



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A**

CARACTERIZACION DE LA
PRODUCCION DE SIDEROFOROS
DE *Rhizobium phaseoli*
EN MEDIOS CARENTES DE HIERRO
Y SU NATURALEZA QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
HORTENCIA TORRES ESQUIVEL
Asesor: Dr. Guillermo Carrillo Castañeda



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.

La evolución es cambio. El género humano ha evolucionado, está evolucionando; si perdura, continuará evolucionando.

Theodosius Dobzhansky.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, en el Laboratorio de **Genética** Molecular del Centro de **Genética** del Colegio de Postgraduados, **Montecillos**, - **México**.

DEDICATORIA

A mis padres: María Reynalda Escuiwel y José Natividad Torres,
que a lo largo de mi vida me guiaron siempre por el buen camino.
Me brindaron su apoyo, consejos y sobre todo su confianza y su
amor. A Dios y a ustedes. Gracias.

A mis hermanos: Fernando
Leticia
Erendira
Laura
José Luis
Arturo
José Natividad
Leonel
Omar
José Guadalupe
Ana Patricia
Teresa de Jesús
Miguel Angel

A mis amigos por su apoyo y amistad.

RECONOCIMIENTOS

Agradezco:

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda por su asesoría, enseñanzas, consejos, paciencia y ayuda en la realización de este trabajo.

A la Q. A. María Elisa Alvarado Cano por su gran ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Al Biol. Daniel Ochoa del Centro de Fitopatología por su ayuda.

Al Biol. Gerardo Ortíz Montiel por su paciencia en la corrección del manuscrito y por su amistad.

A los biólogos Ma. Guadalupe Oliva Martínez, Jesús Medina Soto y Rafael Quintanar Zuñiga por su paciencia en la revisión del trabajo y correcciones de éste.

C O N T E N I D O

| | PAG. |
|---|------|
| INDICE DE CUADROS | x |
| INDICE DE FIGURAS | xiii |
| RESUMEN | xv |
| I. INTRODUCCION | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 Enfermedades de plantas y su control | 4 |
| 2.1.1 Control químico | 6 |
| 2.1.2 Control biológico | 9 |
| 2.2 Sideróforos | 14 |
| 2.2.1 Clasificación | 14 |
| 2.2.2 Biosíntesis | 16 |
| 2.2.3 Propiedades físicas, químicas y biológicas | 16 |
| 2.2.4 Mecanismos de asimilación de hierro. | 19 |
| 2.2.5 Transporte de hierro mediado por sideróforos. | 20 |
| 2.2.6 Control de enfermedades de plantas mediado - por sideróforos. | 21 |
| 2.3 Asimilación y transporte de hierro en mamíferos y plantas superiores | 23 |
| OBJETIVOS | 28 |
| III. MATERIALES Y METODOS. | 29 |
| 3.1 Material biológico | 29 |
| 3.2 Medios de cultivo | 29 |

| | PAG. |
|--|------|
| 3.3 Preparación de los medios de cultivo . . . | 29 |
| 3.3.1 Medio YGB | 31 |
| 3.3.2 Medio YMB | 31 |
| 3.3.3 Medio B de king | 32 |
| 3.3.4 Medio L | 32 |
| 3.3.5 Medio M | 32 |
| 3.3.6 Medio M-Fe | 32 |
| 3.4 Determinación de las cinéticas de crecimiento de ocho cepas de <u>R. phaseoli</u> | 33 |
| 3.4.1 Preparación del inóculo de las cepas de <u>R. phaseoli</u> | 33 |
| 3.4.2 Evaluación del grado de desarrollo de los cultivos de <u>R. phaseoli</u> en medio M y M-Fe | 33 |
| 3.5 Obtención de muestras de SMG en tres tiempos diferentes del desarrollo de los cultivos de cada una de las cepas productoras de sideróforos | 34 |
| 3.6 Bioensayos de la actividad inhibitoria de los SMG obtenidos a tres diferentes tiempos sobre <u>P. solanacearum</u> | 35 |
| 3.6.1 Preparación del inóculo de <u>P. solanacearum</u> | 35 |
| 3.6.2 Bioensayos de inhibición | 36 |

| | PAG. |
|---|------|
| 3.7 Determinación de la capacidad de promover o inhibir el desarrollo de otros microorganismos por sideróforos presentes en SMG y SMG 30x concentrados de muestras tomadas a un tiempo determinado de las cepas Cp Mex 1, 19, 28, 44 y 46 | 37 |
| 3.7.1 Preparación del SMG | 38 |
| 3.7.2 Preparación del SMG 30 veces concentrados (30x) | 38 |
| 3.7.3 Bioensayos para determinar la capacidad de promover o inhibir el desarrollo de otros microorganismos por sideróforos presentes en SMG y SMG 30x de muestras obtenidas a un determinado tiempo | 39 |
| 3.8 Determinación del grupo químico al que pertenecen los sideróforos producidos por <u>R. phaseoli</u> | 40 |
| 3.8.1 Caracterización química de los sideróforos producidos por las cepas Cp Mex 1, 19, 28, 44 y 46 mediante absorción espectrofotométrica | 41 |
| 3.8.2 Caracterización en cromatografía en capa fina de los sideróforos producidos por <u>R. phaseoli</u> | 43 |

| | PAG. |
|--|------|
| 3.8.3 Bioensayos de activación de los SMG 30x eluidos de sílica gel (ESG) en medios sólidos sobre <u>E. coli</u> RW 193 | 46 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSION | 47 |
| 4.1 Grado de desarrollo de los cultivos de <u>R.</u> <u>phaseoli</u> en medios líquidos M y M-Fe | 47 |
| 4.2 Actividad inhibitoria de los sideróforos presen- tes en los SMG de tres muestras obtenidas a di- ferentes tiempos de cepas de <u>R. phaseoli</u> sobre <u>P. solanacearum</u> | 55 |
| 4.3 Capacidad para promover o inhibir el desarrollo de otros microorganismos por sideróforos presen- tes en SMG y SMG 30x de muestras tomadas a un - tiempo determinado | 60 |
| 4.4 Determinación del grupo químico al que pertenecen los sideróforos producidos por <u>R. phaseoli</u> | 71 |
| V. CONCLUSIONES | 86 |
| APENDICE I | 87 |
| BIBLIOGRAFIA: | 93 |

INDICE DE CUADROS

| CUADRO | | PAG. |
|--------|--|------|
| 1 | Algunos efectos tóxicos originados por agentes químicos. | 8 |
| 2 | Clasificación de los sideróforos tipo catecol. | 15 |
| 3 | Clasificación de los sideróforos tipo hidroxamato. | 17 |
| 4 | Fitosideroforos conocidos actualmente. | 26 |
| 5 | Cantidad de muestras utilizadas en el método de Arrow. | 42 |
| 6 y 7 | Datos de turbidez a los tiempos indicados de cultivos bajo agitación constante a 34°C de - ocho cepas no fitopatógenas en medios M y M-Fe. | 48 |
| 8 | Tiempo medio en que se llega al 50 % decrecimiento máximo de ocho cepas de <u>R. phaseoli</u> . | 54 |
| 9 | Determinación de la capacidad inhibitoria ejercida por SMG de <u>R. phaseoli</u> sobre el desarrollo de <u>P. solanacearum</u> en medio M-Fe a las 72 h de incubación. | 56 |
| 10 | Determinación de la actividad inhibitoria de - SMG de muestras obtenidas a un determinado tiempo sobre el desarrollo de <u>P. solanacearum</u> en medio M-Fe a las 72 h de incubación. | 61 |

| CUADRO | | PAG. |
|--------|---|------|
| 11 | Determinación de la actividad inhibitoria de muestras de SMG obtenidas a un determinado tiempo sobre el desarrollo de <u>K. campestris</u> CBP 123 en medio M-Fe. | 63 |
| 12 | Capacidad inhibitoria provocada por SMG 30 - veces concentrados (30x) por liofilización de cuatro cepas de <u>R. phaseoli</u> sobre <u>P. solanacearum</u> en medio M-Fe. | 66 |
| 13 | Determinación de la capacidad promotora del crecimiento de <u>E. coli</u> RW 193 causado por SMG 30x de cepas de <u>R. phaseoli</u> en medio M-Fe a las 20 h de incubación. | 69 |
| 14 | Determinación en μ moles de la cantidad de L-DOPA presente en diferentes concentraciones de ésta en solución, por el método de Arnow para la detección de catecoles. | 73 |
| 15 | Análisis espectrofotométrico de L-DOPA | 75 |
| 16 | Determinación de la producción de sideróforos tipo catecol en muestras de SMG obtenidas en tres diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento de cepas de <u>R. phaseoli</u> por el método de Arnow. | 78 |

CUADRO

PÁG.

| | | |
|----|---|----|
| 17 | Determinación de la producción de sideróforos tipo catecol a un tiempo determinado en SMG en medio M y M-Fe . | 80 |
| 18 | Valores de Rf y color de las manchas observadas en los cromatogramas bajo luz ultravioleta y revelado con $FeCl_3$ al 1% de los SMG 30x. | 83 |
| 19 | Determinación del índice de activación causado por SMG 30x concentrado eluidos de sílica gel sobre el desarrollo de <u>E. coli</u> RW 193 a las 20 h de incubación en medio M-Fe . | 85 |

INDICE DE FIGURAS

| FIGURA | | PAG. |
|-----------------|---|-------------------|
| 1a, b, c y d | Cinéticas de crecimiento de <u>R. phaseoli</u> en medios M y M-Fe. | 50, 51 52 y 53 |
| 2 | Perfil de la actividad inhibitoria de tres - muestras de SMG obtenidas a tres tiempos diferentes a lo largo de la curva de crecimiento - de cepas de <u>R. phaseoli</u> sobre <u>P. solanacearum</u> a las 72 h de incubación en medio M-Fe sólido. | 59 |
| 3 | Perfil de la actividad inhibitoria de los SMG de muestras obtenidas a determinado tiempo de cuatro cepas de <u>R. phaseoli</u> sobre el desarrollo de dos cepas fitopatógenas. | 64 |
| 4 | Perfil de la actividad inhibitoria provocada por SMG 30x concentrado de cuatro cepas de <u>R. phaseoli</u> sobre el desarrollo de <u>P. solanacearum</u> en medio M-Fe. | 67 |
| 5 | Perfil de la capacidad promotora del crecimiento causado por cuatro SMG 30x concentrado de cuatro cepas de <u>R. phaseoli</u> sobre el desarrollo de <u>E. coli</u> RW 193 en medio M-Fe. | 70 |
| 6 | Curva patrón de la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). | 74 |

| FIGURA | | PAG. |
|--------|---|------|
| 7 | Espectro de absorción de la L-DOPA a diferentes longitudes de onda. | 76 |
| 8 | Determinación de la producción de sideróforos tipo catecol en μ moles por ml de muestra de SMG obtenidos a tres tiempos diferentes a lo largo de la curva de crecimiento de cuatro cepas de <u>R. phaseoli</u> en medio M-Fe. | 80 |
| 9 | Representación esquemática de la caracterización en cromatografía en capa fina de sílica gel de los SMG 30x concentrados de las cepas Cp Mex 1, 19, 28, 44, y 46. | 84 |

R E S U M E N

Ciertos microorganismos (bacterias, hongos y algas) pueden causar inhibición o promoción del crecimiento mediante la producción de compuestos llamados sideróforos que presentan una alta afinidad por el ión férrico, existiendo por su estructura química dos tipos de sideróforos de amplia distribución los de tipo catecol y los de tipo hidroxamato. Estos compuestos además de solubilizar el hierro en el suelo pueden ser elementos útiles en sistemas de control biológico de enfermedades de plantas, además, de estimular el crecimiento y producción de ciertas plantas de importancia económica.

Esta investigación fue realizada con el objetivo de determinar los niveles de producción de sideróforos presentes en el medio gastado de Rhizobium phaseoli, a lo largo del desarrollo de los cultivos, así como de determinar su actividad biológica sobre otros microorganismos en medios carentes de hierro, además de la confirmación de pruebas experimentales para determinar el grupo químico al que pertenecen los sideróforos de R. phaseoli.

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo fueron: R. phaseoli Cp Mex 1, 6, 9, 13, 19, 28, 43, 44 y 46; Pseudomonas

solanacearum, Xanthomonas campestris CBP 123 y Escherichia coli RW 193. La determinación de catecoles se realizó sólo en cuatro cepas de R. phaseoli que se seleccionaron en base a su actividad inhibitoria sobre P. solanacearum mediante el método de Arnow, que consiste en la identificación de los anillos aromáticos. - Esta prueba resultó positiva. Los resultados indican que el tiempo en el que se presentó la máxima producción de sideróforos fue de: 24:30 h para la cepa Cp Mex 19, 21:00 h Cp Mex 28, 25:40 h Cp Mex 44 y 26:40 h para la cepa Cp Mex 46. Los grados de inhibición o promoción del crecimiento sobre P. solanacearum, X. campestris CBP 123 y E. coli RW 193 además de depender de la cantidad de sideróforos producidos por R. phaseoli, dependen de la especificidad de éstos compuestos sobre diferentes microorganismos. Por último la mancha eluida del cromatograma de sílica gel presento actividad biológica, indicando la presencia de sideróforos.

I. INTRODUCCION

Desde finales del siglo pasado muchas especies de bacterias fueron identificadas como causantes del deterioro de productos agrícolas y de enfermedades en las plantas. (De Bauer, 1987).

Paralelamente puede ser considerado el CuSO_4 como un posible precursor de los agroquímicos al ser usado por Prevost en 1807, para controlar una enfermedad ocasionada por un hongo. (Coronado, 1965; De Bauer, 1987; Walker, 1973). Una mezcla un poco más compleja de CuSO_4 y cal fue utilizada por Millardet en 1885, demostrando que ésta podía controlar más efectivamente el mildiú de la vid causado por Plasmopora viticola, estudio que despertó interés en el área del control de las enfermedades de las plantas. (De Bauer, 1987; Walker, 1973).

Agostino Bassi propuso en 1838 el uso de microorganismos para el control de plagas de insectos y el primer mecanismo de interferencia microbiana mediado por antibióticos fue propuesto por Dubos en 1939, cuando aisló de Bacillus brevis, dos sustancias llamadas "gramicidina" y "tirocidina" con poder bactericida. Previamente Fleming en 1929 había descubierto que el hongo Penicillium notatum podía inhibir estafilococos. (Asimov, 1985; Debach, 1977), y entre los antibióticos más importantes figuran:

Estreptomicina, Ciclohexamida, Tetraciclina, Griseofulvina y -
Blasticidina entre otras. Los efectos fisiológicos de los anti-
bióticos se dan: a) en la formación de la pared celular y mem-
branas celulares, b) en la síntesis de proteínas y ácidos nucleí-
cos y c) en las reacciones de transporte de energía. (Agrios, -
1986; Asimov, 1985; Debach, 1977; Walker, 1973).

Ciertos microorganismos (bacterias, hongos y algas) pueden -
causar interferencia microbiana mediante la liberación de com-
puestos llamados sideróforos que presentan una alta afinidad -
por el ión férrico, estableciéndose competencia por dicho nutri-
mento. (Emery, 1965 y 1976; Neilands, 1952; Neilands y Leong, -
1986). Estos compuestos en el suelo solubilizan el hierro, tie-
nen un papel significativo en la asimilación del hierro por mi-
croorganismos, sobre todo en suelos calcáreos con valores de pH
elevados. (Emery, 1977). Pueden ser elementos útiles en siste-
mas de control biológico de enfermedades de plantas, además, es-
timulan el crecimiento y producción de ciertas plantas de impor-
tancia económica. (Marugg et al., 1985; Murphy et al., 1976; -
Teintze et al., 1981; Weger et al., 1986).

Investigaciones recientes realizadas en el laboratorio de Ge-
nética Molecular, Centro de Genética, Colegio de Postgraduados,

demonstrarón que algunas cepas de Rhizobium phaseoli producen sideróforos a niveles comparables con los de Pseudomonas capaces de inhibir el desarrollo de otros microorganismos bajo condiciones deficientes de hierro. Además, que podrían constituir una buena opción en el combate de enfermedades propias de las raíces de las plantas podrían ser efectivos en el control de enfermedades foliares. (Peralta y Carrillo, 1988 y 1988a).

II. ANTECEDENTES

2.1 ENFERMEDADES DE PLANTAS Y SU CONTROL

Las enfermedades de las plantas según Stakman y Harrar (De - Bauer, 1987), se clasifican según el daño que causan en:

ANIQUILADORAS.- Son las que destruyen completamente un cultivo en una área o diezman las poblaciones de modo que sólo quedan unos cuantos sobrevivientes. Como ejemplo de ello, se puede señalar la roya del café ocasionada por Hemileia vastatrix.

LIMITANTES.- Aquellas cuya presencia hace incosteable la producción del cultivo en una área determinada. Entre ellas, tenemos el apenachamiento del plátano en Australia. Esta enfermedad, de origen viral, hizo que el cultivo se volviese antieconómico en ese país. En México como ejemplo se tiene la mancha anular - del papayo.

DEVASTADORAS.- Aquellas que atacan en forma destructiva cultivos anuales. El ejemplo clásico son las royas de cereales. En el caso del trigo, la roya de la hoja y la roya amarilla del tallo que pueden llegar a reducir el rendimiento hasta de un 50%.

DEBILITANTES.- Aquellas que causan efectos negativos aunque los síntomas son a veces imperceptibles, como son: pudriciones radicales de cereales, papas, caña de azúcar y leguminosas, que pueden ocasionar daños en combinación con condiciones desfavorables de clima y suelo pasando desapercibido el ataque de patógenos.

DESFIGURANTES.- Aquellas que cambian la apariencia de los productos vegetales y por lo tanto reducen su valor comercial. Dentro de este grupo tenemos la roña del aguacate causada por Sphaceloma perseae.

INHABILITANTES.- Imposibilitan los productos vegetales para su consumo. Por ejemplo el consumo del "diente de caballo" de maíz causado por Claviceps gigantea que puede afectar la salud humana debido a su contenido de alcaloides, dentro de este grupo figura el ataque de hongos de almacenaje a granos y semillas con la consecuente producción de micotoxinas.

