



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA IDENTIFICACION DE
MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE
SIDEROFOROS Y EFECTO DE ESTOS EN LA
ASIMILACION DEL HIERRO POR LA PLANTA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA DEL ROSARIO VAZQUEZ GUTIERREZ

ASESOR: DR. GUILLERMO CARRILLO C.



1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE
GENETICA MOLECULAR DEL CENTRO DE GENETICA DEL
COLEGIO DE POSTGRUADOS, BAJO LA DIRECCION
DEL DR. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

Uno no siempre hace lo que quiere
pero tiene el derecho de no hacer
lo que no quiere.

M. B.

DEDICATORIA

A MIS PADRES: JULIA Y PEDRO
CON AMOR Y RESPETO POR HABERME
DADO LA VIDA Y DEPOSITAR EN MI SU
CONFIANZA.

A MIS HERMANOS: CARMEN, JUAN PABLO
JULY Y FRANCISCO POR TODO LO QUE RE-
PRESENTAN EN MI VIDA.

A MIS AMIGOS: GRACIAS

AGRADEZCO:

Al Centro de Genética y Fitopatología del Colegio de Postgraduados por la oportunidad y apoyo recibidos para la realización de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento brindado.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda por sus acertados consejos, ayuda y dirección en todo el desarrollo del trabajo.

Al M.C. Isaac Romero por su gran apoyo y ayuda siempre desinteresada, para la realización de parte de esta tesis.

Al Biól. Daniel Muñoz Iniestra, Biól. José Luis Andrade Torres, M.C. Ernesto Aguirre León y M.C. Gabriel Camarena Gutiérrez, por la revisión y valiosos consejos respecto a la corrección del trabajo.

A mi gran amiga y compañera Irma Castelán Sánchez por su valiosa ayuda y amistad.

A la Sra. Patricia González de Villaseñor por el excelente trabajo mecanográfico.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	i
INDICE DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. El papel fisiológico del hierro en las plantas.....	1
1.1.1. Clorosis férrica.....	3
1.1.2. Métodos para controlar la clorosis férrica....	4
1.2. Los sideróforos como moléculas transportadoras y solu- bilizadoras del hierro en los microorganismos.....	6
1.2.1. Estructura de los sideróforos.....	7
1.2.2. Propiedades físicas, químicas y biológicas de los sideróforos.....	10
1.3. Posible aplicación de los sideróforos en la agricul- tura.....	17
1.4. Objetivos.....	20
2. MATERIALES Y METODOS.....	21
2.1. Naturaleza de los reactivos.....	21
2.2. Material biológico.....	21
2.2.1. Cepas de microorganismos fitopatógenos.....	21
2.2.2. Cepas de microorganismos no fitopatógenos.....	22
2.2.3. Aislamientos.....	22
2.2.4. Vegetales superiores.....	22

2.3.	Medios de cultivo.....	22
2.3.1.	Medios para microorganismos.....	22
2.3.2.	Medios para la determinación de sideróforos....	23
2.3.3.	Medios para la identificación de los aisla- mientos.....	23
2.3.4.	Medios para el desarrollo de órganos vegetales <u>in vitro</u>	23
2.4.	Preparación de medios de cultivo.....	24
2.4.1.	Medio ALM y modificaciones.....	24
2.4.2.	Medio M y modificaciones.....	24
2.4.3.	Medio BK.....	25
2.4.4.	Medio EDC.....	26
2.4.5.	Medio HL.....	26
2.4.6.	Medio para la producción de levana.....	26
2.4.7.	Medio de Thornley.....	26
2.4.8.	Medio CN ^{2x} y modificaciones.....	26
2.5.	Generalidades.....	27
2.6.	Preparación de inóculos bacterianos.....	29
2.6.1.	Inóculo de las bacterias no fitopatógenas y aislamientos.....	29
2.6.2.	Inóculo de bacterias fitopatógenas.....	29
2.7.	Crecimiento de los cultivos bacterianos en medios M y M-Fe.....	29
2.7.1.	Evaluación del crecimiento en los medios M y M-Fe.....	30
2.8.	Bioensayo para la determinación de la inhibición.....	30
2.8.1.	Inhibición en medios sólidos.....	30
2.8.2.	Evaluación de la inhibición.....	30

2.9.	Identificación de los aislamientos.....	31
2.9.1.	Pruebas para la determinación del género.....	31
2.9.2.	Pruebas para la determinación de la especie....	33
2.10.	Elaboración del sobrenadante de medio gastado SG.....	35
2.11.	Obtención de plántulas de <u>Phaseolus vulgaris in vitro</u> ..	35
2.11.1.	Siembra del material vegetal en los medios de cultivo.....	35
2.11.2.	Inoculación y transferencia.....	35
2.12.	Efecto del sobrenadante de medio gastado (SG) sobre el desarrollo de plántulas de <u>Phaseolus vulgaris</u>	36
2.12.1.	Plántulas de <u>P. vulgaris</u> desarrolladas en medios con SG.....	36
2.13.	Efecto del SG sobre la sintomatología de plántulas de <u>P. vulgaris</u> inoculadas con <u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 123	36
2.13.1.	Siembra de los ápices de <u>P. vulgaris</u> e inoculación.....	36
2.13.2.	Transferencia a los medios CN ^{2x} con SG e inoculación.....	37
2.14.	Determinación de la translocación del principio activo presente en los SG.....	37
2.14.1.	Siembra del primer par de hojas unifoliadas y su posterior inoculación.....	37
3.	RESULTADOS.....	38
3.1.	Selección de los microorganismos para el estudio.....	38
3.2.	Bioensayos para determinar inhibición del crecimiento <u>in vitro</u>	47
3.3.	El posible papel de los sideróforos en el fenómeno inhibitorio.....	49

3.4. Efecto del sobrenadante de medio gastado en el desarrollo de la planta: absorción y translocación del sideróforo.....	57
3.5. Verificación de la translocación de los sideróforos mediante un microorganismo de prueba.....	60
3.6. Identificación taxonómica de los aislamientos productores del compuesto inhibitorio.....	70
4. DISCUSION.....	74
5. CONCLUSIONES.....	81
6. APENDICE.....	83
7. BIBLIOGRAFIA.....	93

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO		Pág.
1	Estimación del grado de desarrollo alcanzado por los microorganismos fitopatógenos en medios deficientes en hierro.	39
2	Estimación del grado de desarrollo alcanzado por los microorganismos no fitopatógenos y aislamientos en medios deficientes en hierro.	40
3	Velocidades de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos en los medios M, M-Fe y MG, MG-Fe.	42
4	Velocidades de crecimiento de los microorganismos no fitopatógenos y aislamientos en los medios M y M-Fe.	43
5	Evaluación preliminar de la inhibición provocada a las 72 h de incubación por once cepas de microorganismos no fitopatógenos y aislamientos sobre seis cepas de microorganismos fitopatógenos, en los medios AM-Fe y AMG-Fe.	48
6	Estimación semicuantitativa de la inhibición provocada a las 72 h de incubación por seis cepas de los aislamientos y <u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 3 y CP Mex 46 sobre seis microorganismos fitopatógenos.	50
7a	Interferencia microbiana promovida por aislamientos y cepas de <u>Rhizobium phaseoli</u> a las 72 h de incubación.	52
7b	Interferencia microbiana promovida por aislamientos a las 72 h de incubación.	53
8a	Efecto de los sobrenadantes de medio gastado de los aislamientos A3, A5, A9, A10 y <u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 46 sobre el desarrollo de la clorosis en plántulas de frijol Negro 150.	59
8b	Efecto de los sobrenadantes de medio gastado de los aislamientos A3, A5, A9, A10 y <u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 46 sobre el desarrollo de la clorosis en plántulas de frijol Canario 107.	59

CUADRO		Pág.
9	Verificación del comportamiento de los sobrenadantes de medio gastado sobre el desarrollo de la clorosis en plántulas de frijol Negro 150.	61
10	Evaluación porcentual del desarrollo de ápices y hojas de frijol Negro 150 incubadas en medios preparados con sobrenadante de medio gastado del aislamiento A10 y <u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 46.	63
11	Efecto de los sobrenadantes de medio gastado de <u>R. phaseoli</u> CP Mex 46 y del aislamiento A10 sobre la aparición de síntomas producidos por <u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 123 en franjas centrales de frijol Negro 150.	66
12a	Efecto de los sobrenadantes de medio gastado del aislamiento A10 y <u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 46 sobre la aparición de síntomas producidos por <u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 123 en franjas centrales de hoja de frijol Negro 150.	68
12b	Efecto de los sobrenadantes de medio gastado del aislamiento A10 y <u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 46 sobre la aparición de síntomas producidos por <u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 123 en franjas centrales de hoja de frijol Canario 107.	69
13	Evaluación de los ensayos realizados en cinco aislamientos para la determinación del género y especie.	71
14	Descripción de los rasgos específicos de <u>Pseudomonas fluorescens</u> y <u>Pseudomonas putida</u> .	73
FIGURA		
1	Esquema comparativo de la eficiencia de desarrollo de los microorganismos fitopatógenos.	45
2	Esquema comparativo de la eficiencia de desarrollo de los microorganismos no fitopatógenos y aislamientos.	46
3	Inhibición en el desarrollo de <u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 123 en el medio AMG-Fe (derecho), provocado por las cepas A10, CP Mex 46 y 7SRI arriba. Y las cepas A3, CP Mex 3 y A5 (abajo) y reversión del fenómeno inhibitorio en el medio AMG+3Fe (izquierda).	54

FIGURA		Pág.
4	Diagrama que muestra la obtención de plántulas de frijol, a partir de los ápices de tallo.	58
5	Diagrama que muestra los pasos seguidos para la determinación de una posible translocación del principio activo presente en los sobrenadantes de medio gastado en plántulas de frijol.	64
6	Diagrama que muestra el corte de hojas, siembra, inoculación e incubación, con objeto de visualizar la posible translocación del principio activo presente en los sobrenadantes de medio gastado.	65

INDICE DE ABREVIATURAS

A 3	Aislamiento A 3
A 5	Aislamiento A 5
A 9	Aislamiento A 9
A 10	Aislamiento A 10
A 11	Aislamiento A 11
A 12	Aislamiento A 12
CP Mex 3	<u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 3
CP Mex 7	<u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 7
CP Mex 19	<u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 19
CP Mex 46	<u>Rhizobium phaseoli</u> CP Mex 46
F 34	<u>Rhizobium meliloti</u> F 34
7 SRI	<u>Pseudomonas</u> sp 7SRI
CBP 123	<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 123
CBP 140	<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 140
CBP 147	<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 147
Frijol común	<u>Phaseolus vulgaris</u> : Canario 107 y Negro 150
Medio ALM	Medio agar levadura manitol
Medio CLM	Medio caldo levadura manitol
Medio CLG	Medio caldo levadura glucosa
Medio ALG	Medio agar levadura glucosa
Medio M	Medio mínimo para <u>Rhizobium</u>
Medio M-Fe	Medio M sin FeCl ₃
Medio M+3Fe	Medio M con 1.85×10^{-5} M de Fe Cl ₃

Medio MG	Medio M glucosa
Medio MG-Fe	Medio MG sin FeCl_3
Medio MG+3Fe	Medio MG con $1.85 \times 10^{-5} \text{M}$ de FeCl_3
Medio CN^{2x}	Medio de Creswell y Nitsch modificado
Medio CN^{2x} -Fe	Medio CN^{2x} carente de hierro
Medio CN^{2x} -Fe-h-s	Medio CN^{2x} carente de hierro, hormona ni sacarosa
Medio CN^{2x} SG-h-s	Medio CN^{2x} suplementado con sobrenadante de medio gastado sin hormona ni sacarosa
Medio CN^{2x} -Fe SG-h-s	Medio CN^{2x} suplementado con sobrenadante de medio gastado carente de hierro sin hormona ni sacarosa
SG	Sobrenadante de medio gastado de cultivos bacterianos
Fe^{++}	Ion ferroso
Fe^{+++}	Ion férrico
M	Molaridad
N	Normalidad
ac.	Acidos
nm	Nanómetros
μ	Micras
NAD	Nicotinaminadenín dinucleótido oxidado

RESUMEN

El conocimiento del mecanismo de inhibición promovido por la presencia de sideróforos provee una posibilidad para diseñar y probar una metodología destinada a corregir deficiencias de hierro en el suelo, logrando complementariamente con esta aplicación la reducción de los efectos de algunas enfermedades infecciosas en plantas.

En el presente trabajo se estimó la capacidad de crecimiento en medios deficientes en hierro de 10 microorganismos fitopatógenos, 6 no fitopatógenos y 7 aislamientos. A partir de esto se seleccionaron 6 microorganismos fitopatógenos y 11 no fitopatógenos y aislamientos.

Se determinó el grado y la forma de inhibición de los microorganismos no fitopatógenos sobre los 6 microorganismos fitopatógenos (Agrobacterium tumefaciens, Corynebacterium fascians, Xanthomonas campestris Xanthomonas phaseoli C B P 123, C B P 140 y C B P 147). Los resultados obtenidos mostraron que el aislamiento A10 y Rhizobium phaseoli CP Mex 46 inhiben fuertemente a las cepas de Xanthomonas phaseoli, en especial a la cepa C B P 123 mediante el uso de sideróforos.

Los bioensayos realizados para la determinación de la translocación y asimilación del complejo ferrisideróforo indicaron que no existe tal translocación en plantas y hojas de frijol.

El efecto de inhibición de los sobrenadantes de medio gastado observado in vitro no pudo ser detectado en un sistema in vivo de interacción

planta-patógeno. La identificación taxonómica demostró que los aislamientos utilizados pertenecen a la especie Pseudomonas fluorescens.

1. INTRODUCCION

1.1. El papel fisiológico del hierro en las plantas

Las plantas en presencia de luz, bióxido de carbono atmosférico y sales minerales se desarrollan sanas.

Para el funcionamiento correcto y la existencia misma de la planta son necesarias una gran variedad de sales minerales, las que se absorben del suelo por medio de las raíces, transportándolas por xilema y floema. Diez elementos son requeridos en cantidades considerables: éstos son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, magnesio, potasio, hierro y calcio llamados macrometabólicos. El aluminio, cloro, silicio y sodio son conocidos como elementos micrometabólicos. Además de ellos se admiten seis elementos vestigiales que son necesarios para el crecimiento de las plantas, ellos son el boro, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno y zinc (Cronquist, 1977).

Cuatro de estos elementos se encuentran presentes en la atmósfera, carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, mientras que los restantes son derivados de las rocas que constituyen el suelo.

El hierro en particular se presenta en un 5% de los revestimientos de la tierra, y en el suelo el hierro suele encontrarse en los minerales como las arcillas, óxidos e hidróxidos, pero en muchos casos éste suele ser extremadamente insoluble, estando en las formas de hematita, magnetita, limonita, pirita y burnita.

Cabe señalar en particular que el hierro sobresale por su versatilidad como un catalizador biológico, encontrándose en dos estados de oxidación férrica y ferrosa (Emery, 1977).

El hierro en las plantas ha sido extensamente estudiado ya que se conoce que juega un papel muy importante en la nutrición vegetal. La forma de absorción es generalmente la ferrosa, pero ésta puede reducirse a partir de Fe^{+++} en la superficie de las células. Parece ser que la forma ferrosa es la que presenta una mayor capacidad para la nutrición vegetal.

El transporte del ion ferroso a través de las raíces hacia el xilema involucra la formación del complejo ion-citrato. Esta es una forma quelada estable que previene la precipitación del hierro con otros aniones. Casi siempre el hierro permanece en forma compleja, permitiendo así su solubilidad (Devlin, 1980).

El hierro en especial es un constituyente esencial de las enzimas peroxidasa (destruye el peróxido de hidrógeno), catalasa y citocromo oxidasa (interviene en el final de la cadena respiratoria). Es indispensable en la síntesis de los anillos pirrólicos que pertenecen a la constitución química de la molécula de clorofila.

El hierro también participa en el sistema de reóox de la fotosíntesis mediante la ferredoxina, así como en las reducciones de sulfato y nitrito y en la fijación de nitrógeno atmosférico (Rodríguez, 1982).

El hierro remanente es almacenado en una fosfoproteína férrica llamada fitoferritina, usada posteriormente para el desarrollo de plástidos. Los cloroplastos con los organelos más ricos en hierro conteniendo del 70 al 90% del hierro total de la planta (Price *et al.*, 1972).

1.1.1. Clorosis férrica

Las plantas superiores son los organismos que demandan y requieren una mayor cantidad de hierro en comparación con los animales, llegando a contener de 6 a 7 veces más hierro en peso seco. Parte de este requerimiento puede deberse a la necesidad para la síntesis de clorofila (Emery, 1977).

La deficiencia en hierro llamada clorosis férrica es debida en gran parte a la poca movilidad del hierro en los tejidos vegetales. La carencia aparece primero en las hojas jóvenes y retoños que pierden su color verde. En una primera fase amarillean las hojas entre los nervios, aunque éstos siguen conservando su color verde. En casos más graves los nervios se tornan amarillos y la hoja se vuelve completamente blanquecina. Las hojas permanecen sin deformación. La vid y los frutales son los cultivos donde se da con mayor frecuencia la clorosis férrica (Tiedale et al., 1985).

Por lo general los suelos tienden a estar bien provistos de hierro, pero su disponibilidad está en estrecha dependencia con el pH del suelo. Cuando el hierro se encuentra en estado ferroso es transportado y asimilado con facilidad, generalmente esto ocurre a pH ácido de 3. Pero en suelos básicos donde el hierro se oxida a la forma férrica, la baja solubilidad de los compuestos que contienen hierro limita severamente la posibilidad y eficacia de su obtención (Brown, 1976).

En algunos casos las excreciones de las raíces y los complejos orgánicos hacen asimilables las formas férricas.

Existen ciertos factores que afectan considerablemente el movimien-

to del hierro en el suelo; el primero de ellos es el exceso de carbonatos y bicarbonatos en el agua de riego, que aumenta excesivamente el pH seguido del antagonismo o competitividad iónica con el zinc, cobre, cobalto y manganeso, así también la falta de drenaje, pobre aireación y bajas temperaturas que reducen la actividad de las raíces. Cuando el hierro se encuentra en condiciones limitantes los microorganismos lo oxidan a formas no asimilables disminuyendo aún más su disponibilidad (Rodríguez, 1982).

Los elementos involucrados dentro de la nutrición vegetal se encuentran interrelacionados de una forma muy compleja, de tal manera que un aumento o disminución en el suministro de cualquiera de ellos influye directa o indirectamente en la necesidad de él o de los demás.

1.1.2. Métodos para controlar la clorosis férrica

Wallace y Lunt en 1960 (Brown, 1976), indicaron que del 25 al 30% de la superficie terrestre es calcárea, esto indica que la clorosis férrica es un problema universal.

Se tiene conocimiento que desde 1844 fue reportada la deficiencia de este elemento en plantas cítricas y posteriormente se empezaron a usar métodos de control de la clorosis, supliendo el hierro por inyección en los troncos y aspersión en las hojas.

En la actualidad se conocen varios métodos de control, entre los más usados están las aplicaciones de azufre, estiércol y abonos verdes que reducen la excesiva alcalinidad. Las aportaciones de sulfato férrico en forma quelada y el injertar a variedades susceptibles tallos de plantas resistentes a la clorosis han dado buenos resultados (Brown, 1976).

