosa	+	L-Arabitol	-

Para la evaluación de resistencia, Peing et al., (2009) en su estudio dirigido a *Kosakonia oryzae* menciona que la bacteria presenta resistencia a eritromicina, neomicina y ampicilina, pero no resiste a kanamicina. Para ampliar la lista se sensibilidad y resistencia por parte de la bacteria, y de acuerdo a los resultados que mostró el antibiograma, la bacteria presenta resistencia únicamente a Cefazolina y Nitrofurantoína de los 12 antibióticos a los que fue expuesta y mantuvo sensibilidad a los 10 restantes que fueron Piperacilina, Ceftriaxona, Cefepima, Aztreonam, Ertapenem, Trimetoprima, Meropenem, Amicacina, Gentamicina, Tobramicina, Ciprofloxacino y Tigeciclina. Lo cual concuerda con la naturaleza de la bacteria; de forma general, los principales factores para que una bacteria genere resistencia reside principalmente en el uso previo de antimicrobianos o condiciones de contaminación extrema en su lugar de origen. Con enfoque en el primer punto, durante el manejo que se tuvo con *Kosakonia oryzae*, el uso de antibióticos fue nulo, por lo que una necesidad de adaptación o mutación se volvió innecesaria y, por tanto, la sensibilidad de la bacteria se mantuvo intacta.

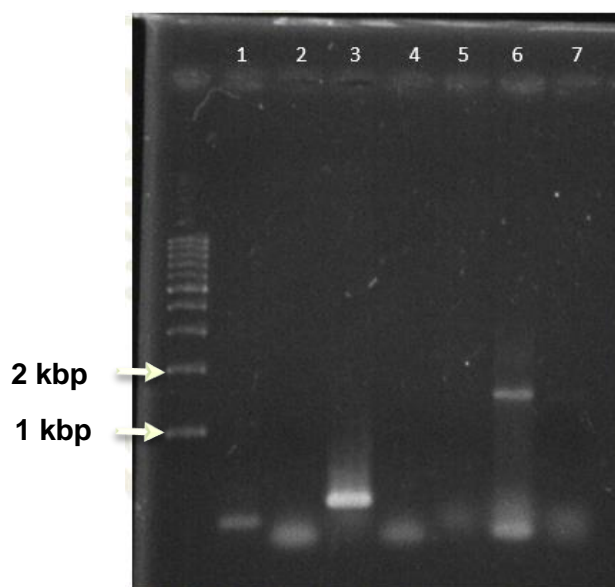
La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos a partir del antibiograma, donde se indica el nombre del antibiótico, CMI e interpretación.

Tabla 6. Resultados de *Kosakonia oryzae* a través del antibiograma llevado a cabo con equipo automatizado VITEK® 2 y kit VITEK 2 GN.

Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Piperacilina	<= 4	S	Meropenem	<= 0.25	S
Cefazolina	<= 4*	*R	Amicacina	<= 2	S
Ceftriaxona	<= 1	S	Gentamicina	<= 1	S
Cefepima	<= 1	S	Tobramicina	<= 1	S
Aztreonam	<= 1	S	Ciprofloxacino	<= 0.25	S
Ertapenem	<= 0.5	S	Tigeciclina	<= 0.5	S
Trimetoprima	<= 20	S	Nitrofurantoína	64	R*

4.5 Identificación genética de los aislamientos

La electroforesis mostró bandas de ADN de cada una de las cepas que correspondían a la región del gen 16S rRNA de las bacterias. Se obtuvo un fragmento de 1490 pb de la bacteria *Bacillus* sp. y otro con un rango aproximado de 1,026 pb para el caso de *Kosakonia oryzae*. Las concentraciones finales de los productos fueron de 8.7 ng/μL de DNA para *Bacillus* sp. y 7.2 ng/μL para *Kosakonia oryzae*.




```

Sbjct  492  |||      ||||| |  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 551
          AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
Query  540  AGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAA 599
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  552  AGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAA 611
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query  600  CTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA 659
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  612  CTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA 671
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query  660  GAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGC 719
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  672  GAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGC 731
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query  720  GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG 760
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  732  GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG 772
          |||||||||||||||||||||||||||||||

```

Figura 8. Secuencia del fragmento amplificado por PCR del gen 16S ribosomal de la bacteria *Bacillus* sp. Alineamiento en el software NCBI-BLAST de la secuencia amplificada con el oligonucleótido 16S8F en un rango de 760 pb con un 98% de identidad. Query es la bacteria *Bacillus* sp., de la base de datos de NCBI-BLAST y Sbjct es la bacteria aislada. Las líneas verticales representan identidad de las bases.

Por otro lado, el alineamiento a partir de la secuencia amplificada del gen 16S rRNA de la bacteria presentó un 99% de identidad con la cepa de *Kosakonia oryzae* aislada en el Departamento de Microbiología Agrícola, Instituto de Investigación y Colegio Agrícola, Madurai, Othakadai, India.

Hasta el momento, los reportes de aislamiento de la bacteria *Kosakonia oryzae* en comparación con *Bacillus* sp., han sido escasos, y únicamente se ha aislado en países como Australia, Brasil e India principalmente, lo que convierte al presente trabajo en el primer reporte de aislamiento de *Kosakonia oryzae* en el cultivo de la caña de azúcar en México. Esto que implica una aportación fundamental en los temas de biodiversidad bacteriana que comprenden los cultivos en el país, así como la posibilidad de nuevas alternativas para su uso y aplicación; da la premisa para posteriores aislamientos, y su consecuente investigación y ensayo para el enriquecimiento de datos informativos sobre la bacteria.

```

Query  1      AAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGSMCGGGTGAGTAA 60
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37      AAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA 96
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

```

Query	61	TGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCAT	120
Sbjct	97	TGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCAT	156
Query	121	AACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATG	180
Sbjct	157	AACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATG	216
Query	181	GGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAACGGCCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA	240
Sbjct	217	GGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAACGGCCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA	276
Query	241	GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG	300
Sbjct	277	GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG	336
Query	301	GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT	360
Sbjct	337	GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT	396
Query	361	TCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTACGGTTAATAACCGTGCTGATT	420
Sbjct	397	TCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTACGGTTAATAACCGTGCTGATT	456
Query	421	GACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAG	480
Sbjct	457	GACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAG	516
Query	481	GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCG	540
Sbjct	517	GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCG	576
Query	541	GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTC	600
Sbjct	577	GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTC	636
Query	601	GTAGAGGGAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC	660
Sbjct	637	GTAGAGGGAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC	696
Query	661	GGTGGCGAAGGCGGCCTCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA	720
Sbjct	697	GGTGGCGAAGGCGGCCTCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA	756
Query	721	AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCC	780
Sbjct	757	AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCC	816
Query	781	CTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA	840
Sbjct	817	CTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA	876
Query	841	AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT	900
Sbjct	877	AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT	936
Query	901	TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACCTGGCAGAGATGCC	960
Sbjct	937	TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACCTGGCAGAGATGCC	996
Query	961	GGGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGA	1020

```

Sbjct  997  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1056
          GGGGTGCCTTCGGGAACGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGA
Query  1021  AATGTTG  1027
          |||||||
Sbjct  1057  AATGTTG  1063

```

Figura 9. Secuencia del fragmento amplificado por PCR del gen 16S rRNA. Alineamiento en el software NCBI-BLAST de la secuencia amplificada con el oligonucleótido 16S8F en un rango de 1,026 pb con un 99% de identidad. Query es la bacteria *Kosakonia oryzae* de la base de datos de NCBI-BLAST y Sbjct es la bacteria aislada. Las líneas verticales representan identidad de las bases.

