



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**CONTROL BIOLÓGICO ENTRE MICROORGANISMOS
MEDIADO POR SIDEROFOROS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L Ó G O

P R E S E N T A :

IRMA CONCEPCION CASTELAN SANCHEZ



MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó 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: Oliva Sánchez y Victor Castelán; por la confianza y fe que siempre han tenido en mí, además de por su amor y sacrificio.

A mis hermanos: Silvia, Alejandro, Oliva, Leti, Victor, Fernando y Alicia; por su cariño.

Y a todos mis amigos, por su amistad.

RECONOCIMIENTOS

Agradezco:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el otorgamiento de la beca-tesis.

A los Centros de Genética y Fitopatología del Colegio de Postgraduados (C.P.) de Montecillos, por haberme proporcionado el espacio físico y el material, tanto de laboratorio como biológico, para la realización del trabajo; así como al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de Cali Colombia, por haber proporcionado parte del material biológico.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la que debo mi formación académica.

Al Dr. Guillermo Carrillo por su dirección y asesoría en el presente trabajo.

Al M. en C. Isaac Luna y al Dr. Leopoldo Fucikovsky, por su asesoría y orientación en la identificación de los aislamientos.

A los biólogos Agustín Ruiz, Jesús Medina, Jaime Angeles y al M. en C. Victor Rivera, por la revisión del trabajo y las

observaciones hechas al mismo.

A Rosario Vázquez, por la ayuda y apoyo que me prestó a lo largo de todo el trabajo.

Y a todos los que, en una u otra forma, contribuyeron a que este trabajo se llevara a cabo ;Gracias mil;.

CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria.....	ii
Reconocimientos.....	iii
Lista de abreviaturas.....	vii
Indice de cuadros y figuras.....	x
Resumen.....	xiii
I. Introducción.....	1
1.1 Control de enfermedades en plantas.....	5
1.2 Compuestos orgánicos relacionados con la asimila-- ción y transporte del hierro.....	11
1.2.1 Sideróforos moléculas microbianas que intervie-- nen en la asimilación del hierro.....	14
Objetivos.....	20
II. Materiales y métodos.....	22
2.1 Reactivos.....	22
2.2 Material biológico.....	22
2.3 Medios de cultivo.....	23
2.4 Métodos.....	24
2.4.1 Pruebas para la determinación de sideróforos y establecimiento de grupos antagónicos.....	25
2.4.1.1 Prueba para evaluar la capacidad del micro-- organismo de asimilar hierro en medios con deficiencia de este elemento.....	25
2.4.1.2 Obtención de sobrenadante gastado (SG).....	27
2.4.1.3 Preparación del inóculo de las cepas fitopa-- tógenas.....	27

	Pág.
2.4.1.4 Prueba para la determinación de la inhibición de microorganismos.....	28
2.4.1.5 Prueba para determinar la reversión de la inhibición.....	29
2.4.1.6 Prueba para determinar efecto bacteriostático o bactericida del SG.....	29
2.4.1.7 Curvas de crecimiento.....	32
2.4.1.8 Análisis espectrofotométrico.....	32
2.4.2 Pruebas para la identificación de los aislamientos.....	34
III. Resultados.....	35
3.1 Capacidad del microorganismo para asimilar hierro en medios con cantidades limitantes de este elemento.....	35
3.2 Prueba microbiológica para establecer grupos antagónicos.....	37
3.3 Prueba de reversión de la inhibición.....	38
3.4 Prueba para definir el efecto bacteriostático o bactericida del SG.....	40
3.5 Cinéticas de crecimiento.....	42
3.6 Análisis espectrofotométrico del SG.....	43
3.7 Identificación de los aislamientos.....	47
IV. Discusión de Resultados.....	52
V. Conclusiones.....	57
Apéndice I.....	58
Apéndice II.....	66
Bibliografía.....	70