Con excepción del sulfato férrico la manera más común de suplir y hacer asimilable a la planta este elemento es en forma quelada. Los quelantes sintéticos más comúnmente usados son el EDTA (etilendiamino-tetracético), EDDHA (etilendiamino di-*o*-hidroxifenilacetato) y el HEDTA (hidroxietilendiaminotetra-acético), donde la manera de actuación de cada uno de ellos va a depender del pH del suelo. Estos han sido de gran ayuda ya que facilitan la obtención del hierro acercándolo a la superficie de las raíces. Ellos además de formar complejos con el hierro, pueden también hacer asimilables otros elementos como el magnesio y zinc.

Existen ciertos cultivos como el maíz, cacahuate, sorgo, soya y tomate que presentan un comportamiento de tolerancia frente a la clorosis; dicha capacidad está determinada por el genotipo de cada planta, que le permite hacer el suelo más ácido, esto posibilita que el hierro se transforme en una forma asimilable. A este tipo de plantas se les ha denominado fierro-eficientes. Es de esperarse que no en todas las especies de importancia económica se dé este tipo de fenómeno, debido a lo cual se ha venido intensificando el trabajo en la obtención de variedades fierro-eficientes por mecanismos genéticos (Brown, 1976). Cabe añadir que el control genético ha sido extensamente aplicado en cítricos.

La capacidad de cada planta para absorber y translocar el hierro parece ser un proceso de control genético adaptativo, que responde a la deficiencia en hierro.

Algunas de las reacciones bioquímicas que ocurren en las raíces de las plantas que permiten tolerar y adaptarse a tal deficiencia son: excreción de iones hidronio, reducción de Fe^{+++} a Fe^{++} , aumento de ácidos orgánicos en la savia de las raíces, transporte adecuado del hierro en

todos los tejidos de la planta y una baja acumulación de fósforo (Tisdale et al., 1985).

1.2. Los sideróforos como moléculas transportadoras y solubilizadoras del hierro en los microorganismos

La mayoría, si no todos los microorganismos incluyendo los hongos requieren hierro para crecer, la concentración de hierro varía de 0.4 a 4×10^{-6} M en el medio. A pH básicos arriba de 6 la solubilidad es de aproximadamente 4×10^{-36} M. Para superar esto los microorganismos han desarrollado la capacidad de sintetizar quelantes de bajo peso molecular, los cuales atrapan el hierro externo y lo hacen asimilable. Estos quelantes han sido denominados sideróforos (Bezkorovainy, 1980).

Un sideróforo puede ser definido como un compuesto de bajo peso molecular de aproximadamente 500 a 1000 daltons y que presenta una alta afinidad por el ion férrico. La biosíntesis es regulada por el hierro y en forma de complejo es reconocido por receptores de membrana específicos. Son sintetizados por microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos, principalmente hongos, bacterias y microalgas (Neilands, 1981).

Existen ciertos criterios preliminares para designar un producto natural dentro de la categoría de un sideróforo, éstos son: la represión de su formación por hierro, la gran especificidad por el ion férrico en comparación con el ion ferroso y la incapacidad de las mutantes o de las cepas que son incapaces de sintetizar estos compuestos o sus receptores de membrana para adquirir el hierro en forma compleja (Frederick et al., 1981).

La nomenclatura de estos compuestos es confusa, ya que se les ha asignado nombres triviales como ferricromo, coprógeno y micobactina. El primero fue aislado del hongo Ustilago sphaerogena en 1952, definido como un factor que no presenta actividad antibiótica ni mortífera. Los dos últimos fueron obtenidos como factores de crecimiento, el coprógeno de Epicocum purpurascens y la micobactina del género Micobacterium (Neilands, 1981).

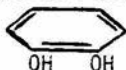
Los sideróforos además de ser utilizados por las cepas productoras, pueden también ser usados por microorganismos homólogos y heterólogos (Bezkorovainy, 1980).

1.2.1. Estructura de los sideróforos

El hierro en los sideróforos es generalmente quelado en estado férrico por las ligaduras del oxígeno, formando un complejo hexadentado octaedral (Neilands, 1981). Los sideróforos presentan una alta afinidad al ion férrico con una constante de asociación de 10^{30} .

Desde el punto de vista de su estructura química existen dos tipos de sideróforos. Los compuestos de tipo catecol-fenolato y los de tipo hidroxamato. Existen sin embargo numerosos sideróforos que no se encuentran dentro de esta clasificación.

Se ha observado que los sideróforos tipo hidroxamato están presentes en hongos, levaduras y bacterias, mientras que los de tipo catecol son exclusivos de bacterias.

Los sideróforos tipo catecol pueden ser químicamente reconocidos por presentar en su estructura un anillo aromático  (Emery,

1977). Existe un número muy limitado de sideróforos que pueden ser clasificados dentro de este grupo. El miembro mejor conocido es la enteroquelina o enterobactina, aislada de los cultivos de Aerobacter aerogenes, Salmonella typhimurium LT 2 y Escherichia coli K-12. La enteroquelina se le considera perteneciente a las enterobacterias, pero no se restringe sólo a estos microorganismos.

El primer sideróforo tipo catecol aislado fue el 2, 3-dihidroxibenzoil glicina de Bacillus subtilis en 1958.

La agrobactina, parabactina y la espermidina son compuestos que han sido también clasificados dentro de este grupo. Dentro de estos compuestos cabe mencionar que sólo la enteroquelina y la agrobactina puede unir un átomo de hierro por molécula de sideróforo (Bezkorovainy, 1981).

Los sideróforos tipo hidroxamato son derivados de varios ácidos hidroxámicos. Se tiene conocimiento de su existencia desde principios de siglo, aunque su verdadera función no fue establecida hasta 1950. Estructuralmente estos compuestos están caracterizados por la presencia de grupos hidroxilos en los átomos de nitrógeno - N - OH, donde el grupo - OH sirve como un ligando de hierro perdiendo su protón al unirse al hierro. Se conoce una gran variedad de este tipo de compuestos.

Los sideróforos tipo hidroxamato se han clasificado en 7 familias (Bezkorovainy, 1981):

1a. Familia las ferrioxaminas. Estos compuestos se caracterizan por la presencia de un α -amino- ω -hidroxiaminoalcano, en forma lineal o cíclica. Se presentan en todos los actinomicetos. El desferal (desferroxamina B y desferrioxamina B) fue el primer compuesto de este tipo del que se elucidó su estructura.

2a. Familia los ferricromos. Presentan en su estructura aminoácidos y otros substituyentes. Un aminoácido común en todos ellos es la L-ornitina, siendo éste específico para ser reconocido por la membrana. Los ferricromos se encuentran en los ascomicetos, basidiomicetos y hongos imperfectos.

3a. Familia del ácido rodoturúlico. Estos compuestos son producidos por levaduras como Neurospora y hongos de penicilina. Son péptidos cíclicos que presentan un substituyente de 8- N- hidroxil-L-ornitina. Son requeridas 3 moléculas de ac. rodoturúlico para unir 2 átomos de hierro. Otro compuesto que se incluye dentro de esta familia es el coprógeno.

4a. Familia las aerobactinas. Se caracterizan por tener citrato en su constitución. Los sideróforos mejor conocidos son la aerobactina sintetizada por Aerobacter aerogenes y la esquizoquinona por Bacillus megaterium. Ellos pueden unir un átomo de hierro por molécula de sideróforo.

5a. Familia las micobactinas. Son compuestos liposolubles asociados con varias especies de micobacterias. Estructuralmente están conformadas por elementos de tipo hidroxamato y catecol; muchos de ellos presentan ac. grasos como substituyentes. Cada molécula de micobactina puede unir un átomo de hierro.

6a. Familia las exoquelinas. Son un grupo de sideróforos de bajo peso molecular que se encuentran en cultivos de Mycobacterium smegmatis, presenta una importante función en la adquisición de hierro para las micobacterias y pueden éstas interactuar con las micobactinas que se encuentran en la membrana celular. Su estructura no ha sido definida.

7a. Familia las fusarinas. Estos compuestos se presentan en los cultivos de Fusarium. La fusarina es un complejo 8- N- hidroxil-L-ornitina y ac. cis-8- metilglutacónico, se presenta en forma linear o cíclica. Cada unidad de fusarina provee dos ligaduras para el hierro.

1.2.2. Propiedades físicas, químicas y biológicas de los sideróforos

La solubilidad de los sideróforos tipo catecol es variable, son escasamente solubles en soluciones acuosas en estado neutral, aunque la solubilidad se incrementa sobre la unión del hierro. Son solubles en solventes orgánicos con altas constantes dieléctricas, como la acetona, alcohol y éter.

Los sideróforos tipo hidroxamato son solubles en medios acuosos, tanto en forma libre como compleja. Sólo una excepción es presentada por las micobactinas, las cuales son insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos.

Las constantes de estabilidad del complejo son extremadamente altas, esto es debido a la función que éstos desempeñan, que es la de mantener unido el hierro en soluciones a pH neutros, así como la de competir exitosamente por el hierro con las transferrinas. El sideróforo enteroquelina es el que posee la constante de estabilidad más alta (Bezkorovainy, 1980).

Todos los sideróforos presentan una absorción máxima en el rango de luz ultravioleta y en el rango visible cuando se coordina con hierro.

La gran mayoría de los complejos son coloreados por adición de cloruro férrico o perclorato férrico al medio gastado, siendo éste un méto-

do para detectar la presencia de sideróforos. En los sideróforos hidroxamato se presenta un color naranja con una máxima absorbencia de 425 a 450 nm, mientras que los de tipo catecol el color es vino y la máxima absorbencia es a 495 nm. Sólo las micobactinas absorben a 450 nm.

Los catecoles son generalmente detectados con el reactivo de Arnow (nitrato-molibdato), siendo una prueba selectiva para los grupos de anillos aromáticos (Neilands, 1981).

Los hidroxamatos pueden ser detectados con el reactivo de Folin o por oxidación con periodato de yodo, esta última prueba llamada de Casaky. Es la prueba más conocida pero difícil de cuantificar (Kushner et al., 1983).

Recientes investigaciones demuestran la existencia de más de un método para detectar y caracterizar sideróforos. Kushner et al., en 1983 describieron un método para detectar ac. hidroxámicos, usando clorhidrato de titanio. Es un método rápido y no requiere instrumentos especiales. Por otra parte Rioux et al., en 1983 reportaron un método para detectar compuestos catecólicos por medio de determinaciones colorimétricas, esta prueba se basa en la reducción de Fe^{+++} a Fe^{++} por los grupos hidroxilo.

Por otro lado los solventes más usados para la extracción de sideróforos son: el etil-acetato para los de tipo catecol y el alcohol-benzil o cloroformo-fenol 1:1 para el grupo hidroxamato. La extracción representa un paso en la purificación del compuesto (Neilands, 1981).

Una de las áreas de interés dentro de la fisiología de los sideróforos es la forma en que éstos son biosintetizados, así como la manera en que el hierro es transportado y asimilado por la célula.

La biosíntesis de los sideróforos tipo catecol es producto del ácido corísmico, este ácido es también intermediario en la biosíntesis de la fenilalanina y la tirosina en microorganismos.

Las vías biosintéticas para los sideróforos tipo hidroxamato para poder ser entendidas deben de ser estudiadas caso por caso, debido a la gran variedad de sideróforos conocidos y al respecto se tiene poca información. Se cree que la hidroxilación de cada grupo amino se lleva a cabo enzimáticamente usando como substratos aminoácidos libres y oxígeno. Los N -hidroxiaminoácidos y otros hidroxamatos, así biosintetizados pueden formar uniones peptídicas con otros aminoácidos por un mecanismo diferente al de la biosíntesis de proteínas, no involucrando el código genético.

Con lo referente al control de la biosíntesis de sideróforos, éstos son usualmente obtenidos a partir de un cultivo de microorganismos crecidos en medios deficientes en hierro. Este recurso pretende inducir la producción de todo un sistema enzimático y de proteínas receptoras de membrana, cuya función es asegurar un adecuado suplemento de hierro al microorganismo. Bajo condiciones donde el suplemento de hierro es adecuado, la biosíntesis de enzimas y proteínas es reprimida (Bezkorovainy, 1980). La expresión de tal mecanismo de control al menos en las enterobacterias que pueden utilizar el hierro de las enteroquelinas, así como de los ferricromos es expresado de la siguiente manera. Los niveles enzimáticos involucrados en la biosíntesis de la enteroquelina, así como los responsables de la degradación intracelular del complejo son elevados, los componentes responsables de la obtención celular del hierro en forma compleja son elevados, existe un incremento en los niveles de ciertas proteínas de membrana externa.

El transporte y asimilación del ferrisideróforo (el ion férrico en forma compleja) a la célula, está ejemplificado en tres mecanismos básicos (Bezkorovainy, 1980).

Primer mecanismo. El sideróforo enteroquelina obtiene el hierro y ya en forma compleja es introducido, el hierro es separado del sideróforo por una hidrolización enzimática posterior, esta hidrolización ocurre por medio de una esterasa, las rupturas se presentan sobre las uniones seril-serina que se relacionan con el hierro. Antes de que el complejo penetre a la célula, éste se combina con un receptor específico de membrana. En este caso el receptor es una proteína con peso molecular de 75 000 a 90 000 daltons y su biosíntesis es promovida en condiciones de deficiencia en hierro.

Segundo mecanismo. Este mecanismo está ejemplificado por los ferri-cromos, donde el complejo primero es introducido y posteriormente el hierro es removido por reducción al estado ferroso, finalmente el sideróforo es reexcretado al medio.

Tercer mecanismo. Este mecanismo de adquisición se presenta en las micobacterias y organismos que utilizan el ácido rodotorúlico. Dentro de este mecanismo intervienen dos clases de compuestos, los solubles y los insolubles. En las micobactinas los compuestos solubles son usados para quelar el hierro, en este caso en particular son usados los silicatos y las exoquelinas, éstos intercambian el hierro con las micobactinas, compuestos insolubles que se encuentran localizados en la porción lipofílica de la superficie celular. Las micobactinas translocan el hierro al interior de la célula, donde es reducido por un sistema de oxidorreductasa dependiente del NAD, siendo así removido el hierro del sideróforo.

La obtención del hierro mediante la utilización de sideróforos es un proceso que requiere energía, ya que se lleva a cabo mediante un transporte netamente activo. Esto puede ser demostrado usando inhibidores metabólicos como la cianidina, dinitrofenol y bajo condiciones anaeróbicas. Se demostró en Bacillus subtilis que el mecanismo es termodependiente, presentando un óptimo de 37°C (Peters y Warren, 1968).

Los sideróforos aparte de ser considerados como solubilizadores y transportadores de hierro, pueden actuar como factores de germinación o de crecimiento. Esto fue estudiado por Mc Craken y Swinburne (1979) quienes usando células de Pseudomonas sp UV 3 crecidas en medios deficientes en hierro e incubadas con conidios de Colletotrichum musae, comprobaron la alta capacidad estimuladora en la germinación, ocasionado por los sideróforos tipo hidroxamato. Se ha encontrado también que ellos son esenciales para la germinación de ascosporas de Neurospora crassa.

Se han presentado resultados recientes donde mutantes de Erwinia chrysantemi resistentes a las bacteriocinas fueron incapaces de inducir síntomas de la enfermedad en plantas. La baja patogenicidad fue correlacionada con la ausencia de tres polipéptidos de membrana externa. La producción de estas proteínas en cepas silvestres se realiza en condiciones limitantes de hierro. Se observa con ello que los componentes de membrana expresan la patogenicidad de la bacteria y con ello se aumenta la capacidad de reconocimiento de los sideróforos. Tal patogenicidad puede involucrar una competitividad entre la capacidad del hospedero de negar el hierro y la capacidad de la bacteria de recuperar este vital ion para iniciar la infección (Expert y Toussaint, 1985).

Una de las tantas preguntas que se han venido haciendo con respecto a la naturaleza de los sideróforos, es si ellos pueden también ser encontrados en animales y plantas. Se tiene conocimiento de que aún no ha sido aislada ninguna molécula con las características de un sideróforo en tejidos de organismos superiores (Neilands, 1981).

El citrato y los ácidos orgánicos son constituyentes muy comunes en las plantas y se les considera como factores importantes dentro del metabolismo del hierro (Cline et al., 1981).

En animales se tiene conocimiento que mutantes de células de mamíferos transformadas (BALB13T3) adaptadas a crecer en ácido piolínico forman compuestos con ligaduras de hierro llamados sideróforo-factor de crecimiento (SGF), se demostró que estimula la absorción de hierro, pero aún no han sido definidos químicamente.

Se conoce que células normales de mamífero no son capaces de producir sustancias tipo sideróforo en respuesta a la deficiencia en hierro (Neilands, 1981).

Aún cuando este tipo de compuestos no se presenta en plantas y animales en condiciones normales, existen en ellos moléculas con una función homóloga dentro del metabolismo del hierro.

El ser humano en condiciones normales tiene entre 4 y 5 g de hierro, de los cuales el 85% se encuentra en los compuestos porfirínicos del tipo de la hemoglobina, mioglobina, citocromos y enzimas como la citocromo oxidasa. El 15% restante se presenta en la ferritina, transferrina y hemosiderina, proteínas que regulan el metabolismo celular del hierro (Bezkorovainy, 1980).

La ferritina juega un papel importante dentro del mecanismo de absorción del hierro a nivel de la mucosa intestinal y de su almacenamiento formando coloides de óxido férrico. La biosíntesis de la ferritina se presenta en todos los tejidos y está influenciada de manera positiva por el hierro. El hierro de la ferritina participa en la producción de una gran variedad de proteínas hemo.

La ferritina está presente en animales vertebrados e invertebrados, así como en plantas y microorganismos (Bezkorovainy, 1980).

El hierro proveniente del intestino se une a la proteína transferrina que la transporta a la médula ósea, esto en el caso de los vertebrados.

Las transferrinas están presentes en muchos fluidos biológicos; la serotransferrina se encuentra en el torrente sanguíneo, la lactoferrina en la leche y la conalbumina en la clara de huevo.

Las transferrinas han sido asociadas con una cierta actividad bacteriostática, tal actividad está determinada debido a su alta constante de asociación con el hierro, debido a esto las transferrinas pueden hacer inaccesible el hierro a los microorganismos. Existen ciertos microorganismos que pueden superar tal inhibición produciendo sideróforos que son capaces de combinarse con las transferrinas. Dentro de las transferrinas la lactoferrina se le considera como un potente agente bacteriostático. En base a lo anterior se sospecha que las transferrinas juegan un papel muy importante dentro de los mecanismos de defensa del hospedero (Bezkorovainy, 1980).

Se sabe que el buen éxito del establecimiento de una infección bac-

terial en mamíferos depende en gran parte de la capacidad del microbio de adquirir el hierro del hospedero (Ong et al., 1979). Pero también es conocido y ampliamente aceptado que la deprivación del hierro contribuye a la defensa de las enfermedades bacterianas (Weinberg, 1978). Dentro de este proceso son involucradas las transferrinas que niegan el hierro a los microorganismos. Este fenómeno ha sido denominado Inmunidad Nutricional. Queda así demostrado el efecto del metal en las relaciones huésped-parásito (Weinberg, 1978).

Finalmente sólo cabe mencionar que al igual que la ferritina la hemosiderina interviene en el proceso de almacenamiento.

1.3. Posible aplicación de los sideróforos en la agricultura

Existen limitados trabajos que han tenido por objeto conocer la capacidad de los sideróforos para ser usados como alternativa en el control biológico de enfermedades (Schroth y Hancock, 1981).