4.3 Ensayos de antagonismo

Las pruebas de antagonismo no mostraron resultados positivos. En las 4 formas de estriado ambas bacterias mantuvieron un crecimiento uniforme y no se presentó inhibición de crecimiento cuando los límites coloniales de ambas se encontraron. Lo que sugiere que entre *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae* no existe un comportamiento antagónico, sino que logran crecer y desarrollarse en conjunto de forma factible. Resultados obtenidos por Velazquez *et al.*, (2008), Menhaz (2013) y Leite *et al.*, (2021), en sus ensayos sobre los endófitos que habitan el interior de la caña de azúcar, concluyen que hay una amplia variabilidad de BPCV y entre las cuales se encuentran varias especies de *Bacillus* spp. Leite *et al.*, (2021) hace la mención de varios informes sobre el aislamiento de miembros de la familia Enterobacteriaceae de la caña de azúcar, donde los mayores representantes son *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. Sin embargo, menciona recientes aislamientos de género *Kosakonia* puntualizando a *K. oryzae* y *K. radicincitans*. Por otro lado, Velazquez *et al.*, (2008) menciona la presencia de *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* principalmente. Así, Menhaz (2013) menciona que se han encontrado especies de *Bacillus* spp., entre ellas *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, interactuando como endófitos de una misma planta con el género *Kosakonia*, donde incluye a la especie *K. oryzae*, lo cual justifica el comportamiento que tuvieron las bacterias en el ensayo, ya que varios estudios sugieren que existe una previa interacción entre ambas y, por tanto, las respuestas de antagonismo entre ambas se muestran bajas e imperceptibles. Actualmente no hay con información concreta sobre posibles

reacciones antagónicas o sinérgicas entre *Bacillus* sp. y *Kosakonia oryzae*, sin embargo, el presente ensayos de inoculación fue posible llegar a un acercamiento.

A continuación, las fotografías de los resultados obtenidos de las pruebas de antagonismo, las cuales se mantuvieron en incubación durante 7 días a temperatura ambiente.

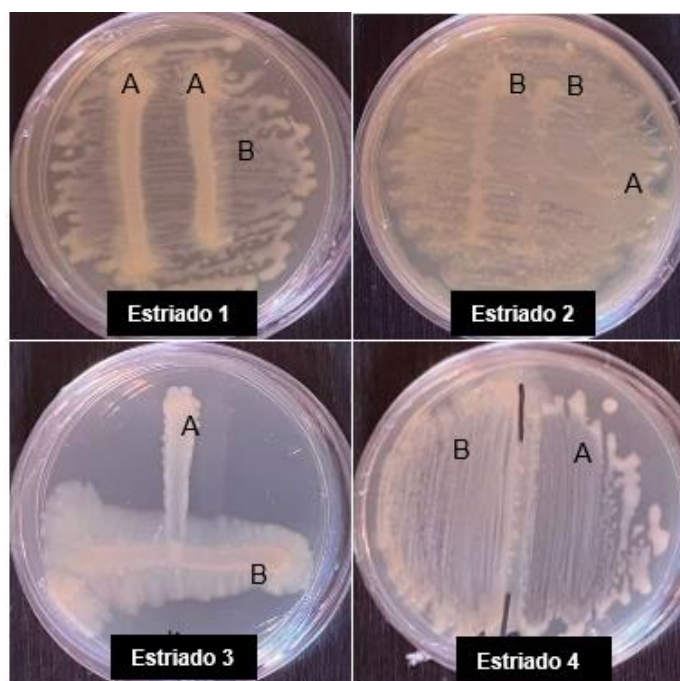


Figura 10. Fotografías del ensayo de antagonismo donde **A** representa *Kosakonia oryzae* y **B** a *Bacillus* sp. Obsérvese el desarrollo simultáneo de ambas bacterias y la ausencia de inhibición en el crecimiento. Crecimiento en cajas con Agar nutritivo después de una semana de incubación.

4.4 Ensayos de inoculación en plantas

Las gráficas mostraron divergencias en las algunas de las variables evaluadas, sin embargo, la desviación estándar indicó que no se obtuvieron diferencias significativas, debido a que el total de cuerpos vegetales, utilizados para cada variable, no fue suficiente para acortar la desviación. Por lo tanto, es necesario que se tome cuenta la ausencia de diferencias significativas en las explicaciones posteriores que se den de los resultados obtenidos, esto a menos que se indique lo contrario.

La variable de altura en la planta se mantuvo similar entre *Bacillus* sp., inóculo con ambas bacterias y el testigo, a diferencia de *Kosakonia oryzae* que disminuyó la altura de la planta, lo cual indica que *K. oryzae* afecta negativamente la longitud del cuerpo vegetal, sin embargo, esto no sucede cuando es inoculado junto a *Bacillus* sp., ya que la planta mantiene su crecimiento promedio según lo indica la planta testigo.

Por otro lado, el grosor del tallo se mantuvo uniforme entre los tres inóculos y el testigo, lo que sugiere que no hay una influencia positiva o negativa por parte de las bacterias en la variable. Sin embargo, en la inducción de brotes, se observó que *Bacillus* sp. favoreció esta variable, y se mostró más favorable cuando se inoculó con *K. oryzae*, a diferencia del testigo y *K. oryzae* que se mantuvieron similares por debajo de *Bacillus* sp. Esto sugiere que *K. oryzae*, a diferencia de *Bacillus* sp., no cuenta con la capacidad de inducir la producción de brotes por sí misma, pero genera una sinergia con *Bacillus* sp. que mejora la inducción si se compara con los resultados que obtuvo de forma individual.

No obstante, *Bacillus* sp. obtuvo una mayor producción de frutos que la que se generó en conjunto con *K. oryzae*, la cual se mantuvo a la par con el testigo, y, por último, *K. oryzae* que se mantuvo por debajo de todos. Esto sugiere que la sinergia producida entre ambas bacterias para la brotación no favoreció la producción de frutos en la planta y, según el comportamiento que se observa en la gráfica donde *Bacillus* sp. produce el doble que *K. oryzae* y la producción de ambas bacterias se mantuvo a la mitad de ambos, sugiere que la producción de frutos no se ve favorecida por *K. oryzae*.