Los principios de control se llevan a cabo mediante diversos métodos: culturales; mediante cuarentenas, inspecciones, certificaciones y campañas erradicativas que en ocasiones llegan a alcanzar la categoría de disposiciones legales; mediante méto-

dos biológicos, como el aprovechamiento de recursos genéticos, inmunidad inducida, por la acción de microorganismos o bien, mediante control químico y métodos de control biológico.

2.1.1 CONTROL QUÍMICO

Los plaguicidas son sustancias tóxicas que actúan como bloqueadores de los distintos procesos fisiológicos en los organismos plaga. Entendiéndose como plaga cualquier especie animal o vegetal que el hombre considere perjudicial a su persona, propiedad o a su medio. (Barberá, 1976; Debach, 1977; Restrepo, 1988).

Existen varias formas de clasificar a los plaguicidas:

1.- Por su naturaleza química: en inorgánicos y orgánicos. 2.- Por su composición: en organoclorados; relativos del DDT, relativos del benceno y ciclodienos; y en organofosforados; alifáticos, cíclicos y heterocíclicos. 3.- Por su modo de acción: contacto, ingestión, fumigantes y sistemáticos. 4.- Por su uso y tipo de organismo: insecticidas, acaricidas, herbicidas, bactericidas, fungicidas y otros plaguicidas específicos. (Restrepo, 1988; Stoker y Seager, 1981).

Entre los primeros plaguicidas empleados por el hombre figuran los arseniatos de sodio y de plomo, la creolita y el azufre.

Los efectos de los plaguicidas en los ecosistemas incluyen:

- a) La resistencia que a su acción muestran cientos de especies de microorganismos patógenos, con clara tendencia a aumentar en el futuro;
- b) la resistencia de numerosas especies a los herbicidas, fungicidas, bactericidas, etc.;
- c) las variaciones en el éxito reproductor de una gran variedad de plantas, inducidas por los efectos nocivos de los plaguicidas sobre los organismos polinizantes;
- d) la reducción de las poblaciones vegetales y animales benéficos como efecto del uso de herbicidas, insecticidas, etc.;
- e) la toxicidad de los productos químicos en organismos benéficos y
- f) la presencia de plaguicidas persistentes en el agua, suelo, aire y en los organismos vivientes.

Entre los efectos tóxicos que originan los agentes químicos más peligrosos y de mayor toxicidad aparecen algunos en el cuadro 1. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un nivel promedio por debajo de 15 ppm de la concentración de plaguicida se considera "normal" en una población. La OMS recomienda el análisis de tejido adiposo humano o animal como un indicador directo para evaluar, reglamentos y medidas de control en el uso de plaguicidas. (Restrepo, 1988).

-
- I. EN HUMANOS:** Alteraciones gastrointestinales, hepáticas, renales, pulmonares, jaquecas, vómitos, paraplejía. Daños a embriones y fetos humanos: abortos espontáneos, partos prolongados, muerte al nacer o durante el embarazo. Además, irregularidades menstruales, disminución en la producción de espermatozoides e incluso esterilidad en hombres. Cáncer e incluso la muerte.
- II. EN ANIMALES:** Enfermedades y muerte en: aves de corral, ganado porcino, vacuno, peces, cangrejos, tortugas, ballenas, langostinos, camarones, aves marinas y zooplacton entre otros.
- III. EN VEGETALES:** Pérdida del follaje en cultivos, reducción en la producción de plantas, contaminación en verduras, cereales, cítricos y frutas. En el fitoplacton se produce inhibición en el crecimiento y de la respiración; la reducción de la fotosíntesis y la inhibición en la utilización de C^{14} en la fotosíntesis, etc.
- IV. CONTAMINACION DE PRODUCTOS COMO:** Cremas emolientes, lubricantes, cremas faciales y para las manos, pomadas, aceites vitamínicos; alimentos enlatados como jaleas, frutas en almíbar, aceites comestibles. Harinas y huevo entre infinidad de productos más.
-

CUADRO 1. Algunos efectos tóxicos originados por agentes químicos. (Restrepo, 1988).

Por lo que concierne a la contaminación de alimentos, México en numerosas ocasiones ha sufrido el rechazo de algunos de sus productos agrícolas en el mercado internacional, principalmente por parte de los Estados Unidos, ya que se han encontrado altas concentraciones de agroquímicos en pepino, tomate, chile, cebolla, fresa, etc., propiciando grandes pérdidas económicas para el país.

Rachel Louise Carson en 1962 en su libro titulado *Silent Spring* (Primavera silenciosa) recalca que por el uso indiscriminado de los productos químicos, el hombre puede aniquilar especies indefensas y útiles al mismo tiempo que a aquellas a las que en realidad trata de eliminar. (Asimov, 1985; Debach, 1977).

2.1.2 CONTROL BIOLÓGICO

El término "control biológico" se creó en 1956, para referirse a la mayoría de los casos de interferencia microbiana. (Messenger, 1976). El control biológico intenta lograr una regulación permanente de poblaciones recurriendo al uso de organismos biológicos para controlar microorganismos perjudiciales.

Cualquier agente microbiano de control debe reunir varios re

quisitos para ser efectivos: el agente debe ser altamente específico para determinados patógenos. En muchos países éste es un requisito legal; el organismo tiene que ser fácil de producir, pues de lo contrario su uso puede ser incosteable; también, debe tener un período latente en su ciclo de vida que permita su almacenamiento; es conveniente que la presentación del agente microbiano sea similar a la del plaguicida, para permitir su aplicación por medio de los equipos ya disponibles. (Restrepo, 1988).

Existen varios tipos de control biológico, cada uno con sus fundamentos establecidos con respecto a principios ecológicos distintos. (Restrepo, 1988). Los principios son:

1.- EL CONTROL BIOLÓGICO CONSERVATIVO, busca mantener y manejar el medio para conservar a los enemigos naturales de las plagas, lo que implica una mezcla de cultivos y métodos culturales dirigidos hacia el mantenimiento del equilibrio del ecosistema.

2.- EL CONTROL BIOLÓGICO AUMENTATIVO, la introducción del agente de control debe efectuarse antes de que la población llegue a nivel de daño económico, combate varias plagas a la vez, pero puede ser un peligro para las especies benéficas.

Del control biológico suplementativo existen abundantes trabajos como la línea de ataque, organizada por Carrol Milton, que consiste en utilizar las propias hormonas de los insectos. Mediante el aislamiento y aplicación de la llamada "hormona juvenil" se puede interceptar la fase adulta durante el tiempo necesario para matar al insecto. Otro método es la utilización de hormonas sexuales para capturar insectos machos. (Asimov, 1985; Debach, 1977; Stoker y Seager, 1981). El control biológico a base de insectos estériles conocido como control autocida o técnica del insecto estéril, también, a dado buenos resultados. (Aluja, 1984).

El control biológico de las enfermedades de plantas también se logra mediante la selección y producción de plantas resistentes a ciertos patógenos o mediante la utilización de otros microorganismos que sean antagónicos a ellos o que los parasiten. En los últimos años a cobrado un considerable interés el uso de hiperparásitos o microorganismos antagónicos para controlar las enfermedades de las plantas. (Restrepo, 1988; Stoker y Seager, 1981).

3.- EL CONTROL BIOLOGICO CLASICO, introduce agentes de con--

trol que llagan a ser una parte integral del ecosistema. Ejerce un control extenso con relativa inversión monetaria, la cual es mayor en la etapa inicial de la investigación; pero después, el uso del agente tiene un precio muy bajo para el agricultor. Tiene un nivel de éxito del 55 al 75%.

Existen abundantes reportes de control biológico clásico, como el control que se desarrolló comercialmente y para el cual en el aceite lubricante de la cadena de motosierras y colonias de Fomes annosus se aplicaron los conidios del antagonista Peniophora gigantea. (Rishbeth, 1963).

Bacillus thuringiensis bacteria que forma esporas y produce uno o más cristales de proteína tóxica (endotóxina-delta) con cada espora, ha resultado ser un buen productor de bioinsecticida, cuando las esporas y cristales son ingeridos por insectos susceptibles, las partes bucales y el intestino quedan paralizados destruyéndose el epitelio intestinal, pero la muerte puede ocurrir también por septicemia bacteriana. Esta bacteria es patógena para los siguientes órdenes de insectos: Lepidóptera, Díptera, Hymenóptera y Coleóptera. Entre los productos elaborados a base de Bacillus y que se expanden comercialmente a nivel

mundial se encuentran: "Thuricide" (B. thuringiensis), "DOON" (B. popilliae) y "Japidemic" (B. lentimorbus). (Fisher y Rosner, 1959; Hannay, 1953; Krywienczyk y Lüthy, 1974; Yousten y Rogoff, 1969).


Mediante técnicas de ingeniería genética se está tratando obtener cepas más potentes y virulentas de bacterias patógenas a insectos y ampliar su espectro de hospederos a los cuales infecten. En este sentido con la manipulación de genes clonados en plásmidos se puede mejorar la patogenicidad y producción de B. thuringiensis. Actualmente la incorporación de genes que codifican para la producción de la toxina de B. thuringiensis son introducidos directamente a las células de las plantas por medio de plásmidos, produciendo las células de las plantas, cantidades suficientes de toxina para matar insectos. (Yanchinski, 1985).

Recientemente se han utilizado compuestos llamados sideróforos para obtener un incremento en la producción de papa, remolacha, rábano, cerezo, trigo, etc., mediante la bacterización de tubérculos y suelo con células de Pseudomonas fluorescentes, además de controlar ciertos microorganismos fitopatógenos. (Farrugg et al., 1989; Teintze et al., 1981).

2.2 SIDEROFOROS

El término sideróforo fue propuesto por Lankford en 1973 para substituir los existentes como siderocromo que denota la molécula libre de hierro, mientras que la forma asociada al hierro es referida como ferrisideróforo. (Emery, 1977; Neillands, 1981 y 1982). Los sideróforos se definen como compuestos de bajo peso molecular de 1000 daltones aproximadamente y que presentan una alta afinidad por el ión férrico. (Neillands, 1981).

2.2.1 CLASIFICACION

Por su estructura química existen dos tipos de sideróforos - de amplia distribución, el tipo catecol  y tipo hidroxamato $(-\overset{\text{O}}{\parallel}-\text{N}-)$. (Emery, 1977; Frederick et al., 1981 y 1981a)

SIDEROFOROS TIPO CATECOL. Estos generalmente son producidos por bacterias, siendo reconocidos químicamente por presentar un anillo aromático en su estructura. Entre los sideróforos que pueden ser clasificados en este grupo se presentan en el cuadro 2.

SIDEROFOROS TIPO HIDROXAMATO. Estos se encuentran presentes

| NOMBRE | DESCRIPCION QUIMICA | ESTRUCTURA QUIMICA | MIcroORGANISMOS PRODUCTORES | FAMILIA | AUTORES |
|---------------|---|---|---|---------------------------|--|
| ENTEROBACTINA | Ac. 2,3 dihidroxi benzoico conjugado con glicina. | <p>Ciclo-[Co-CH-CH₂-O]₃</p> | <p><u>Salmonella typhimurium</u></p> <p><u>Escherichia coli</u></p> | <u>Enterobacteriaceae</u> | Emery, 1977 y 1978 Neillands, 1982 Neillands y Leong, 1986 |
| AGROBACTINA | Espermidina sustituida en sus grupos amino primarios con ác. 2,3 dihidroxi benzoico y en sus grupos amino secundarios con ác. 2,3 dihidroxi benzoil treonina. | <p>R=OH</p> | <p><u>Agrobacterium tumefaciens</u></p> <p><u>Micrococcus denitrificans</u></p> | <u>Rhizobiaceae</u> | Leong y Neillands, 1981 Ong et al., 1979 |
| PARABACTINA | Parecida a agrobactina. | <p>R=H</p> | <u>Klebsiella aerogenes</u> | <u>Enterobacteriaceae</u> | Neillands, 1982 Neillands y Leong, 1986 |
| VIBRIOBACTINA | | | <u>Vibrio cholerae</u> | | Neillands, 1982 Neillands y Leong, 1986 |

CUADRO 2. Clasificación de los sideróforos tipo catecol

en hongos, bacterias y algas. (Cody y Gross, 1987; Frederick et al., 1981 y 1981a; Gorringer et al., 1990; Powell et al., 1980). Los sideróforos clasificados en este grupo se pueden observar - en el cuadro 3.

2.2.2 BIOSÍNTESIS

El ácido corísmico es el precursor en la biosíntesis de los sideróforos tipo fenol-catecol, mientras que para la biosíntesis de los sideróforos tipo hidroxamato, se cree que la hidroxilación de los grupos amino de las moléculas ocurre enzimáticamente a partir de aminoácidos libres y oxígeno. Los *N*-hidroxiaminocidos y otros hidroxamatos pueden entonces formar uniones peptídicas, aunque el mecanismo de síntesis no es ribosómico. (Bez korovainy, 1980). La biosíntesis de los sideróforos es regulada por el hierro y en forma de complejo es reconocido por receptores de membrana específicos. (Neilands, 1981).

2.2.3 PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

Los sideróforos en general son caracterizados por las siguientes propiedades: 1) son sintetizados sólo cuando los microorganismos se encuentran en condiciones de deficiencia de hierro; -

| NOMBRE | DESCRIPCION QUIMICA | ESTRUCTURA QUIMICA | MICROORGANISMOS PRODUCTORES | FAMILIA | AUTORES |
|--|--|--------------------|--|--|---|
| FERRICROMO | Peptido ciclico con un tripeptido de N-acil-N-hidroxiornitina y una combinacion variable de glicina, serina o alanina. | | <u>Aspergillus niger</u> <u>Rhizopus arrhizus</u> | | Emery, 1978 Neillands y Leong, 1986 |
| FERRIOXAMINA | Unidades repetidas de 1-amino-w-hidroxiamino alcano (pentano o butano) alternado con Ac. succinico o acetico. "Desferal" (Ciba-Geigr). | | 80 % de los Actinomicetos <u>Streptomyces</u> <u>Micromonospora</u> <u>Nocardia</u> | <u>Streptomycetaceae</u> <u>Micromonosporaceae</u> <u>Nocardiaceae</u> | Neillands y Leong, 1986 |
| FUSARININA | γ-N- hidroxil-L-ornitina y Ac. cis-B-metil glutámico. | | <u>Fusarium roseum</u> <u>F. subense</u> y otros hongos | | Neillands y Leong, 1986 |
| ACIDO RODOTORULICO | Peptido ciclico que presenta un substituyente de γ-N-hidroxi-L-ornitina. | | La mayor parte de los Basidiomicetos <u>Rhodotorula pilimanae</u> | <u>Basidiomycetaceae</u> | Frederick et al., 1981 y 1981a Miller et al., 1985 Neillands y Leong, 1986 |
| ESQUIZOQUINONA | Contienen citrato 1-amino-3-(N-hidroxi-N-acetil) amino propano. | | <u>B. megaterium</u> y varias cepas de cianobacterias como <u>Anabaena spp.</u> | <u>Bacillaceae</u> | Mullin et al., 1971 Neillands y Leong, 1986 |
| AEROBACTINA | Contienen citrato | | <u>Aerobacter aerogenes</u> <u>A. flavescens</u> <u>A. terreus</u> | <u>Enterobacteriaceae</u> | Emery, 1978 Neillands y Leong, 1986 |
| ARTROBACTINA | Contienen citrato | | <u>Arthrobacter spp.</u> | | Emery, 1978 Neillands y Leong, 1986 |
| MICOBACTINA | Contienen fenolato y acidos grasos sustituyentes liposolubles. | | Algunas micobacterias | <u>Mycobacteriaceae</u> | Emery, 1978 Neillands y Leong, 1986 |
| EXOQUELINA | | | <u>Mycobacterium smegmatis</u> | <u>Mycobacteriaceae</u> | Emery, 1978 Neillands y Leong, 1986 |
| PIOVERDINA | Contiene 2 dipeptidos Ser-OHorn y Lys-OHorn y un tetrapeptido, Thr-Thr-Lys-NH | | <u>Pseudomonas aeruginosa</u> <u>P. fluorescens</u> <u>P. syringae</u> | <u>Pseudomonadaceae</u> | Wendenbaum et al., 1983 Mayer y Abdallah, 1980 Hohnadel et al., 1986 |
| RHIZOBACTINA | Contiene porciones de etilendiamino dicarboxil como grupos coordinados al metal. | | <u>Rhizobium meliloti</u> | <u>Rhizobiaceae</u> | Smit et al., 1985 Neillands y Leong, 1986 |
| PSEUDOACTINA PIOCHELINA FERRIMICINA FERRIBACTINA COPROGENO TRIORNICINA SIRINGOMICINA entre otros. | | | | | Moores et al., 1984 Teintze y Leong, 1981 Teintze et al., 1981 Wendenbaum et al., 1983 |

CUADRO 3. Clasificación de los sideróforos tipo hidroxamato.

2) son específicos para asociarse con el ión férrico y tienen poca afinidad por el ferroso; 3) muchos sideróforos contienen -N-hidroxiornitina; 4) como resultado de su capacidad de formar el complejo con el ión férrico, los sideróforos incrementan el rango de entrada de estos cationes a la célula. (Meyer, 1978).

Los sideróforos tipo catecol se solubilizan en compuestos orgánicos como el etilacetato o en solventes como la acetona y el etanol a pH 2 o menos, mientras que los de tipo hidroxamato son hidrosolubles, a excepción de las micobactinas. (Emery, 1977; Neilands, 1981).

Todos los sideróforos presentan una absorción máxima en el rango de luz ultravioleta y de luz visible cuando se coordinan con el hierro. La mayoría de los complejos, son coloreados en presencia de cloruro férrico o perclorato férrico, siendo éste un método para detectar la presencia de sideróforos en el medio. Mediante éste método los catecoles presentan un color vino y tienen una absorbencia máxima a los 495 nm., por otra parte los ácidos hidroxámicos presentan una coloración naranja y una absorbencia máxima en el rango de 425 a 450 nm.

Químicamente también son detectables mediante métodos colorimétricos. Los catecoles son detectados generalmente con el reactivo de Arnow (nitrito-molibdato), siendo ésta una prueba selectiva para los grupos de anillos aromáticos. (Arnow, 1937; Neillands, 1981). Otro método para la identificación de éstos compuestos es mediante el reactivo de Hathway (cloruro-ferricianuro férrico). (Reeves et al., 1983). Los sideróforos tipo hidroxamato son detectados mediante la prueba de Caskey basado en la oxidación con peryodato o yodo (Neillands, 1981) y también son detectados por el método de Gibson y Magra (1969).