ABREVIATURAS

A3 = aislamiento 3

A4 = aislamiento 4

A5 = aislamiento 5

A6 = aislamiento 6

A7 = aislamiento 7

A8 = aislamiento 8

A9 = aislamiento 9

A10 = aislamiento 10

ALM = medio de agar levadura manitol

ALM Kn = medio ALM con kanamicina

ALM Nal = medio ALM con ácido nalidíxico

ALM Tc = medio ALM con tetraciclina

b = ordenada al origen

BK = medio B de King

CBP-123 = X. phaseoli cepa CBP-123

CBP-140 = X. phaseoli cepa CBP-140

CBP-147 = X. phaseoli cepa CBP-147

CLM = medio de caldo levadura manitol

C.P.Mex 3 = R. phaseoli cepa C.P.Mex 3

C.P.Mex 7 = R. phaseoli cepa C.P.Mex 7

C.P.Mex 46 = R. phaseoli cepa C.P.Mex 46

EDC = medio extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio

HL = medio de Hugh y Leifson

m = pendiente

M̄ = medio mínimo

M-Fe = medio M sin cloruro férrico

M-FeA = sobrenadante gastado autoclaveado, proveniente del
medio M-Fe

M+3Fe = medio M con el triple de la concentración de cloruro
férrico

MG = medio M con glucosa

MG-Fe = medio MG sin cloruro férrico

MG+3Fe = medio MG con el triple de la concentración de cloru-
ro férrico

SG = sobrenadante de medio gastado

SG₃^M = medio M con SG de C.P.Mex 3

SG₃^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de C.P.Mex 3

SG₃^{M+3Fe} = medio M+3Fe con SG de C.P.Mex 3

SG₇^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de C.P.Mex 7

SG₄₆^M = medio M con SG de C.P.Mex 46

SG₄₆^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de C.P.Mex 46

SG₄₆^{M+3Fe} = medio M+3Fe con SG de C.P.Mex 46

SG_{7SRI}^M = medio M con SG de 7SRI

SG_{7SRI}^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de 7SRI

SG_{7SRI}^{M+3Fe} = medio M+3Fe con SG de 7SRI

SG_{A3}^M = medio M con SG de A3

SG_{A3}^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de A3

SG_{A3}^{M+3Fe} = medio M+3Fe con SG de A3

SG_{A4}^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de A4

SG_{A5}^M = medio M con SG de A5

SG_{A5}^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de A5

SG_{A5}^{M+3Fe} = medio M+3Fe con SG de A5

SG_{A7}^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de A7

SG_{A9}^M = medio M con SG de A9

SG_{A9}^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de A9

SG_{A9}^{M+3Fe} = medio M+3Fe con SG de A9

SG_{A10}^M = medio M con SG de A10

SG_{A10}^{M-Fe} = medio M-Fe con SG de A10

SG_{A10}^{M+3Fe} = medio M+3Fe con SG de A10

S = desviación estándar

\bar{X} = media

7SRI = P. fluorescens cepa 7SRI

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<u>CUADROS:</u>	Pág.
1.- Crecimiento alcanzado por los microorganismos, a las 72 h de incubación, en los medios M y M-Fe....	36
2.- Lista de microorganismos seleccionados y por ciento de desarrollo que alcanzaron en el medio M-Fe.	37
3.- Efecto inhibitorio causado a <u>A. tumefaciens</u> , <u>C. fascians</u> y <u>P. syringae</u> , por la presencia de SG en el medio M-Fe.....	39
4.- Pares de microorganismos antagónicos.....	40
5.- Comparación del efecto inhibitorio en los medios SG _x M-Fe, SG _x M y SG _x M+3Fe.....	41
6.- Determinación del efecto del SG de A3 y A5 sobre el desarrollo de <u>A. tumefaciens</u> (absorbencia)....	42
7.- Determinación del efecto del SG de A3 y A5 sobre el desarrollo de <u>A. tumefaciens</u> (células por ml)..	42
8.- Resultados de las pruebas para identificar los aislamientos.....	50
<u>FIGURAS:</u>	
1.- Prueba para evaluar la capacidad del microorganismo de asimilar hierro.....	26
2.- Obtención de SG.....	27
3.- Preparación del inóculo de las cepas fitopatógenas	28
4.- Prueba para determinar inhibición.....	29
5.- Prueba para determinar reversión en la inhibición.	30
6.- Prueba para descartar efecto bactericida del SG...	31