La variable de producción de clorofila se subdividió en tres tipos de resultados: clorofilas A, B y Totales, de las cuales se obtuvieron diferencias significativas tanto en clorofila A y clorofila B. En los resultados de la producción de clorofila A se observó una diferencia significativa entre el testigo y el inóculo con *K. oryzae* y *Bacillus* sp. en conjunto, donde las plantas con el inóculo bacteriano produjeron el doble de clorofila que el testigo; de igual manera, *Bacillus* sp. y *K. oryzae* mantuvieron su producción por encima del testigo, pero no la suficiente para que se tuvieran diferencias significativas. En el caso de la clorofila B sucedió lo contrario que el primer caso: nuevamente hubo diferencias significativas donde *Bacillus* sp. y las plantas testigo, produjeron el doble de clorofila B que *K. oryzae* y el inóculo de ambas bacterias, las cuales se mantuvieron similares en los resultados. Finalmente, en la producción de clorofilas totales no se produjeron diferencias significativas, sin embargo, se

observó que las plantas inoculadas con ambas bacterias se mantuvieron por encima de las demás, resultado seguido de por *Bacillus* sp. y, por último, *K.oryzae* con una producción similar al testigo. Esto sugiere que *Bacillus* sp. efectivamente induce la producción de clorofila en la planta, mientras *K. oryzae*, por sí misma, no genera diferencias respecto a la producción ordinaria, sin embargo, cuando actúa en conjunto con *Bacillus* sp, la producción se vuelve mayor a la que el bacilo induce de forma individual.

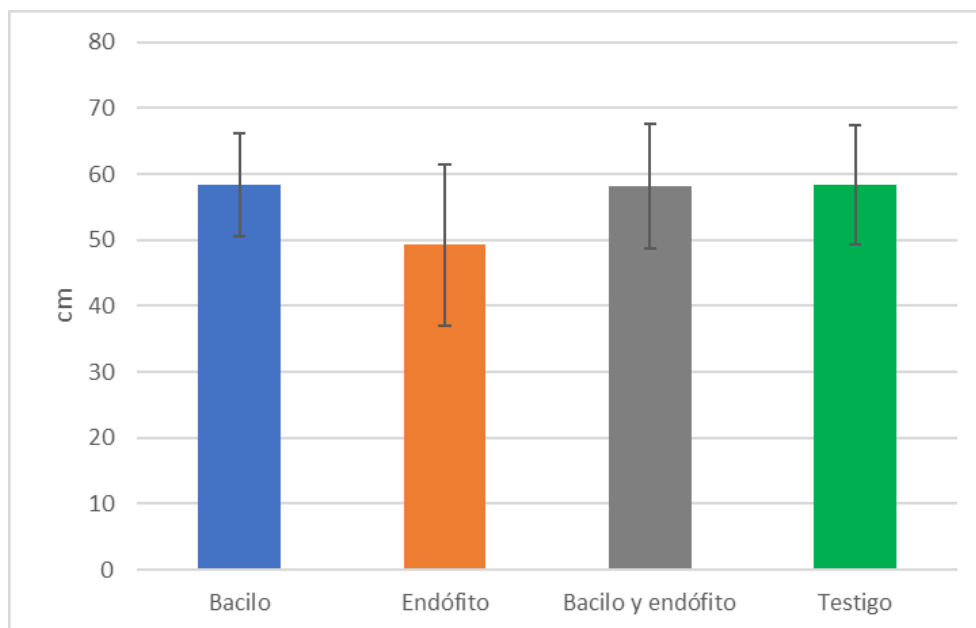


Figura 11. Gráfica de las alturas totales de los cuerpos vegetales. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Nótese que los inóculos del bacilo y ambas bacterias se mantuvieron similares a diferencia del endófito que se mantuvo 10 unidades por debajo.

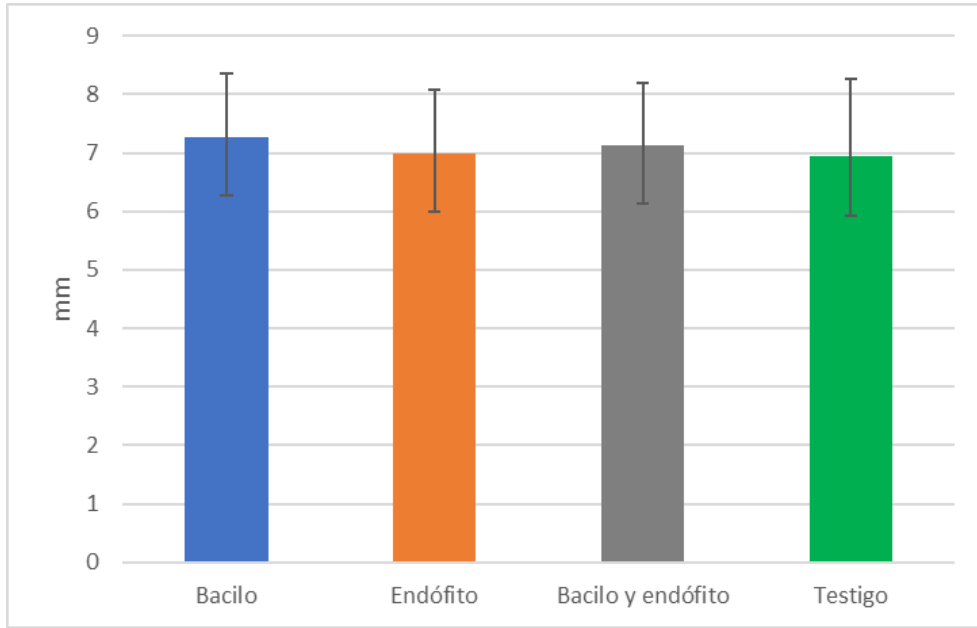


Figura 12. Gráfica del grosor del tallo. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Nótese que los resultados entre los inóculos y el testigo se mantuvieron similares.

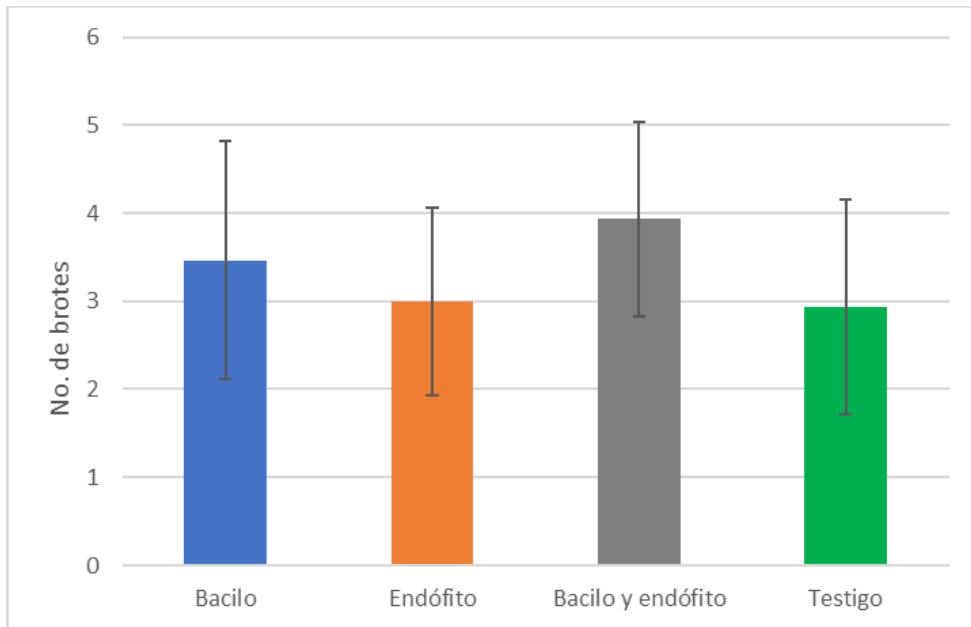


Figura 13. Gráfica del total de brotes. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Obsérvese que las plantas con el inóculo de ambas bacterias, tuvo una mayor producción frente a los inóculos individuales y testigo.