En el caso del alga Anabaena sp. durante el proceso de fijación del nitrógeno, excreta sideróforos en demanda de hierro. Por lo tanto Anabaena sp. incrementa su crecimiento a la vez que restringe directamente el crecimiento de especies competidoras. Es evidente la capacidad de ciertas especies para sobrevivir en períodos de baja disponibilidad de hierro, así como su habilidad de antagonizar especies competidoras, mediante el uso de sideróforos (Murphy et al., 1976). Es clara la importante intervención de estos compuestos que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos.

Kloepper y colaboradores (1980a) publicaron un primer trabajo donde se expone que mediante la adición de Pseudomonas fluorescens B 10 o

del sideróforo pseudobactina a suelos inoculados con Fusarium oxysporum f sp lini o Gaeumannomyces graminis var trici se suprime la enfermedad producida por estos últimos. Concluyen que la supresividad de la enfermedad es debida en parte a los sideróforos microbianos, los cuales forman complejos altamente eficientes con el ion férrico del suelo, haciéndolo indisponible para los patógenos y por lo tanto inhibiendo su desarrollo. La capacidad de convertir suelos conducibles a suelos supresibles de la enfermedad, implica que Pseudomonas fluorescens u otros microorganismos que produzcan sideróforos puedan ser usados en el control biológico.

Anteriormente los sideróforos producidos por las Pseudomonas de la rizosfera se les consideraba como potentes antibióticos, habiendo sido probados in vitro en el laboratorio y en invernadero (Schroth y Hancock, 1981).

Tomando como base los resultados antes expuestos, fue reportado por Kloepper y colaboradores un segundo trabajo, donde usando cepas de P. fluorescens-putida como inoculante de semillas de papa, remolacha y rábano se promovió el crecimiento de las plantas e incrementó la producción de estas cosechas en 144%, resultados obtenidos en pruebas de campo. En el laboratorio se determinó la inhibición producida por la pseudobactina sobre Erwinia carotovora que causa la pudrición de la raíz de la papa (Kloepper et al., 1980b).

En base a lo anterior, puede decirse que los sideróforos no sólo constituyen un mecanismo para la adquisición del hierro para ciertos microorganismos, sino que pueden ser un factor de competencia por interferencia hacia otros microorganismos (Peralta, 1986).

Anteriormente fue expuesto que el hierro para poder ser asimilado tiene que ser solubilizado mediante compuestos orgánicos que se encuentran en el suelo, como el ácido fúlvico y húmico, estos compuestos mantienen un adecuado suplemento de hierro a una concentración de 10^{-8} M. Posteriormente se evidenció que no sólo estos compuestos intervenían en este proceso sino también sideróforos del tipo de los hidroxamatos, la concentración a la cual se encontraron fue biológicamente significativa, de 10^{-7} a 10^{-8} M. Demostrándose también su alta efectividad de quelación en suelos ácidos y alcalinos, además de ser encontrados de 10 a 50 veces más en la rizosfera que en otro lugar del suelo. Todo esto indica que los sideróforos pueden funcionar como movilizadores del hierro en los ecosistemas (Cline *et al.*, 1983).

A lo largo de toda la revisión de literatura se hizo énfasis en el gran problema que se presenta con el hierro para ser asimilado y que para ello animales, plantas y microorganismos han tenido que crear y adaptar mecanismos para su obtención.

Powell *et al.* (1980) evidenciaron que la presencia de sideróforos en el suelo, permite que el hierro sea solubilizado, pero la posibilidad de que ellos tengan un papel muy significativo en la fisiología y metabolismo del hierro en la planta aún está en consideración. Los primeros reportes a este respecto fueron dados a conocer por Atkin (Emery, 1977), donde aplicando una solución de sideróforos a hojas de frijol dieron el efecto de islas verdes. Concluyendo que los sideróforos mimetizan el efecto de islas verdes. Las islas verdes son manchas en las hojas que se presentan cuando hay una infección fúngica, las cuales resisten la clorosis. En quelantes sintéticos no se mostró tal efecto. Se sospecha que los sideróforos en la naturaleza puedan ser translocados

en los tejidos vegetales y así prevenir los efectos cloróticos producidos por la deficiencia en hierro (Emery, 1977).

En experimentos preliminares se encontró que la fusarina-férrica es translocada en frijol. Esto sugiere que el hierro puede ser obtenido vía ferrisideróforo (Emery, 1977). Sin embargo Kloepper *et al.* (1980b) reportaron que la pseudobactina-férrica no promueve el desarrollo de las plantas de papa, remolacha y rábano. Queda pues por averiguar más acerca de este fenómeno de gran trascendencia, ya que su aplicación en la agricultura contribuiría al control de la clorosis férrica en suelos calcáreos; así como en la prevención de enfermedades bacterianas y micóticas en plantas de importancia económica.

1.4. Objetivos

- a) Caracterizar cepas productoras de sideróforos.
- b) Seleccionar mediante bioensayos aquellas cepas que presenten capacidad de inhibición mediada por sideróforos.
- c) Determinar si las condiciones experimentales son adecuadas para caracterizar los mecanismos de inhibición microbiana.
- d) Determinar la capacidad de la planta para absorber y translocar hierro vía ferrisideróforo.
- e) Identificar taxonómicamente aquellos aislamientos que presenten efecto inhibitorio.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Naturaleza de los reactivos

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron los siguientes reactivos: las sustancias inorgánicas de grado analítico procedieron de las casas Merck, J.T. Baker y Técnica Química; los compuestos orgánicos para fines bioquímicas de las casas ICN Pharmaceutical, Merck, Eastman, J.T. Baker y Sigma. El agar usado fue Merck. Para la preparación de las soluciones se utilizó agua tridestilada marca Sigma, así como agua deionizada preparada en un deionizador marca Water I (mod. 15300).

2.2. Material biológico

Los organismos utilizados en el presente trabajo fueron veintiocho cepas de microorganismos, los cuales se clasificaron como se menciona a continuación:

2.2.1. Cepas de microorganismos fitopatógenos

Agrobacterium tumefaciens (Smith y Townsend) Conn; Corynebacterium fascians (Tilford) Dowson; Erwinia atroseptica (van Hall) Jemison; E. carotovora (Jones) Hollans; E. herbicola (Lohnif) Dye; Pseudomonas phaseolicola (Burkholder) Dowson; P. syringae (van Hall); Xanthomonas campestris (Pammell) Dowson; X. phaseoli (Erw. Smith) Dowson, cepas C B P 123, C B P 140 y C B P 147.

Las primeras ocho cepas bacterianas fueron aportadas por el Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados (C.P.) Chapingo, México. Las tres restantes fueron proporcionadas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de Cali, Colombia.

2.2.2. Cepas de microorganismos no fitopatógenos

Pseudomonas sp. Migula, cepa 7SRI; Rhizobium meliloti Dangeread, cepa F 34; R. phaseoli Dangeread, cepas CP Mex 3, CP Mex 7, CP Mex 19 y CP Mex 46.

Las cepas de P. sp y R. meliloti se obtuvieron del cepario del laboratorio de Genética Molecular y las de R. phaseoli fueron proporcionadas por el Centro de Edafología del C.P., Chapingo, México.

2.2.3. Aislamientos

Los aislamientos A3, A4, A5, A7, A9, A10, A11 y A12, se encuentran formando parte de la colección del laboratorio de Genética Molecular.

2.2.4. Vegetales superiores

Se emplearon plántulas de Phaseolus vulgaris L. Las semillas de frijol de las variedades Canario 107 y Negro 150, fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

2.3. Medios de cultivo

2.3.1. Medios para microorganismos

Se prepararon los siguientes medios: el medio caldo de levadura manitol (CLM), medio agar levadura manitol (ALM), medio caldo levadura glucosa (CLG) y el medio agar levadura glucosa (ALG).

2.3.2. Medios para la determinación de sideróforos

Para la determinación de sideróforos se emplearon los siguientes: el medio mínimo para Rhizobium (M), el medio M sin FeCl_3 (M-Fe), el medio M con 1.85×10^{-5} M de FeCl_3 (M + 3Fe), el medio M glucosa (MG), el medio MG sin FeCl_3 (MG -Fe) y el medio MG con 1.85×10^{-5} M de FeCl_3 (MG+3Fe).

Cuando los medios de cultivo M se requirieron en estado sólido se agregaron 18 g/l de agar, utilizándose los medios siguientes: AM, AM - Fe, AM + 3Fe, AMG, AMG - Fe y AMG + 3Fe.

2.3.3. Medios para la identificación de los aislamientos

Los medios que se prepararon fueron: el medio extracto levadura dextrosa CaCO_2 (EDC), el medio B de King (BK), el medio de Hugh y Leifson (HL), el medio para la producción de Levana y el medio de Thornley (hidrolasa de arginina).

2.3.4. Medios para el desarrollo de órganos vegetales *in vitro*

Se utilizaron los siguientes: el medio de Creswell y Nitsch 2 x (CN^{2x}), medio CN^{2x} carente de hierro (CN^{2x} -Fe), el medio CN^{2x} carente de hierro, hormona ni sacarosa (CN^{2x} -Fe- h - s), medio CN^{2x} suplementado con sobrenadante de medio gastado sin hormona ni sacarosa (CN^{2x} SG -h -s), medio CN^{2x} suplementado con sobrenadante de medio gastado carente de hierro sin hormona ni sacarosa (CN^{2x} - Fe SG -h -s). Para la identificación de la naturaleza del sobrenadante de medio gastado se puso como subíndice a las iniciales del SG el nombre o número de la cepa de la cual se preparó el sobrenadante de medio gastado (SG).

2.4. Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se siguieron los siguientes pasos generales: los constituyentes sólidos del medio se pesaron y colocaron en un matraz del doble de capacidad de volumen de medio a preparar, después de le agregó agua destilada; excepto para los casos de los medios CN^{2x}, M y sus modificaciones, en donde se utilizó agua tri-distilada.

La esterilización de los medios, soluciones, agua y material de vidrio se llevó a cabo en una autoclave eléctrica, manteniendo el material por un período de 15 minutos a 1.05 kg cm⁻² de presión a menos que exista otra indicación al respecto. La preparación de los medios, así como su distribución en cajas de Petri, tubos y matraces se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. A las cajas de Petri de vidrio se les agregó 25 ml de medio aproximadamente; a los tubos de vidrio (15 mm de diámetro por 125 mm de longitud) con tapón de rosca se les adicionó 5 y 3.5 ml para tubos con medio inclinado.

En la preparación de los medios de cultivo sólidos para vegetales superiores, antes de esterilizarlos se licuaron por medio de calor y agitación, se sirvieron en frascos (10 ml en frascos de 30 ml de capacidad) y posteriormente se esterilizaron para su uso.

2.4.1. Medio ALM y modificaciones

El proceso de preparación del medio ALM fue el siguiente: los constituyentes sólidos se pesaron y mezclaron con un litro de agua esterilizándose. A continuación se agregaron 0.8 ml de la solución C-a y 10 ml de la solución C-b (Apéndice 2). El medio se agitó y se transfirió a tubos y cajas.

Medio ALG. Para su preparación se esterilizó el extracto de levadura y el agar junto con 1000 ml de agua, a continuación se le agregaron 0.8 ml de la solución C-a, 10.0 ml de C-b y 20.0 ml de la solución de glucosa (Apéndice 3). Después de agitarlo se transfirió a tubos y cajas.

2.4.2. Medio M y modificaciones

Medio M. A 900 ml de agua estéril se le agregaron 10 ml de cada una de las ocho soluciones (M-a a la M-h) que aparecen en el Apéndice 2.

Medio M-Fe. Se preparó como el medio M, agregándose 10 ml de la solución M-i en lugar de la solución M-g.

Medio M+3Fe. Su preparación es como la del medio M, agregándose 10 ml de la solución M-j en lugar de la solución M-g.

Medio MG. A 900 ml de agua estéril se le agregaron 10 ml de cada una de las ocho soluciones (M-a a M-h) y 20 ml de la solución de glucosa omitiéndose la solución M-b.

Medio MG - Fe. Se preparó como el medio MG, agregándose 10 ml de la solución M-i en lugar de la solución M-g.

Medio MG+3Fe. Su preparación fue como la del medio MG, agregándose 10 ml de la solución M-j, omitiéndose la solución M-g.

2.4.3. Medio BK

Para la preparación de este medio se colocaron 200 ml de agua destilada en un matraz y posteriormente se agregaron uno a uno todos los constituyentes (Apéndice 1), después se aforó y se esterilizó, sirviéndose en cajas de Petri.

2.4.4. Medio EDC

Su preparación fue similar a la del medio BK, sólo que al momento de servir en las cajas se agitó para que el carbonato de calcio precipitado se homogenizara.

2.4.5. Medio HL

Todos sus componentes se colocaron en un matraz agregando posteriormente el agua, finalmente se esterilizó. 5 ml aproximadamente de medio fueron servidos en tubos. En la preparación de este medio se tuvo cuidado de pesar con exactitud el azul de bromotimol.

2.4.6. Medio para la producción de levana

Todos los constituyentes del medio se depositaron en un matraz con 200 ml de agua, se disolvieron y se aforó a volumen de 1 l. A continuación el medio se esterilizó sirviéndose en cajas.

2.4.7. Medio de Thornley

Este medio se preparó de forma similar a la del medio HL, agregando la cantidad exacta del rojo-fenol; 5 ml de medio se sirvieron en tubos.

2.4.8. Medio CN^{2x} y modificaciones

Medio CN^{2x}. La manera de preparación fue la siguiente: en un vaso de precipitado de aproximadamente el doble del volumen de medio a preparar, se colocaron 200 ml de agua tridestilada y posteriormente se fueron agregando con pipetas las soluciones concentradas (Apéndice 2) de la CN-h a la CN-1, el meso-inositol y la sacarosa (Apéndice 1). Después de

disolverlos perfectamente se ajustó el pH a 5.8 con gotas de HCl o NaOH 0.1 N según fue el caso, se aforó a 1 litro. Finalmente se agregó el agar, se licuó, y se sirvió en frascos y esterilizándose.

Medio CN^{2x} -Fe. La preparación fue similar a la del medio CN^{2x} suprimiendo la solución CN-e en su fórmula.

Medio CN^{2x} -h-s. Para la preparación de este medio se omitió la solución CN-1 y la sacarosa.

Medio CN^{2x} -Fe-h-s. Su preparación fue similar al medio anterior sólo se omitió la solución CN-e.

Medio CN^{2x} SG -h-s. Este medio es similar al CN^{2x} -h-s, contenía 250 ml de sobrenadante de medio gastado el cual se agregó estéril antes de que el medio CN^{2x} -h-s solidificara. En este caso la solución CN -a se adicionó junto con el sobrenadante de medio gastado.

Medio CN^{2x} -Fe SG -h-s. Se preparó igual que el medio CN^{2x} SG -h-s omitiendo la solución CN-e.

2.5. Generalidades

A partir de las especificaciones que en cada método se describen se llevaron a cabo ciertos procedimientos generales, que se expresan a continuación. En los cultivos líquidos la agitación fue de 100 oscilaciones por minuto, con 5 cm de desplazamiento.

En la realización de los experimentos en los que se determinaron niveles de inhibición y en la preparación de los sobrenadantes de medio gastado se lavó de manera especial el material de vidrio, consistiendo en lo siguiente: los tubos y matraces se llenaron con una solución de

HCl 1 N dejándose reposar por un período de 72 h. A continuación se enjuagaron diez veces con agua corriente y dos con agua destilada, el material se secó en una estufa eléctrica.

La manera en la que se cuantificó el crecimiento de los cultivos en medio líquido fue por medio del método turbidimétrico, el cual se realizó utilizando un espectrofotómetro marca Coleman Junior II y las lecturas se efectuaron a 660 nm.

La sedimentación de células y restos celulares para la preparación de los sobrenadantes se realizó a 25 900 g en los aislamientos y 46 500 g para CP Mex 46 por 15 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada marca Beckman.

La esterilización por filtración se realizó utilizando membranas millipore con diámetro de poro de 0.45 μ .

Para los experimentos en los cuales se utilizaron plántulas de frijol, éstas se obtuvieron de la siguiente manera; las semillas de frijol sin manchas, de tamaño homogéneo y sin deformaciones, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de calcio al 3% (Apéndice 3) por 10 minutos; posteriormente las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar. Se colocaron tres semillas en cada vaso de unicel de 250 ml de capacidad con tierra estéril y se regaron con agua corriente. De plántulas de 10 a 12 días de edad se obtuvieron los ápices y hojas (según fue el caso), los que se sometieron a un proceso de desinfección, primero con alcohol al 70% por 30 segundos y después con hipoclorito de calcio al 3% (Apéndice 3) más dos gotas de Tween por 30 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. El fotoperíodo de incubación fue de 16 h luz y 8 h oscuridad.

2.6. Preparación de inóculos bacterianos

2.6.1. Inóculo de las bacterias no fitopatógenas y aislamientos

Preparación del primer inóculo. En cajas que contenían medio ALM fueron sembradas las bacterias por método de estría, una vez crecidas una pequeña muestra de células fue transferida a un tubo que contenía 3 ml de medio M e incubado durante 24 h.

Con ayuda de una pipeta estéril se tomó 0.1 ml del primer inóculo y se transfirió a otro tubo que contenía 3 ml de medio M-Fe. Se incubó por un período de 48 h, quedando así listo para su uso.

2.6.2. Inóculo de bacterias fitopatógenas

Se siguieron las mismas indicaciones que el método anterior, tomando en consideración los requerimientos de las fuentes de carbono específicas de cada cultivo. Xanthomonas y Pseudomonas phaseolicola se cultivaron primero en el medio ALG y de este se transfirieron al medio MG. Para la preparación del segundo inóculo se tomó una muestra alícuota de 0.1 ml del primer inóculo, éste se utilizó para inocular los tubos con 3 ml de medio M, M -Fe, MG y MG -Fe, según fue requerido.

2.7. Crecimiento de los cultivos bacterianos en medios M y M -Fe

Para tener una visión general del comportamiento que presentan ciertos microorganismos para crecer en medios deficientes en hierro, se cuantificó el crecimiento de éstos en medios deficientes en hierro, comparándolos con el medio normal.

Tubos que contenían 5 ml de medio M y M -Fe fueron inoculados con el segundo inóculo preparado, ajustándose la absorbencia inicial a 0.04;

para el caso de las especies del género Xanthomonas y P. phaseolicola fue utilizado el medio MG y MG -Fe. El crecimiento se cuantificó por el método turbidimétrico realizándose lecturas cada 24 h.

2.7.1. Evaluación del crecimiento en los medios M y M -Fe

El porcentaje de desarrollo de los cultivos se determinó en los medios deficientes en hierro (M -Fe y MG -Fe), tomándose como 100% el crecimiento alcanzado por los cultivos en los medios M y MG. Se obtuvieron las cinéticas de crecimiento, determinando así el desarrollo de los cultivos a diferentes tiempos.

2.8. Bioensayo para la determinación de la inhibición

2.8.1. Inhibición en medios sólidos

Se determinó la capacidad de los microorganismos no fitopatógenos de inhibir el crecimiento de seis cepas de bacterias fitopatógenas.

Teniendo preparado el segundo inóculo de los microorganismos fitopatógenos, no fitopatógenos, aislamientos y los medios: AM -Fe, AM +3Fe, AMG -Fe y AMG +3Fe, se hicieron diluciones de 10^{-5} y 10^{-7} de las bacterias fitopatógenas utilizando solución salina estéril, posteriormente se sembraron 0.1 ml de las diluciones extendiéndose sobre la superficie de los medios arriba anotados. Aproximadamente 0.01 ml del segundo inóculo de las bacterias no fitopatógenas fueron colocadas en tres sitios equidistantes sobre la superficie del medio. Las cajas se incubaron de 48 a 72 h.