Los solventes más utilizados para la extracción de sideróforos son: acetato de etilo para los de tipo catecol y el alcohol-bencílico o cloroformo-fenol 1:1 para el grupo hidroxamato. (Neillands, 1981).

2.2.4 MECANISMOS DE ASIMILACION DE HIERRO

El problema de la asimilación celular de hierro puede ser dividido en dos estados principalmente: El primer estado, es el problema de la solubilización del hierro extracelular. El hierro existe en la corteza terrestre formando compuestos extremademen

te insolubles en forma de óxidos de minerales tales como: hematita (Fe_2O_3), magnetita (Fe_2O_4) y limonita ($\text{FeO}(\text{OH})$) o como sulfuros como pirita (FeS_2) y burnita (CuFeS_4). Este problema es debido a que la solubilidad de las sales de hierro está estrechamente relacionada con el pH del suelo; en suelos alcalinos la solubilidad disminuye principalmente donde el pH puede alcanzar valores de 10; y elementos tales como cobre, manganeso, níquel y zinc, interfieren fisiológicamente en el aprovechamiento del hierro, dando por resultado que el elemento sea poco accesible para las plantas. (Emery, 1977).

El segundo estado está relacionado con la quelación por sideróforos y su transferencia a receptores de membrana específicos como enzimas o proteínas. (Emery, 1977).

2.2.5 TRANSPORTE DE HIERRO MEDIADO POR SIDEROFOROS

El transporte de hierro mediado por sideróforos se podría explicar en base a tres mecanismos: en el primero los sideróforos se asocian con el hierro del medio, el ferrisideróforo es transportado al interior de la célula y allí es liberado por hidrólisis, siendo el sideróforo utilizado sólo una vez. En el segundo

mecanismo el ferrisideróforo es introducido a la célula y por reducción ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) el ión ferroso se disocia y el sideróforo es reexcretado al medio. En el tercer mecanismo, el hierro es secuestrado del medio por exocelinas, que posteriormente lo seden a las micobactinas (localizadas en las porciones lipofílicas de la superficie celular), las cuales lo translocan al interior de la célula, donde es reducido para ser removido de las micobactinas. Este mecanismo ocurre en micobacterias y organismos que utilizan ácido rodotelónico. (Emery, 1977).

2.2.6 CONTROL DE ENFERMEDADES DE PLANTAS MEDIADO POR SIDERÓFOROS

Investigaciones recientes han demostrado que el sobrenadante de medio gastado (SMG) de una serie de cepas de Rhizobium phaseoli, logró inhibir el desarrollo de Xanthomonas campestris pv. phaseoli hasta en un 90% mediante la presencia de sideróforos en el SMG. (Peralta y Carrillo, 1988).

La aplicación de sideróforos de R. phaseoli en las hojas de plantas de frijol, redujó significativamente el daño causado por las cepas bacterianas X. campestris pv. phaseoli CBP 123 y Pseudomonas syringae pv. phaseolicola. Estos resultados indican

que los sideróforos, además, de ser efectivos en el combate de enfermedades propias de las raíces de las plantas, pueden constituir una buena opción en el control de enfermedades foliares. (Peralta y Carrillo, 1988a).

Se conoce que Pseudomonas spp., coloniza rápidamente raíces de plantas y causan incrementos en la producción. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la población de hongos y bacterias de la rizosfera. Una explicación a este fenómeno, es un mecanismo en el cual la competencia por el hierro limitante en el suelo desempeña un papel central. (Weger et al., 1986).

La cianobacteria Anabaena sp., durante el proceso de fijación de nitrógeno, excreta sideróforos dada la demanda de hierro que tiene dicho organismo. Por consiguiente, Anabaena sp., incrementa su crecimiento a la vez que restringe directamente el crecimiento de otras especies del medio por la utilización de sideróforos. (Murphy et al., 1976).

En pruebas llevadas a cabo en el campo inoculando semillas de papa, remolacha y rábano con células de P. fluorescens putida - se obtuvo un incremento en el crecimiento de las plantas y en

la producción. En laboratorio se ha demostrado que pseudobactina, un sideróforo tipo hidroxamato inhibe a Erwinia carotovora causante de la pudrición de la raíz de la papa. (Kloeppe et al., 1980). Sin embargo éstos mismos autores reportan que la pseudobactina-férrica no promueve el desarrollo de las plantas de papa, remolacha y rábano.

Existen evidencias de que la presencia de sideróforos en el suelo permite que el hierro precipitado sea solubilizado. (Powell et al., 1980).

2.3 ASIMILACION Y TRANSPORTE DE HIERRO EN MAMIFEROS Y PLANTAS SUPERIORES

Se tiene conocimiento que células mutantes de mamífero transformadas (BALB 13T3), adaptadas a crecer en ácido piolínico forman compuestos con ligaduras de hierro llamadas Factor-Sideróforo de Crecimiento (SGF) que se demostró que estimulan la absorción de hierro, pero aún no ha sido definido químicamente. (Neilands, 1981).

En humanos, la mayor parte del total del hierro del cuerpo es intracelular y la pequeña cantidad de hierro libre en flui--

dos del cuerpo (10^{-18} M, Shelley y Payne) potencialmente disponible para patógenos invasores, está limitado por las proteínas transferrinas y lactoferrinas de alta afinidad al ión hierro. - Durante la infección, el mamífero hospedero, reduce la cantidad de hierro en el plasma sanguíneo e incrementa el almacenamiento de este metal en el hígado. Esta capacidad del hospedero para - negar hierro a los microbios invasores se la ha llamado " Inmunidad Nutricional". (Leong y Neilands, 1981).

La ferritina es una proteína compleja formada por 24 subunidades idénticas, que tienen un peso molecular de 4.5×10^5 daltones y cuya función es ayudar a la absorción del hierro; así - como al almacenamiento de este elemento. La transferrina es aparentemente una sola cadena polipeptídica de peso molecular aproximadamente de 8.0×10^4 daltones y su función es transportar - hierro. (Emery, 1977).

Las plantas superiores son los organismos que demandan y requieren una mayor cantidad de hierro a 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. Acerca del mecanismo molecular de

la absorción y transporte de hierro en plantas, no se conoce ninguna teoría sólida. (Emery, 1977).

Las plantas producen ácido húmico y se ha especulado su papel en la solubilización del hierro. El ácido húmico es una mezcla mal definida de varios ácidos carboxílicos, tales como el cítrico, fumárico, oxálico y succínico; la excreción de tales sustancias al suelo disminuye el pH y en consecuencia el hierro se solubiliza. (Emery, 1977).

Los fitosideróforos descubiertos por Takagi en 1976 en raíces de Avena sativa y Criza sativa son aminoácidos que poseen la característica de quelar hierro. (Mishizawa et al., 1989). Los fitosideróforos conocidos actualmente aparecen en el cuadro 4.

Bajo condiciones de deficiencia de hierro, las plantas gramíneas excretan fitosideróforos por las raíces, para disolver el hierro insoluble en la rizosfera tienen receptores para los ferrifitosideróforos. Esta respuesta adaptativa fue llamada "Estrategia II". (Marshner et al., 1986).

La biosíntesis de el ácido mugineico en las gramíneas no ha sido muy estudiada, sin embargo se sabe que el precursor es la L-metionina. (Mori et al., 1987). Se ha intentado obtener líneas de células de cebada que producen y excretan ácido mugineico en condiciones deficientes de hierro. (Nishizawa et al., 1989).

Por todo lo antes mencionados la utilización de sideróforos podría constituir una buena opción en el control biológico de enfermedades de plantas de importancia económica.

O B J E T I V O S

- 1) Determinación de los niveles de producción de sideróforos presente en el medio gastado de Rhizobium phaseoli, a lo largo del desarrollo de los cultivos utilizando medios carentes de hierro, mediante bioensayos de la actividad de promover o inhibir a otros microorganismos en medios carentes de hierro.
- 2) Confirmación de pruebas experimentales para determinar el grupo químico al que pertenecen los sideróforos de R. phaseoli.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las especies de microorganismos bacterianos utilizados en el presente estudio fueron: Rhizobium phaseoli cepas Cp Mex: 1, 6, 9, 13, 19, 28, 43, 44 y 46; Escherichia coli RW 193, Pseudomonas solanacearum y Xanthomonas campestris CEP 123, obtenidas del Cepario del Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo tanto para la preservación y desarrollo de los microorganismos fueron: Levadura glucosa (YGB), Levadura manitol (YMB), B de King (BK), Medio de Luria (L), Medio mínimo para Rhizobium (M) y Medio M sin $FeCl_3$ (M-Fe). Cuando los medios se prepararon en condición sólida se les agregó agar por litro de medio: 18 g para YGB, YMB, BK y L mientras que para los medios M y M-Fe se utilizaron 16 g. (Vincent, 1970).

3.3 PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La esterilización de los medios de cultivo y soluciones con-

centradas utilizadas para la preparación de los medios de cultivo así como el tratamiento que se le dió a el material de cristalería fue el descrito por Peralta y Carrillo (1988), con las siguientes variaciones: el material de cristalería como matraces de tubo lateral y cajas Petri para preparar cultivos en medio M-Fe, fueron tratados con HCl 1 N durante 24 horas, transcurrido este tiempo se lavaron 10 veces con agua desionizada. La esterilización de los medios de cultivo y soluciones concentradas se efectuó en matraces Erlenmeyer de doble capacidad en una autoclave de vapor eléctrica a 1.05 Kg/cm^2 durante 15 minutos, la esterilización del material de vidrio también se llevó a cabo a la presión y tiempo antes mencionados, excepto la solución de glucosa, la cuál se esterilizó a 0.7 Kg/cm^2 durante 10 minutos.

Las soluciones de HCl, FeCl_3 y vitaminas se esterilizaron por filtración con membranas Millipore de $0.45 \mu\text{m}$ en soporte de vidrio de 250 ml de capacidad, con ayuda de una bomba de vacío.

Para la preparación de los medios de cultivo y soluciones se utilizó agua desionizada o tridestilada, excepto para los medios YGB, YMB en los que se utilizó agua destilada. Las soluciones -

concentradas estériles, así como los medios de cultivo fueron manipulados en forma estéril frente a un mechero Fisher. Los medios de cultivo sólidos se vertieron, a róximadamente 25 ml - por caja, en cajas Petri estériles o 3.5 ml en tubos de vidrio estériles de 100 x 10 mm "pyrex" procediendo a inclinarlos hasta que se solidificaran.

3.3.1 MEDIO YGB

A 1000 ml de agua destilada en un matraz de 2000 ml de capacidad se le agregó 1 g de extracto de levadura, se esterilizó y se procedió a añadir 0.8 ml de una solución 1 M de $MgSO_4$, 10 ml de la solución de sales (apéndice I) y 20 ml de la solución de glucosa al 20%.

3.3.2 MEDIO YMB

En un matraz Erlenmeyer, se colocaron 1000 ml de agua destilada, 10 g de manitol y 1 g de extracto de levadura, se tapó con un tapón de algodón y gase y un gorrito de papel. Una vez estéril se le agregó 0.8 ml de la solución 1 M de $MgSO_4$ y 10 ml de la solución de sales.

3.3.3 MEDIO BK

Para la preparación de éste medio se procedió de la siguiente manera: en un matraz con 400 ml de agua desionizada, se le agregó 15 g de caseína, 10 ml de glicerol, 1.5 g K_2HPO_4 , enseguida se procedió a aforar a un litro y el medio se esterilizó.

3.3.4 MEDIO L

A 500 ml de agua desionizada se le agregó 10 g de caseína, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura, procediendo enseguida a aforar a un litro y se esterilizó.

3.3.5 MEDIO M

A 900 ml de agua desionizada previamente estéril se le agregó 10 ml de cada una de las soluciones "a" a "i" (apéndice I).

3.3.6 MEDIO M-Fe

Se siguió el mismo procedimiento que para el caso del medio M, solo que en lugar de utilizarse la solución de $FeCl_3$ se utilizó la solución de HCl 0.1 N. (apéndice I).

Para la preparación de los medios y soluciones de los medios anteriores consultar el apéndice I.

3.4 DETERMINACION DE LAS CINETICAS DE CRECIMIENTO DE OCHO CEPAS DE R. phaseoli

3.4.1 PREPARACION DEL INOCULO DE LAS CEPAS DE R. phaseoli

A partir de tubos de agar inclinado, cada una de las cepas - fue crecida en cajas Petri que contenían 25 ml de medio YMB sólido aproximadamente, durante 48 horas. Transcurrido este tiempo tubos de vidrio con tapón de rosca "pyrex" de 100 x 10 mm estériles que contenían 3 ml de medio M-Fe con ayuda de un asa de platino fueron inoculados, los que se agitaron e incubaron durante 24 horas a una temperatura de 34°C en agitación constante.

3.4.2 EVALUACION DEL GRADO DE DESARROLLO DE LOS CULTIVOS DE R. phaseoli EN MEDIO M Y M-Fe

A partir del inóculo señalado en el punto anterior, matraces de tubo lateral de 125 ml conteniendo 10 ml de medio M o M-Fe - se inocularon hasta alcanzar una lectura de absorbencia inicial de aproximadamente 0.03, la cual se midió en un espectrofotómetro Coleman Junior II Modelo 6/20, a una longitud de onda de -

660 nm. Los cultivos se incubaron en agitación constante a 34°C en un agitador IKD líneal tomando lecturas de absorbencia cada dos horas y media hasta llegar a la fase estacionaria de la curva de crecimiento de cada una de las cepas. La lectura inicial de absorbencia fue tomada utilizando como blanco matraces de tubo lateral con medio de cultivo sin inóculo.

3.5 OBTENCION DE MUESTRAS DE SMG EN TRES TIEMPOS DIFERENTES DEL DESARROLLO DE LOS CULTIVOS DE CADA UNA DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE SIDEROFOROS

Inóculos de 3 ml en medio M-Fe se prepararon como se indicó anteriormente. Los cultivos de 24 horas de incubación se utilizaron para inocular 10 ml de medio M o M-Fe contenidos en matraces de tubo lateral de 125 ml, siendo la lectura inicial de aproximadamente 0.03 a 660 nm. Estos cultivos se sometieron a agitación constante a una temperatura de 34°C. Posteriormente de estos cultivos se obtuvieron muestras a tres diferentes tiempos (T_1 , T_2 y T_3), a las cuales se les midió la absorbencia a 660 nm y se determinó el tiempo en horas a las que fueron obtenidas.

De cada una de las muestras, 1.5 ml del cultivo fueron centrifugados en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad en una cen-

trífuga clínica Damon/IEC Division a 6000 x g durante 12 minutos. Después de la centrifugación los sobrenadantes de medio gastado fueron colectados cada uno por separado con pipetas Pasteur estériles y finalmente se colectaron en tubos Eppendorf estériles, las muestras se etiquetaron y se colocaron en el congelador hasta su utilización. Todo éste procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

3.6 BIOENSAYOS DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS SMG OBTENIDOS A TRES DIFERENTES TIEMPOS SOBRE P. solanacearum.

3.6.1 PREPARACION DEL INOCULO DE P. solanacearum

A partir de tubos de agar inclinado se tomó un inóculo de P. solanacearum, se creció en cajas Petri con 25 ml de medio Bk sólido durante 48 horas a 28°C. Posteriormente en un matraz Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 10 ml de medio Bk fue inoculado e incubado durante 24 horas en agitación constante a 28°C. Transcurrido este tiempo, un matraz de tubo lateral de 125 ml conteniendo 10 ml de medio BK fue inoculado agregando al medio de cultivo el volumen de inóculo necesario para alcanzar la lectura de 0.03 de absorbencia aproximadamente. Enseguida se tomó la lectura inicial de absorbencia, utilizando como control un ma---

traz de tubo lateral conteniendo medio de cultivo. Las condiciones de incubación fueron las antes descritas. Los cultivos se desarrollaron hasta alcanzar una lectura de absorbencia de 0.25.

3.6.2 BIOENSAYOS DE INHIBICION

A partir de los cultivos desarrollados como se indicó anteriormente, se realizaron diluciones como se indica a continuación: en cada uno de tres tubitos Kiróx de 5 ml se colocaron 0.9 ml de agua desionizada estéril, al primero de los tubitos se le agregó 0.1 ml de suspensión de células de P. solanacearum, el cual se mezcló con la ayuda de una micropipeta con puntillas de plástico estériles, enseguida de éste se pasó 0.1 ml al segundo tubo y de éste último se pasó 0.1 ml al tercer tubo hasta llegar a una dilución de 10^{-3} . De ésta última dilución, cajas Petri con 25 ml de medio M o M-Fe sólidos fueron inoculadas con 0.1 ml.

Las células se distribuyeron en la superficie del medio con ayuda de una varilla de vidrio en forma de L previamente flameada en alcohol. En cuatro puntos ecuidistantes se colocaron discos de papel filtro estériles de aproximadamente 0.6 cm de diá-

metro a los que se les colocó previamente 30 μ l de sobrenadante de medio gastado de las muestras T_1 , T_2 y T_3 de cada cepa. Como control se colocó un disco con SMG de la cepa Cp Mex 1 ya que no causa inhibición. Las cajas se invirtieron e incubaron durante 72 horas. Los resultados fueron evaluados midiendo el radio de la zona de crecimiento de R. phaseoli; así como el radio de inhibición del microorganismo fitopatógeno. Posteriormente se calcularon las áreas respectivas mediante la fórmula del cálculo del área de la circunferencia ($A = \pi r^2$). El índice de inhibición se calculó dividiendo el área de la zona de crecimiento de la cepa de R. phaseoli entre el área de la zona de inhibición de la cepa fitopatógena.

A partir de los resultados obtenidos del promedio de cuatro experimentos independientes y realizados por duplicado se seleccionaron cuatro cepas en base a la mayor actividad inhibitoria presentada. Además de seleccionarse el tiempo de la muestra de SMG en que se presento ésta.

3.7 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE PROMOVER O INHIBIR EL DESARROLLO DE OTROS MICROORGANISMOS POR SIDEROFOROS PRESENTES EN SMG Y SMG 30x CONCENTRADO DE MUESTRAS TOMADAS A UN TIEMPO DETERMINADO DE LAS CEPAS CP MEX 1, 19, 28, 44 y 46.