<u>FIGURAS:</u>	Pág.
7.- Curvas de crecimiento (metodología).....	33
8.- Fase exponencial de las cinéticas de crecimiento de las cepas C.P.Mex 46, 7SRI y A3, en los medios M, M-Fe, MG y MG-Fe.....	44
9.- Fase exponencial de las cinéticas de crecimiento de las cepas A5, A9 y A10, en los medios M, M-Fe, MG y MG-Fe.....	45
10.- Fase exponencial de las cinéticas de crecimiento de las cepas <u>A. tumefaciens</u> , <u>C. fascians</u> y <u>P. syringae</u> , en los medios M y M-Fe.....	46
11.- Curvas espectrofotométricas de los SG de las cepas C.P.Mex 46, 7SRI y A3.....	48
12.- Curvas espectrofotométricas de los SG de las cepas A5, A9 y A10.....	49

Nadie enciende una lámpara y la
pone en un rincón, ni bajo el celemín,
sino sobre un candelero, para que los
que entren tengan luz.

San Lucas 11, 33.

RESUMEN

Los sideróforos son moléculas microbianas que presentan una alta afinidad por el ion férrico (Fe^{+++}), tienen bajo peso molecular y se sintetizan cuando en el medio existen cantidades limitantes de hierro (Bezkorovainy, 1980; y Neilands, 1982). Estas moléculas forman quelatos con el ion férrico, haciéndolo soluble y asimilable al microorganismo. Ahora bien, se ha reportado que el desarrollo de algunos microorganismos se ve reducido o inhibido por la presencia de sideróforos de otras cepas en el medio (Reeves et al, 1983); también se ha observado que la producción en cultivos como la papa y el rábano, se incrementa al estar presentes, en el rizoplasma, cepas de Pseudomonas fluorescentes o su sideróforo (la pseudobactina), ya que se inhibe el crecimiento de los otros microorganismos, incluyendo los fitopatógenos específicos de dichos cultivos (Kloepper et al, 1980a y 1980b).

Considerando lo importante que sería implementar este tipo de control biológico, mediado por sideróforos, en la agricultura, los objetivos del trabajo fueron: 1.- Incrementar la evidencia experimental de este fenómeno de inhibición; 2.- Establecer condiciones experimentales económicas y adecuadas para seleccionar microorganismos capaces de inhibir a otros en medios deficientes en hierro, simplificando la metodología; y 3.- Analizar las características generales del mecanismo de inhibición.

Para este trabajo se emplearon originalmente veinticuatro cepas de microorganismos, de las cuales doce eran fitopatógenas. Después de las pruebas de selección y establecimien-

to de pares antagónicos, sólo se siguió trabajando con diez cepas: A. tumefaciens, C. fascians, P. syringae, R. phaseoli cepas C.P.Mex 3 y C.P.Mex 46; P. fluorescens 7SRI; y los aislamientos A3, A5, A9 y A10; las tres primeras son microorganismos fitopatógenos.

Dentro de los resultados se encontraron, para algunos casos, valores de inhibición arriba del 90%. Y en once, de las quince parejas de organismos antagónicos, parece ser que la inhibición es causada por sideróforos, ya que ésta disminuye cuando se agrega al medio $FeCl_3$.

I. INTRODUCCION

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), ha estimado que dos tercios de la población mundial está subalimentada, por lo que es importante aumentar la producción agrícola. Para lograr aumentos en la producción existen dos vías: a) mediante prácticas agrícolas óptimas, como son el uso adecuado de los fertilizantes, la selección de semillas mejoradas, buen riego, etc.; y b) mediante la lucha contra las plagas y enfermedades (Primo y Carrasco, 1981). La diferencia entre las plagas y enfermedades consiste en que las primeras son causadas por parásitos macroscópicos; mientras que las segundas por parásitos microscópicos, o bien, pueden tener un origen no parasitario causado por condiciones desfavorables del medio (Messiaen y Lafon, 1968).