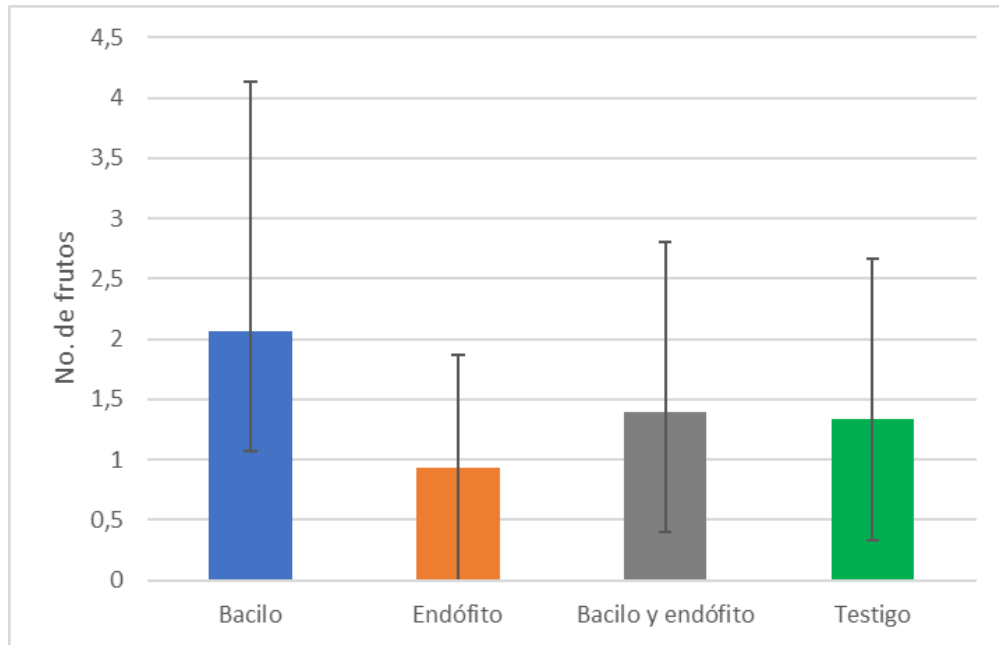


Figura 14. Gráfica del total de frutos. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Nótese la diferencia entre *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae*, donde el primero tuvo una producción del doble, respecto al segundo. El inóculo con ambas bacterias se mantuvo similar al testigo.

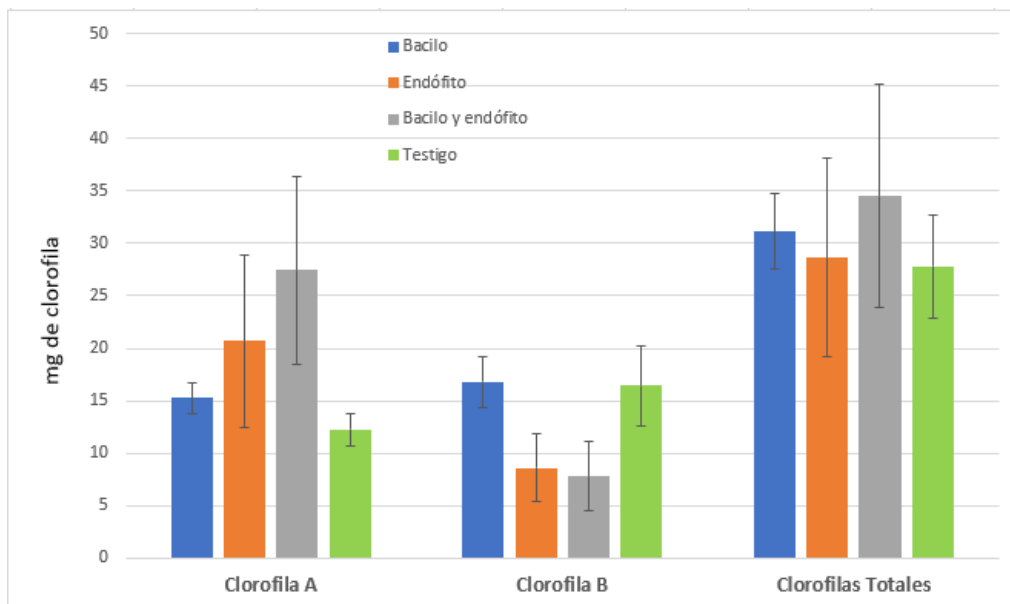


Figura 15. Gráfica de las clorofilas A, B y Totales obtenidas de las hojas del cuerpo vegetal. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar. Donde Bacilo representa a *Bacillus* sp., y Endófito a *Kosakonia oryzae*. Nótese la diferencia en la producción de clorofila A del inóculo con ambas bacterias respecto al testigo que fue el doble de su producción. Mismo caso en la Clorofila B donde *Bacillus* sp. y testigo produjeron el doble que *Kosakonia oryzae* y bacterias en conjunto. La

producción de clorofilas totales no mostró diferencias significativas de los inóculos respecto al testigo.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

La cepa *Bacillus* sp. demostró tener efectos benéficos sobre la planta de jitomate de acuerdo a las variables evaluadas como fueron: la producción de brotes, frutos y Clorofila; a diferencia de *K. oryzae* que se mantuvo similar o por debajo del testigo, a excepción de la producción de clorofila. Sin embargo, fue interesante observar el comportamiento sinérgico que se producía cuando ambas bacterias se inocularon en conjunto sobre el cuerpo vegetal, ya que, en las variables de inducción de brotes y clorofilas totales, los resultados se vieron por encima de los efectos que ejercía *Bacillus* sp. por sí misma. Por lo tanto, se concluye que *Bacillus* sp. ejerce un comportamiento positivo para promoción del crecimiento en planta de jitomate tomate mientras que *K. oryzae* únicamente tienen efectos benéficos al ser inoculada junto a *Bacillus* sp. Cabe mencionar que los estudios sobre *K. oryzae* como BPCV son escasos, y generalmente la posicionan como una bacteria fijadora de nitrógeno e inductora de la ACC desaminasa, sin embargo, y de acuerdo a los resultados observados, todavía falta mucho por conocer acerca de esta bacteria.