3.7.1 PREPARACION DEL SMG

Inóculos de 3 ml en medio M-Fe se prepararon de la manera ya indicada anteriormente. Cultivos de 24 horas de incubación se utilizaron para inocular 10 ml de medio M y M-Fe contenidos en matraces de tubo lateral de 125 ml de capacidad, siendo la lectura inicial de absorbencia de aproximadamente 0.03. Estos cultivos se sometieron a agitación constante a 34°C durante 25 h - (T₁) de incubación para la cepa Cp Mex 1, 24:30 h (T₂) para Cp Mex 19, 21:00 h (T₂) para Cp Mex 28, 25:40 h (T₃) Cp Mex 44 y 26:40 h (T₃) para la cepa Cp Mex 46; midiendo la absorbencia a 660 nm. Los cultivos se centrifugaron y conservaron de la manera previamente indicada.

3.7.2 PREPARACION DEL SMG 30 VECES CONCENTRADO (30x)

Cultivos de 24 h de incubación se utilizaron para inocular 100 ml de medio M-Fe contenido en matraces Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad, manteniendose los cultivos en agitación oscilatoria constante a 34°C durante los tiempos ya indicados para cada cepa. Transcurrido este tiempo los cultivos se centrifugaron en una centrífuga Beckman modelo J2-21 a 28 000 x g durante 15 minutos entre 4 y 10°C.

El sobrenadante se separó de la pastilla de células con una pipeta y se conservo en refrigeración.

Muestras alícuotas de 90 ml de SMG fueron colocadas en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, posteriormente las muestras fueron congeladas en el matraz con hielo seco y acetona tratando de que la muestra formara una película lo más delgada posible en la pared del matraz para facilitar la liofilización. - Posteriormente cada matraz fue colocado en una liofilizadora - New Brunswick Scientific CD., INC., esperando que se estabilizara el vacío entre 0-50 micrones de mercurio. Las muestras fueron concentradas 30 veces, operación que tardo aproximadamente 8 horas.

3.7.3 BIOENSAYOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE PROMOVER O INHIBIR EL DESARROLLO DE OTROS MICROORGANISMOS POR SIDEROFOROS PRESENTES EN SMG Y SMG 30x DE MUESTRAS OBTENIDAS A UN DETERMINADO TIEMPO

A partir de tubos de agar inclinado, cada una de las cepas - fue crecida en cajas Petri que contenían 25 ml de medio sólido (Para P. solanacearum BK, Y. campestris CBP 123 medio YGB y para E. coli RW 193 medio L) durante 48 horas, las dos primeras -

cepas a 28°C y la última a 37-38°C. El desarrollo de los cultivos de las cepas así como las diluciones realizadas y distribución de las células en medio M y M-Fe sólidos fue el descrito - en experimentos anteriores para P. solanacearum. Para la realización de los bioensayos, en el centro de la caja se colocaron discos de papel filtro estériles de aproximadamente 0.6 cm de diámetro a los que previamente se les colocó 30 µl de SMG y para los bioensayos con SMG 30x fueron utilizados 20 µl con ayuda de una micropipeta. Como control se utilizaron discos que contienen SMG y SMG 30x de la cepa Cp Mex 1. Las cajas de P. solanacearum y X. campestris CBP 123 se invirtieron e incubaron 72 h a 28°C y E. coli RW 193 a 37°C durante 24 h. Los resultados obtenidos del promedio de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado tanto para los bioensayos con SMG y SMG - 30x fueron evaluados mediante el cálculo del área de crecimiento de R. phaseoli, el área de inhibición, el índice de inhibición o el área de activación y el índice de activación según fuera el caso.

3.8 DETERMINACION DEL GRUPO QUIMICO AL QUE PERTENECEN LOS SIDEROFOROS PRODUCIDOS POR R. phaseoli

El principio activo de interferencia o promoción del crecimiento de otros microorganismos por sideróforos de R. phaseoli fue determinado mediante absorción espectrofotométrica del SMG de muestras tomadas a tres tiempos diferentes (T_1 , T_2 y T_3) - del desarrollo de los cultivos de R. phaseoli; SMG, SMG 30x y - SMG eluido de sílica gel (ESG) de muestras tomadas a un determinado tiempo. Además, también se realizó la caracterización por cromatografía en capa fina de sílica gel.

3.8.1 CARACTERIZACION QUIMICA DE LOS SIDEROFOROS PRODUCIDOS POR LAS CEPAS CP MEX 1, 19, 28, 44 y 46 MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRIA.

Para la caracterización química se empleó la metodología descrita por Arnow (1937) para la identificación de sideróforos fenólicos cateólicos, la cual consiste en agregar a 1 ml de muestra a identificar 1 ml de agua destilada, 0.5 ml de HCl 0.5 N, 1 ml de reactivo nitrito-molibdato y 0.5 ml de NaOH 1 N. Transcurrido 30 minutos, la absorbencia fue medida en un espectrofotómetro Bush Lomb Spectronic 2000 a 500 nm. La L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) fue utilizada como standard con la que se determinó su espectro de absorción en un rango de 375 a 700 nm y se

estableció una curva patrón. La determinación de fenoles catecoles se realizó utilizando las siguientes cantidades de SMG:

| | SMG | SMG (ESG) SMG 30x |
|-----------------------------|-------------|----------------------|
| SMG, SMG 30x o SMG (ESG) | 500 μ l | 50.00 μ l |
| Agua destilada | 1.5 ml | 1.95 ml |
| HCl 0.5 N | 0.5 ml | 0.5 ml |
| Nitrito-Molib- dato | 1.0 ml | 1.0 ml |
| NaOH 1 N | 0.5 ml | 0.5 ml |

CUADRO 5. Cantidad de muestras utilizadas para la determinación de catecoles por el método de Arnow.

La determinación cuantitativa de la producción de sideróforos tipo catecol se midió de la siguiente manera; una vez obtenida la pendiente de la curva tipo se obtuvo el valor l/m el cual es multiplicado por cada una de las lecturas de absorbencia obtenidas a 500 nm y que nos da la cantidad de μ moles de catecoles producidos.

3.9.2 CARACTERIZACION EN CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LOS SIDE POFOROS PRODUCIDOS POR R. phaseoli

La técnica empleada fue la de cromatografía en capa fina de sílica gel en su modalidad ascendente, para lo cual se utilizaron cromatofolios comerciales AL de sílica gel 60 (sin indicador fluorescente) de 20 por 20 cm de 0.2 mm de espesor marca Merck, también se utilizaron placas cromatográficas preparadas en placas de vidrio de la siguiente manera: en un matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad se preparó una suspensión en una proporción 1:2 de sílica gel (GF tipo 60) de Merck en agua destilada. En una plataforma de un extensor Yazawa Scientific Apparatus MFG CO. LTD., cuatro placas de vidrio de 20 por 20 cm fueron colocadas una tras de otra adheridas a la plataforma con unas gotas de agua de tal manera que no se movieron durante el corrimiento. La suspensión se vació en el carro del extensor, se derramó y extendió en una capa de grosor uniforme de 0.5 mm por deslizamiento del extensor a lo largo de las placas de vidrio. Posteriormente las placas una vez secas fueron retiradas de la plataformas.

Los solventes utilizados fueron butanol: **ácido** acético: agua

en una proporción de 24:6:8.

Los cromatofolios así como las placas cromatográficas preparadas fueron activadas durante 1 h en un Horno Felisa^r modelo - Fe 293 AD a 100°C.

A los cromatofolios se les trazó la línea del origen con lápiz a lo largo de uno de sus lados y a un cm de la orilla. Sobre esta línea y en puntos ecuidistantes se colocaron muestras de 20 µl de SMG 30x de cada una de las cepas con ayuda de tubos capilares de 10 µl. Cuando las muestras se secaron, los cromatofolios se colocaron en una cámara cromatográfica, la cual se mantuvo saturada con el solvente durante 2 h. El tiempo de separación fue de 5 h. Transcurrido este tiempo, los cromatofolios se retiraron de la cámara y se dejaron secar. Uno de los cromatogramas fue observado bajo luz ultravioleta y el otro se reveló con una solución de FeCl_3 al 1% en HCl 0.05 N, éste último fue expuesto a una fuente de calor durante unos minutos antes y después del revelado. Las manchas observadas fueron delineadas en su contorno con lápiz, el color de éstas se anotó y se determinaron sus valores de Rf.

Para la purificación del principio activo de los SMG 30x de las cepas Cp Mex 19, 28, 44 y 46 se utilizaron las placas cromatográficas preparadas a las cuales se les trazó la línea del origen. En cada una de las placas sobre toda la línea del origen se colocaron con ayuda de capilares de 100 μ l muestras de 500 μ l de SMG 30x, utilizándose una placa por cepa. Una vez secas las placas se colocaron en una cámara cromatográfica bajo las mismas condiciones antes mencionadas para los cromatofolios. Una vez desarrollados y secos fue revelada una parte del cromatograma de aproximadamente 4 cm de ancho de un extremo de la placa con FeCl_3 al 1%, para lo cual la parte que no se reveló de aproximadamente 14 cm de ancho se cubrió con un acetato para protegerla del revelador.

La parte no revelada fue observada bajo luz ultravioleta remarcando las líneas que coincidían con las manchas que aparecieron en la parte revelada con FeCl_3 al 1%. El sílica gel de estas áreas de aproximadamente 1 cm de ancho fueron raspadas con una navaja recuperándose la sílica gel de la placa cromatográfica. Con agua desionizada fue eluída y la preparación centrifugada a 27 500 x g durante 5 minutos. Posteriormente la solución -

fue separada. La identificación y cuantificación de los compuestos tipo catecol presentes en los SMG (ESG) se realizó mediante la metodología antes descrita.

3.8.3 BIOENSAYOS DE ACTIVACION DE LOS SOBRENADANTES DE MEDIO - GASTADO ELUIDOS DE SILICA GEL (ESG) EN MEDIOS SOLIDOS SOBRE E. coli RW 193

Los bioensayos fueron establecidos en cajas Petri que contenían medio M y M-Fe sólido para probar la actividad biológica - de cada uno de los SMG (ESG) contra E. coli RW 193. En discos - de aproximadamente 0.6 cm de diámetro se pusieron 30 μ l de cada muestra, utilizando una micropipeta con puntas de plástico estériles. Estos discos fueron colocados en cajas con medio sólido previamente inoculadas con la cepa ya mencionada, colocando un disco por caja. Las cajas se invirtieron e incubaron a 37°C durante 24 h aproximadamente. Los resultados obtenidos del promedio de dos experimentos realizados por duplicado fueron evaluados como se indicó en bioensayos anteriores.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 GRADO DE DESARROLLO DE LOS CULTIVOS DE R. phaseoli EN MEDIOS LIQUIDOS M Y M-Fe

Un criterio para determinar si un microorganismo produce sideróforos, se basa en la capacidad del microorganismo para crecer en medios deficientes de hierro. (Frederick et al., 1981).

Los resultados obtenidos en esta prueba, se muestran en el cuadro 6 y 7 en los cuales aparece el crecimiento presentado por ocho cepas de R. phaseoli en medio M y M-Fe; tres cepas presentaron una disminución en la velocidad de crecimiento en el medio carente de hierro, mientras que cinco presentaron un crecimiento similar en ambos medios. Las ocho cepas presentaron una pigmentación ámbar, siendo más marcada en los medios M-Fe que en los medios M. Además, esta pigmentación se presentó más tempranamente en medio M-Fe.

La producción de pigmento parece estar relacionada con la producción de sideróforos. (Peralta y Carrillo, 1988; Meyer y Abdallah, 1978; Teintze et al., 1981) El caso de Pseudomonas sp. produce un pigmento negro debido a la acumulación de sideróforos

CUADRO 6

MEDIO M

| R. pha- seoli | Absorbencia 660 nm | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | Tiempo de incubación en horas | | | | | | | | | | |
| Cp Mex: | 0 | 2:30 | 5 | 7:30 | 10 | 13:30 | 16 | 18:30 | 21 | 23:30 | |
| 6 | 0.023 | 0.041 | 0.116 | 0.250 | 0.510 | 0.600 | 0.660 | 0.730 | 0.800 | 0.800 | |
| 9 | 0.021 | 0.041 | 0.138 | 0.336 | 0.740 | 0.780 | 0.800 | 0.800 | 0.780 | 0.771 | |
| 13 | 0.023 | 0.031 | 0.061 | 0.111 | 0.211 | 0.380 | 0.580 | 0.810 | 0.810 | 0.782 | |
| 19 | 0.020 | 0.041 | 0.132 | 0.336 | 0.701 | 0.780 | 0.780 | 0.730 | 0.780 | 0.780 | |
| 28 | 0.020 | 0.037 | 0.100 | 0.298 | 0.620 | 0.760 | 0.760 | 0.750 | 0.758 | 0.720 | |
| 43 | 0.020 | 0.045 | 0.122 | 0.332 | 0.660 | 0.760 | 0.760 | 0.760 | 0.760 | 0.760 | |
| 44 | 0.017 | 0.023 | 0.050 | 0.098 | 0.199 | 0.370 | 0.540 | 0.642 | 0.730 | 0.730 | |
| 46 | 0.019 | 0.033 | 0.072 | 0.148 | 0.289 | 0.475 | 0.710 | 0.740 | 0.740 | 0.740 | |

CUADRO 7

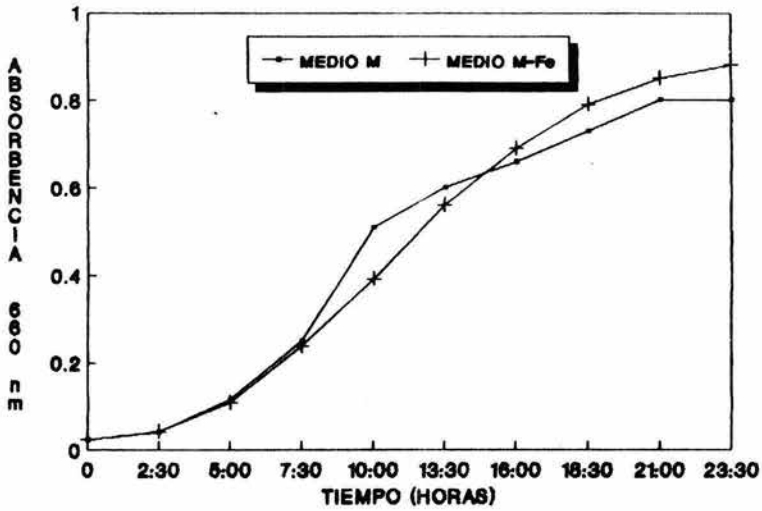
MEDIO M-Fe

| R. pha seoli | Absorbencia 660 nm | | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | Tiempo de incubación en horas | | | | | | | | | | |
| Cp Mex: | 0 | 2:30 | 5 | 7:30 | 10 | 13:30 | 16 | 18:30 | 21 | 23:30 | |
| 6 | 0.023 | 0.042 | 0.108 | 0.238 | 0.392 | 0.560 | 0.690 | 0.790 | 0.850 | 0.880 | |
| 9 | 0.030 | 0.058 | 0.152 | 0.292 | 0.520 | 0.690 | 0.740 | 0.760 | 0.780 | 0.780 | |
| 13 | 0.023 | 0.050 | 0.108 | 0.178 | 0.350 | 0.469 | 0.648 | 0.770 | 0.790 | 0.790 | |
| 19 | 0.019 | 0.040 | 0.110 | 0.226 | 0.399 | 0.600 | 0.680 | 0.750 | 0.800 | 0.820 | |
| 28 | 0.023 | 0.037 | 0.101 | 0.230 | 0.360 | 0.576 | 0.700 | 0.750 | 0.770 | 0.770 | |
| 43 | 0.028 | 0.062 | 0.180 | 0.358 | 0.590 | 0.682 | 0.760 | 0.780 | 0.800 | 0.800 | |
| 44 | 0.032 | 0.056 | 0.111 | 0.160 | 0.281 | 0.380 | 0.515 | 0.615 | 0.680 | 0.680 | |
| 46 | 0.022 | 0.042 | 0.107 | 0.188 | 0.289 | 0.445 | 0.570 | 0.660 | 0.680 | 0.680 | |

CUADRO 6 y 7. Datos de turbidez e los tiempos indicados de cultivos bajo agitación constante a 34°C de ocho cepas no fitopatógenas en medios M y M-Fe.

clorocatecoles. (Halley y Finn, 1979). Por otra parte la secreción de sideróforos metil catecol en P. putida también produce un pigmento pardo (Harwood y Ornston, 1984), esto mismo sucede con algunas P. fluorescentes que producen un pigmento amarillo verdoso fluorescente. (Meyer, 1978).