Aunque en 1807, Prévost ya había demostrado que el carbón apestoso era ocasionado por un hongo, sus descubrimientos fueron rechazados por sus contemporáneos, y la acción patógena de los hongos fue reconocida hasta 1847, cuando los trabajos de los hermanos Tulasne demostraron que los hongos del carbón y de las royas eran parásitos (confirmando las observaciones de Prévost). Mientras que las bacterias fueron consideradas patógenos en 1878, al ser estudiada la mancha del fuego por Burril (Agrios, 1985; Coronado, 1965b; y Walker, 1973).

Los géneros bacterianos más importantes en México desde el punto de vista fitopatológico son: Erwinia, Pseudomonas,

Xanthomonas, Agrobacterium y Corynebacterium, respectivamente (García, 1967; y Jaimes, 1977); y las enfermedades más comunes que producen en las plantas son: manchas y tizones, marchitamientos vasculares, pudriciones blandas, agallas y cánceres (Agrios, 1985).

Tizones y manchas bacterianas más frecuentes:

Erwinia

Tizón de fuego (E. amylovora) en el manzano (Pyrus malus), el membrillo (Cydonia oblonga) y el peral (Pyrus communis).

Pseudomonas

Mancha angular de la hoja (P. sesami) en el ajonjolí (Sesamum indicum); el tizón de halo (P. coronafaciens) en la avena (Avena sativa); la mancha angular de la hoja (P. lachrymans) en la calabaza (Cucurbita sp.); el tizón bacteriano (P. pisi) del chícharo (Pisum sativum); el tizón de halo (P. phaseolicola) en el frijol (Phaseolus sp.); y el tizón bacteriano (P. glycinea) de la soya (Glycine sp.)

Xanthomonas

Mancha angular de la hoja (X. malvacearum) en el algodónero (Gossypium hirsutum); la mancha bacteriana (Xanthomonas sp.) del arroz (Oryza sativa); la raya roja (X. rubrilineans) de la caña de azúcar (Saccharum officinarum); la mancha bacteriana (X. pruni) del ciruelo (Prunus domestica) y del duraznero (Prunus persica); la mancha bacteriana de hojas y frutos (X. vesicatoria) en el chile (Caapsicum annum) y jitomate (Lycopersicon esculentum); la mancha angular de la hoja (X. fragariae) en la fresa (Fragaria sp.); el tizón común (X. phaseoli) del frijol (Phaseolus sp.); el tizón bacteriano (X. gummisudans)

de la gladiola (Gladiolus sp.); el tizón bacteriano (X. stewartii) del maíz (Zea mays); el tizón bacteriano (Xanthomonas sp.) del sorgo (Sorghum vulgare); y la espiga negra (X. translucens) del trigo (Triticum sp.).

Marchitamientos vasculares bacterianos más importantes:

Erwinia

Marchitez o pudrición del tallo (E. stewartii) del maíz (Z. mays); y la marchitez bacteriana (E. tracheiphila) de la calabaza (Cucurbita sp.).

Pseudomonas

Marchitez bacteriana (P. solanacearum) en el ajonjolí (S. indicum), marchitez o pudrición suave en el camote (Ipomoea batatas), la vaquita de la papa (Solanum tuberosum), la enfermedad Moko del plátano (Musa sp.) y la marchitez bacteriana del tabaco (Nicotiana tabacum).

Corynebacterium

Marchitez bacteriana (C. insidiosum) de la alfalfa (Medicago sativa); y la pudrición anular (C. sepedonicum) de la papa (S. tuberosum).

Pudriciones blandas bacterianas más comunes:

Erwinia

Pudrición suave (Erwinia sp.) en el aguacatero (Persea americana), el alcatraz (Zantedeschia aethiopica), el henequén (Agave sisalana) y el maguey manso (Agave atrovirens); la pudrición suave (E. carotovora) en el ajo (Allium sativum), el apio (Apium graveolens), la calabaza (Cucurbita sp.), el camote (I. batatas), la cebolla (Allium cepa) y el jitomate (L. esculentum); la pudrición blanda (E. atroseptica) del girasol

(Helianthus annuus) y de la papa (S. tuberosum); y la pudrición morena del fruto (E. ananas) en la piña (Ananas comosus).

Pseudomonas

Pudrición bacteriana (P. alliicola) de la cebolla (A. cepa); y pudrición blanda del tallo (Pseudomonas sp.) en el margaritón (Carysanthemum maximum).