2.8.2. Evaluación de la inhibición

Se midió el radio del halo de inhibición del microorganismo fitopa-

tógeno; así como el radio de la zona de crecimiento de la cepa no fitopatógena.

Posteriormente fueron calculadas las áreas respectivas. El área de inhibición (AI) se calculó restando al área de la circunferencia de inhibición $A = \pi |R^2 - r^2|$, el área correspondiente a la zona de crecimiento (ZC) de la bacteria no fitopatógena $|A = \pi r^2|$.

El índice de inhibición (II) se calculó dividiendo AI entre ZC.

2.9. Identificación de los aislamientos

2.9.1. Pruebas para la determinación del género

Existen pruebas específicas que se utilizan para determinar la posición taxonómica de los microorganismos, siendo las utilizadas en el presente estudio las de morfología celular y colonial, flagelos y la tinción de Gram.

Morfología colonial. Los aislamientos fueron sembrados en cajas que contenían medio ALM, siendo incubados por un período de 72 h. Las colonias que se desarrollaron fueron observadas a través de un microscopio estereoscópico, para determinar su color, forma, bordes, elevación, superficie, diámetro y olor.

Tinción de Gram. A partir de cultivos bacterianos crecidos en el medio BK se hizo un frotis fijándose al calor, se agregó sobre las células gotas de solución de Cristal violeta (Apéndice 3) y se dejó en contacto por un minuto. La solución se decantó y se adicionó la solución de Lugol (Apéndice 3), y al cabo de un minuto, el frotis se lavó con etanol para eliminar el exceso de colorante. La solución de Safr-

nina (Apéndice 3) se agregó sobre el frotis y se dejó actuar por 30 segundos, finalmente se lavó con agua de la llave y se dejó secar.

Prueba para la determinación del género Xanthomonas. A partir de cultivos crecidos en medio BK se tomó una pequeña muestra, para hacer estrías sobre el medio EDC. La prueba es positiva si las colonias se observan mucoides y de color amarillo intenso.

Fluorescencia. El medio BK se usa para identificar a los microorganismos que son capaces de producir fluorescencia. De cultivos bacterianos crecidos en medio ALM se transfirió una pequeña muestra y se hicieron estrías sobre la superficie del medio BK, incubándose. Al cabo de 24 horas se observaron.

Tinción de flagelos. Una de las características morfológicas que ayudan a la identificación de las cepas bacterianas es el número y disposición de los flagelos. En este caso se usó el método de Pepller para teñirlos y poderlos observar al microscopio óptico. En tubos de ensaye que contenían 5 ml de agua destilada estéril se preparó una suspensión de células de aproximadamente 3×10^6 células ml^{-1} . La preparación de la muestra se hizo con cuidado; evitando cualquier movimiento brusco. Se colocó una gota de la suspensión de células sobre un portaobjetos perfectamente limpio y se dejó secar al aire, a continuación se adicionó el mordiente filtrado (Apéndice 3), dejándolo actuar por 5 minutos. Posteriormente la preparación se lavó con agua destilada agregando a continuación la solución de Cristal violeta la que se dejó actuar por 2 minutos. Finalmente ésta se lavó con agua y se dejó secar al aire. La preparación se observó al microscopio con objetivo de inmersión.

Prueba de óxido-fermentación. El medio HL se usó para determinar el requerimiento de oxígeno para el desarrollo de los microorganismos. La inoculación fue por punción en tubos que contenían medio HL, utilizándose dos tubos por muestra, uno de ellos se manejó en condiciones aeróbicas y el otro anaeróbicas, agregando un poco de aceite mineral estéril. Las observaciones se realizaron a las 72 horas de incubación. Si el medio vira de color verde a amarillo sólo en condiciones aeróbicas las cepas se consideran oxidativas y si cambian en ambas condiciones son consideradas fermentativas.

2.9.2. Prueba para la determinación de la especie

Una vez definido el género, se procede a determinar la especie. Existen pruebas específicas para establecer la especie, siendo importante mencionar las pruebas de patogenicidad.

Hipersensibilidad en tabaco. La respuesta que se observa al ser infiltradas células bacterianas en las nervaduras de las hojas de tabaco, es considerada positiva si la hoja pierde turgencia, determinando con esto la posible patogenicidad del microorganismo. Hojas de tabaco fueron inyectadas por el envés con suspensiones bacterianas de aproximadamente 10^8 células ml^{-1} , la reacción se observa a las 10 horas de inoculación.

Oxidasa. Esta prueba permite determinar la presencia de la enzima oxidasa que es específica del grupo de los microorganismos fluorescentes. Pequeños trozos de papel filtro fueron impregnados con una solución de monoclóhidrato de dimetil-p-fenilenediamina, inmediatamente después una pequeña asada del cultivo fue pasado sobre el papel fil-

tro, se esperó 10 segundos para observar el cambio de color; la prueba es positiva si la muestra vira a color rojo-negruzco.

Pudrición de papa. Esta prueba ayudó a diferenciar las especies fitopatógenas. En este caso se usó papa variedad "Alpha". Los tubérculos se desinfectaron con agua y jabón superficialmente y después con un algodón empapado con solución desinfectante (Apéndice 3), posteriormente éstos se enjuagaron con agua destilada estéril. Se cortaron rebanadas de 0.5 cm de grosor y sobre papel filtro en cajas de Petri se colocaron tres rebanadas a las que se les hicieron incisiones. En dos de ellas se depositaron las células del microorganismo en prueba. Finalmente se agregaron de 10 a 15 ml de agua destilada estéril a cada caja para mantener húmedo el ambiente. Las preparaciones se incubaron y a las 24 y 48 horas se realizaron las observaciones.

Arginina de hidrolasa. Esta prueba diferencia cepas fluorescentes del grupo fluorescens. A partir de cultivos crecidos en medio BK dos tubos fueron inoculados por punción en medio Thornley (Apéndice 1), uno de ellos se selló con aceite mineral estéril. Al término de 72 horas de incubación se determinó si el medio viraba de color rojo a rosa en las dos condiciones, en cuyo caso la prueba se consideró positiva.

Levana. Ciertas bacterias fitopatógenas producen levana, que es un polisacárido que se produce a partir de la sacarosa. En cajas que contenían medio nutritivo con 15% de sacarosa, las bacterias se inocularon por punción. Si las colonias se muestran mucoides y convexas se está produciendo levana.

2.10. Elaboración del sobrenadante de medio gastado SG

Para la preparación del sobrenadante de medio gastado de los cultivos bacterianos no fitopatógenos y de los aislamientos se utilizó el segundo inóculo crecido en el medio M-Fe, del cual se tomaron 4 ml que fueron transferidos a un matraz que contenía 100 ml de medio M-Fe. Los cultivos fueron incubados entre 24 y 48 horas de agitación. Antes de colectar el sobrenadante el pH del cultivo se ajustó a 5.8 y posteriormente fue centrifugado. El sobrenadante se esterilizó por filtración.

2.11. Obtención de plántulas de *Phaseolus vulgaris in vitro*

Utilizando la metodología de cultivo de tejidos se obtuvieron plántulas de frijol a partir de los ápices de tallo, con el fin de que éstas se encontraran libres de patógenos, a la vez de poder controlar las condiciones experimentales de una manera más precisa.

2.11.1. Siembra del material vegetal en los medios de cultivo

En condiciones de asepsia usando una campana de flujo laminar, los ápices de frijol, después de haber sido desinfectados, fueron colocados sobre cajas de Petri estériles. La región apical de aproximadamente 5 mm fue separada con ayuda de un bisturí y pinzas flameadas en alcohol y posteriormente transferida a frascos que contenían 10 ml de medio CN^{2x}.

2.11.2. Incubación y transferencia

La incubación de los ápices se llevó a cabo en un cuarto de temperatura controlada a 26°C, humedad 50% y fotoperíodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad. Debido a que este material vegetal fue utilizado en las siguientes pruebas, tuvieron que ser transferidos cada 15 a 25 días.

Las transferencias a medios nuevos fueron hechas de la manera siguiente: la plántula sin restos de agar se colocó en una caja de Petri con pinzas y después de ser lavada con agua destilada estéril se transfirió al medio nuevo. Cuidando que las raíces quedaran bien ancladas al medio.

2.12. Efecto del sobrenadante de medio gastado (SG) sobre el desarrollo de plántulas de *P. vulgaris*

Se pretendió determinar el efecto del SG sobre la presencia de los pigmentos verdes de las plántulas de frijol obtenidas in vitro.

2.12.1. Plántulas de *P. vulgaris* desarrolladas en medios con SG

Las plántulas de frijol de 25 días de incubación fueron transferidas a los medios CN^{2x} -h -s, CN^{2x} -Fe -h -s, CN^{2x} SG_x -h -s y CN^{2x} -Fe SG_x -h -s (Figura 4). Las plántulas se incubaron durante 15 a 25 días, tiempo en el cual se evaluó cualitativamente la presencia o ausencia de zonas cloróticas en las hojas jóvenes.

2.13. Efecto del SG sobre la sintomatología de plántulas de *P. vulgaris* inoculadas con *X. phaseoli* CBP 123

La finalidad de esta prueba fue determinar el posible efecto que tendría el SG sobre el desarrollo de *X. phaseoli* CBP 123.

2.13.1. Siembra de los ápices de *P. vulgaris* e incubación

Apices de frijol Negro 150 fueron sembrados en frascos con medio CN^{2x} y CN^{2x} -Fe e incubados durante 10 días, siguiendo las indicaciones antes mencionadas (Figura 5).

2.13.2. Transferencia a los medios CN^{2x} con SG e incubación

Las plántulas después de haberse desarrollado en el medio CN^{2x} fueron transferidas al medio CN^{2x} -Fe SG_x -h -s. Después de ser incubadas durante 5 días se inocularon con X. phaseoli CBP 123, por medio de pinzas. Las plántulas inoculadas se incubaron durante 8 días (Figura 5).

La presencia de síntomas de la enfermedad se evaluó al cabo del período de incubación, comparando las plántulas inoculadas con las plántulas control, las que fueron únicamente dañadas mecánicamente con pinzas sin bacterias.

2.14. Determinación de la translocación del principio activo presente en los SG

Al igual que la prueba anterior, ésta tuvo la finalidad de determinar la capacidad de translocación del principio activo a diferentes distancias a través de los tejidos de la planta, en estos casos se utilizaron hojas de frijol, las que fueron inoculadas con bacterias fitopatógenas, tal como se indica a continuación.

2.14.1. Siembra del primer par de hojas unifoliadas y su posterior inoculación

La franja central de las hojas de frijol, de aproximadamente 2 cm de ancho se sembraron en los medios CN^{2x} -Fe -h -s, CN^{2x} -h -s, CN^{2x} SG_x -h -s y CN^{2x} -Fe SG_x -h -s; e inmediatamente después se inocularon con X. phaseoli CBP 123, de la misma forma que en el caso anterior. Las punciones se hicieron en las nervaduras laterales a distancias de aproximadamente 0.5 y 1.5 cm de la base de la hoja. Los síntomas de la enfermedad se evaluaron después de un período de incubación de 8 a 10 días (Figura 6).

3. RESULTADOS

3.1. Selección de los microorganismos para el estudio

Dada la importancia que reviste el fenómeno de interferencia mediado por sideróforos, se trató de identificar y seleccionar un grupo de cepas de microorganismos que tuvieran la capacidad de sintetizar estos compuestos. Una manera indirecta de identificar este tipo de microorganismos es determinando la capacidad de éstos para crecer en medios deficientes en hierro.

Para determinar dicha capacidad, se consideró conveniente uniformizar las condiciones experimentales de trabajo, para lo cual se seleccionó en primer lugar aquellos microorganismos que pudieran crecer en el medio mínimo de Rhizobium M, que posee una composición química definida.

Para establecer el grado de desarrollo de los cultivos en estudio, éstos fueron crecidos en los medios M, M-Fe y MG, MG-Fe, por el hecho de que algunos no utilizan eficientemente el manitol como fuente de carbono y energía. Los resultados son expresados en los Cuadros 1 y 2, donde se anotan los porcentajes de desarrollo en los medios deficientes en hierro M-Fe y MG-Fe en comparación con los medios correspondientes M y MG. Los registros fueron realizados a las 14, 24 y 46 h de incubación.

Se observó que tanto Xanthomonas (4) como Pseudomonas phaseolicola crecieron lentamente en comparación con los demás microorganismos, debi-

Cuadro 1. Estimación del grado de desarrollo alcanzado por los microorganismos fitopatógenos en medios deficientes en hierro. Los resultados entre paréntesis expresan el porcentaje de desarrollo a diferentes tiempos, así como sus respectivas absorbencias.

Cepa	14 h		24 h		46 h	
	M	M-Fe	M	M-Fe	M	M-Fe
<u>Corynebacterium fascians</u>	0.11 (100)	0.11 (100)	0.18 (100)	0.19 (105)	0.44 (100)	0.50 (113)
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	0.18 (100)	0.18 (100)	0.35 (100)	0.35 (100)	0.61 (100)	0.67 (110)
<u>Pseudomonas syringae</u>	0.21 (100)	0.13 (62)	0.35 (100)	0.20 (57)	0.37 (100)	0.40 (108)
<u>Erwinia herbicola</u>	0.15 (100)	0.17 (113)	0.16 (100)	0.18 (112)	0.30 (100)	0.31 (103)
<u>Erwinia carotovora</u>	0.17 (100)	0.15 (80)	0.38 (100)	0.31 (81)	0.48 (100)	0.47 (98)
Cepa	24 h		46 h			
	MG	MG-Fe	MG	MG-Fe		
<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 123	0.04 (100)	0.04 (100)	0.37 (100)	0.32 (86)		
<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 147	0.24 (100)	0.22 (91)	0.38 (100)	0.29 (76)		
<u>Xanthomonas campestris</u>	0.12 (100)	0.10 (83)	0.19 (100)	0.13 (68)		
<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 140	0.20 (100)	0.13 (65)	0.43 (100)	0.26 (60)		
<u>Pseudomonas phaseolica</u>	0.37 (100)	0.16 (43)	0.38 (100)	0.20 (52)		

Cuadro 2. Estimación del grado de desarrollo alcanzado por los microorganismos no fitopatógenos y aislamientos en medios deficientes en hierro. Los resultados entre paréntesis expresan el porcentaje de desarrollo a diferentes tiempos, así como sus respectivas absorbencias.

	14 h		24 h		46 h	
	M	M-Fe	M	M-Fe	M	M-Fe
Aislamiento 9	0.42 (100)	0.20 (48)	0.47 (100)	0.27 (58)	0.47 (100)	0.48 (102)
Aislamiento 3	0.37 (100)	0.22 (59)	0.46 (100)	0.27 (59)	0.56 (100)	0.53 (95)
Aislamiento 4	0.16 (100)	0.09 (56)	0.27 (100)	0.16 (59)	0.44 (100)	0.37 (84)
CP Mex 3	0.26 (100)	0.16 (61)	0.33 (100)	0.22 (67)	0.44 (100)	0.35 (79)
CP Mex 19	0.26 (100)	0.14 (54)	0.33 (100)	0.22 (67)	0.46 (100)	0.31 (77)
CP Mex 46	0.48 (100)	0.21 (44)	0.53 (100)	0.32 (60)	0.64 (100)	0.49 (77)
Aislamiento 12	0.53 (100)	0.34 (64)	0.62 (100)	0.48 (77)	0.57 (100)	0.43 (75)
Aislamiento 7	0.09 (100)	0.08 (78)	0.26 (100)	0.19 (68)	0.40 (100)	0.26 (67)
<u>R. meliloti</u> F 34	0.07 (100)	0.06 (88)	0.20 (100)	0.12 (60)	0.46 (100)	0.30 (65)
CP Mex 7	0.09 (100)	0.07 (89)	0.22 (100)	0.15 (73)	0.49 (100)	0.33 (65)
Aislamiento 5	0.31 (100)	0.14 (45)	0.41 (100)	0.21 (51)	0.56 (100)	0.36 (64)
Aislamiento 10	0.35 (100)	0.20 (57)	0.47 (100)	0.30 (64)	0.65 (100)	0.40 (61)
<u>P. sp</u> 7SRI	0.28 (100)	0.12 (43)	0.40 (100)	0.20 (50)	0.47 (100)	0.28 (60)

do a esto no fue posible evaluarlos a las 14 h. Para estos cinco casos los valores máximos de absorbencia no pasaron de 0.43 (Cuadro 1).

Puede advertirse que los cinco primeros microorganismos de la lista crecen de manera similar en el medio deficiente y el suplementado con hierro, mientras que los cinco restantes el desarrollo observado en el medio deficiente en hierro siempre fue menor (86 a 52%).

El caso contrastante fue observado con C. fascians y P. phaseolicola, donde el primero posee la capacidad de adquirir el elemento bajo tal limitación, mientras que el segundo se ve seriamente afectado en su desarrollo al escasear el hierro en el medio (Cuadro 1).

Los microorganismos no fitopatógenos y aislamientos presentaron un comportamiento variable, esto es observado en el Cuadro 2. Sólo los aislamientos A9 (102%) y A3 (95%) presentaron un crecimiento similar en ambos medios a las 46 h de incubación.

Una vez estimado el grado de desarrollo de los microorganismos en medios deficientes en hierro a diferentes tiempos, se procedió a comparar las velocidades máximas de crecimiento de los microorganismos. Se ha demostrado la presencia de sideróforos hidroxamato en la fase exponencial de crecimiento en cultivos de Aerobacter aerogenes (Gibson, 1969).

En base a lo anterior se determinaron los cocientes de las velocidades entre ambos medios, denominados en este caso índices de eficiencia.

Las evaluaciones se presentan en los Cuadros 3 y 4. Los valores de índice de eficiencia arriba o igual a uno expresan mayor capacidad de desarrollo, mientras que los valores abajo de uno representan menor capacidad. Cada grupo de microorganismos (fitopatógenos, no fitopatóge-

Cuadro 3. Velocidades de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos en los medios M, M-Fe y MG, MG-Fe. Los resultados expresan la velocidad máxima en cada medio en un tiempo determinado, así como el cociente entre los dos medios.