En las figuras la, b, c y d se pueden observar las cinéticas de crecimiento de los cultivos tanto en medio M como en M-Fe - para cada una de las cepas; las cepas Cp Mex 6, 13, 43, 44 y 46 no presentan diferencias pronunciadas en la velocidad de crecimiento en ambos medios, mientras que Cp Mex 9, 19 y 28 presentaron una disminución en la velocidad de crecimiento en el medio M-Fe. En base a los resultados obtenidos en ambos medios - se obtuvo el tiempo medio en que se llegó al 50 % de crecimiento máximo de las ocho cepas, presentándose los resultados en el cuadro 8, la mayoría de los microorganismos alcanzaron el tiempo de 50 % de crecimiento prácticamente al mismo tiempo en ambos medios, a excepción de las cepas Cp Mex 19 y Cp Mex 28 - cuyo crecimiento medio fue mayor en el medio M-Fe y de la cepa Cp Mex 13 en medio M. Basados en los resultados obtenidos se puede decir que la deficiencia de hierro en el medio, además de inducir la síntesis de sideróforos, induce también un siste



CPMEX 9

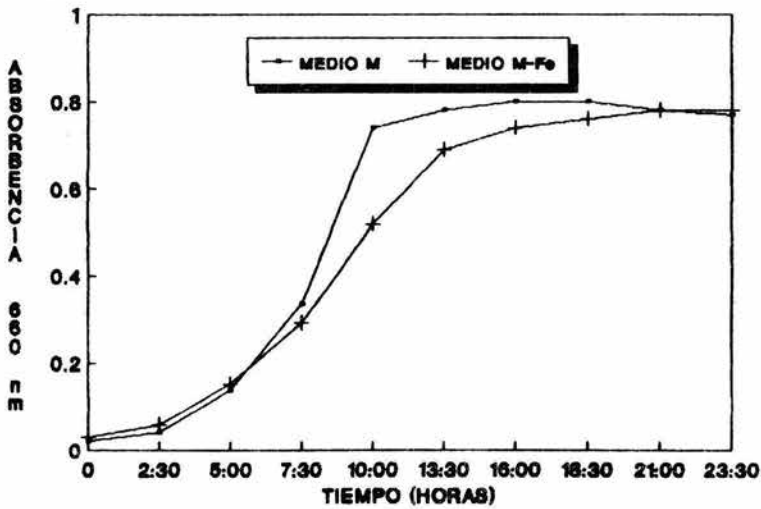
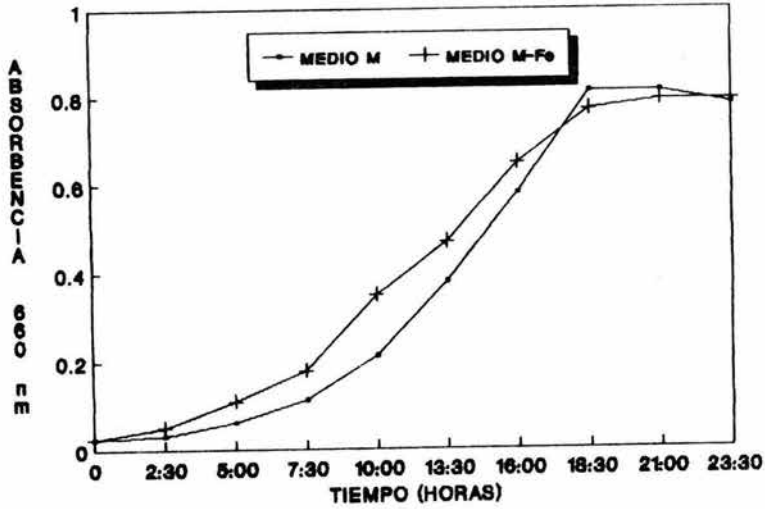


FIGURA 1 a, b, c y d. Cinéticas de crecimiento de R. phaseoli en medios M y M-Fe.

CPMEX 13



CPMEX 19

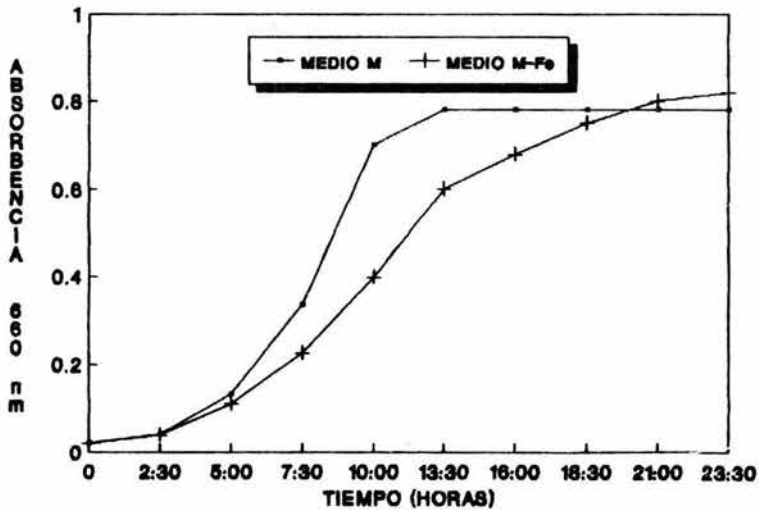
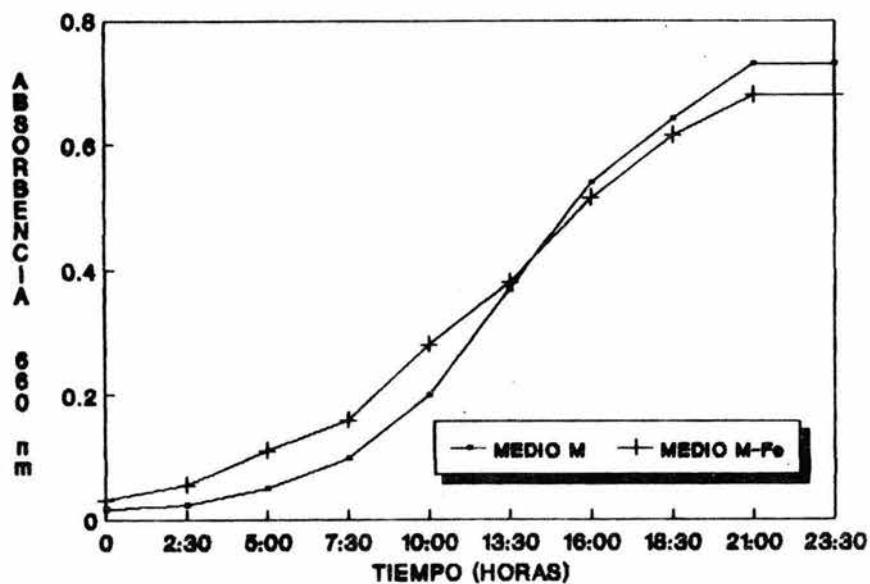


FIGURA 1b.



CPMEX 46

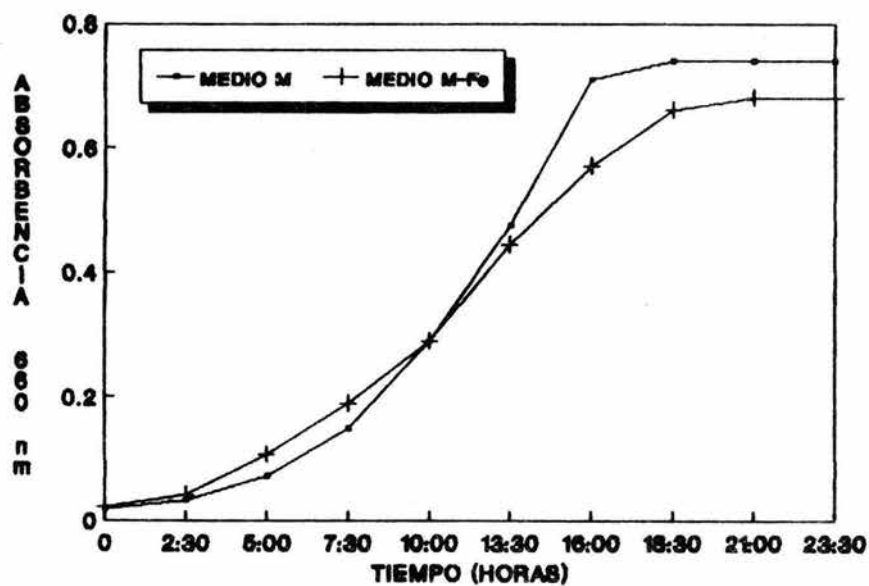


FIGURA 1c.

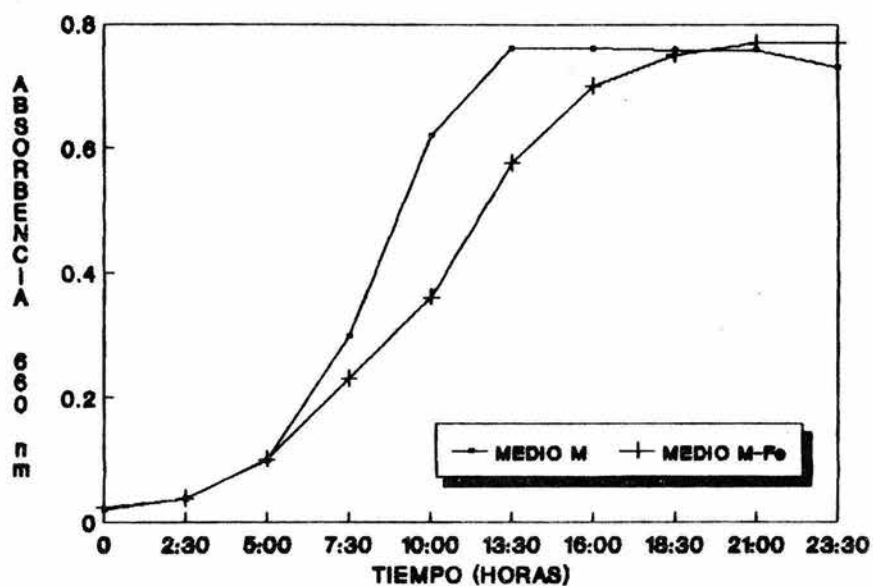
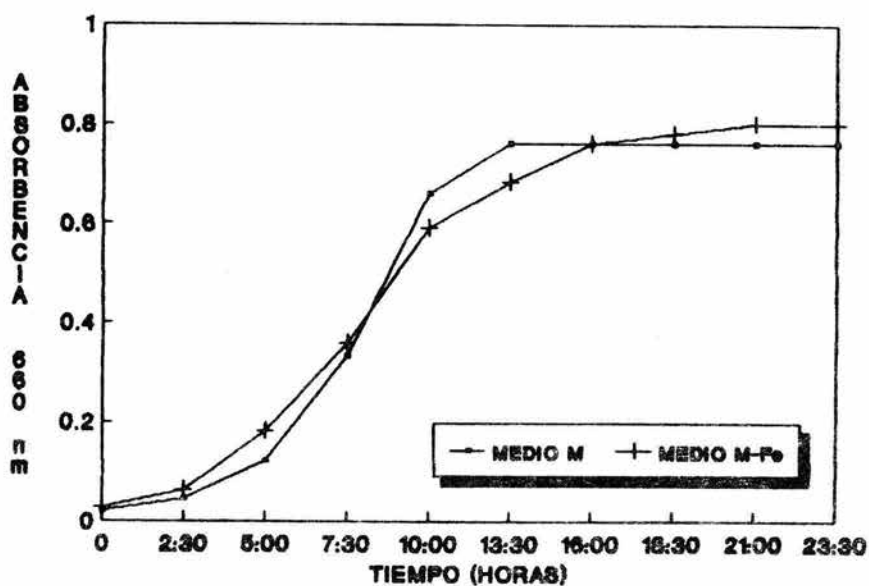
CPMEX 28**CPMEX 43**

FIGURA 1d.

| Cepas | Tiempos de incubación en horas | |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|
| | M | M-Fe |
| Cp Mex 6 | 9 | 10 |
| Cp Mex 9 | 8 | 8 ¹ / ₂ |
| Cp Mex 13 | 14 | 12 ¹ / ₂ |
| Cp Mex 19 | 7 ¹ / ₂ | 10 |
| Cp Mex 28 | 8 ¹ / ₂ | 10 ¹ / ₂ |
| Cp Mex 43 | 8 | 8 |
| Cp Mex 44 | 12 ¹ / ₂ | 12 ¹ / ₂ |
| Cp Mex 46 | 11 | 11 ¹ / ₂ |

CUADRO 8. Tiempo medio en que se llega al 50% de crecimiento máximo de ocho cepas de R. phaseoli.

ma de alta afinidad de proteínas en la membrana externa (Cody y Gross, 1987); Marugg et al., 1989), por lo que el crecimiento de la mayoría de las cepas fue similar en ambos medios, y el hecho de que dos cepas hayan presentado un crecimiento medio máximo mayor en el medio M-Fe y una cepa en medio M, posiblemente se debe a que existe un requerimiento diferencial de hierro por los diversos microorganismos, donde la asimilación es mejor por unos microorganismos en comparación con otros.

4.2 ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS SIDEROFOROS PRESENTES EN LOS SMG DE TRES MUESTRAS OBTENIDAS A DIFERENTES TIEMPOS DE CEPAS DE R. phaseoli SOBRE P. solanacearum

Con el fin de detectar la actividad biológica de los sideróforos en distintos estadios de desarrollo, se tomaron tres muestras de SMG a diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento de las cepas Cp Mex 1, 6, 9, 13, 19, 28, 43, 44 y 46 - en medio M y M-Fe se realizaron pruebas sobre el desarrollo de P. solanacearum. Los resultados aparecen en el cuadro 9, los índices de inhibición representan la capacidad de un organismo para inhibir a otro. Se puede observar que los SMG de siete cepas por lo menos en alguna de sus muestras provocaron inhibición

| Muestra | <u>R. phaseoli</u> Cp Mex: | | | | | | | | |
|----------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 6 | 9 | 13 | 19 | 28 | 43 | 44 | 46 |
| | <u>Absorbencia 660 nm</u> | | | | | | | | |
| T ₁ | 0.770 | 0.840 | 0.750 | 0.720 | 0.750 | 0.750 | 0.760 | 0.620 | 0.560 |
| T ₂ | 0.800 | 0.860 | 0.760 | 0.750 | 0.770 | 0.760 | 0.780 | 0.700 | 0.650 |
| T ₃ | 0.890 | 0.830 | 0.780 | 0.770 | 0.800 | 0.780 | 0.800 | 0.700 | 0.680 |
| | <u>Tiempo en horas</u> | | | | | | | | |
| T ₁ | 23:30 | 19:30 | 18:30 | 21:00 | 17:30 | 18:30 | 18:30 | 20:00 | 21:00 |
| T ₂ | 24:00 | 22:00 | 21:00 | 23:30 | 20:00 | 21:00 | 22:30 | 22:30 | 24:00 |
| T ₃ | 26:00 | 25:20 | 24:20 | 26:40 | 24:30 | 24:20 | 25:40 | 25:40 | 26:40 |
| | <u>Area de crecimiento (mm²)</u> | | | | | | | | |
| T ₁ | 280 | 500 | 790 | 790 | 640 | 640 | 790 | 790 | 640 |
| T ₂ | 280 | 790 | 790 | 790 | 790 | 790 | 790 | 790 | 790 |
| T ₃ | 280 | 790 | 790 | 640 | 790 | 790 | 790 | 790 | 790 |
| | <u>Area de inhibición (mm²)</u> | | | | | | | | |
| T ₁ | 280 | 500 | 790 | 790 | 1330 | 1330 | 790 | 790 | 1130 |
| T ₂ | 280 | 790 | 950 | 790 | 1770 | 2010 | 790 | 790 | 2270 |
| T ₃ | 280 | 1330 | 1130 | 1130 | 3140 | 790 | 790 | 2840 | 2840 |
| | <u>Indice de inhibición</u> | | | | | | | | |
| T ₁ | 1 | 1 | 1 | 1 | 2.08 | 2.08 | 1 | 1 | 1.47 |
| T ₂ | 1 | 1 | 1.2 | 1 | 2.24 | 2.54 | 1 | 1 | 2.87 |
| T ₃ | 1 | 1.68 | 1.43 | 1.77 | 3.97 | 1 | 1 | 3.59 | 3.59 |
| | <u>Indice de inhibición (%)</u> | | | | | | | | |
| T ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.39 | 81.89 | 0 | 0 | 49.30 |
| T ₂ | 0 | 0 | 83.92 | 0 | 56.42 | 100 | 0 | 0 | 79.94 |
| T ₃ | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 |

El índice de inhibición I=0

CUADRO 9. Determinación de la capacidad inhibitoria ejercida por SMG de R. phaseoli sobre el desarrollo de P. solanacearum en medio M-Fe a las 72 h de incubación.

sobre P. solanacearum, únicamente la cepa Cp Mex 43 no causó inhibición con ninguna de las tres muestras de SMG sobre la cepa fitopatógena, ésto no indica que no produzca sideróforos sino que posiblemente las muestras no se obtuvieron en el momento indicado. Cabe señalar que la cepa Cp Mex 1 fue utilizada como control puesto que no produce sideróforos y por lo tanto no causa inhibición, los resultados señalados anteriormente corresponden a pruebas realizadas en medio M-Fe. Las muestras de SMG al ser probadas en medio M, no causaron ningún efecto sobre el desarrollo de P. solanacearum, por lo que los resultados no se presentan en cuadro, siendo esta una prueba más de que la inhibición esta mediada por sideróforos, cuya máxima producción se encuentra relacionada con la velocidad de crecimiento del organismo.

El índice de inhibición más alto correspondió a la cepa Cp Mex 19 con 3.97 veces el crecimiento de R. phaseoli de la muestra T₃ (24:30 h) y que tuvo una absorbencia de 0.800, seguida de las cepas Cp Mex 44 y Cp Mex 46 con 3.59 de la muestra T₃ (25:40 h y 26:40 h respectivamente) y una absorbencia de 0.700 y 0.680, el índice más bajo lo presentó la cepa Cp Mex 9 con -

1.2 de la muestra T₂ (21:00 h) y una absorbencia de 0.760. Los índices de inhibición presentados en el cuadro con el valor de 1 equivalen a una inhibición de 0. Esto concuerda con algunos autores (Neilands, 1981, 1982; Neilands y Leong, 1986) en que la producción de sideróforos en medios deficientes de hierro, es presentada por algunas bacterias, hongos y algas siendo utilizados para interferir en el crecimiento de otros microorganismos en condiciones limitantes de hierro. La interferencia causada por microorganismos productores de sideróforos se ha demostrado in vitro en numerosas cepas de Pseudomonas fluorescentes como P. fluorescens y P. putida, desapareciendo la actividad inhibitoria cuando se adicionó hierro al medio. Esta es una indicación de que los sideróforos son usualmente responsables de la actividad antagonista. (Weger et al., 1986). Esta actividad también se ha demostrado sobre el crecimiento de Erwinia carotovora causada por el sideróforo pseudobactina. (Kloepper et al., 1980).

Gráficamente se pueden observar en la figura 2, los índices de inhibición en las tres muestras de SMG obtenidas a diferentes tiempos para cada una de las cepas.