El presente trabajo es el primer reporte sobre el aislamiento de *K. oryzae* en cultivo de la caña de azúcar en México, esto da una pauta significativa para posteriores aislamientos, identificaciones e investigaciones más concretas sobre los aportes benéficos o antagónicos que se puedan obtener con el uso o estudio de *K. oryzae*.

CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abeles, F.B. (1973) Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York.
- Bakker, M. G., Schlatter, D. C., Otto-Hanson, L., & Kinkel, L. L. (2013). Diffuse symbioses: roles of plant-plant, plant-microbe and microbe-microbe interactions in structuring the soil microbiome. *Molecular Ecology*. 23(6): 1571–1583.
- Bernard R. Glick (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 251 (2005) 1–7.
- Bloemberg, G. V., & B. J. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 343 – 350.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., & De Vos, P. (2013). *Taxonomic evaluation of the genus Enterobacter based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify E. nimipressuralis and E. amnigenus into Lelliottia gen. nov. as Lelliottia nimipressuralis comb. nov. and Lelliottia amnigena comb. nov., respectively, E. gergoviae and E. pyrinus into Pluralibacter gen. nov. as Pluralibacter gergoviae comb. nov. and Pluralibacter pyrinus comb. nov., respectively, E. cowanii, E. radicincitans, E. oryzae and E. arachidis into Kosakonia gen. nov. as Kosakonia cowanii comb. nov., Kosakonia radicincitans comb. nov., Kosakonia oryzae comb. nov. and Kosakonia arachidis comb. nov., respectively, and E. turicensis, E. helveticus and E. pulveris into Cronobacter as Cronobacter zurichensis nom. nov., Cronobacter helveticus comb. nov. and Cronobacter pulveris comb. nov., respectively, and emended description of the genera Enterobacter and Cronobacter*. *Systematic and Applied Microbiology* 36 (2013) 309–319.
- Cavalcante, V. A., & Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108(1), 23–31.
- Chak, K.F., Chao, D.C., Tseng, M.Y., Kao, S.S., Tuan, S.J., and T.Y., Fen. 1994. Determination and Distribution of cry-Type Genes of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 2415-2420.
- Chen, X., Liu, X., Zhang, X., Cao, L., & Hu, X. (2017). Phytoremediation effect of *Scirpus triquetus* inoculated plant-growth-promoting bacteria (PGPB) on different fractions of pyrene and Ni in co-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. 325: 319–326.
- Deikman, J. (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol. Plant*. 100, 561–566
- Duffy, B. K., & G. Défago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2429 – 2438.
- Dwivedi, M. (2020). *Gluconobacter*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. 521–544. family *Enterobacteriaceae*. *Curr. Microbiol*. 41 (6), 417e420.

- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*. 100(9): 1738–1750.
- Goudaa, S., R. G. Kerryb, G. Dasc, S. Paramithiotisd, H-S. Shine, & J. Kumar Patra. (2017). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 306, 131-140.
- Grobelaka, A., P. Kokota, D. Hutchisonb, A. Grossera, & M. Kacprzaka. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria as an alternative to mineral fertilizers in assisted bioremediation - Sustainable land and waste management. *Journal of Environmental Management*. 227, 1–9.
- Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong LY, Zhang LX. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biology Control*. 29, 66–72.
- Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal Experiment Botanic*. 53, 1–11.
- Hashem, A., B. Tabassum, & E. Fathi Abd-Allah. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26, 1291-1297.
- Hiscox, J. D., & G. F. Israelstam, (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57(12), 1332–1334.
- Inoue, K., Sugiyama, K., Kosako, Y. et al. *Enterobacter cowaniisp. nov.*, a New Species of the Family *Enterobacteriaceae*. *Curr Microbiol* 41, 417–420 (2000).
- Kämpfer, P., McInroy, J.A., Doijad, S., Chakraborty, T., Glaeser, S.P., 2016. *Kosakonia pseudosacchari sp. nov.*, an endophyte of *Zea mays*. *Syst. Appl. Microbiol.* 39 (1), 1e7.
- Kpombrekou-A, K., & M. A. Tabatabai. 2003. Effect of low-molecular weight organic acids on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soils. *Agriculture Ecosystems & Environment*. 100: 275 – 284.
- Kumar, B.L., & D. V. R. Sai Gopal. (2015). Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. Springer.
- Leal, J., Gutiérrez M., Castro L., Lares F., Cortes J. M., & de los Santos S. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo casa sombra. *Agrociencia*. 52, 1149-1159.
- Leite, M. F. A., Dimitrov, M. R., Freitas-Iório, R. P., de Hollander, M., Cipriano, M. A. P., Andrade, S. A. L., ... Kuramae, E. E. (2021). Rearranging the sugarcane holobiont via plant growth-promoting bacteria and nitrogen input. *Science of The Total Environment*, 800, 149493.
- Li, Y., Li, S., Chen, M., Peng, G., Tan, Z., & An, Q. (2017). Complete genome sequence of *Kosakonia oryzae* type strain Ola 51T. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1).
- Macauley, S., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2001). The Genus *Gluconobacter* and Its Applications in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 21(1), 1–25.
- Mehnaz, S. (2013). Microbes - friends and foes of sugarcane. *Journal of Basic Microbiology*, 53(12), 954–971.

- Mehnaz, S., Deeba N. B., and George L. (2010). Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Sugarcane Plants Growing in Pakistan. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2010), 20(12), 1614–1623.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews.* 37(5): 634–663.
- Mishra, P. & Dash, D. (2014). Rejuvenation of Biofertiliser for Sustainable Agriculture Economic Development Consilience. *Journal of Sustainable Development.* 11(1), 41-61.
- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vázquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 20(1), 68–83.
- Ose, T., Fujino, A., Yao, M., Watanabe, N., Honma, M. and Tanaka, I. (2003) Reaction intermediate structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *J. Biol. Chem.* 278, 41069–41076.
- Peng, G., Zhang, W., Luo, H., Xie, H., Lai, W., Tan, Z., 2009. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 (10), 1650e1655.
- Saravanan, V.S., M. Madhaiyan, Jabez Osborne, M. Thangaraju & T.M. Sa. (2007). Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. *Microbial Ecology.* 55(1), 130-140.
- Schlemper, T.R., Dimitrov, M.R., Silva Gutierrez, F.A.O., van Veen, J.A., Silveira, A.P.D., Kuramae, E.E., 2018. Effect of *Burkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense* strains on sorghum growth is plant genotype dependent. *PeerJ.* 6, e5346.
- Velázquez E., Rojas. M, Lorite M.J., Rivas R., Zurdo-Piñero J. L., Heydrich M. and Bedmar E. J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology* 2008, 48, 118–124.
- Vivanco, J. M. 2011. El ambiente rizosférico, el mundo oculto de la productividad agrícola. DIHP, INTAGRI. Celaya, México.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier., D. A., & Lane, D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology.* 173(2), 697-703.