Cepa	Velocidad de crecimiento en medios M-Fe y MG-Fe	Velocidad de crecimiento en medios M y MG	Cociente de las velocidades Índice de eficiencia
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	14.60×10^{-3}	12.60×10^{-3}	1.15
<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 147	5.80×10^{-3}	5.49×10^{-3}	1.05
<u>Corynebacterium fascians</u>	14.50×10^{-3}	14.39×10^{-3}	1.00
<u>Erwinia herbicola</u>	5.58×10^{-3}	5.70×10^{-3}	0.97
<u>Pseudomonas syringae</u>	12.90×10^{-3}	13.70×10^{-3}	0.94
<u>Pseudomonas phaseollicola</u>	4.35×10^{-3}	5.37×10^{-3}	0.81
<u>Erwinia carotovora</u>	11.50×10^{-3}	15.00×10^{-3}	0.76
<u>Xanthomonas campestris</u>	3.75×10^{-3}	6.21×10^{-3}	0.60
<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 140	3.55×10^{-3}	7.45×10^{-3}	0.47
<u>Xanthomonas phaseoli</u> CBP 123	3.82×10^{-3}	17.40×10^{-3}	0.22

Cuadro 4. Velocidades de crecimiento de los microorganismos no fitopatógenos y aislamientos en los medios M y M-Fe. Los resultados expresan la velocidad máxima en cada medio en un tiempo determinado, así como el cociente entre ambos medios

Cepa	Velocidad de crecimiento en el medio M-Fe	Velocidad de crecimiento en el medio M	Cociente de las velocidades Índice de eficiencia
Aislamiento 12	5.58×10^{-3}	3.18×10^{-3}	1.75
Aislamiento 9	9.90×10^{-3}	6.75×10^{-3}	1.46
Aislamiento 4	8.10×10^{-3}	6.91×10^{-3}	1.17
Aislamiento 3	11.00×10^{-3}	10.00×10^{-3}	1.10
CP Mex 3	5.64×10^{-3}	5.29×10^{-3}	1.06
Aislamiento 5	10.80×10^{-3}	12.70×10^{-3}	0.85
Aislamiento 10	5.12×10^{-3}	6.05×10^{-3}	0.84
CP Mex 46	8.41×10^{-3}	10.90×10^{-3}	0.77
Aislamiento 7	6.99×10^{-3}	11.00×10^{-3}	0.63
<u>R. meliloti F34</u>	6.98×10^{-3}	11.00×10^{-3}	0.63
CP Mex 19	6.61×10^{-3}	4.05×10^{-3}	0.61
CP Mex 7	5.58×10^{-3}	11.90×10^{-3}	0.46
<u>P. sp 7SRI</u>	4.43×10^{-3}	10.00×10^{-3}	0.44

nos y aislamientos) quedó finalmente dividido en dos clases, la primera representada por aquellos cultivos con una alta eficiencia de asimilación de hierro, si consideramos que en estas condiciones un mayor desarrollo equivale a mayor eficiencia de asimilación del elemento, y la segunda con una baja eficiencia de desarrollo (Figura 1 y 2).

Se encontró dentro del muestreo realizado que los microorganismos no fitopatógenos y aislamientos obtuvieron el valor de índice de eficiencia más alto que fue de 1.75, correspondiente a la cepa A12, mientras que en el grupo de los microorganismos fitopatógenos el valor más alto fue de 1.15 para A. tumefaciens.

Realizando una estimación porcentual se encontró que el 12.50% (3 casos) de los microorganismos fitopatógenos poseen alta eficiencia de asimilación de hierro, mientras que para el grupo no fitopatógeno y aislamientos el valor porcentual fue de 20.83% (5 casos).

El porcentaje global de todos los microorganismos analizados mostró que el 33.33% de ellos tenía una alta capacidad de desarrollo en medios carentes en hierro (resultados no presentados en cuadros).

Aún cuando la muestra probada fue pequeña, es indicativo de que los microorganismos en general poseen mecanismos eficientes de asimilación de hierro.

Finalmente, para la selección de los microorganismos se tomaron en consideración dos criterios. Primero, el grado de dificultad o capacidad para desarrollarse en condiciones desfavorables de hierro. De esta forma para el grupo de microorganismos fitopatógenos, se seleccionaron aquellos que tuvieron un desarrollo en el medio carente en hierro de cuando más 80%, así como índices de eficiencia bajos. Mientras que el grupo de microorganismos no fitopatógenos y aislamientos se escogieron aquellos

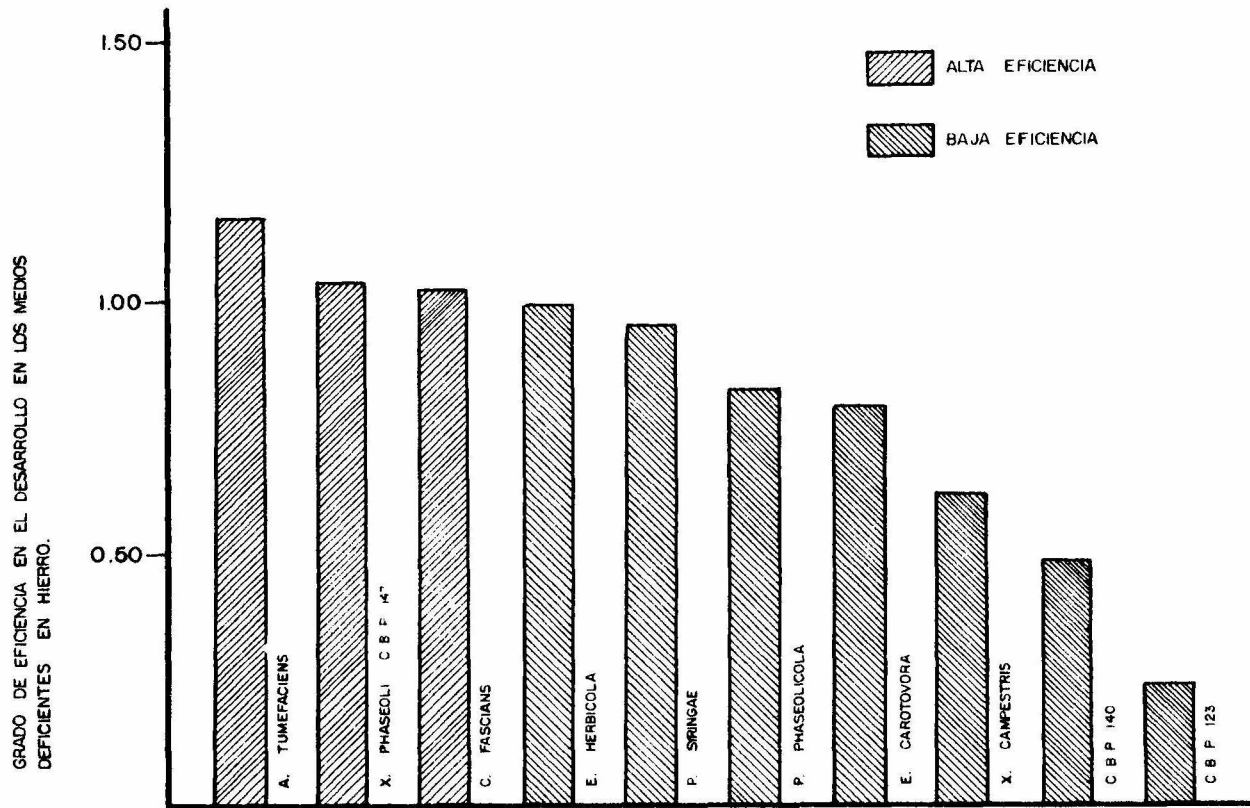


FIGURA 1: ESQUEMA COMPARATIVO DE LA EFICIENCIA DE DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS FITOPATOGENOS. LOS DATOS REPRESENTAN EL COCIENTE DE LAS VELOCIDADES DE DESARROLLO EN LOS MEDIOS DEFICIENTES Y SUPLEMENTADOS CON HIERRO

GRADO DE EFICIENCIA EN EL DESARROLLO EN LOS MEDIOS DEFICIENTES EN HIERRO.

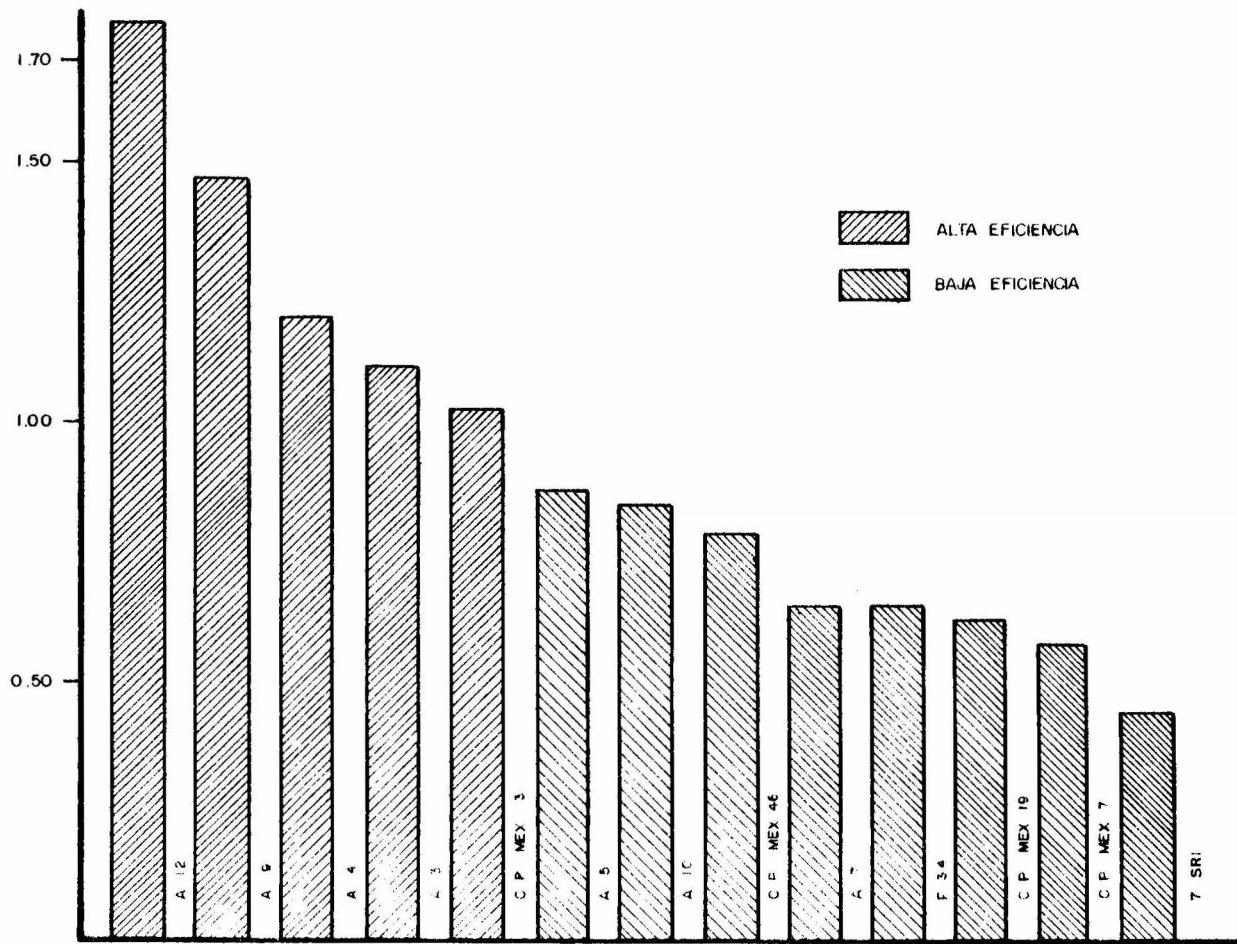


FIGURA 2. ESQUEMA COMPARATIVO DE LA EFICIENCIA DE DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS NO FITOPATOGENOS Y AISLAMIENTOS. LOS DATOS REPRESENTAN EL COEFICIENTE DE LAS VELOCIDADES DE DESARROLLO EN LOS MEDIOS DEFICIENTES Y SUPLEMENTADOS CON HIERRO.

que mostraron un desarrollo mayor del 50% y de índices de eficiencia altos. Segundo, el poder establecer un sistema de interacción específica planta-patógeno, en donde la planta fuese fácilmente cultivable in vitro.

En base a lo anterior, los organismos seleccionados fueron: A. tumefaciens, C. fascians, X. campestris, X. phaseoli CBP 123, 140, 147, R. phaseoli CP Mex 3, 19, 46, R. meliloti F 34, P. sp 7SRI y los aislamientos A3, A5, A9, A10, A11, A12.

3.2. Bioensayos para determinar inhibición del crecimiento in vitro

Investigaciones realizadas han demostrado que el mecanismo de interferencia microbiana, puede representar alguna alternativa en el control biológico de enfermedades en las plantas (Kloepper et al., 1980a), por el hecho de que bioensayos in vitro en medio sólido se ha medido la capacidad de interferencia mediada por sideróforos, tal es el caso de la pseudobactina sobre Erwinia carotovora (Kloepper et al., 1980b).

Después de haber sido seleccionado un grupo de microorganismos, se realizó un bioensayo inicial para determinar la capacidad de los microorganismos no fitopatógenos y aislamientos de interferir en el desarrollo de seis microorganismos fitopatógenos. Dos de ellos, A. tumefaciens y C. fascians altamente eficientes en medios carentes de hierro y los cuatro restantes del género Xanthomonas de baja eficiencia.

Las estimaciones preliminares de inhibición se realizaron cualitativamente. Los resultados se expresan en el Cuadro 5.

C. fascians y CBP 123 fueron los microorganismos fitopatógenos más interferidos por el mayor número de microorganismos que fue de 9, seguido de CBP 140 y 147 con 8 y 7 respectivamente. Finalmente A. tumefaciens y X. campestris con 6.

Cuadro 5. Evaluación preliminar de la inhibición provocada a las 72 h de incubación por once cepas de microorganismos no fitopatógenos y aislamientos sobre seis cepas de microorganismos fitopatógenos, en los medios AM-Fe y AMG-Fe. La interferencia fue determinada mediante la aparición de un halo de inhibición del microorganismo fitopatógeno en torno al microorganismo no fitopatógeno.

Cepas	Microorganismos no fitopatógenos y aislamientos										
	A10	A11	A12	A 5	A 9	CP Mex 46	A 3	P.sp 7SRI	CP Mex 3	CP Mex 19	F34
<u>A. tumefaciens</u>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<u>C. fascians</u>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<u>X. campestris</u>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<u>X. phaseoli</u> CBP 123	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<u>X. phaseoli</u> CBP 140	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<u>X. phaseoli</u> CBP 147	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Número de casos de inhibición	6	6	6	5	5	5	4	3	2	2	0

+ : Se presentó halo de inhibición.

- : No se presentó halo de inhibición.

En particular los aislamientos que produjeron hasta 6 casos de inhibición fueron A10, A11, y A12. Del género Rhizobium sólo CP Mex 46 fue quien presentó 5 casos de inhibición.

3.3. El posible papel de los sideróforos en el fenómeno inhibitorio

Bacterias y hongos en un medio carente en hierro secretan sideróforos. Los sideróforos son considerados moléculas transportadoras del ion férrico, siendo su papel el de secuestrar el hierro y facilitarlo al microorganismo con receptores específicos para el ferrisideróforo. Un criterio preliminar para catalogar un producto natural como sideróforo, es la represión de su formación en la célula por la presencia de hierro en el medio (Frederick et al., 1981).

Después de haberse identificado cualitativamente aquellos microorganismos capaces de interferir en el desarrollo de los microorganismos fitopatógenos, se realizó una determinación semicuantitativa del grado de inhibición, mediante el cálculo de las áreas de crecimiento del microorganismo no fitopatógeno y la inhibición del microorganismo fitopatógeno en torno al primero. Para poder comparar el grado de inhibición causada por cada microorganismo, se obtuvo el cociente (II) de los valores del área de inhibición (AI) entre el área de crecimiento (ZC) (Cuadro 6).

La manera como se determinó dicho efecto inhibitorio fue creciendo a los dos tipos de microorganismos en medios con exceso y deficientes en hierro, como se especifica en Materiales y Métodos.

Los cocientes de las áreas fueron denominados índices de inhibición y representan la capacidad de un microorganismo de inhibir el desarrollo de otro. Existe pues, una relación proporcional donde mientras mayor

Cuadro 6. Estimación semicuantitativa de la inhibición provocada a las 72 h de incubación por seis cepas de los aislamientos y Rhizobium phaseoli CP Mex 3 y CP Mex 46 sobre seis microorganismos fitopatógenos. Los valores representan los índices de inhibición en los medios AM-Fe y AMG-Fe.

Cepas	Microorganismos no fitopatógenos y aislamientos								
	A10	CP Mex 46	A5	P.sp7SRI	A3	A12	A9	CP Mex 3	A11
<u>C. fascians</u>	6.62	6.03	4.68	-	7.58	8.61	-	1.37	-
<u>A. tumefaciens</u>	1.43	-	2.03	-	0.72	0.96	4.01	-	4.06
<u>X. campestris</u>	4.78	8.31	-	10.73	-	8.48	-	-	-
<u>X. phaseoli</u> CBP 123	28.29	27.62	18.56	29.68	2.32	-	-	2.53	-
<u>X. phaseoli</u> CBP 140	8.09	22.78	7.55	14.09	-	-	10.75	-	-
<u>X. phaseoli</u> CBP 147	22.22	18.72	11.25	15.29	15.00	-	-	-	-
Número de casos de inhibición	6	5	4	4	4	3	2	2	1

- : Casos donde no se presentó inhibición.

sea el valor del índice de inhibición, mayor será la habilidad inhibitoria. Los índices de inhibición en medios deficientes en hierro representan en algunos casos la capacidad del sideróforo de atrapar el hierro y hacerlo inaccesible al microorganismo fitopatógeno.

Los índices de inhibición señalan que el aislamiento A10 fue el que causó interferencia en todos los microorganismos fitopatógenos probados en este trabajo. En segundo y tercer lugar se presentaron CP Mex 46 y A5, en ellos los casos de inhibición fueron 5. El caso opuesto se presentó con A11 que sólo inhibió a A. tumefaciens. El índice de inhibición más alto se presentó con A10 sobre CBP 123 con 28.29 y el más bajo con CP Mex 3 sobre C. fascians con 1.37 en medios deficientes en hierro (Cuadro 6).

Como se ha venido observando, existen microorganismos con una alta capacidad de interferir en el desarrollo de otros en medios deficientes en hierro. Para probar si alguno de estos fenómenos de interferencia obedecían a la presencia de sideróforos, se realizó una serie de bioensayos complementarios.

Dependiendo del comportamiento manifestado por las cepas en los medios con exceso y deficientes en hierro, los diferentes tipos de inhibición se clasificaron en tres categorías. En la primera donde ocurrió con mayor frecuencia la inhibición, ésta se presentó más fuertemente en el medio con deficiencia en hierro. En el caso de la segunda, la inhibición se presentó en forma similar en ambos medios. Y la tercera, la inhibición se produjo mayormente en medios con exceso en hierro.

Los valores que se expresan en los cuadros 7a y 7b son índices de

Cuadro 7a. Interferencia microbiana promovida por aislamientos y cepas de *Rhizobium phaseoli* a las 72 h de incubación. Los resultados expresan los índices de inhibición en los medios AM-Fe, AM+3Fe y AMG-Fe, AMG+Fe, así como las categorías en que fueron agrupadas.

	Categoría 1							
	Microorganismos no fitopatógenos y aislamientos							
	CP Mex 46	A10	P. sp 7SR1	A3	A5	A12	A9	CP Mex 3
<u>C. fascians</u>	6.03/1.39	-	-	7.58/2.12	-	8.61/5.31	-	1.37/0.00
<u>A. tumefaciens</u>	-	-	-	0.72/0.00	2.03/0.00	-	4.01/0.96	-
<u>X. campestris</u>	8.31/1.04	4.78/0.00	10.73/1.25	-	-	8.48/0.00	-	-
<u>X. phaseoli</u> CBP 123	27.62/0.92	28.30/18.49	29.68/6.44	-	18.56/2.16	-	-	2.53/0.00
<u>X. phaseoli</u> CBP 140	22.78/1.37	8.09/2.63	14.09/3.00	-	7.55/2.72	-	10.75/5.83	-
<u>X. phaseoli</u> CBP 147	18.72/1.36	22.22/6.38	15.29/6.24	15.00/3.00	-	-	-	-

- : Casos donde la inhibición no pudo ser agrupada dentro de esta categoría.