La estimación porcentual se realizó sacando el porcentaje ab

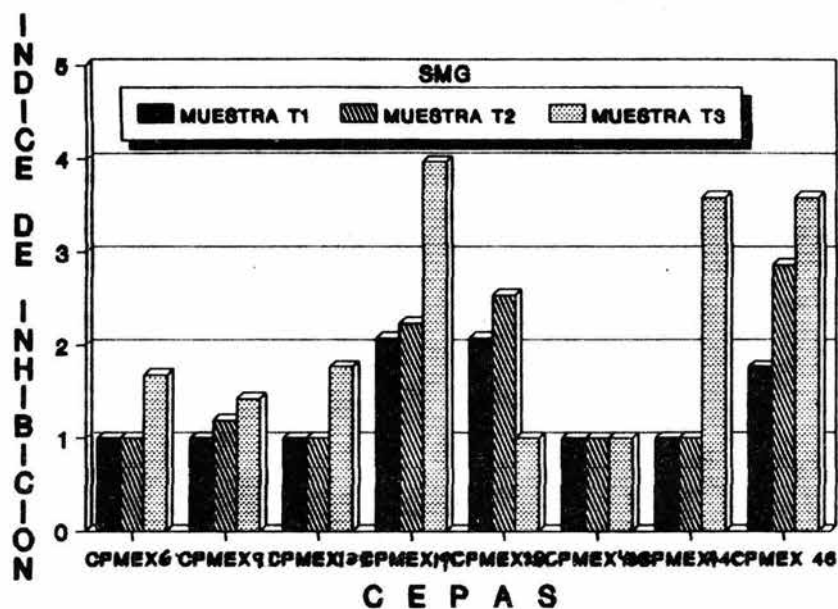


FIGURA 2. Perfil de la actividad inhibitoria de tres muestras de SMG obtenidas a tres tiempos diferentes a lo largo de la curva de crecimiento de cepas de R. phaseoli sobre P. solanacearum a las 72 h de incubación en medio M-Fe sólido. 1 es equivalente a 0.

soluto de inhibición para cada una de las cepas, tomando como 100% el valor más alto de inhibición en las tres muestras de SMG en cada una de las cepas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron cuatro cepas a parte de la cepa Cp Mex 1 en base a la mayor actividad inhibitoria provocada sobre P. solanacearum. Además, de seleccionarse el tiempo de la muestra de SMG en que se presentó ésta.

4.3 CAPACIDAD PARA PROMOVER O INHIBIR EL DESARROLLO DE OTROS MICROORGANISMOS POR SIDERÓFOROS PRESENTES EN SMG Y SMG 30x DE MUESTRAS TOMADAS A UN TIEMPO DETERMINADO

Con los microorganismos seleccionados y el tiempo en que se produce la máxima producción de sideróforos los cuales aparecen en el cuadro 10, se procedió a confirmar los resultados obtenidos en experimentos anteriores sobre P. solanacearum. Además de los SMG fueron probados los SMG 30x concentrados (SMG 30x) de muestras tomadas a un determinado tiempo en los cuales se evaluó su capacidad para promover o inhibir el desarrollo de X. campestris CBP 123 y E. coli RW 193 además de la cepa antes mencionada.

| Cepas | Mues- tra | Absor- bencia 660 nm | Tiem- po en (h) | Area de creci- miento (mm ²) | Area de inhibi- ción (mm ²) | Indice de in- hibi- ción | Indice de inhibi- ción (%) |
|-----------|----------------|----------------------------|-----------------------|---|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Cp Mex 1 | T ₂ | 0.80 | 25:00 | 280 | 280 | 1 | 0 |
| Cp Mex 19 | T ₃ | 0.82 | 24:30 | 950 | 2840 | 2.9 | 100 |
| Cp Mex 28 | T ₂ | 0.76 | 21:00 | 1130 | 2270 | 2.01 | 67.22 |
| Cp Mex 44 | T ₃ | 0.71 | 25:40 | 950 | 2540 | 2.67 | 89.30 |
| Cp Mex 46 | T ₃ | 0.78 | 26:40 | 790 | 1540 | 1.95 | 65.22 |

El índice de inhibición con valor de 1=0

CUADRO 10. Determinación de la actividad inhibitoria de SMG de mues-
tras obtenidas a un determinado tiempo sobre el desarrollo de
P. solanacearum en medio M-Fe a las 72 h de incubación.

Los datos del efecto de los SMG de las cuatro cepas de R. phaseoli sobre el crecimiento de P. solanacearum aparecen en el cuadro 10 y los datos obtenidos para X. campestris CBP 123 aparecen en el cuadro 11 y ambos resultados aparecen graficados en la figura 3, en donde se muestra que las cuatro cepas utilizadas interfirieron en el desarrollo de ambas cepas fitopatógenas en medio M-Fe, mientras que en medio M no se observó ningún efecto, por lo que no se presentan los resultados en cuadro. Se observa que la capacidad de interferencia de los SMG de la cepa Cp Mex 19 obtenidos a las 24:30 h afectó en mayor grado el desarrollo de P. solanacearum así como de X. campestris CBP 123 - presentando un índice de inhibición de 2.99 (100%) y 4.37 (100%) cada una respectivamente. El SMG que causó el menor efecto sobre ambas cepas fue el de Cp Mex 46 con un índice de inhibición de 1.95 (65.22%) para la primera cepa fitopatógena y 2.87 (65.68%) para la segunda cepa fitopatógena. Resultados similares se han encontrado en pruebas realizadas con otros microorganismos. (Mogre y Emery, 1976; Emery, 1977). Los resultados obtenidos sobre X. campestris CBP 123 son similares a los encontrados por Carri

| Cepas | Mues- tra | Absor- bencia 660 nm | Tiem- po en (h) | Area de creci- miento (mm ²) | Area de inhibi- ción (mm ²) | Indice de in- hibi- ción | Indice de inhibi- ción (%) |
|-----------|----------------|----------------------------|--------------------------|---|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Cp Mex 1 | T ₂ | 0.80 | 25:00 | 280 | 280 | 1 | 0 |
| Cp Mex 19 | T ₃ | 0.082 | 24:30 | 950 | 4150 | 4.37 | 100 |
| Cp Mex 28 | T ₂ | 0.76 | 21:00 | 1130 | 3800 | 3.36 | 76.88 |
| Cp Mex 44 | T ₃ | 0.71 | 25:40 | 950 | 3140 | 3.31 | 75.74 |
| Cp Mex 46 | T ₃ | 0.68 | 26:40 | 790 | 2270 | 2.87 | 65.68 |

El índice de inhibición con valor de 1=0

CUADRO 11. Determinación de la actividad inhibitoria de mues-
tras de SMG de muestras obtenidas a un determinado
tiempo sobre el desarrollo de X. campestris CBP
123 en medio M-Fe.

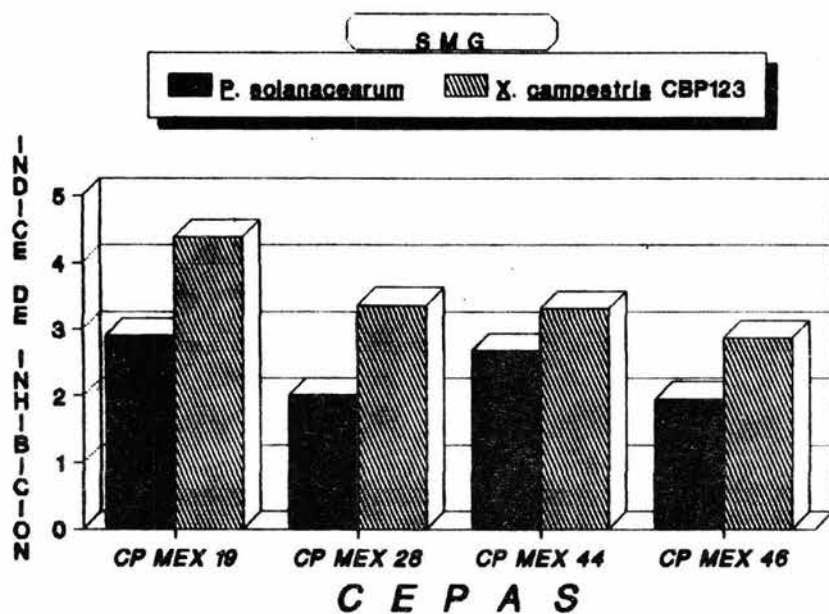


FIGURA 3. Perfil de la actividad inhibitoria de los SMG de muestras obtenidas a determinado tiempo de - cuatro cepas de R. phaseoli sobre el desarrollo de dos cepas fitopatógenas. 1 es equivalente a 0.

llo y Peralta (1988a) en experimentos que realizaron al estudiar el fenómeno de interferencia en R. phaseoli.

Para detectar la actividad promotora o inhibitoria de los SMG 30x concentrados de las cuatro cepas de R. phaseoli ya mencionadas anteriormente se provó su efecto sobre P. solanacearum y E. coli RW 193 puesto que en estas cepas los resultados se obtienen rápidamente, para la primera a las 72 h y para la segunda en menos de 24 h. En el cuadro 12 y figura 4 se observan los resultados, el SMG 30 x concentrado de las cuatro cepas no fitopatógenas causaron inhibición sobre el desarrollo de P. solanacearum en el medio M-Fe. El mayor efecto lo causó el SMG 30x concentrado de la cepa Cp Mex 19 con un índice de inhibición de 7.17 (100%), por otra parte las cepas Cp Mex 28 y 44 actuaron de la misma manera presentando un índice de inhibición de 6.3 (83.87%) para ambos casos. El menor índice de inhibición fue presentado por el SMG 30x concentrado de la Cp Mex 46. En el medio M se presentó una pequeña inhibición quizá debido a la gran cantidad de sales presentes en el SMG 30x por lo que no se presentan los resultados en cuadro.

Por otra parte los resultados obtenidos sobre E. coli Rw 193 aparecen en el cuadro 13 y figura 5 indican que tres cepas cau-

| Cepas | Mues- tra | Absor- bencia 660 nm | Tiem- po en (h) | Area de creci- miento (mm ²) | Area de inhibi- ción (mm ²) | Indice de in- hibi- ción | Indice de inhibi- ción (%) |
|-----------|----------------|----------------------------|--------------------------|---|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Cp Mex 1 | T ₂ | 0.80 | 25:00 | 280 | 280 | 1 | 0 |
| Cp Mex 19 | T ₃ | 0.82 | 24:30 | 280 | 2010 | 7.17 | 100 |
| Cp Mex 28 | T ₂ | 0.76 | 21:00 | 280 | 1767 | 6.3 | 83.87 |
| Cp Mex 44 | T ₃ | 0.71 | 25:40 | 280 | 1767 | 6.3 | 83.87 |
| Cp Mex 46 | T ₃ | 0.68 | 26:40 | 280 | 1327 | 4.73 | 65.96 |

CUADRO 12. Capacidad inhibitoria provocada por SMG 30 veces concentrados (30x) por liofilización de cuatro cepas de R. phaseoli sobre P. solanacearum en medio M-Fe.

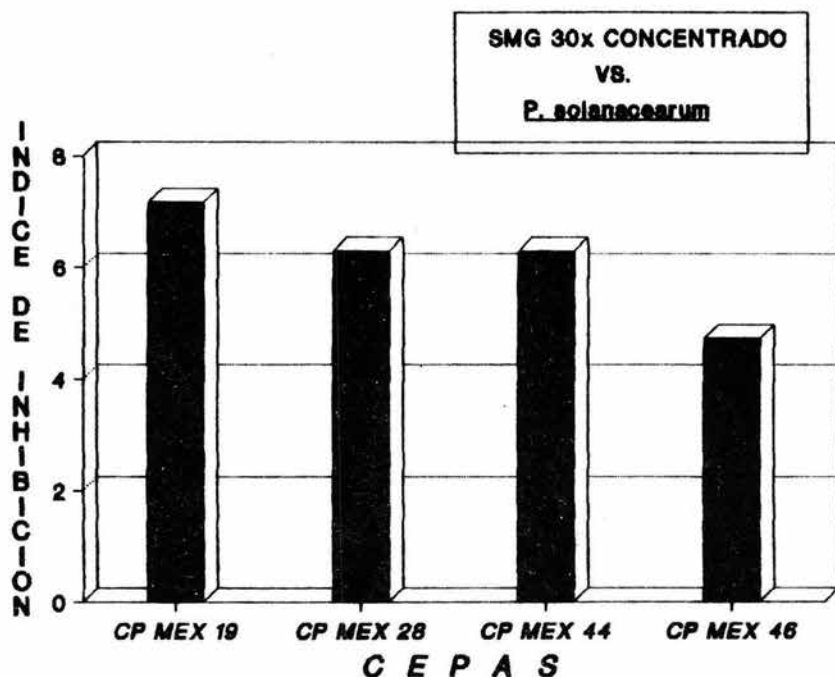


FIGURA 4. Perfil de la actividad inhibitoria provocada por SMG 30x de cuatro cepas de R. phaseoli sobre el desarrollo de P. solanacearum en medio M-Fe. 1 es equivalente a 0.

saron promoción del crecimiento de E. coli RW 193, por lo que se puede decir que esta cepa es capaz de utilizar el hierro que lado por los sideróforos presentes en los SMG 30x. Varios microorganismos tienen la capacidad de utilizar los sideróforos producidos por otras especies como E. coli y Salmonella typhimurium (Moody, 1986). Un caso interesante fue el presentado por el SMG 30x de la cepa Cp Mex 46 que causó inhibición sobre E. coli RW 193.

El SMG 30x de la cepa Cp Mex 19 causó la mayor activación del crecimiento de E. coli RW 193 con un índice de activación de 70.1 (100%) seguido de la Cp Mex 44 (49.02%), mientras el SMG 30x de la cepa Cp Mex 28 causó una activación de 25.25 (36.02%).

El SMG 30x de la cepa Cp Mex 46 provocó un índice de inhibición de 25.25 (36%). Los resultados también fueron expresados en porcentaje, tomando como cien por ciento el valor máximo obtenido. En medio M no se presentó ningún efecto.

Los resultados obtenidos tanto en los SMG así como de los SMG 30x de las cuatro cepas no fitopatógenas utilizadas indican nuevamente, que debido a la gran especificidad de los compuestos

| Cepas | Muestra | Absorbencia 660 nm | Tiempo en (h) | Area de crecimiento (mm ²) | Area de activación (mm ²) | Indice de ac- tiva- ción | Indice de activa- ción (%) |
|-----------|------------------------------|-----------------------|------------------|--|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Cp Mex 1 | T ₂ | 0.80 | 25:40 | 280 | 280 | 1 | 0 |
| Cp Mex 19 | T ₃ | 0.82 | 24:30 | 280 | 19,635 | 70.1 | 100 |
| Cp Mex 28 | T ₂ | 0.76 | 21:00 | 280 | 7,069 | 25.25 | 36.02 |
| Cp Mex 44 | T ₃ | 0.71 | 25:40 | 280 | 9,621 | 34.36 | 49.02 |
| Cp Mex 46 | ⁺⁺ T ₃ | 0.68 | 26:40 | 280 | 7,069 | 25.25 | 36.02 |

++ = inhibición

CUADRO 13. Determinación de la capacidad promotora del crecimiento de E. coli RW 193 causado por SMG 30x de cepas de R. phaseoli en medio M-Fe a las 20 h de incubación.

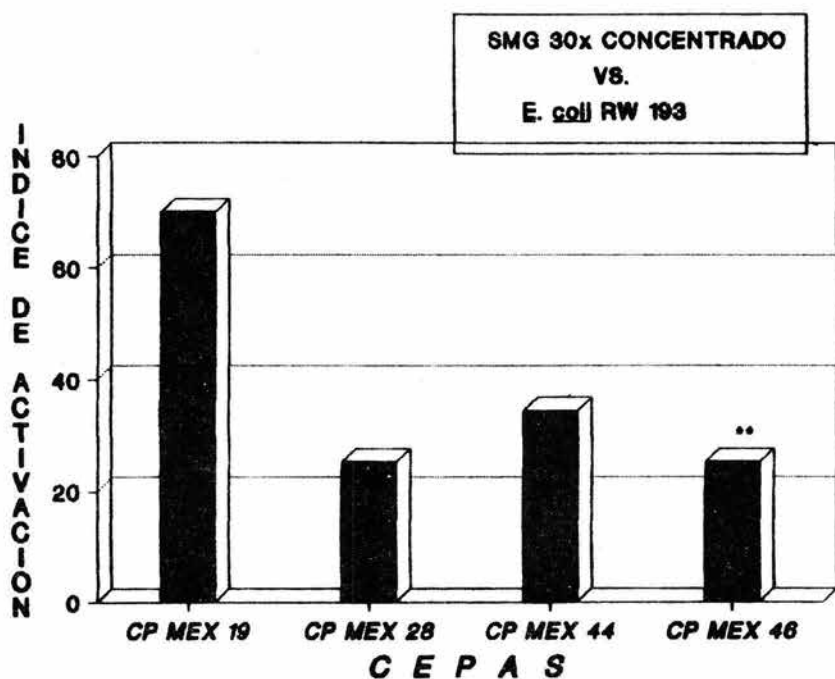


FIGURA 5. Perfil de la capacidad promotora del crecimiento causado por cuatro SMG 30x de cuatro cepas de R. phaseoli sobre el desarrollo de E. coli RW 193 en medio M-Fe. ** provocó inhibición.

producidos por R. phaseoli sobre diferentes microorganismos. - Esta es una evidencia más de que el mecanismo de captación de hierro esta mediado por sideróforos.

3.8 DETERMINACION DEL GRUPO QUIMICO AL QUE PERTENECEN LOS SIDEROFOROS PRODUCIDOS POR R. phaseoli

Como una aportación más para la determinación del grupo químico al que pertenecen los sideróforos producidos por R. phaseoli ya que son escasos los trabajos al respecto en este microorganismo.

Todos los sideróforos presentan una absorción máxima en el rango de luz ultravioleta y el rango de luz visible cuando se coordinan con el hierro. Químicamente los sideróforos tipo catecol son detectables mediante métodos colorimétricos. Los catecoles son detectados generalmente con el reactivo de Arnow (Nitrito-Molibdato), siendo ésta una prueba selectiva para los grupos de anillos aromáticos. (Arnow, 1937; Neilands, 1961).

Para realizar la estimación colorimétrica por el método de Arnow de los sideróforos tipo catecol fue necesario primeramente establecer una curva patrón para determinar cuantitativamente la cantidad de catecoles producidos por R. phaseoli, utilizando

se como estandar la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), en las concentraciones que se indican en el cuadro 14. En el cuadro 15 se muestran los datos obtenidos en la medición del espectro de absorción de la L-DOPA a diferentes longitudes de onda que van de un rango de 375 a 700 nm., obteniéndose un sólo pico de absorción máxima de 500 nm con una absorbencia de 0.742, éstos resultados se muestran gráficamente en la figura 7. Una vez establecido el rango de absorción máxima todas las estimaciones se realizaron a 500 nm, para posteriormente determinar la cantidad de éstos compuestos en μ moles. En la figura 6 se observan éstos datos.

Las pruebas de identificación química de los sideróforos tipo catecol dieron resultados positivos observándose un tono rosado en la presencia de dichos compuestos, éste mismo tono fue observado en la L-DOPA.