CAPITULO VII. ANEXOS

7.1 Abreviaturas de las pruebas bioquímicas

Pocillo	Análisis	Abreviatura	Cantidad/ Pocillo
2	Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASA	APPA	0,0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0,1875 mg
4	L-PirrolidoniL-ARILAMIDASA	PryA	0,018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0,3 mg
7	D-CELOBIOSA	dCEL	0,3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASA	BGAL	0,036 mg
10	PRODUCCIÓN DE H ₂ S	H ₂ S	0,0024 mg
11	BETA-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA	BNAG	0,0408 mg
12	Glutamil Arilamidasa p NA	AGLTp	0,0324 mg
13	D-GLUCOSA	dGLU	0,3 mg
14	GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA	GGT	0,0228 mg
15	FERMENTACIÓN/GLUCOSA	OFF	0,45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASA	BGLU	0,036 mg
18	D-MALTOSA	dMAL	0,3 mg
19	D-MANITOL	dMAN	0,1875 mg
20	D-MANOSA	dMNE	0,3 mg
21	B-XILOSIDASA	BXYL	0,0324 mg
22	BETA-Alanina arilamidasa p NA	BAIap	0,0174 mg
23	L-Prolina-ARILAMIDASA	ProA	0,0234 mg
26	LIPASA	LIP	0,0192 mg
27	PALATINOSA	PLE	0,3 mg
29	Tirosina ARILAMIDASA	TyrA	0,0276 mg
31	UREASA	URE	0,15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg
33	SACAROSA	SAC	0,3 mg
34	D-TAGATOSA	dTAG	0,3 mg
35	D-TREALOSA	dTRE	0,3 mg
36	CITRATO (SODIO)	CIT	0,054 mg
37	MALONATO	MNT	0,15 mg
39	5-KETO-D-GLUCONATO	5KG	0,3 mg

40	Alcalinización de L-LACTATO	ILATk	0,15 mg
41	ALFA-GLUCOSIDASA	AGLU	0,036 mg
42	Alcalinización de SUCCINATO	SUCT	0,15 mg
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASA	NAGA	0,0306 mg
44	ALFA-GALACTOSIDASA	AGAL	0,036 mg
45	FOSFATASA	PHOS	0,0504 mg
46	Glicina ARILAMIDASA	Gly A	0,012 mg
47	ORNITINA DESCARBOXILASA	ODC	0,3 mg
48	LISINA DESCARBOXILASA	LDC	0,15 mg
52	BASE DESCARBOXILASA	ODEC	N / C
53	Asimilación de L-HISTIDINA	IHISa	0,087 mg
56	CUMARATO	CTM	0,126 mg
57	BETA-GLUCORONIDASA	BGUR	0,0378 mg
58	RESISTENCIA O/129 (comp. vibrio)	O129R	0,0105 mg
59	Glu-Gly-Arg-ARILAMIDASA	GGAA	0,0576 mg
61	Asimilación de L-MALATO	IMLTa	0,042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0,03 mg
64	Asimilación de L-LACTATO	ILATa	0,186 mg

7.2 Trabajo presentado en el V Congreso Nacional y III Internacional de Ciencias Agropecuarias del TECNM.



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



EL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
A TRAVÉS DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ROQUE

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

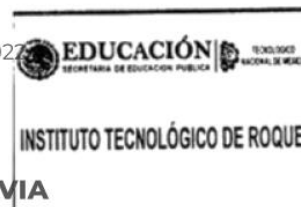
A

**MARIELA AGUILAR LINARES, M. LOURDES VELÁZQUEZ
HERNÁNDEZ**

POR LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO TITULADO “EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Bacillus sp.*, Y *Kosakonia oryzae* (BASONYM: *Enterobacter sp.*) EN EL CULTIVO DE JITOMATE PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL”, EN EL MARCO DEL V CONGRESO NACIONAL Y III INTERNACIONAL DE CIENCIAS AGROPECUARIAS DEL TECNM

ROQUE, CELAYA, OTO, 21 DE DICIEMBRE DE 2022

NAYELLI DEL CARMEN RAMIREZ SEGOVIA
DIRECTORA



REVISTA TECNOLÓGICA CEA

Difusión vía red de cómputo

<http://www.revistatecnologicacea.mx>

ISSN 25940414

Año 7, Núm. 18, Volumen III

Diciembre 2022

NUMERO ESPECIAL

MEMORIAS



V Congreso Nacional y III
Internacional de Ciencias
Agropecuarias del TECNM



28 de noviembre al 2 de diciembre de 2022. Celaya Gto. México.



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Bacillus* sp., Y *Kosakonia oryzae* (BASONYM: *Enterobacter* sp.) EN EL CULTIVO DE JITOMATE PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL

Mariela Aguilar-Linares* y M. Lourdes Velázquez-Hernández^{1§}

*Estudiante de posgrado, Tecnológico Nacional de México-Roque, ¹Investigador,

Tecnológico Nacional de México-Roque. §Autor de correspondencia:

maria.vh@losreyes.tecnm.mx

RESUMEN

Se sabe que la agricultura está posicionada como una de las actividades más importantes y practicadas del país, sin embargo, no es secreto que en la actualidad se está presentando una contaminación y desequilibrio ecológico en los suelos debido al uso constante e indiscriminado de los agroquímicos convencionales. En el presente proyecto se analizó el aislamiento de dos bacterias de género distinto que formen parte del grupo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) con las cuales sea posible que, al inocularlas en las plantas, estas promuevan su crecimiento, protección a los distintos tipos de estrés biótico y abiótico, así como su desarrollo. Para esto se llevaron a cabo distintas pruebas básicas bioquímicas para su primera identificación, así como su consecuente extracción de ADN para cada una, PCR's, electroforesis, y usos de kits de purificación de ADN para su identificación molecular. Dando como resultados la obtención de las bacterias *Bacillus* sp., y *Kosakonia oryzae* (basonym: *Enterobacter* sp.); estas se inocularon por un periodo de 10 semanas en plantas de jitomate variedad Rio Grande, de lo cual se obtuvieron los siguientes resultados: dentro de las variables de altura, grosor y número de frutos no se presentaron diferencias significativas, sin embargo no fue así en la producción de clorofila dado que las plantas que fueron inoculadas con ambas bacterias presentaron mayor producción en Clorofila A y Totales. Así pues, es posible posicionarlas como candidatas para su uso práctico dentro de los cultivos de la región y de este modo efficientizar la producción de clorofila en la planta y junto

con ello, mejorar la producción de fuente carbono en la planta y por ende en su desarrollo general.