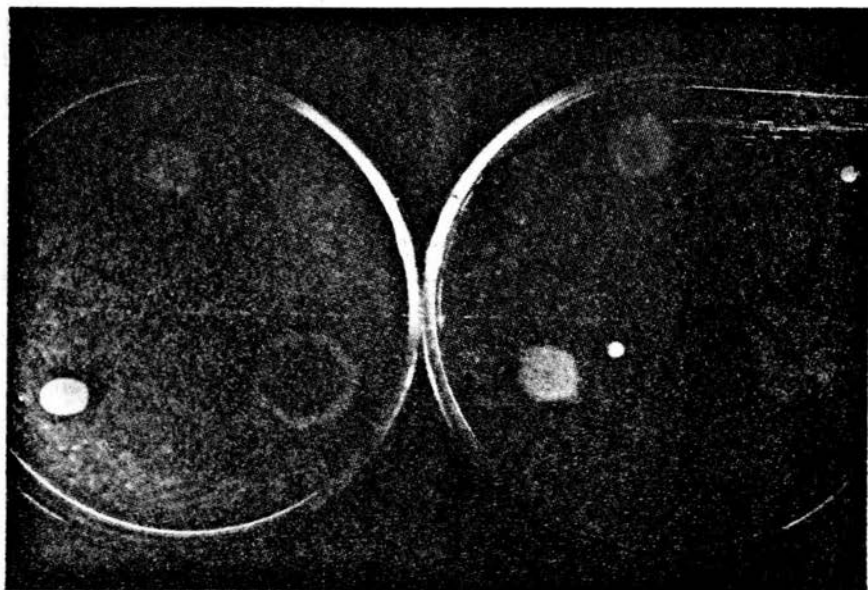
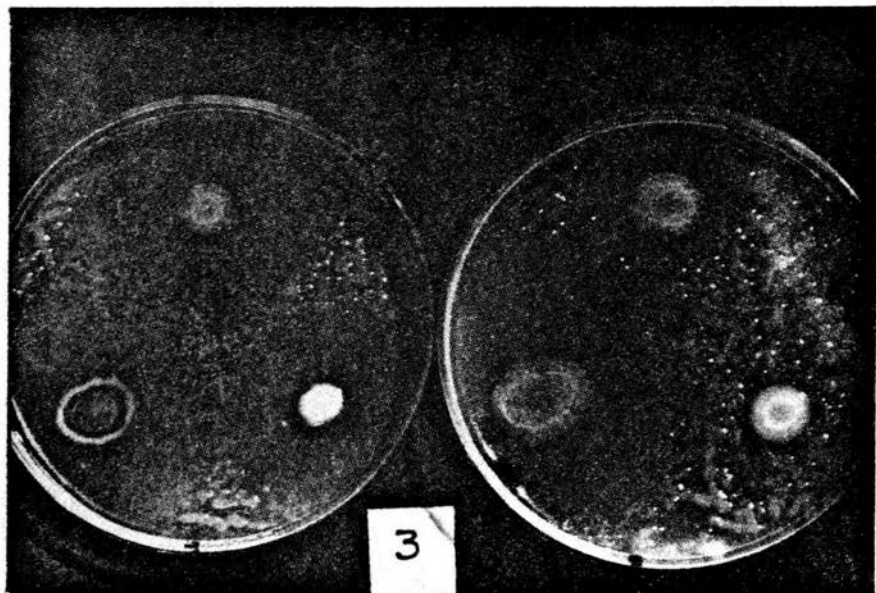
Cuadro 7b. Interferencia microbiana promovida por aislamientos a las 72 h de incubación. Los resultados expresan los índices de inhibición en los medios AM-Fe, AM+3Fe y AMG-Fe, AMG+3Fe, así como las categorías en que fueron agrupadas.

Cepas	Categoría 2 Aislamientos	
	A5	A11
<u>C. fascians</u>	4.68/4.39	-
<u>A. tumefaciens</u>	-	4.06/4.96
<u>X. phaseoli</u> CBP 147	11.25/10.11	-
Número de casos de inhibición	2	1

Cepas	Categoría 3 Aislamientos		
	A10	A3	A12
<u>C. fascians</u>	6.62/19.42	-	-
<u>A. tumefaciens</u>	1.43/ 2.24	-	0.96/4.54
<u>X. phaseoli</u> CBP 123	-	2.32/24.33	-
Número de casos de inhibición	2	1	1

- : Casos donde la inhibición no pudo ser agrupada dentro de estas categorías.

Figura 3. Inhibición en el desarrollo de X. phaseoli CBP 123 en el medio AMG-Fe (derecho), provocado por las cepas A10, CP Mex 46 y 7SRI arriba. Y las cepas A3, CP Mex 3 y A5 (abajo) y reversión del fenómeno inhibitorio en el medio AMG+3Fe (izquierda) de acuerdo a las manecillas del reloj.



inhibición, donde el primer número corresponde al medio con carencia en hierro y el siguiente al medio con exceso en hierro.

Cabría mencionarse que las inhibiciones fueron mayores en los medios con deficiencia en hierro. Lo que podría indicar que por lo menos en la primera categoría, la inhibición estuvo mediada por sideróforos, ya que la inhibición disminuyó al agregar hierro en exceso al medio.

Casos particulares se presentaron con R. phaseoli CP Mex 46 y CBP 123, donde los índices de inhibición fueron muy altos en el medio deficiente en hierro (27.62), llegando a ser casi nula la inhibición en el medio con exceso en hierro (0.92).

Las categorías dos y tres no presentaron disminución de la inhibición al agregar hierro al medio. Se deduce pues, que la inhibición ocurrió por otro tipo de mecanismo.

Cabe destacar que algunos aislamientos fueron agrupados dentro de más de dos categorías (A3, A5, A10 y A12), esto hace suponer que las inhibiciones están determinadas por la relación entre los dos microorganismos.

Finalmente, es interesante observar que las cepas CP Mex 3 y 46 siempre fueron agrupadas en la categoría 1. Y que la cepa CBP 123 fue la que presentó los más altos índices de inhibición dentro del grupo de microorganismos fitopatógenos.

En base a los anteriores resultados se determinó, que el organismo fitopatógeno más idóneo para establecer un sistema de interacción específica planta-patógeno fue CBP 123, organismo que sufrió mayormente inhibición. Debido a esto se seleccionó a Phaseolus vulgaris (fri-

jol común) para establecer un sistema de inhibición in vivo. La planta puede ser cultivada con gran facilidad in vitro, obteniéndose plántulas en 15 días de incubación.

3.4. Efecto del sobrenadante de medio gastado en el desarrollo de la planta: absorción y translocación del sideróforo

Lycopersicum esculentum asimila hierro utilizando el sideróforo ferricromo producido por hongos que habitan en el suelo. Las fusarinas han sido usadas experimentalmente para translocar hierro en frijol soya (Emery, 1977). En el caso del frijol común se trató de definir si existe un mecanismo similar de translocación de los sideróforos, para lo cual se usaron plántulas de frijol Negro 150 y Canario 107 obtenidas in vitro.

Las plántulas de frijol fueron desarrolladas en medios $CN^{2x}-Fe$, siendo transferidas a los medios preparados con SG 25% v/v de las cepas A3, A5, A9, A10 y CP Mex 46 (Figura 4). Las plántulas fueron incubadas y evaluadas a los 5, 15 y 25 días (Materiales y Métodos). Los registros se expresan en los Cuadros 8a y 8b.

Se determinó cualitativamente la presencia o ausencia de clorosis férrica en las hojas nuevas, ya que son en ellas donde se empieza a hacer evidente un amarillamiento causado por la deficiencia en hierro en el medio.

Para el caso de las plántulas de frijol Negro 150, la evaluación hecha a los 5 días de incubación demostró que no existió cambio alguno. No así a los 15 días cuando todas las plántulas presentaron los primeros efectos de la clorosis. Aquellas desarrolladas en presencia de los

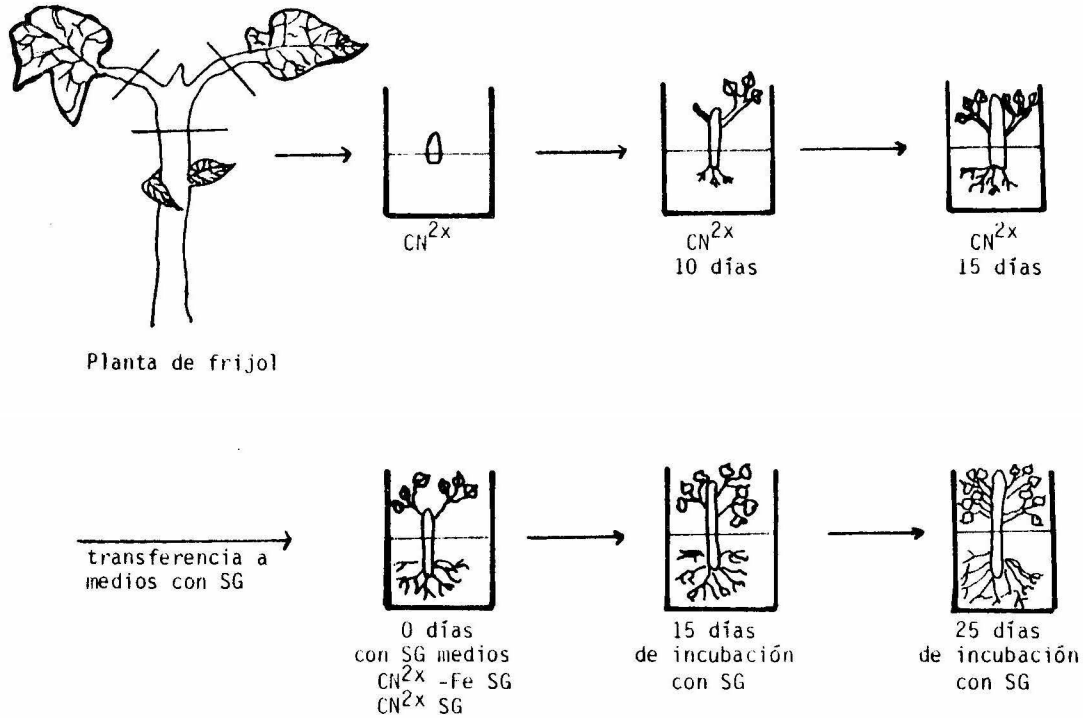


FIGURA 4. DIAGRAMA QUE MUESTRA LA OBTENCIÓN DE PLANTULAS DE FRIJOL, A PARTIR DE LOS APICES DE TALLO. SE EXPRESAN LOS MEDIOS Y TIEMPOS REQUERIDOS, ASÍ COMO LAS TRANSFERENCIAS A DIFERENTES MEDIOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE LOS SOBRENADANTES EN LA PREVENCIÓN DE LOS EFECTOS CLORÓTICOS.

Cuadro 8a. Efecto de los sobrenadantes de medio gastado de los aislamientos A3, A5, A9, A10 y *Rhizobium phaseoli* CP Mex 46 sobre el desarrollo de la clorosis en plántulas de frijol Negro 150.

Medios de cultivo	Días de incubación		
	5	15	25
CN ^{2x} -Fe SG _{A3} -h-s	-	=	±
CN ^{2x} -Fe SG _{A5} -h-s	-	=	+
CN ^{2x} -Fe SG _{A9} -h-s	-	±	+
CN ^{2x} -Fe SG _{A10} -h-s	-	=	±
CN ^{2x} -Fe SG _{CP Mex46} -h-s	-	±	±
CN ^{2x} -Fe	-	=	=

Cuadro 8b. Efecto de los sobrenadantes de medio gastado de los aislamientos A3, A5, A9, A10 y *Rhizobium phaseoli* CP Mex 46 sobre el desarrollo de la clorosis en plántulas de frijol Canario 107.

Medios de cultivo	Días de incubación		
	5	15	25
CN ^{2x} -Fe SG _{A3} -h-s	-	-	-
CN ^{2x} -Fe SG _{A5} -h-s	-	=	+
CN ^{2x} -Fe SG _{A9} -h-s	-	±	±
CN ^{2x} -Fe SG _{A10} -h-s	-	±	±
CN ^{2x} -Fe SG _{CP Mex46} -h-s	-	±	±
CN ^{2x} -Fe	-	±	±

- : Casos donde no se presentó clorosis.

± : Casos donde se presentaron evidencias cloróticas.

+ : Casos donde se presentó clorosis severa.

SG de las cepas A5 y A9 exhibieron clorosis severa a los 25 días de incubación (Cuadro 8a).

En el Cuadro 8b se aprecia que las plántulas de frijol Canario 107 no presentaron efectos cloróticos a los 5 días de incubación. Sólo en presencia del SG A3 pudo ser prevenida la clorosis en las plántulas durante toda la prueba. Los demás SG probados presentaron un comportamiento similar al observado con la variedad Negro 150.

Una vez que fueron probados los SG de las cepas A3, A5, A9, A10 y CP Mex 46, se procedió a realizar una serie de ensayos utilizando aquellas que manifestaron mayor capacidad de inhibición sobre CBP 123. Se emplearon medios CN^{2x} con hierro y deficientes en él, suplementando SG de las cepas A10 y CP Mex 46, para determinar efectos en las plantas. No existieron diferencias apreciables con respecto a las anteriores pruebas (Cuadro 9).

3.5. Verificación de la translocación de los sideróforos mediante un microorganismo de prueba

Debido a que las plántulas de frijol Canario 107 desarrolladas en medios conteniendo el SG del aislamiento A3, fueron las que presentaron menor grado de clorosis, se decidió emplear otro elemento de apoyo para determinar la posible translocación del principio activo. Se trató de evidenciar el efecto inhibitorio al colocar el SG en el medio de cultivo para el desarrollo de los ápices de frijol in vitro e inoculando las hojas de las plántulas de frijol con la cepa CBP 123 (este microorganismo causa la enfermedad conocida como añublo común en frijol). Se determinó el efecto de la inoculación en las hojas desarrolladas con y sin SG. Los resultados del desarrollo de ápices y trifolios son presenta-

Cuadro 9. Verificación del comportamiento de los sobrenadantes de medio gastado sobre el desarrollo de la clorosis en las plántulas de frijol Negro 150. Los medios fueron preparados en condiciones de deficiencia y suplementados con hierro.

Medio de cultivo	Días de incubación 20
$CN^{2x}SG_{A10-h-s}$	+
$CN^{2x-Fe} SG_{A10-h-s}$	+
$CN^{2x}SG_{CP\ Mex\ 46-h-s}$	+
$CN^{2x-Fe} SG_{CP\ Mex\ 46-h-s}$	+
CN^{2x}	-
CN^{2x-Fe}	+

- : Casos donde no se presentó clorosis.

± : Casos donde se presentaron evidencias cloróticas.

+ : Casos donde se presentó clorosis severa.

dos en porcentaje, mientras que los de aspecto clorótico y daño producido por CBP 123, sólo son cualitativos (Cuadro 10) (Figura 5).

Aún cuando el número de muestras fue pequeño (36 ejemplares total), el porcentaje indica evidentemente que las plántulas en desarrollo necesitan ser abastecidas adecuadamente de hierro. La presencia de los SG en el medio de cultivo influyó en un 40 a 60% promoviendo el desarrollo de los ápices y trifolios, comparativamente con los ejemplares control (CN^{2x} y $CN^{2x}-Fe$). No así en la prevención de los efectos cloróticos, donde la clorosis fue evidente. A excepción de los ejemplares que fueron desarrollados en el medio $CN^{2x} SG_{A10}-h-s$ donde disminuyó la clorosis.

Por otro lado la inhibición observada in vitro de CBP 123, no pudo ser demostrada en plántulas de frijol Negro 150, mediante la inoculación en las hojas (Cuadro 10).

Tomando en consideración los resultados sobre el efecto que tienen los SG en el desarrollo de los ápices y trifolios (Cuadro 10), se estimó necesario determinar la capacidad de movilidad del principio activo en los tejidos de la planta.

El objeto de esta prueba fue determinar la capacidad de la planta para absorber y translocar el principio activo. Se probó específicamente tejido de hoja, determinando la reducción de las lesiones producidas por CBP 123 en los sitios de inoculación.

Secciones de hoja de frijol Negro 150 se sembraron en medios suplementados con SG de CP Mex 46 y de A10 e inmediatamente después las hojas fueron inoculadas con CBP 123 (Figura 6), se incubaron durante 13 días. Las evaluaciones se encuentran en el Cuadro 11.

Cuadro 10. Evaluación porcentual del desarrollo de ápices y hojas de frijol Negro 150 incubados en medios preparados con sobrenadante de medio gastado del aislamiento A10 y *Rhizobium phaseoli* CP Mex 46. Se presentan las determinaciones de aspecto clorótico de la plántula y el daño producido por *Xanthomonas phaseoli* CBP 123 a los cinco días de la inoculación.

Medio de cultivo	10 días de incubación		15 días de incubación	
	Desarrollo de los ápices Porcentaje	Desarrollo del trifolio Porcentaje	Aspecto clorótico	Daño producido por <i>X. phaseoli</i> CBP 123
CN ^{2x} SG _{CP Mex 46} -h-s	33.33 %	57.12 %	±	c
CN ^{2x} -Fe SG _{CP Mex 46} -h-s	38.09	42.85	±	c
CN ^{2x} SG _{A10} -h-s	61.90	62.50	-	c
CN ^{2x} -Fe SG _{A10} -h-s	42.80	57.14	+	c
CN ^{2x}	60.00	60.00	-	c
CN ^{2x} -Fe	0.00	0.00		

- : Casos donde no se presentó clorosis.

± : Casos donde se presentaron evidencias cloróticas.

+ : Casos donde se presentó clorosis severa.

a : Casos donde no existió daño.

b : Casos donde existió daño leve.

c : Casos donde existió daño severo.

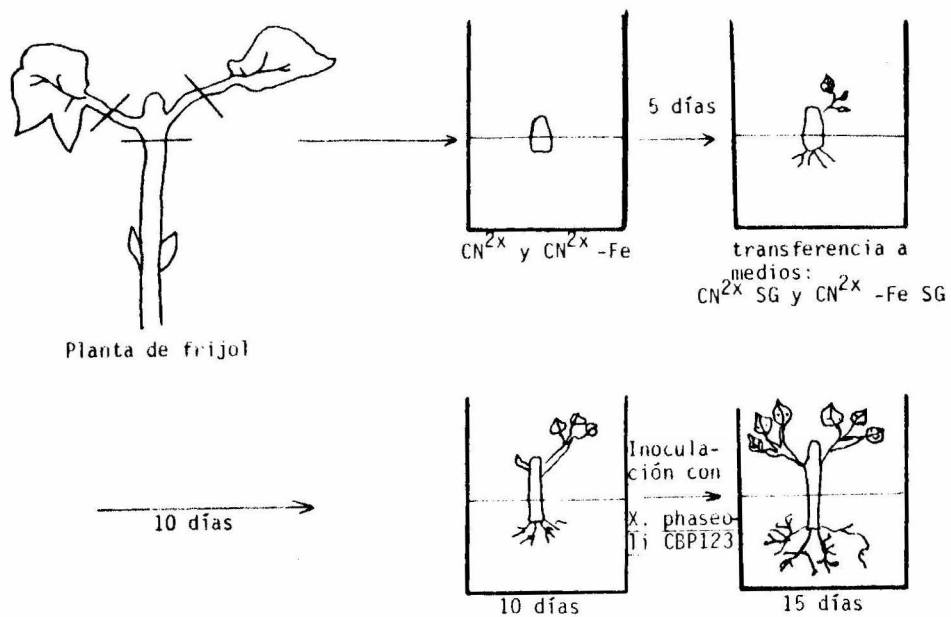
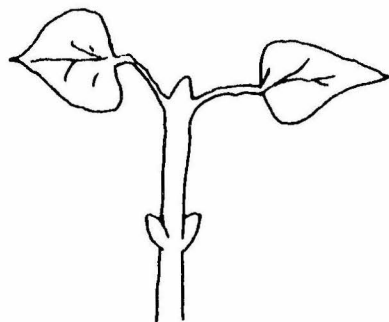
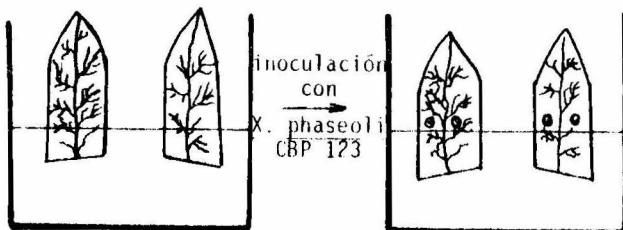


FIGURA 5. DIAGRAMA QUE MUESTRA LOS PASOS SEGUIDOS PARA LA DETERMINACION DE UNA POSIBLE TRANSLOCACION DEL PRINCIPIO ACTIVO PRESENTE EN LOS SOBRENADANTES DE MEDIO GASTADO EN PLANTULAS DE FRIJOL.