En los SMG de tres muestras tomadas a diferentes tiempos de de cuatro cepas de R. phaseoli en medio M y M-Fe fue cuantificada la cantidad de sideróforos tipo catecol producidos en 1 ml de muestra, midiéndose la absorbencia a 500 nm. Los resultados se muestran en el cuadro 16; la máxima producción de sideróforos fue presentada por los SMG de la cepa Cp Mex 46 siendo mayor la producción a las 26:40 h (T₂) con 0.166 μ moles/ml de muestra.

| μ l de L-DOPA | Absorbencia 500 nm | μ moles de L-DOPA |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0 | 0.00 | 0.00 |
| 10 | 0.016 | 0.011 |
| 20 | 0.038 | 0.025 |
| 40 | 0.078 | 0.051 |
| 80 | 0.159 | 0.101 |

CUADRO 14. Determinación en μ moles de la cantidad de L-DOPA presente en diferentes concentraciones de ésta en solución, por el método de Arnou para la detección de catecoles.

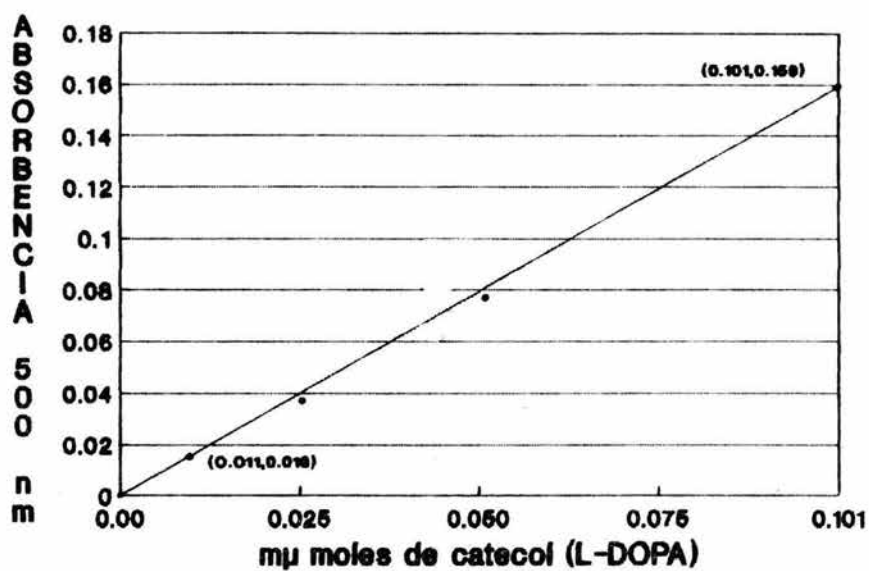


FIGURA 6. Curva patrón de la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

| Longitud de onda | Absorbencia | nm |
|------------------|-------------|----|
| 700 | 0.003 | |
| 690 | 0.004 | |
| 680 | 0.006 | |
| 670 | 0.007 | |
| 660 | 0.010 | |
| 650 | 0.014 | |
| 640 | 0.020 | |
| 630 | 0.029 | |
| 620 | 0.043 | |
| 610 | 0.062 | |
| 600 | 0.089 | |
| 590 | 0.127 | |
| 580 | 0.175 | |
| 570 | 0.240 | |
| 560 | 0.311 | |
| 550 | 0.400 | |
| 540 | 0.500 | |
| 530 | 0.586 | |
| 520 | 0.667 | |
| 510 | 0.718 | |
| 500 | 0.742 | |
| 490 | 0.739 | |
| 480 | 0.708 | |
| 470 | 0.655 | |
| 460 | 0.586 | |
| 450 | 0.522 | |
| 440 | 0.468 | |
| 430 | 0.445 | |
| 420 | 0.441 | |
| 410 | 0.458 | |
| 400 | 0.469 | |
| 390 | 0.459 | |
| 380 | 0.498 | |
| 375 | 1.020 | |

CUADRO 15. Análisis espectrofotométrico de L-DOPA.

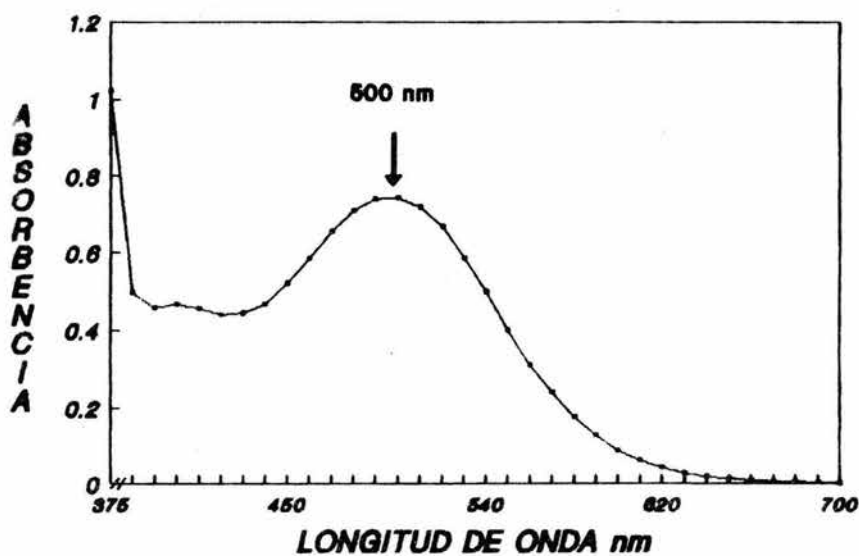


FIGURA 7. Espectro de absorción de la L-DOPA a diferentes longitudes de onda.

Seguida de los SMG de la cepa Cp Mex 19 teniendo ésta su máxima Producción de sideróforos a las 24:30 h con 0.107 μ moles por ml de muestra. Mientras que los SMG T₂ de las cepas Cp Mex 28 y Cp Mex 44 presentan una producción parecida siendo esta de 0.097 para la primera y 0.094 para la segunda. Cuando los SMG de las cepas no fitopatógenas crecidas en medio M fueron analizados -- por el método de detección de catecoles dieron resultados negativos o sea no se presentó ningún cambio de color al igual que en los SMG de la cepa Cp Mex 1, tanto en medio M como en M-Fe - la cual fue utilizada como control. Estos resultados se muestran gráficamente en la figura 8.

En el cuadro 17 se dan los valores de la producción de sideróforos tipo catecol en SMG, SMG 30x concentrados y SMG 30x concentrados eluidos de sílica gel, observándose una mayor producción en los SMG 30x concentrados correspondiendo la máxima producción a la cepa Cp Mex 46 con 2.72 μ moles por ml de muestra, mientras que la menor producción la presentó la Cp Mex 44 con 1.04. En segundo lugar en la producción de sideróforos se encuentran los SMG 30x concentrados eluidos de sílica gel; presentando la máxima producción la cepa Cp Mex 13 con 0.5 μ moles por ml de muestra mientras que las tres cepas restantes tienen una producción similar. Por último se encuentran los SMG; pre--

| Cepas | Muestra | Tiempo en (h) | SMG (500 μ l de muestra) 500 nm | | SMG μ l moles de catecol por ml de muestra. | |
|-----------|----------------|------------------|---|----------------|--|-------|
| | | | M | M-Fe | M | M-Fe |
| | | | Cp Mex 1 | T ₂ | 25:00 | 0.004 |
| Cp Mex 19 | T ₁ | 22:00 | 0.069 | 0.081 | 0.087 | 0.102 |
| | T ₂ | 24:30 | 0.069 | 0.085 | 0.087 | 0.107 |
| | T ₃ | 27:00 | 0.071 | 0.074 | 0.089 | 0.093 |
| Cp Mex 28 | T ₁ | 19:00 | 0.063 | 0.074 | 0.079 | 0.093 |
| | T ₂ | 21:00 | 0.066 | 0.077 | 0.083 | 0.097 |
| | T ₃ | 27:00 | 0.060 | 0.070 | 0.076 | 0.088 |
| Cp Mex 44 | T ₁ | 23:00 | 0.043 | 0.070 | 0.054 | 0.088 |
| | T ₂ | 25:40 | 0.048 | 0.075 | 0.060 | 0.094 |
| | T ₃ | 27:00 | 0.050 | 0.070 | 0.063 | 0.088 |
| Cp Mex 46 | T ₁ | 23:30 | 0.047 | 0.126 | 0.059 | 0.158 |
| | T ₂ | 26:40 | 0.047 | 0.132 | 0.059 | 0.166 |
| | T ₃ | 29:00 | 0.045 | 0.119 | 0.057 | 0.150 |

CUADRO 16. Determinación de la producción de sideróforos tipo catecol en muestras de SMG obtenidas en tres diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento de cepas de R. phaseoli por el método de Arrow.

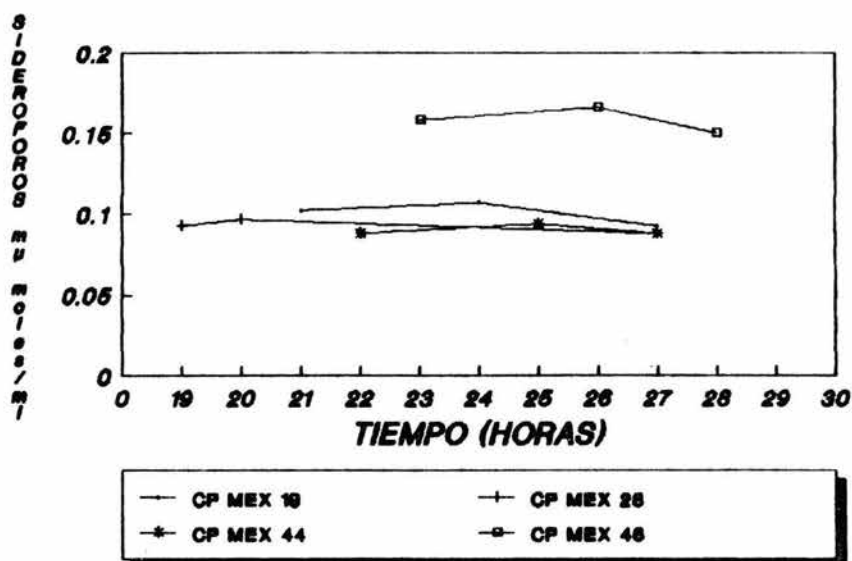


FIGURA 8. Determinación de la producción de sideróforos tipo catecol en μmole s por ml de muestra de SMG obtenidos a tres diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento de cuatro cepas de R. phaseoli en medio M-Fe.

| Cepas | Tiempo de incubación (h) | Absorbencia 660 nm | Determinación de catecoles (500 nm) en: | | | | Determinación de catecoles por ml de muestra determinados en: | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------|---|-----------|----------|----------------------|---|---------|---------|
| | | | SMG 320 nm | SMG 500ml | SMG 50ml | SMG 30x 30x ESG 50ml | SMG 30x | SMG 30x | SMG ESG |
| MEDIO M-Fe | | | | | | | | | |
| Cp Mex 1 | 25:00 | 0.610 | 0.061 | 0.004 | 0.008 | ----- | 0.005 | 0.1 | ----- |
| Cp Mex 19 | 24:30 | 0.780 | 0.950 | 0.085 | 0.106 | 0.040 | 0.108 | 1.34 | 0.5 |
| Cp Mex 28 | 21:00 | 0.760 | 0.210 | 0.077 | 0.121 | 0.037 | 0.098 | 1.52 | 0.46 |
| Cp Mex 44 | 25:40 | 0.740 | 0.770 | 0.075 | 0.083 | 0.032 | 0.094 | 1.04 | 0.47 |
| Cp Mex 46 | 26:40 | 0.680 | 1.490 | 0.125 | 0.215 | 0.038 | 0.158 | 2.72 | 0.48 |
| MEDIO M | | | | | | | | | |
| Cp Mex 1 | 25:00 | 0.750 | 0.003 | 0.004 | ----- | ----- | 0.005 | ----- | ----- |
| Cp Mex 19 | 24:30 | 0.780 | 0.540 | 0.069 | ----- | ----- | 0.086 | ----- | ----- |
| Cp Mex 28 | 21:00 | 0.750 | 0.550 | 0.066 | ----- | ----- | 0.084 | ----- | ----- |
| Cp Mex 44 | 25:40 | 0.720 | 0.490 | 0.048 | ----- | ----- | 0.060 | ----- | ----- |
| Cp Mex 46 | 26:40 | 0.740 | 0.330 | 0.047 | ----- | ----- | 0.058 | ----- | ----- |

----- No se determinaron

CUADRO 17. Determinación de la producción de sideróforos tipo catecol a un tiempo determinado en SMG en medio M y M-Fe.

sentando la máxima producción la Cp Mex 46 con 0.158 y la mínima producción la Cp Mex 44 con 0.094 μ moles por ml de muestra. Varios reportes señalan que la producción de sideróforos en E. coli K-12 es de 32 mg por litro de cultivo. Mientras que Agrobacterium tumefaciens mostró una producción de 6-9 mg de agrobactina por litro de cultivo. (Ong et al., 1979). En Rhizobium RA-1 la máxima producción de sideróforos fue a las 36 h con 6.2 mg por litro de cultivo filtrado. (Wodi et al., 1985) Esta es una evidencia más que los sideróforos producidos por R. phaseoli producen sideróforos tipo catecol y que su producción es dependiente del crecimiento de éste. Además de determinarse la producción de sideróforos se determinó la producción de pigmento a 320 nm en lo SGM; presentando la máxima producción la cepa Cp Mex 46 con 1.490, quedando comprobado una vez más que la producción de pigmento esta relacionada con la producción de sideróforos. (Peralta y Carrillo, 1988; Meyer y Abdallah, 1978).

En la cromatografía en capa fina en sílica gel del SGC 30x concentrado de las cepas Cp Mex 19, 28, 44 y 46 se obtuvieron los valores de Rf presentados por las manchas observadas bajo luz ultravioleta y revelados con $FeCl_3$ al 1%, estos valores se muestran en el cuadro 18 y la presentación esquemática se presenta

| Cepas | Luz ultravioleta | | Revelado con FeCl_3 1% | |
|-----------|------------------|----------------|---------------------------------|----------------|
| | Rf | color | Rf | color |
| Cp Mex 19 | 0.19 | anaranjado | 0.13 | blanco |
| | 0.23 | azul claro | 0.18 | pardo |
| | 0.47 | verde azulado | 0.35 | anaranjado |
| | 0.57 | amarillo | ++ 0.71 | pardo |
| | 0.61 | blanco | | |
| | ++ 0.69 | ladrillo | | |
| | 0.77 | rosa | | |
| Cp Mex 28 | 0.17 | anaranjado | 0.15 | blanco |
| | 0.21 | azul claro | 0.35 | anaranjado |
| | 0.41 | verde azulado | ++ 0.67 | pardo leve |
| | 0.60 | blanco | | |
| | ++ 0.69 | ladrillo leve | | |
| | 0.77 | rosa | | |
| Cp Mex 44 | 0.19 | anaranjado | 0.15 | blanco |
| | 0.23 | azul claro | 0.35 | anaranjado |
| | 0.43 | verde azulado | ++ 0.67 | pardo leve |
| | 0.62 | blanco | | |
| | ++ 0.70 | ladrillo leve | | |
| | 0.77 | rosa | | |
| Cp Mex 46 | 0.17 | amarillo limón | 0.13 | blanco |
| | 0.24 | azul intenso | 0.15 | pardo |
| | 0.35 | ladrillo | 0.35 | anaranjado |
| | 0.49 | blanco | ++ 0.66 | pardo |
| | ++ 0.69 | ladrillo | | |
| | 0.79 | rosa | | |
| Cp Mex 1 | 0.00 | ninguna mancha | 0.00 | ninguna mancha |

CUADRO 18. Valores de Rf y color de las manchas observadas en los cromatogramas bajo luz ultravioleta y revelados con FeCl_3 al 1% de los SMG 30x. Mancha eluida de silica gel ++.

en la figura 9. La mayoría de los complejos, son coloreados en presencia de cloruro férrico o perclorato férrico, siendo este un método para detectar la presencia de sideróforos.

Al comparar la resolución obtenida por ambos sistemas de revelado, se observa que hay manchas en común de acuerdo con sus valores de R_f . Las manchas color ladrillo y ladrillo leve observadas bajo luz ultravioleta aparecen en el cromatograma revelado con cloruro férrico al 1% pero presentando un color pardo. Estas manchas fueron eluidas de la sílica gel y fue determinada su actividad biológica. A estas fracciones obtenidas se les nombró SMG 30x eluidos de sílica gel.