Ejemplos de agallas bacterianas:

Pseudomonas

Enfermedad del nudo (P. savastanoi) en el olivo (Olea europea).

Agrobacterium

Agalla de la corona (A. tumefaciens) en la alfalfa (M. sativa), el ciruelo (P. domestica), el chabacano (Prunus armeniaca), el duraznero (P. persica), el frijol (Phaseolus sp.), el manzano (P. malus), el membrillo (C. oblonga), el olivo (O. europea), el peral (P. communis) y el rosal (Rosa sp.); y la agalla del tallo (A. rubi) en la zarzamora (Rubus sp.)

Corynebacterium

Fasciación bacteriana (C. fascians) del margaritón (Chrysanthemum maximum).

Cánceres bacterianos más importantes:

Pseudomonas

Cáncer de yemas y ramas (P. syringae) en el peral (Pyrus communis).

Xanthomonas

Cáncer (X. pruni) del duraznero (P. persica); y cáncer bacteriano (X. citri) del naranjo dulce (Citrus aurantiacum).

Corynebacterium

Cáncer bacteriano del fruto (C. michiganense) en el jitomate (L. esculentum).

1.1. Control de Enfermedades en Plantas

Existen varias formas o tipos de control, los cuales van a depender tanto de la clase de cultivo, como de la naturaleza de la enfermedad; sin embargo, se pueden clasificar en dos tipos: los preventivos y los curativos y/o de erradicación. En el caso de los hongos, dentro del tipo de los preventivos, se encuentran: la resistencia genética o inducida; la protección por medios químicos; y la legislación para el establecimiento de cuarentenas, medidas regulatorias y servicios de inspección sanitaria. Los curativos y/o de erradicación son: eliminación de los hospederos alternantes; erradicación química o por rotación de cultivos; y curación química. Los que han tenido mayor éxito son, en los preventivos, las variedades resistentes; y en los curativos, los fungicidas (Coronado, 1965b).

Con lo que respecta a las enfermedades producidas por bacterias, existen también varios métodos, entre los preventivos se encuentran: el uso de semilla certificada o tratada con sustancias químicas desinfectantes del tipo del bicloruro de mercurio, formalina, óxido de zinc, etc.; la desinfección de las yemas para injertos, las cuales deben ser de árboles aparentemente sanos, así como la desinfección de los instrumentos o herramientas a utilizar; la destrucción de insectos

tos transmisores; y también el uso de variedades resistentes. Cuando se trata de invernaderos, semilleros o viveros, es recomendable la esterilización del suelo, ya sea por calor o por la aplicación de compuestos químicos. Dentro de los métodos de tipo curativo y/o de erradicación tenemos: la rotación de cultivos; la quema de residuos de cosechas; la aplicación de compuestos químicos y antibióticos, como la estreptomicina y tetraciclina (Agrios, 1985; y Coronado, 1965b).

Control químico. Los plaguicidas son sustancias que sirven para combatir los parásitos de los cultivos, del ganado, de los animales domésticos y del hombre; y se dividen en: rodenticidas, nematocidas, insecticidas, atrayentes, repelentes, acaricidas, herbicidas, fungicidas y antibióticos (Primo y Carrasco, 1977).

El uso y el tipo de compuestos químicos han ido evolucionando a través del tiempo; hasta 1867, los compuestos químicos que se usaron fueron: el azufre, la rotenona y los aceites. A partir de 1868 y hasta aproximadamente 1940, se agregaron a los antes mencionados el verde de París, arseniato de plomo, ácido cianhídrico, paradiclorobenceno, púrpura de Londres, arsénico blanco, arseniato de calcio, cloratos de sodio y calcio, criolita, estricnina, etc.; además se utilizaron insecticidas de origen vegetal como el eléboro, la nicotina o el sulfato de nicotina activo, la piretrina y la causa. La aplicación y descubrimiento de estos productos se debió a que algunas plagas estaban causando estragos en la producción agrícola, entre ellas la catarinita de la papa (Leptinotarsa