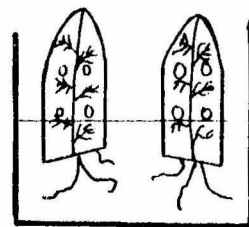
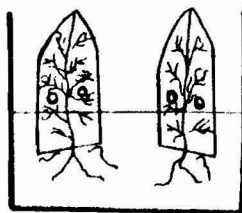


Planta de frijol

13 días →



Siembra en medios
CN²x SG
CN²x-Fe SG



Dos diferentes
distancias de
inoculación

FIGURA 6. DIAGRAMA QUE MUESTRA EL CORTE DE HOJAS, SIEMBRA, INOCULACION E INCUBACION CON OBJETO DE VISUALIZAR LA POSIBLE TRANSLOCACION DEL PRINCIPIO ACTIVO PRESENTE EN LOS SOBRENADANTES DE MEDIO GASTADO.

Cuadro 11. Efecto de los sobrenadantes de medio gastado de Rhizobium phaseoli CP Mex 46 y del aislamiento A10 sobre la aparición de síntomas producidos por Xanthomonas phaseoli CBP 123 en franjas centrales de frijol Negro 150.

Medios de cultivo	Inoculación	Tiempo de incubación	
		7 días	13 días
CN ^{2x} SG _{CP Mex 46} -h-s	Sí	c	c
CN ^{2x} -FeSG _{CP Mex 46} -h-s	Sí	c	c
CN ^{2x} SG _{A10} -h-s	Sí	c	c
CN ^{2x} -FeSG _{A10} -h-s	Sí	c	c
CN ^{2x}	Sí	c	c
CN ^{2x} -Fe	Sí	c	c
CN ^{2x}	No	a	a
CN ^{2x} -Fe	No	a	a

a : Casos donde no existió daño.

b : Casos donde existió daño leve.

c : Casos donde existió daño severo.

Los resultados de esta prueba se consideran preliminares, porque solamente la prueba se realizó por duplicado. A partir del séptimo día de incubación las lesiones se evidenciaron, observándose claramente al décimo tercer día, siendo similares para todos los tratamientos. Esto presumiblemente indicaría que los dos tipos de SG probados no pueden ser movilizados hasta el lugar de la inoculación. Se consideró necesario tener en cuenta la distancia de la superficie del medio al sitio donde se practicaría las inoculaciones, éstas se realizaron a 0.5 y 1.5 cm de la superficie de contacto con el medio (Figura 6). Las evaluaciones se realizaron a los 7 días de inoculación, procediéndose a agruparlas en 3 grupos dependiendo del daño que presentaron.

Los organismos clasificados en el grupo 1 no presentaron daño aparente, en el grupo 2 aquéllos en que el daño fue moderado y en el 3 los que presentaron daño severo. Los resultados se encuentran en los Cuadros 12a y 12b.

En el Cuadro 12a se observa que el medio $CN^{2x}SG_{CPMex\ 46}$ -h-s mostró mayor efectividad en la prevención de los síntomas del añublo común en 75% de las muestras clasificadas dentro del grupo 1, para ambas distancias, en segunda posición dentro del grupo 1 se presentó el medio $CN^{2x}-Fe\ SG_{A10}$ -h-s con 50%. Aparentemente no existieron diferencias en cuanto a las distancias relativas al medio y por consiguiente a los SG.

En comparación con los resultados obtenidos en frijol Negro 150, en Canario 107 observamos que ninguno de los medios probados con SG pudo disminuir considerablemente el daño producido por el patógeno (Cuadro 12b).

Cuadro 12a. Efecto de los sobrenadantes de medio gastado del aislamiento A10 y *Rhizobium phaseoli* CP Mex 46 sobre la aparición de síntomas producidos por *Xanthomonas phaseoli* CBP 123 en franjas centrales de hoja de frijol Negro 150. Los resultados son expresados en porcentaje.

Medios de cultivo	Distancia de inoculación	D a ñ o		
		1	2	3
CN ^{2x} SG _{A10} -h-s	0.5 cm	0.00 %	66.66 %	33.33 %
	1.5	0.00	66.66	33.33
CN ^{2x} -FeSG _{A10} -h-s	0.5	50.00	25.00	25.00
	1.5	50.00	0.00	50.00
CN ^{2x} SG _{CP Mex 46} -h-s	0.5	75.00	12.50	12.50
	1.5	75.00	0.00	25.00
CN ^{2x} -FeSG _{CP Mex 46} -h-s	0.5	0.00	70.00	30.00
	1.5	10.00	70.00	20.00
CN ^{2x}	0.5	0.00	100.00	0.00
	1.5	0.00	0.00	100.00
CN ^{2x} -Fe	0.5	50.00	50.00	0.00
	1.5	100.00	0.00	0.00

1 : Calificación que se dio a aquellas franjas de hoja donde no hubo daño.

2 : Calificación que se dio a aquellas franjas de hoja donde hubo daño leve.

3 : Calificación que se dio a aquellas franjas de hoja donde hubo daño severo.

Cuadro 12b. Efecto de los sobrenadantes de medio gastado del aislamiento A10 y *Rhizobium phaseoli* CP Mex 46 sobre la aparición de síntomas producidos por *Xanthomonas phaseoli* CBP 123 en franjas centrales de hoja de frijol Canario 107. Los resultados son expresados en porcentaje.

Medios de cultivo	Distancia de inoculación	D a ñ o		
		1	2	3
CN ^{2x} SG _{A10} -h-s	0.5 cm	0.00 %	0.00 %	100.00 %
	1.5	0.00	0.00	100.00
CN ^{2x} -FeSG _{A10} -h-s	0.5	0.00	0.00	100.00
	1.5	0.00	0.00	100.00
CN ^{2x} SG _{CP Mex 46} -h-s	0.5	0.00	14.28	85.71
	1.5	0.00	16.66	83.33
CN ^{2x} -FeSG _{CP Mex 46} -h-s	0.5	0.00	33.33	66.66
	1.5	0.00	33.33	66.66
CN ^{2x}	0.5	0.00	0.00	100.00
	1.5	0.00	0.00	100.00
CN ^{2x} -Fe	0.5	0.00	0.00	100.00
	1.5	0.00	0.00	100.00

1 : Calificación que se dio a aquellas franjas de hoja donde no hubo daño.

2 : Calificación que se dio a aquellas franjas de hoja donde hubo daño leve.

3 : Calificación que se dio a aquellas franjas de hoja donde hubo dano severo.

3.6. Identificación taxonómica de los aislamientos productores del compuesto inhibitorio

Debido a que gran parte de los microorganismos utilizados en este estudio, no han sido identificados taxonómicamente y dado que presentaron actividad inhibitoria, fue necesario determinar género y especie de cada aislamiento.

Los resultados de las pruebas morfológicas en las que se determinaron las características de las colonias y de las células: forma y flagelos (número y posición) a nivel microscópico; así como las pruebas selectivas, medios específicos y requerimientos metabólicos, se muestran en el Cuadro 13.

Con respecto a la morfología colonial y celular se demostró que no existen diferencias considerables entre los aislamientos y de éstos con respecto a P. sp 7SRI. El crecimiento típico que manifestaron en el medio BK, así como el requerimiento de oxígeno, hace suponer que pertenecen al género Pseudomonas (Cuadro 13).

La posición polar y el número de flagelos de 1 a 3 es típico del género Pseudomonas (Buchanan y Gibbons, 1974), esta característica fue observada en las cepas A3 y A9, mientras que en los aislamientos restantes no fue posible observar dichas estructuras.

Dentro del género Pseudomonas existen especies fitopatógenas y no fitopatógenas, debido a esto se consideró necesario conocer la especie a la cual pertenecen los aislamientos. Se realizaron 5 pruebas específicas que se basan en determinar la agresividad de la bacteria. Los resultados se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Evaluación de los ensayos realizados en cinco aislamientos para la determinación del género y especie.

Pruebas	Aislamientos					
	A 3	A 5	A 9	A 10	A 12	P.sp 7SRI
Morfología colonial en el medio ALM						
olor	jabón	leche	jabón	leche	leche	sin olor
color	verde	blanco	verde	blanco	verde	verde
forma	circular	circular	circular	circular	circular	circular
borde	ondulado	ondulado	ondulado	ondulado	ondulado	ondulado
elevación	plana	plana	plana	plana	plana	convexa
superficie	brillante	brillante	brillante	brillante	brillante	brillante
	rugosa			pulvurenta	pulvurenta	lisa
diámetro	4 mm	3 a 4 mm	3 a 5 mm	2 mm	3 a 4 mm	3 mm
Morfología celular						
forma	bacilar	bacilar	bacilar	bacilar	bacilar	bacilar
Tinción de Gram	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
Crecimiento característico						
medio EDC	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
medio BK	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Flagelos						
número	1 a 3		1 a 3			1 a 3
posición	polar		polar			polar
Oxido-fermentación	-	-	-	-	-	-
Hipersensibilidad en tabaco	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+
Pudrición de papa	-	-	-	-	-	-
Arginina de hidrolasa	+	+	+	+	+	+
Producción de levana	-	-	-	-	-	+

Los resultados de las pruebas realizadas fueron comparados con los del Cuadro 14, donde se presentan las características de las especies P. fluorescens y putida.

Los únicos resultados confiables presentados en el Cuadro 13, pertenecieron a las cepas A3 y A9. Para los aislamientos restantes sólo se tuvo en consideración el número y posición de los flagelos, ya que en ellos no pudo ser observado, las demás características fueron similares a las cepas A3 y A9.

Según Buchanan y Gibbons (1974) sólo existe una diferencia muy particular para separar la especie P. fluorescens y P. putida y ésta es la presencia de levana, característica que se encuentra en tres de las cuatro razas de P. fluorescens. En este caso, todas las cepas probadas fueron levana negativa, lo que hace suponer que su posición taxonómica sea P. fluorescens-putida.

Cuadro 14. Descripción de los rasgos específicos de Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas putida.

Caracterización	<u>P. fluorescens</u>	<u>P. putida</u>
Morfología celular	bacilar	bacilar
Tinción de Gram	negativo	negativo
Dependencia de oxígeno	aeróbica	aeróbica
Producción de pigmento en medio BK	+	+
Número de flagelos	mayor de 1	mayor de 1
Producción de levana	+	-
Arginina de hidrolasa	+	+
Reacción de oxidasa	+	+

4. DISCUSION

Fue un objetivo del presente trabajo establecer las condiciones experimentales más sencillas que permitieran observar con claridad el fenómeno denominado interferencia microbiana provocada por sideróforos. Esto fue debido a que en la literatura se citan métodos bastante complejos y sofisticados, que han sido usados para retirar impurezas de nitrógeno en reactivos, agua y material de cristalería (Peters y Warren, 1968; Meyer y Abdallah, 1978a; Ong *et al.*, 1979, Frederick *et al.*, 1981; McCracken y Swinburne, 1979; Leong y Neiland, 1982; Fekete *et al.*, 1983; Expert y Toussainy, 1985).

La metodología empleada para determinar el grado de desarrollo, así como las velocidades de crecimiento de los microorganismos en medios carentes en hierro, demostraron grandes diferencias entre los medios M y M-Fe, MG y MG-Fe. En algunos casos donde el crecimiento fue similar en ambos medios se consideró factible que los microorganismos presentaran la capacidad de sintetizar estos compuestos. Así también pudo observarse claramente halos grandes de inhibición, preferentemente en los medios con carencia en hierro, presentándose inhibiciones parciales y totales. Y esto sólo ocurre en medios con muy bajas cantidades de hierro como contaminante.

Estas evidencias demuestran que la metodología empleada fue sencilla y apropiada, ya que se pueden reducir costos y ahorrar tiempo, permitiendo seleccionar entre una gran cantidad de microorganismos aqué-

llos que posean mecanismos altamente eficientes en la asimilación de hierro. Así como la capacidad que tengan éstos de interferir en el desarrollo de otros microorganismos.

Existe un criterio preliminar para determinar si un microorganismo es capaz de producir sideróforos. Este se basa en detectar la capacidad del microorganismo para crecer en medios deficientes en hierro (Frederick et al., 1981). Los dos grupos de organismos aquí estudiados, bacterias fitopatógenas y no fitopatógenas exhibieron una gama de respuestas al ser crecidas en medios deficientes en hierro. Al parecer existe una mayor dependencia al elemento por parte de las bacterias fitopatógenas (Cuadro 1). Pero esto no descarta la posibilidad de que ellos puedan sintetizar sideróforos. Se sabe que por lo menos A. tumefaciens (Ong et al., 1979; Leong y Neilands, 1981), P. phaseolicola y E. carotovora (Leong y Neilands, 1982) sintetizan sideróforos tipo catecol e hidroxamato.

Los sideróforos se consideran compuestos metabólicos secundarios que se producen y se acumulan en mayor cantidad en la fase exponencial tardía de crecimiento (Peralta, 1986), en base a lo anterior y analizando los Cuadros 1 y 2 se puede inferir que los compuestos sintetizados a las 24 y 48 h presumiblemente sean sideróforos, ya que permiten que el organismo se vea parcialmente liberado de tal limitación.

Analizando comparativamente los Cuadros 3 y 4, donde se muestran las velocidades obtenidas para los medios deficientes y suplementados con hierro en la fase exponencial de crecimiento, se encontró que las bacterias no fitopatógenas presentaron los valores más altos de índices de eficiencia, citaremos aquí algunos ejemplos: A12 (1.75), A9 (1.46),

A4 (1.17) A3 (1.10) y CP Mex 3 (1.06). Esto parece indicar que en ellos existe un mecanismo de asimilación del hierro altamente eficiente. No así la especie X. phaseoli CBP 123 que presentó un índice de eficiencia de 0.22. En este caso pudo apreciarse una estrecha dependencia por el hierro y por lo tanto un mecanismo poco efectivo para su asimilación. Aún cuando esta especie mostró un crecimiento similar a las 24 h (100%)

Cuadro 1. Los resultados anteriormente expuestos son considerados más confiables, ya que indican la forma en la cual responden los microorganismos al ser privados de hierro.

De los 5 géneros de bacterias fitopatógenas probadas, las 4 cepas del género Xanthomonas mostraron dificultad para crecer en condiciones detrimentales en hierro. En base a lo anterior se diseñó una metodología para determinar y seleccionar especies con sistemas de alta capacidad para quelar selectivamente el hierro y que por ello pudieran interferir favorablemente con especies competidoras en el medio. Esto ha sido mejor estudiado en mamíferos, donde la competencia por el hierro entre los sideróforos microbianos y las proteínas de los mamíferos transferrinas y lactoferrinas determinan la virulencia del microbio (Weinberg, 1978).

Examinado el Cuadro 5, se advierte la capacidad que tienen algunos de los organismos de interferir en el desarrollo de otros. La intensidad o magnitud de tal inhibición se observa en el Cuadro 6, donde las cepas A10, CP Mex 46 y A5 mostraron los mayores casos de inhibición, así como los valores más altos de índices de inhibición obtenidos.

A excepción del aislamiento A11 todas las cepas probadas presentaron en el medio deficiente en hierro un pigmento difusible. En el caso

de los aislamientos el pigmento fue fluorescente, mientras que para R. phaseoli CP Mex 46 se presentó un color parduzco; todos ellos en la fase estacionaria de crecimiento. Esto parece indicar que la producción de pigmento está relacionada con la producción de este tipo de compuestos.

Se encontró dentro de este fenómeno de inhibición la existencia de cierta especificidad, esto lo demuestran los valores de índices de inhibición, donde cierto microorganismo puede ser mayor o menormente agresivo dependiendo del otro microorganismo con el que se esté probando. El resultado más sobresaliente de esta interacción se encontró con las cepas A10 y CBP 123. Se conoce por los resultados aquí presentados que la cepa CBP 123 se desarrolla con gran dificultad en medios carentes en hierro, lo anterior explicaría sólo en parte la inhibición tan elevada provocada por la cepa A10. Con respecto a la cepa A10 ésta se clasificó como organismo de mediana capacidad de desarrollo, (Cuadro 2), pero por otro lado fue la que presentó el mayor número de casos de inhibición (Cuadro 6), indicando con ello su alta habilidad de antagonismo. Los resultados permitieron así mismo caracterizar preliminarmente a los aislamientos. Se presentó cierta similitud en los patrones de inhibición de las cepas A10 con A5 y A9 con A11. Usando medios con cantidades de hierro disponible se observaron tres distintos mecanismos de interferencia. El primer caso ocurrió fundamentalmente en medios carentes en hierro, la recuperación se observó en el medio con hierro (Categoría 1). La inhibición en el segundo caso fue similar en ambos medios (Categoría 2) y la tercera donde la inhibición se presentó en mayor grado en medios con hierro disponible (Cuadro 7a y 7b).

En la gran mayoría de los casos estudiados la inhibición estuvo regulada por la ausencia de hierro y ésta fue suprimida cuando existió hierro disponible. Si la biosíntesis de sideróforos y de las proteínas receptoras de membrana es regulada por el hierro (Neilands, 1981) esto es otra evidencia más para clasificar a estos compuestos como sideróforos.

Los sideróforos han sido encontrados tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (Cline et al., 1983; Murphy et al., 1976; Powell et al., 1980) y han sido utilizados para interferir en el desarrollo de otros habitantes del mismo nicho (Peralta, 1986).

Fueron considerados de manera arbitraria como resultados confiables aquéllos donde el índice de inhibición fue mayor o igual a 15. Esto sólo se presentó con las tres cepas de X. phaseoli. La reversión total se presentó en un solo caso para la Categoría 1 (CP Mex 46 y GBP 123).

Es interesante señalar que la cepa CP Mex 46 fue la única que presentó los más altos índices de inhibición sobre las tres cepas de X. phaseoli, esto cabría ser explicado desde un punto de vista coevolutivo.