En los bioensayos para determinar la actividad biológica de los SMG 30x concentrados eluidos de sílica gel se obtuvieron los resultados presentados en el cuadro 19, donde se puede observar que las cuatro cepas causaron promoción del crecimiento de E. coli RW 193, el mayor efecto fue ejercido por el SMG 30x eluido de sílica gel de la cepa Cp Mex 19 (100%), mientras que las fracciones de las cepas Cp Mex 28 y 44 presentan un índice de activación similar. La cepa Cp Mex 46 provocó inhibición.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

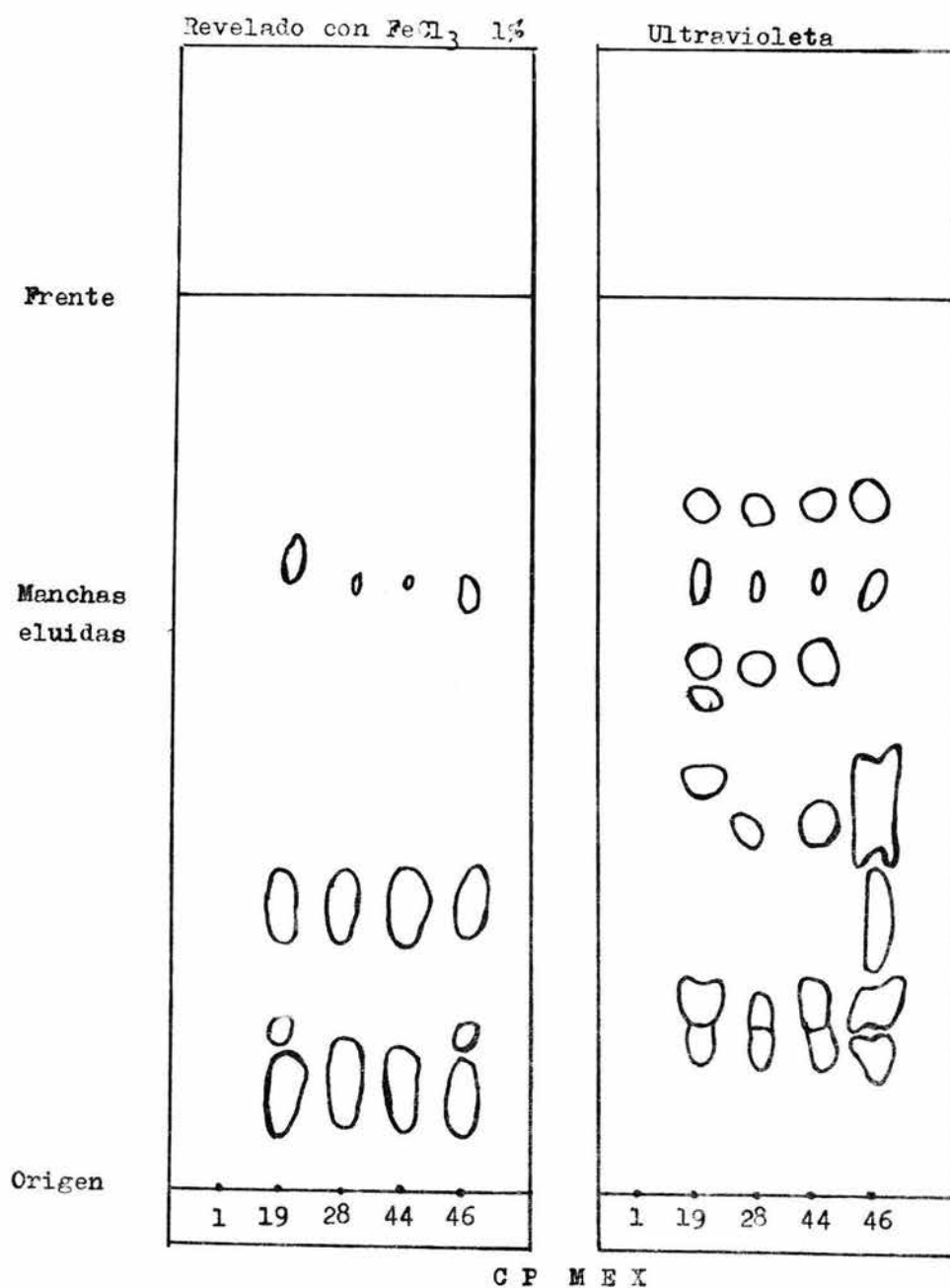


FIGURA 9. Representación esquemática de la caracterización en cromatografía en capa fina de sílica gel de los SMG 30x de las cepas Cp Mex 1, 19, 28, 44 y 46.

| SMG 30x con- centrados eluidos de - sílica gel de: | µ moles de catecol en 50 uL de - muestra | Area de creci-- miento (mm ²) | Area de activa- ción (mm ²) | Indice de ac- tive-- ción | Indice de activa-- ción (%) |
|--|---|--|--|------------------------------------|--------------------------------------|
| Cp Mex 19 | 0.040 | 280 | 836 | 2.99 | 100 |
| Cp Mex 28 | 0.037 | 280 | 729 | 2.60 | 86.96 |
| Cp Mex 44 | 0.039 | 280 | 719 | 2.57 | 85.95 |
| Cp Mex 46 ⁺⁺ | 0.038 | 280 | 665 | 2.30 | 76.92 |

++ Inhibición

CUADRO 19. Determinación del índice de activación causado por SMG 30x concentrado eluidos de sílica gel sobre el desarrollo de E. Coli RW 193 a las 20 h de incubación en medio M-Fe.

V. CONCLUSIONES

R. phaseoli produce sideróforos en medios carentes de hierro.

Los diferentes grados de inhibición o promoción del crecimiento sobre E. coli RW 193, P. solanacearum y X. campestris GBP 123 - además de depender de la cantidad de sideróforos producidos por R. phaseoli dependen de la gran especificidad de éstos compuestos sobre diferentes microorganismos.

Las pruebas de identificación química para determinar el grupo químico al que pertenecen los sideróforos de R. phaseoli fueron positivas, confirmandose que producen sideróforos tipo catecol.

El tiempo en el que se presentó la máxima producción de sideróforos fue de: 24:30 h para la cepa Cp Mex 19, 21:00 h Cp Mex 28, 25:40 h para Cp Mex 44 y 26:40 h para la cepa Cp Mex 46.

En la producción de sideróforos así como en su actividad biológica y caracterización química las cepas Cp Mex 28 y Cp Mex 44 -- son muy similares.

Por último, la mancha eluida del cromatograma de sílica gel presentó actividad biológica, indicando la presencia de sideróforos.

A P E N D I C E I

Todas las cantidades están dadas para preparar un litro de solución.

M E D I O M

SOLUCIONES:

| | |
|---|---------|
| a) Acido L-glutámico (100x) | 100.0 g |
| b) Manitol (100x) | 100.0 g |
| c) Fosfatos (100x) | |
| KH_2PO_4 | 30.0 g |
| Na_2HPO_4 | 30.0 g |
| d) Sulfato de magnesio (100x) | 10.0 g |
| e) Cloruro de calcio (100x) | 5.0 g |
| f) Elementos traza (100x) | |
| H_3BO_3 | 1.0 g |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.05 g |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.05 g |
| $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 g |
| g) Vitaminas (100x) | |
| Biotina | 0.1 g |
| Tiamina | 0.1 g |
| Pantotenato de calcio | 0.1 g |
| h) Cloruro férrico (100x) | 0.10 g |

PREPARACION:

| | |
|------------|-------|
| Solución a | 10 ml |
| Solución b | 10 ml |
| Solución c | 10 ml |
| Solución d | 10 ml |
| Solución e | 10 ml |
| Solución f | 10 ml |
| Solución g | 10 ml |
| Solución h | 10 ml |

M E D I O M - Fe**SOLUCIONES:**

Son las mismas que las del medio M, pero sin la solución h que se substituye por HCl 0.1 N en la misma concentración.

PREPARACION:

Se prepara de la misma manera que el medio M.

M E D I O M P A R A E. coli R W 1 9 3

SOLUCIONES:

Son las mismas que las del medio M, pero a demás lleva la solución de coctel.

*Coctel:

| | |
|-------------|-----------|
| Tiamina HCl | 0.0026 mg |
| Leucina | 0.01 mg |
| Prolina | 0.01 mg |
| Triptefano | 0.01 mg |

PREPARACION:

| | |
|----------------------|---------|
| Coctel | 20.0 ml |
| Extracto de levadura | 0.5 g |
| Caseína | 1.0 g |

Todas las soluciones del medio M

Se prepara de la misma manera que el medio M.

M E D I O M-Fe P A R A E. coli R W 1 9 3

SOLUCIONES:

Son las mismas que las del medio M para RW 193.

PREPARACION:

Se prepara de la misma manera que el medio M para RW 193.

* Las cantidades dadas para preparar el coctel son para 10 ml.

M E D I O Y G B

SOLUCIONES:

| | |
|--------------------------|----------|
| Sulfato de magnesio 1M | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246.48 g |
| Solución de sales (100x) | |
| K_2HPO_4 | 50.0 g |
| NaCl | 10.0 g |
| Glúcosa 20% | 200.0 g |

PREPARACION:

| | |
|-------------------------|---------|
| Extracto de levadura | 1.0 g |
| Sulfato de magnesio 1 M | 0.8 ml |
| Solución de sales | 10.0 ml |
| Solución de glúcosa | 20.0 ml |

M E D I O Y M B

SOLUCIONES:

| | |
|--------------------------|----------|
| Sulfato de magnesio 1 M | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246.48 g |
| Solución de sales (100x) | |
| K_2HPO_4 | 50.0 g |
| NaCl | 10.0 g |

PREPARACION:

| | |
|-------------------------|---------|
| Manitol | 40.0 g |
| Extracto de levadura | 1.0 g |
| Sulfato de magnesio 1 M | 0.8 ml |
| Solución de sales | 10.0 ml |

M E D I O B D E K I N G

PREPARACION:

| | |
|------------|--------|
| Glicerol | 10 ml |
| Caseína | 15.0 g |
| K_2HPO_4 | 1.5 g |

M E D I O L

PREPARACION:

| | |
|----------------------|--------|
| Caseína | 10.0 g |
| Extracto de levadura | 5.0 g |
| NaCl | 10.0 g |

B I B L I O G R A F I A

- Agrios, G. 1986. *Fitopatología*. Ed. Limusa, México. 756 p.
- Aluja, M. S. 1984. *Manejo integrado de las moscas de la fruta*. Programa Mosca del Mediterraneo. SARH. D.G.S.V.
- Arnou, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3-4-Dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixture. *J. Biol. Chem.* 118: 531-537.
- Asimov, I. 1985. *Introducción a la Ciencia II*. Trad. por Jorge de Orus y Manuel Vázquez. Plaza y Janés, Muy Interesante, Barcelona. pp. 431-839.
- Barberá, C. 1976. *Pesticidas agrícolas*. Ed. Omega. Era. Ediciones, Barcelona. 541 p.
- Bezkorovainy, A. 1980. *Biochemistry of nonheme iron: in biochemistry of the elements*. Vol. 1. Plenum Press, New York. 435 p.
- Cody, Y. S., y Gross. 1987. Outer membrane protein mediates iron uptake via pyoverdinin pss. the fluorescent siderophore produced by Pseudomonas syringae pv. syringae. *J. Bacteriol.* 169: 2207-2214.

- Coronado, R. 1965. Breve historia del uso de enemigos naturales para el combate de plagas agrícolas en México. Fitofitología 18: 5-9.
- Debach, P. 1977. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Ed. Continental, México. 949 p.
- De Bauer, de la I. 1987. Fitopatología. Colegio de Postgraduados, México. pp. 84-86.
- Emery, T. 1965. Isolation, characterization and properties of fusarinine A -hydroxamic acid derivative of ornithine. Biochem. 4(7): 1410-1417.
- _____. 1976. Fungal ornithine esterases: relationship to iron transport. Biochem. 15(31): 2723-2728.
- _____. 1977. The storage and transport of iron. In H. Sigel (Ed.) Metal ions in biological systems, iron in model and natural compounds. Marcel Dekker, Inc., N. York. 7: 77-125.
- Fisher, R. A., y Rosner, L. 1959. Toxicology of the microbial insecticide, Thuringia. J. Agric. Ed. Chem. 7: 686-688.
- Frederick, C. B., P. J. Szanislo, P. E. Nickery, M. D. Bentkey, y Shive. 1981. Produccion and isolation of sideropho-

res from the soil fungus Epicoccum purpurascens.
Biochem. 20: 2432-2436.

_____, M. D. Bentley, y V. Shiva. 1981a. Structure
of triornicin, a new siderophore. Biochem. 20: 2436-
2438.

Gibson, F. y D. I. Magrath. 1969. The isolation and characteri-
zation of hydroxamic acid (aerobactin) formed by Aero-
bacter aerogenes. 62-I. Biochim. Biophys Acta. 192:
175-184.

Gorringe, A. R., G. Woods, y A. Robinson. 1990. Growth and side
ronphore production by Bordetella pertussis under -
iron-restricted conditions. FEMS Microbiol. Lett. 66:
191-196.

Haller, H. D., y Finn, R. K. 1979. Biodegradation of 3- chloro-
benzoate and formation of black colour in the presen-
ce and absence of benzoate. Eur. J. Appl. Microbiol.
Biotech. 8: 191-205.

Hannay, C. L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore -
forming bacteria. Nature 172: 1004, 1953.

- Harwood, C. E., y Crnston, L. M. 1984. Tol plasmid can prevent induction of chemotactic responses to aromatic acids. *J. Bacteriol.* 160: 797-800.
- Hohnader, D., D. Fass., y J. H. Meyer. 1986. Mapping of mutations affecting pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 195-199.
- Kloepper, J. W., M. N. Schroth, y T. D. Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 7: 1076-1082.
- Krywienczyk, J., y P. Mithy. 1974. Serological relationship between three varieties of *Bacillus pabilliae*. *J. Inv. Pathology.* 23: 275-279.
- Leong, S. A. y J. B. Neilands. 1981. Relationship of siderophore-mediated iron assimilation to virulence in - grown gall disease. *J. Bacteriol.* 147(2): 482-491.
- Marschner, H., V. Romheld., y M. Kissel. 1986. Different - strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant. Nutr.* 9: 695-713.
- Marugg, J. D., M. Spanje, W. P. M. Haekstra, E. Shippers y P.J. Weisbeek. 1985. Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant- growth stimulating *Pseudomonas putida* WCS 350. *J. Bacteriol.* 164: 563-570.
- -

- _____, L. A. de Weger, H. D. Nielanden, M. Oorthuizen, Recourt, B. Lugtenberg, G. A. J. M. Vander Horsttal, y P. J. Wisbeek. 1989. Cloning and characterization of a gene encoding an outer membrane protein required for siderophore-mediated uptake of Fe^{3+} in *Pseudomonas putida* WGB 358. *J. Bacteriol.* 171: 2819-2826.
- Messeger, P. S. 1976. *Theory and practice of biological control.* Academic Press, New York. 75 p.
- Meyer, J. M. y A. Abdallah. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- _____. 1980. The siderochromes of nonfluorescent *Pseudomonas*: Production of nocardamine by *Pseudomonas stutzeri*. *J. Gen. Microbiol.* 118: 125-129.
- Miller, G. W. y J. C. Pushnick, J. C. Brown, T. E. Emery, V. D. Jolley, y K. Y. Warnick, 1985. Uptake and translocation. *Plant. Nut.* 8(3): 249-264.
- Woody, M.D. 1986. Microorganisms and iron limitation. *Bioscience* 36: 618-623.
- Moore, R. E. y Emery. 1976. α -Acetilfusarinines: isolation, characterization and properties. *Biochem.* 15(13): 2719-2723.

- Moore, J. C., M. Magazin, G. S. Ditta., y J. Leong. 1984. Cloning of genes involved in the biosynthesis of Pseudobactin, a high-affinity iron transport agent of a plant growth promoting Pseudomonas strain. *J. Bacteriol.* 157: 53-58.
- Mori, S. N., K.M. Nishizawa, S. Kawai, Y. Sato., y S. Takagi. 1987. Dynamic state of mugineic acid and analogous - phytosiderophores in Fe-deficient barley. *J. Plant Nutr.* 10: 1003-1011.
- Mullis, K. B., J. R. Pollack., y J. B. Neilands. 1971. Structure of schizokinen, an iron-transport compound from Bacillus megaterium. *Biochem.* 10(26): 48-94.
- Murphy, T. P., D. R. S. Lean ., y Nalewajko. 1976. Blue-green algae: their excretion of iron selective chelators enables them to dominate other algae. *Science* 192: 900- 902.
- Neilands, J. B. 1952. A crystalline organo-iron pigment from -- rust fungus (Ustilago sphaerogenena). *J. Am. Chem. Soc.* 74: 4846-4847.
- _____. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 718-731.

- _____. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 285-309.
- _____., y S. A. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Physiol.* 37: 187-208.
- Nishizawa, N. K., S. Mori, S. Takahashi, y Ueda. 1989. Mucineic acid secretion by cultured barley cells derived from anther. *Protoplasma* 148: 164-166.
- Ong, S. A., T. Peterson, y J. B. Neilands. 1979. Agrobactin a siderophore from Agrobacterium tumefaciens. *J. Biol. Chem.* 254(6): 1860-1865.
- Peralta, J. R. y G. Carrillo C. 1988. El fenómeno de interferencia en Rhizobium phaseoli (Dangeard). *Agrociencia* 74: 193-202.
- _____. 1988a. Efecto de los sideróforos de Rhizobium phaseoli en el desarrollo de enfermedades foliares de Phaseolus vulgaris L. *Agrociencia*
- Powell, P. E., G. R. Cline, C. P. P. Reid., y P. J. Szaniszlo. 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* 287: 833-234.

- Reeves, M., L. Pine, J. B. Neilands, A. Ballows. 1983. Absence of siderophore activity in Legionella sp. agrown in iron deficient media. J. Bacteriol. 154: 324-329.
- Restrepo, I. 1988. Naturaleza muerta. Los plaguicidas en México. 36. Andrómeda, S. A., México. 236 p.
- Rishbeth, J. 1963. Stump protection against Fomes annosus. III. Inoculation with Peniophora gigantea. Ann. Apple. Biol. 52: 63-67.
- Shelley, M. Payne. Comunicación personal.
- Smith, M. J., J. N. Shoolery, B. Schwyn, I. Holden, y J. B. Neilands. 1985. Rhizobactin, a structurally novel siderophore from Rhizobium meliloti. J. Am. Chem. Soc. 107(6): 1739-1743.
- Stoker, S. H. y S. L. Seager. 1981. Química ambiental. Contaminación del aire y del agua. Ed. Blume, Barcelona. 313 p.
- Teintze, M., M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong, y D. Van der Helm. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting Pseudomonas. Biochem. 20: 6446-6457.

- _____, and J. Leong. 1981a. Structure of pseudobactin A a second siderophore from plant growth promoting Pseudomonas B10. Biochem. 20: 6457-6462.
- Vincent, J. M. 1970. Manual práctico de rizobiología. Traducido por Carlos Bathyany. Ed. Hemisferio Sur, Argentina. 200 p.
- Walker, C. J. 1973. Patología Vegetal. Trad. por Aspeitia, A. A. Ed. Omega, Barcelona. 818 p.
- Weger, L. A., R. Van Bostel., B. Van der Burg., R. A. Gruters., R. P. Geels., B. Schippers, y B. Lugtenberg. 1986. Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing Pseudomonas spp. J. Bacteriol. 165: 585-594.
- Wendenbaum, S., P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer, y M. A. Abdallah. 1983. The structure of pyoverdine P₈, the siderophore of Pseudomonas aeruginosa. Tetrahedron Letters, 24(24): 4877-4880.
- Yanchinski, S. 1985. Plant engineered to kill insects. New Scientist. pp 25.
- Yeusten, A., Rogoff, M. H. 1969. Metabolism of Bacillus thuringiensis in relation to spore and crystal formation. J. Bacteriol. 100: 1229-1236.