Palabras clave: Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, Clorofila A, Proceso Fotosintético, Kosakonia

ABSTRACT

It is known that agriculture is positioned as one of the most important and practiced activities in the country, however, it is no secret that pollution and ecological imbalance are currently occurring in the soil due to the constant and indiscriminate use of conventional agrochemicals. In the present project, the isolation of two bacteria of different genera that are part of the group of plant growth promoting bacteria (PGPB) with which it is possible that, when inoculated into plants, they promote their growth, protection to the different types of biotic and abiotic stress, as well as their development. For this, different basic biochemical tests were carried out for their first identification, as well as their consequent DNA extraction for each one, PCR's, electrophoresis, and the use of DNA purification kits for their molecular identification. Resulting in the obtaining of the bacteria *Bacillus* sp., and *Kosakonia oryzae* (basonym: *Enterobacter* sp.); These were inoculated for a period of 10 weeks in Rio Grande variety tomato plants, from which the following results were obtained: within the variables of height, thickness and number of fruits there were no significant differences, however it was not so in the production of chlorophyll since the plants that were inoculated with both bacteria had higher production in Chlorophyll A and Totals. Thus, it is possible to position them as candidates for their practical use within the region's crops and in this way make the production of chlorophyll in the plant more efficient and along with it, improve the production of carbon source in the plant and therefore in its general development.

Keywords: Plant Growth Promoting Bacteria, Chlorophyll A, Photosynthetic Process, Kosakonia

INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las actividades humanas más antiguas y actualmente más importantes para el ser humano; el creciente número de población junto a su necesidad de abastecimiento alimenticio ha llevado a los agricultores al uso de distintos productos químicos que les ayuden tanto en la eficiencia de producción como en la salud de sus cultivos, sin embargo, este recurrente uso de agroquímicos ha llevado al desgaste del suelo, dependencia del cultivo y resistencia de plagas. La búsqueda de alternativas para aminorar el uso de estos productos ha comenzado a crecer, existe un grupo de bacterias, el cual ha demostrado actuar en conjunto con la planta y de este modo proporcionarles resistencia a los distintos tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, nutrición gracias a los distintos exudados que estas generan, conllevando por supuesto, a un mejor funcionamiento en general del cuerpo vegetal. El presente proyecto se aisló *Bacillus* sp. y *Kosakonia oryzae* las cuales son integrantes del grupo antes mencionado, esperando factibilidad al trabajar en conjunto resultados prometedores una vez que se inocularon en las plantas, para de este modo, sea posible hacer uso de ellas en forma práctica en diferentes cultivos de la región, proporcionando así una integración con los productos convencionales, aminorando el uso de estos y sus efectos negativos, así como apoyar en el bolsillo del propio productor.

MATERIALES Y MÉTODOS

El método utilizado para la extracción del *Bacillus* del suelo fue el reportado por Chak y colaboradores (1994). En el caso de *K. oryzae* se llevó a cabo tal como señala Cavalcante (1988) en su método de aislamiento para *Gluconacetobacter*. A ambas se les hizo la tinción de Gram, así como la técnica de prueba de catalasa y oxidasa. Para las extracciones de ADN se llevó a cabo según Akamatsu, (2000) con algunas modificaciones para *Bacillus* sp., y Ureta y colaboradores (1995) nuevamente con algunas modificaciones para *K. oryzae*., así como la purificación

de ADN que se llevó a cabo con el uso del kit ZYMO RESEARCH “Extracción de PCR de gel de agarosa”. La caracterización molecular fue la misma para ambas según Weisburg y colaboradores (1991). Y para los ensayos de antagonismo se llevó a cabo el crecimiento bacteriano en 10 ml de caldo nutritivo y en placas Petri con agar nutritivo, las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente durante 48 h para después llevar a cabo los siguientes estriados de ambas bacterias como se muestran a continuación:



Figura 1. Tipos de estria utilizados. Bacterias A ● y B ●.

Para los ensayos de inoculación: Planta de jitomate. Las semillas de jitomate se germinaron haciendo uso únicamente de agua, una vez logrado se plantaron en bolsas plásticas negras las cuales contenían 50 % arena y 50% sustrato humedecidos y mezclados perfectamente (2.7 kg de mezcla cada una). Las cuales fueron etiquetadas y rotuladas de acuerdo a la bacteria o bacterias que les fueron inoculadas, así como los que quedaron como testigos. En total fueron un total de 60 platos: 15 y 15 para una bacteria de forma individual, 15 para ambas bacterias y 15 quedaron como testigos. Para la preparación de los inóculos se crecieron ambas bacterias por separado en 300 ml de caldo nutritivo y se dejaron incubadas durante 48 h. Posteriormente se midió el nivel de absorbancia con el que cada caldo contaba y se hizo una aplicación de 6 ml más 4 ml de agua de riego para la inoculación de cada una de las plantas de jitomate. Estas fueron regadas únicamente con agua de riego mediante goteo sin agregar otro tipo de producto o componente salvo los microorganismos inoculados; lo cual se llevó a cabo dos veces en un periodo de 10 semanas. Las variables que se tomaron en cuenta en cuanto a fisiología y rendimiento fueron: altura y grosor de la planta, índice de contenido de clorofila,

rendimiento y número de tubérculos (Leal *et al.*, 2018). Y por último, para la cuantificación de clorofila se llevó a cabo con un protocolo modificado de Hiscox e Israelsta (1979).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras haber llevado la metodología y protocolos seleccionados se obtuvo un alineamiento con el 98% de identidad con una cepa de *Bacillus* sp., que fue reportada por la Unidad de Investigación de Genética y Mejoramiento de Cultivos en EE. UU. Por lo tanto, se confirma que tenemos una cepa de *Bacillus* sp., la cual fue llamada Bm3 de la cual no fue posible su identificación como especie. Para el segundo caso la identidad obtenida fue el 99% con una cepa de *Kosakonia oryzae*, presentada el 06 de junio del 2019 en el Departamento de Microbiología Agrícola, Instituto de Investigación y Colegio Agrícola, Madurai, Othakadai, , India. Confirmando así, la presencia de una cepa de *Kosakonia oryzae*, la cual fue llamada Km5 de la cual no fue posible su identificación como especie.

En los ensayos de inoculación en plantas y tras haber tomado medidas tanto de la altura como del grosor, así como la aparición de nuevos brotes y frutos durante un periodo de 10 semanas se cayó en cuenta que aparentemente no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las variables respecto al testigo; sin embargo, no fue el caso en el contenido de clorofila, donde las clorofilas A, B y totales, presentaron divergencias notables respecto una de otra. Las gráficas obtenidas se muestran a continuación, donde los resultados del bacilo se representan con el color azul, el endófito con naranja, ambas bacterias con gris y, por último, el testigo que fue representado con el color verde.

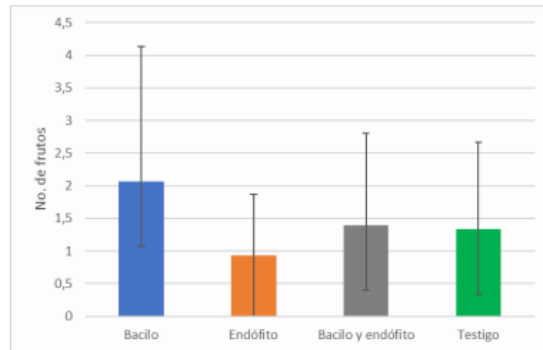


Figura 2. Gráfica del total de frutos.