Con lo referente al fenómeno de absorción y translocación de sideróforos por la planta, cabe enfatizar ciertos puntos; se ha demostrado la presencia de sideróforos tipo hidroxamato en una gran variedad de suelos en muy altas concentraciones, lo que potencialmente afecta la absorción del hierro en la planta, además de ser capaces de formar quelantes estables de hierro en suelos con pH ácidos y básicos (Cline, 1984).

Usando los sobrenadantes de medio gastado de las cepas que se en-

contraron interfieren sobre X. phaseoli, se determinó la capacidad de éstos de disminuir los efectos cloróticos producidos por la falta de hierro. La primera serie de resultados probando plántulas de frijol Negro 150 y Canario 107 mostraron que la ausencia de hierro en el medio no permitió la activación y utilización del ferrisideróforo previamente formado (Cuadros 8a y 8b) en el medio de cultivo.

Aún cuando los resultados son poco confiables debido al número de repeticiones (2), cabe notar que al incubar frijol Canario 107 con el SG de la cepa A3, este último previno la clorosis férrica.

Los tratamientos donde se usaron medios deficientes y suplementados con hierro más la adición de los SG de las cepas A10 y CP Mex 46, permitieron advertir que la planta aparentemente no posee los mecanismos necesarios para absorber el ferrisideróforo.

Existen evidencias experimentales que demuestran que las plantas fierro-eficientes tienen la capacidad de asimilar hierro a partir de ferrisideróforos, mientras que las fierro-ineficientes absorben el hierro en forma no quelada, usando el sideróforo sólo como acarreador y solubilizador.

En base a lo anterior se puede señalar como posible utilización el ferrisideróforo de la cepa A10 probada con frijol Negro 150 en plántulas de 10 días de desarrollo, ya que no hubo evidencias cloróticas. En todos los tratamientos de inoculación con la cepa CBP 123 hubo daño severo. Existiendo la posibilidad de que el complejo no sea absorbido, sino que la reducción del hierro ocurra fuera de la célula de la raíz y por lo tanto éste no sea translocado.

Los bioensayos realizados usando franjas centrales de hoja de frijol e inoculándolas con el organismo de prueba indican que para frijol Negro 150 el SG que mostró mejor resultado preventivo fue el de la cepa CP Mex 46 más adición de hierro al medio, presentando un 70% de muestras sin daño. Para frijol Canario 107 los resultados obtenidos no fueron considerados confiables, ya que aún los testigos presentaron daño.

Los aislamientos utilizados fueron identificados dentro del género Pseudomonas especie fluorescens. Se puede afirmar que aún cuando los aislamientos fueron identificados como P. fluorescens, su actividad antagonizadora los hace diferentes (Weger et al., 1986). Indicando con ello que las cepas son similares, ya que pertenecen a la misma especie pero no idénticas.

La pseudobactina (Neilands, 1982; Kloepper et al., 1980a y b; Teintze et al., 1981) y la pioverdina (Marugg, 1985; Meyer y Abdallah, 1978b) han sido reportados como sideróforos tipo hidroxamato de P. fluorescens. Debido a ello es indicativo de que el principio activo pueda pertenecer a cualquiera de los dos sideróforos antes mencionados.

5. CONCLUSIONES

No existió una relación dentro del ordenamiento de los microorganismos por su velocidad de crecimiento en medios deficientes en hierro con respecto a su capacidad de inhibir, así como su rango de interferencia, ya que influyó de manera determinante la especificidad entre ellos.

De los trece microorganismos no fitopatógenos y aislamientos probados, ocho causaron inhibición mediada por sideróforos. Estableciéndose que el orden del sistema de selección y caracterización de organismos productores de sideróforos fue bueno y apropiado.

Las pruebas realizadas sobre inhibición permitieron determinar si el fenómeno estaba mediado por sideróforos.

Mediante un sistema de análisis de este tipo se puede establecer los posibles sistemas de control biológico, al poderse identificar aquellos microorganismos que posean la capacidad de inhibir de manera específica a microorganismos fitopatógenos.

El microorganismo que causó el mayor número de casos de inhibición sobre microorganismos fitopatógenos fue R. phaseoli CP Mex 46, que inhibe preferentemente a bacterias fitopatógenas de frijol (P. vulgaris).

La posibilidad de que los sideróforos pudieran tener algún efecto en la adquisición del hierro por las plantas de frijol, sólo pudo ser

considerado probable y bajo ciertas reservas. Esto sólo fue observado en los aislamientos A3 y A10 que evitaron aparentemente la clorosis férrica en frijol Canario 107 y Negro 150 respectivamente.

Los sobrenadantes de medio gastado presentes en los medios de cultivo de hojas y plántulas de frijol no redujeron el daño ocasionado por X. phaseoli CBP 123.

Las pruebas de identificación taxonómica de los aislamientos A3, A5, A9, A10 y A12 dieron como resultado que todos ellos pertenecen al grupo de las Pseudomonas fluorescens-putida, bacterias saprofitas.

6. APENDICE

APENDICE 1

Composición de los medios de cultivo

Todas las cantidades anotadas, están expresadas para la preparación de 1 l de medio de cultivo.

Medio ALM

	compuesto	cantidad
1.	K_2HPO_4	500.00 mg
2.	$MgSO_4$	96.00 "
3.	$NaCl$	100.00 "
4.	Extracto de levadura	1.00 g
5.	Manitol	10.00 "
6.	Agar	18.00 "

Medio ALG

Tiene la misma composición que la del medio ALM, cambiando el manitol por 4 g de glucosa.

Medio M

	compuesto	cantidad
1.	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.50 mg
2.	$FeCl_3$	1.00 "
3.	KH_2PO_4	10.00 "
4.	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.50 "
5.	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.00 "
6.	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.10 "

7. Ac.l-glutámico	0.10 g
8. Biotina	1.00 mg
9. Pantotenato de calcio	1.00 "
10. Tiamina B ₁	1.00 "
11. Manitol	1.00 "

Medio M-Fe

Tiene la misma composición que el medio M, cambiando sólo el componente No. 2 por 10 ml de HCl 0.1 N.

Medio M+3Fe

Presenta la misma composición que el medio M, aumentándose la concentración del compuesto No. 2 a 3 mg.

Medio AM

Contiene la misma composición que el medio M más 16 g de agar.

Medio AM-Fe

Presenta la misma composición del medio M-Fe más 16 g de agar.

Medio AM+Fe

Presenta la misma composición del medio M+3Fe más 16 g de agar.

Medio MG

Tiene la misma composición que el medio M, sólo que en lugar del compuesto No. 11, contiene 4 g de glucosa.

Medio MG-Fe

Presenta la misma composición que la del medio MG sólo que sin el compuesto No. 2, en su lugar contiene 10 ml de HCl 0.1 N.

Medio MG+3FE

Tiene la misma composición que el medio MG, aumentando a 3 mg el componente No. 2.

Medio AMG

Tiene la misma composición del medio MG más 16 g de agar.

Medio AMG-Fe

Tiene la misma composición del medio MG-Fe más 16 g de agar.

Medio AMG+3Fe

Tiene la misma composición del medio MG+3Fe más 16 g de agar.

Medio BK

	compuesto	cantidad
1.	K_2HPO_4	1.50 g
2.	$MgSO_4$	1.50 "

3. Polipeptona	20.00 g
4. Glicerol	10.00 ml
5. Agar	15.00 g

Medio EDC

compuesto	cantidad
1. CaCO_3	20.00 g
2. Extracto de levadura	10.00 "
3. Glucosa	20.00 "
4. Agar	15.00 "

Medio HL

compuesto	cantidad
1. K_2HPO_4	0.30 g
2. NaCl	5.00 "
3. Peptona	20.00 "
4. Glucosa	10.00 "
5. Agar	3.00 "
6. Azul de bromotimol	0.03 "

Medio para producción de levana

compuesto	cantidad
1. Extracto de carne	3.00 g
2. Peptona	10.00 "
3. Sacarosa	50.00 "
4. Agar	20.00 "

Medio de Thornley

compuesto	cantidad
1. K_2HPO_4	0.30 g
2. NaCl	5.00 "
3. Arginina-HCl	10.00 "
4. Peptona	1.00 "
5. Agar	5.00 "
6. Rojo Fenol	0.01 "

Medio de Creswell y Nitsch modificado (1975) para cultivo de órganos vegetales (CN^{2x}).

compuesto	cantidad	molaridad
1. $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	991.80 mg	0.0042
2. KNO_3	246.60 "	0.00238
3. KH_2PO_4	250.40 "	0.001838
4. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	125.70 "	5.09×10^{-4}
5. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.80 "	9.99×10^{-5}
6. Na_2EDTA	37.22 "	9.99×10^{-5}
7. H_3BO_3	19.60 "	3.16×10^{-4}
8. $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	18.59 "	8.33×10^{-5}
9. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	12.30 "	4.27×10^{-5}
10. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	24.00 "	9.61×10^{-8}
11. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	482.00 "	1.99×10^{-6}
12. Glicina	200.00 "	2.66×10^{-5}
13. Mesoinositol	121.00 "	6.71×10^{-4}
14. Ac. Nicotínico	5.00 "	4.06×10^{-5}
15. Ac. Fólico	480.00 μ g	1.08×10^{-6}

16. Biotina	48.00 μg	1.94×10^{-7}
17. Piridoxina-HCl	0.49 mg	2.30×10^{-6}
18. Tiamina-HCl	5.00 "	1.48×10^{-5}
19. Ac. Indol-3-butírico	230.00 μg	9.99×10^{-7}
20. Sacarosa	20.50 g	0.0598
21. Agar	4.00 "	
pH	5.8	

APENDICE 2

Composición de las soluciones y volúmenes requeridos para
la preparación de 1 l de medio de cultivo

Las cantidades que se anotan a continuación son para la preparación de 1 l de solución.

Medio	Solución	Compuesto	Cantidad	Volumen para la preparación de 1 l de medio
ALM	C-a	MgSO ₄	120.30 g	3.0 ml
	C-b	K ₂ HPO ₄	50.00 "	10.0 "
		NaCl	10.00 "	
M	M-a	Ac.l-glutámico	100.00 "	10.0 "
	M-b	Manitol	100.00 "	10.0 "
	M-c	KH ₂ PO ₄	30.00 "	10.0 "
		Na ₂ HPO ₄	30.00 "	
	M-d	MgSO ₄ .7H ₂ O	10.00 "	10.0 "
	M-e	CaCl ₂ .2H ₂ O	5.00 "	10.0 "
	M-f	H ₃ BO ₃	1.00 "	
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.10 "	10.0 "
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05 "	
		MnCl ₂ .4H ₂ O	0.05 "	
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.01 "	
	M-g	FeCl ₃	100.00 mg	10.0 "
	M-h	Biotina	100.00 "	
Pantotenato de calcio		100.00 "	10.0 "	

Medio	Solución	Compuesto	Cantidad	Volumen para la preparación de 1 l de medio
		Tiamina	100.00 mg	
	M-i	HCl	0.1 N	10.0 ml
	M-j	FeCl	300.00 mg	10.0 "
CN ^{2x}	CN-a	Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	49.59 g	20.0 "
	CN-b	KNO ₃	12.13 "	20.0 "
	CN-c	KH ₂ PO ₄	12.52 "	10.0 "
	CN-d	H ₃ BO ₃	0.98 "	
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	24.00 mg	
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	12.57 g	
		MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.85 "	
		CuSO ₄ ·7H ₂ O	2.40 mg	
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.23 g	
		CN-e	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.59 "
		Na ₂ EDTA	7.45 "	
	CN-f	Glicina	1.00 "	2.0 "
	CN-g	Ac. Nicotínico	1.00 "	5.0 "
	CN-h	Ac. Fólico	100.00 "	5.0 "
CN-i	Biotina	10.00 mg	5.0 "	
CN-j	Piridoxina	1.00 g	0.5 "	
CN ^{2x}	CN-k	Tiamina	1.00 "	5.0 "
		Ac. indol-3-butí-rico	100.00 mg	2.0 "

APENDICE 3

Composición de las soluciones de uso general

Las cantidades que se anotan a continuación son para la preparación de 100 ml de solución.

Solución	Compuesto	Cantidad
Glucosa	Glucosa	20.00 g
Kanamicina	Kanamicina	1.00 "
Cristal violeta	Cristal violeta	0.25 "
	Fenol	1.25 "
	Etanol al 97%	10.00 "
	Glicerol	40.00 "
Lugol	Iodo	0.10 "
	KI	0.20 "
Mordiente	Ac. tánico	25.00 "
(Tinción de flagelos)	Trióxido de cromo	0.468"
Safranina	Safranina	0.10 "
Reactivo para la deter- minación de oxidasa	N-N-dimetil-p- fenilenadiazamino	1.00 "
Desinfectante	Hipoclorito de calcio	3.00 "
Salina	NaCl	0.85 "

7. BIBLIOGRAFIA

- Akers, H.A. 1981. The effect of waterlogging on the quantity of microbial iron chelater. *Soil Sci.* 132:150-152.
- Armstrong, J.E. and C. van Baalen. 1979. Iron transport in microalgae: the isolation and biological activity of a hydroxamate siderophore from the blue-green alga Agmenellum quadruplicatum *J. Gen. Microbiol.* 111:253-262.
- Bezkorovainy, A. 1980. Biochemistry of nonheme iron. *In* Biochemistry of the elements. Vol I. Eds. Earl Friend. Plenum Press, New York and London. 435 p.
- Brown, J.C. 1976. Iron deficiency and boron toxicity in alkaline soil. *In* Plant adaptation to mineral stress in problem soils. Eds. Proceedings of a workshop held at the National Agricultural Library, Beltsville, Maryland. pp. 83-94.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative bacteriology* 8a. ed. The Waverly Press Inc., Baltimore 1268 p.
- Budesensky, M., Z. Prochazka, H. Budzikiewicz, A. Romer, H. Ripperger, K. Schreiber and G. Schols. 1981. On the "normalizing factor" for the tomato mutant "chloronerva" - X₁. *Tetrahedron.* 17:191-196.
- Cline, G.R., P.E. Powell, P.J. Szanislo and C.P.P. Reid. 1983. Comparison of the abilities of hydroxamic and other natural organic acids to chelate iron and other ions in soil. *Soil Sci.* 136:145-157.
- _____, C.P.P. Reid, P.E. Powell and P.J. Szanislo. 1984. Effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum. *Plant Physiol.* 76:36-39.
- Cronquist, A. 1977. *Introducción a la Botánica* 2a. ed. C.E.C.S.A. México. 848 p.
- Devlin, M.R. 1980. *Fisiología Vegetal* 3a. ed. Omega, Barcelona. Esp. 517 p.
- Emery, T. 1977. The storage and transport of iron. *In* Metal ions in biological systems, iron in model and natural compounds. Vol. 7 Eds. H. Sigel. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 77-125.
- Expert, D. and A. Toussainy. 1985. Bacteriocin-resistant mutants of Erwinia chrysanthemi: Possible involvement of iron acquisition in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 163:221-227.

- Fekete, F.A., J.T. Spence and T. Emery. 1983. A rapid and sensitive paper electrophoresis assay for the detection of microbial siderophores elicited in solid-plating culture. *Analytical Biochem.* 131:516-519.
- Frederick, C.B., P.T. Szaniszló, P.E. Nickery, M.P. Bentley and W. Shire. 1981. Production and isolation of siderophores from the soil fungus Epicoccum purpurascens. *Biochem.* 20:2432-2436.
- Gibson, F. and D.I. Magrath. 1969. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by Aerobacter aerogenes 62-1. *Biochem. Biophys. Acta* 192:175-184.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze and M.N. Schroth. 1980a. Pseudomonas siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4:317-320.
- _____. 1980b. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886.
- Kushner, D.J., T.A. Landry, M.C. Tyrrell and H.A. Akers. 1983. The production of hydroxamic acids with Titanium (III) Chloride: A tool for the characterization of siderophores. *Analytical Biochem.* 133:116-119.
- Leong, S.A. and J.B. Neilands. 1981. Relationship of siderophore-mediated iron assimilation to virulence in grown gall disease. *J. Bacteriol.* 147:482-491.
- _____. 1982. Siderophore production by phytopathogenic microbial species. *Arch. Biochem. Biophys.* 218:351-359.
- Marugg, J.D., M. Spanje, W.P.M. Haekstra, B. Schippers and P.J. Weisbeek. 1985. Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant-growth-stimulating Pseudomonas putida WCS 358. *J. Bacteriol.* 164:563-570.
- Mc Cracken, A.R. and T.R. Swinburne. 1979. Siderophores produced by saprophytic bacteria as stimulants of germination of conidia of Colletotrichum musae. *Physiol. Pl. Path.* 15:331-340.
- Meyer, J.M. and M.A. Abdallah. 1978a. The fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107:319-328.
- _____. and J.M. Hornsperger. 1978b. Role of Pyoverdine_{pf}, the iron-binding fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens, in iron transport. *J. Gen. Microbiol.* 107:329-331.
- Mullis, K.B., J.R. Pollack and J.B. Neilands. 1971. Structure of schizokinensin, and iron-transport compound from Bacillus megaterium. *Biochem.* 10:4894-4898.

- Murphy, T.P., D.R.S. Lean and C. Nalewajko. 1976. Blue-green algae: their excretion of iron selective chelators enables them to dominate other algae. *Science* 192:900-902.
- Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.
- _____. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.* 36:285-309.
- Ong, S.A., T. Peterson and J.B. Neilands. 1979. Agrobactin, a siderophore from Agrobacterium tumefaciens. *J. Biol. Chem.* 254:1860-1865.
- Peralta, V.J.R. 1986. El fenómeno de interferencia en Rhizobium phaseoli (Dnageard). La biología, aspectos evolutivos y posibles aplicaciones. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. 131 p.
- Peters, W.J. and R.A.J. Warren. 1968. Phenolic acids and iron transport in Bacillus subtilis. *Biochem. Biophys. Acta* 165:225-232.
- Powell, P.E., G.R. Cline, C.P.P. Reid and P.J. Szaniszlo. 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* 287: 833-834.
- Price, C.A., H.E. Clarck and E.A. Funkhouser. 1972. Functions of micronutrients in plants. In Micronutrients in agriculture. Soil Sci. Soc. of America Madison, Wisconsin. pp. 731-742.
- Reeves, M.W., L. Pine, J.B. Neilands and A. Balows. 1983. Absence of siderophore activity in Legionella species grown in iron-deficient media. *J. Bacteriol.* 154:324-329.
- Rioux, C., D.C. Jordan and J.B.M. Ratlray. 1983. Colorimetric determination of catechol siderophores in microbial cultures. *Analytical Biochem.* 133:163-169.
- Rodríguez, S.F. 1982. Fertilizantes-Nutrición vegetal. A.G.T. Editor S.A. México. 157 p.
- Schroth, M.N. and J.G. Hancock. 1981. Selected topics in biological control. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:453-476.
- Teintze, M., M.B. Hossain, C.L. Barnes, J. Leong and D. Helm. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting Pseudomonas. *Biochem.* 20:6446-6457.
- Tisdale, S.L., W.L. Nelson and J.D. Beaton. 1985. Soil fertility and fertilizers. 4a ed. Mc Millan Publishing Co. New York. 745 p.
- Walker, J.C. 1969. Plant pathology. 3a ed. Mc Graw-Hill. Book Company. New York. 819 p.

- Weger, L.A., R. Boxtel, B. Burg, R.A. Gruters, F.P. Zeels, B. Schippers and B. Lugtenberg. 1986. Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing Pseudomonas spp. *J. Bacteriol.* 165:585-594.
- Weinberg, E.D. 1978. Iron and infection. *Microbiol. Rev.* 42:45-66.