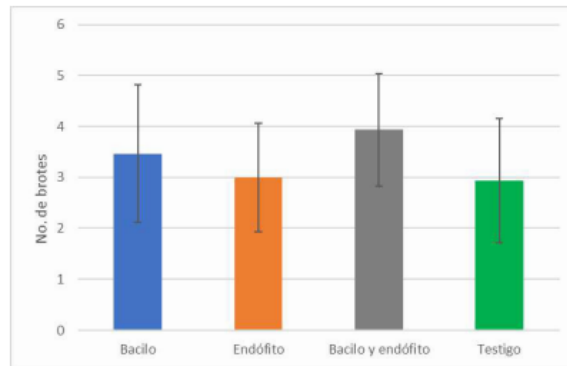


Figura 3. Gráfica del total de brotes.

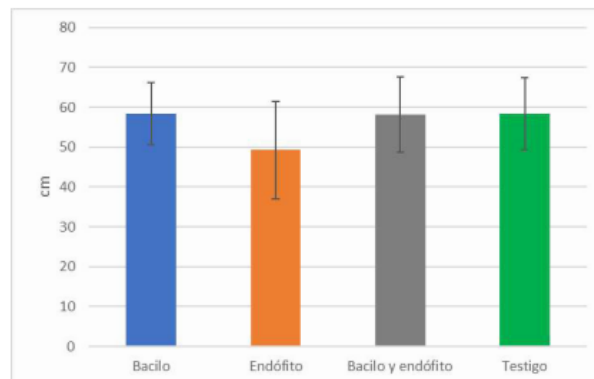


Figura 4. Gráfica de las alturas totales de los cuerpos vegetales.

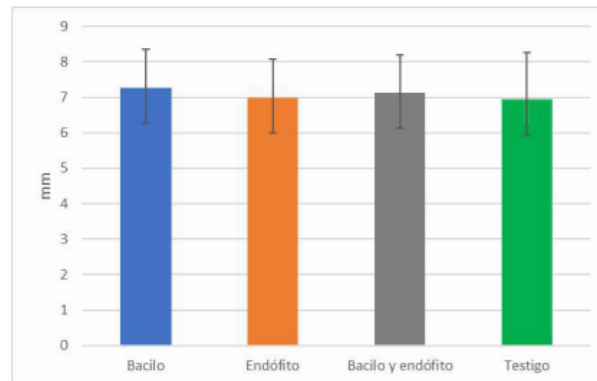


Figura 5. Grafica del grosor del tallo.

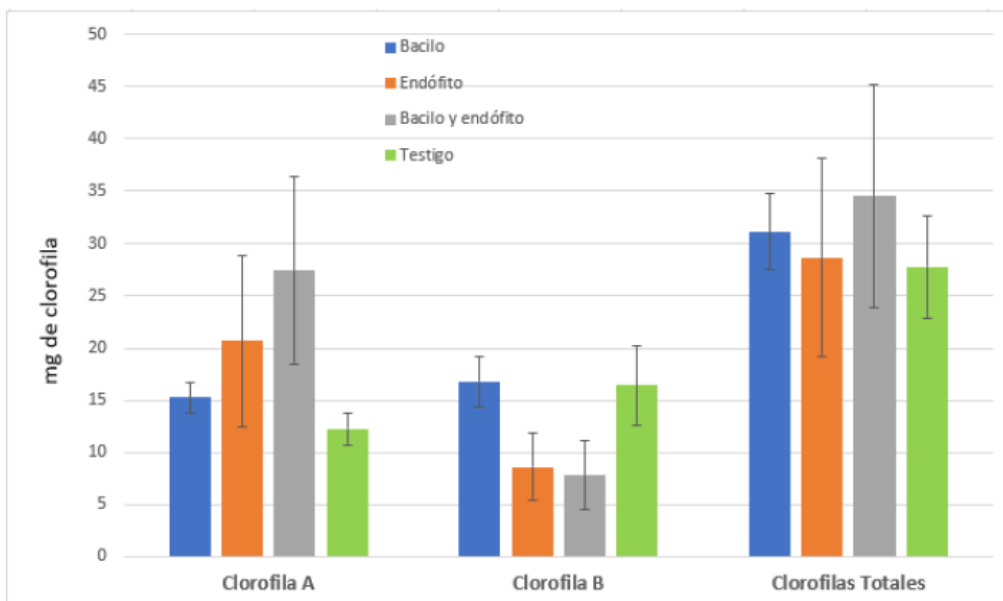


Figura 6. Grafica de las clorofilas A, B y Totales obtenidas de las hojas del cuerpo vegetal.

Debido a las diferencias que se mostraron en las gráficas, aun sin concluir que verdaderamente se tratara de una diferencia significativa, abre una puerta prometedora la obtención de nuevos resultados en caso de usar un mayor número

de testigos en la elaboración del ensayo; los resultados obtenidos en el presente proyecto muestran posibilidades acerca de otras aportaciones que pudieran efectuar ambas bacterias aisladas.

CONCLUSIONES

Cada bacteria tiene una función y forma especial de actuar en el cuerpo vegetal, y los resultados también varían en caso en caso de ser inoculadas tanto de forma individual como en conjunto. El presente proyecto fue un claro ejemplo de esto; tanto *Bacillus*, como *Kosakonia oryzae* cuando fueron inoculadas de forma individual no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las variables que se tomaron en cuenta, sin embargo, no fue así en el caso de la producción de clorofila dado que al momento de inocularlas en conjunto la producción de esta se vio en aumento mostrando una diferencia significativa en comparación a los testigos que no contenían ambos inóculos. Demostrando así la factibilidad del uso de BPDV en un plan de producción integrado para los cultivos. Por último, y no menos importante, es la brecha de posibilidades potenciales que aún quedan por demostrar tanto de ambas bacterias, como de las integrantes del grupo BPCV en general.

AGRADECIMIENTOS

Tecnológico Superior de Los Reyes

LITERATURA CITADA

- Bakker, M. G., Schlatter, D. C., Otto-Hanson, L., & Kinkel, L. L. (2013). Diffuse symbioses: roles of plant-plant, plant-microbe and microbe-microbe interactions in structuring the soil microbiome. *Molecular Ecology*. 23(6): 1571–1583.
- Bloemberg, G. V., & B. J. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 343 – 350.

- Cavalcante, V. A., & Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108(1), 23–31.
- Goudaa, S., R. G. Kerryb, G. Dasc, S. Paramithiotisd, H-S. Shine, & J. Kumar Patra. (2017). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 306, 131-140.
- Grobelaka, A., P. Kokota, D. Hutchisonb, A. Grossera, & M. Kacprzaka. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria as an alternative to mineral fertilizers in assisted bioremediation - Sustainable land and waste management. *Journal of Environmental Management*. 227, 1–9.
- Hiscox, J. D., & G. F. Israelstam, (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57(12), 1332–1334.
- Vivanco, J. M. 2011. El ambiente rizosférico, el mundo oculto de la productividad agrícola. DIHP, INTAGRI. Celaya, México.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier., D. A., & Lane, D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2), 697-703.