decerlineata), que en 1958 se extendió del Colorado al Este de los Estados Unidos (Coronado, 1965b; y National Academy of Sciences, 1978). Desde 1940 y hasta la fecha, los nuevos plaguicidas descubiertos han causado una revolución en el control de las plagas, ya que nunca antes habían sido tan potentes, este período empezó con el DDT, al cual le siguieron otros del mismo tipo, que por derivarse de combinaciones de hidrógeno, carbono y cloro se les conoce como hidrocarburos clorados; por otra parte, en la década de 1941 a 1950, también fueron muy usados los dinitrocompuestos, como ejemplo tenemos al efusan 34-36. Otro tipo de compuestos orgánicos sintéticos derivados del fósforo, llamados en general organofosfatos o fosforados, se empezaron a utilizar después de la Segunda Guerra Mundial, entre ellos tenemos al paratión. Los compuestos químicos usados en el último período contra las plagas son: bromuro de metilo, dicloruro de etilo, tetracloruro de etano, etc. (Coronado, 1981).

Control biológico. En la naturaleza existe un equilibrio, resultado de miles de años de evolución, en el cual unas especies se alimentan de otras o las afectan de una u otra forma, el hombre ha utilizado esto para destruir o controlar a las poblaciones de las especies que dañan sus intereses. Las noticias más antiguas de este tipo de control se remontan hasta los años de 900 a 1200 A.C., con el uso de hormigas para destruir tanto las plagas de los cítricos, como a otras hormigas que atacaban los árboles. A este tipo de control, por medio de enemigos naturales de las especies perjudiciales, se le

llama "Control Biológico", "Combate Biológico" o "Biocontrol" (Coronado, 1965a). A pesar de ser tan antiguo este control, no cobra verdadera importancia hasta el año de 1892, cuando la escama algodonosa Icerya purchasi se convirtió en California, E.U.A., en un serio problema al presentar resistencia a todos los insecticidas; fue entonces cuando la catarina Vedalia cardinalis se utilizó, acabando prácticamente con la escama algodonosa (Coronado, 1965a).

En México este tipo de control se inició en el año de 1900, al fundarse la "Comisión de Parasitología Agrícola". Esta comisión hizo algunos estudios, como por ejemplo el de los hongos entomófagos y el de la hormiga Formica fusca perpillosa, predadora del picudo del algodonero (Coronado, 1965a).

El control biológico ha tenido éxito contra el piojo hariniso de los cítricos, la escama roja de California, la mosca prieta de los cítricos, el pulgón manchado de la alfalfa, la escama púrpura, etc. Actualmente se cuenta con 17 centros de Reproducción Masiva de Insectos Benéficos (Coronado, 1981).

Con respecto al control biológico de enfermedades, este ha sido más reciente y consiste básicamente en la reducción de la densidad del inóculo o actividad del patógeno, en su estado activo o de latencia, por uno o más organismos acompañantes, ya sea por manipulación a través del medio, del hospedero o del antagonista; o por la introducción en masa de uno o más antagonistas (Burges, 1981). Existen varias formas de este tipo de control, dependiendo de si se trata de patógenos de las raíces o aéreos. En el primer caso los métodos que se usan son los siguientes: a) preparación de semillas; b) pre--

inoculación de plantas y/o inoculación del suelo con antagonistas y c) competidores en los raigones de los árboles.

a) Preparación de semillas.- Junto con las semillas se introducen antagonistas de los patógenos, como en el caso de las semillas de maíz protegidas con Bacillus subtilis o Chaetomium globosum contra Fusarium roseum f.sp. + cerealis (Burges, 1981).

b) Preinoculación de plantas y/o inoculación del suelo con antagonistas.- Existen varios ejemplos: en unos casos se sumergen las estacas o raíces en una suspensión, como se ha hecho con el clavel para evitar la pudrición del tallo causada por F. roseum f.sp. cerealis, en donde las estacas se sumergen en una suspensión de Bacillus subtilis o bacterias del suelo como Pseudomonas. En otros casos se preinoculan las raíces con organismos avirulentos relacionados con el patógeno, por ejemplo, las plántulas de tomate son preinoculadas con Cephalosporium sp., para reducir la infección de Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici, el cual produce marchitez; mientras mayor sea el intervalo entre las dos inoculaciones, la protección es mejor (Burges, 1981).

c) Competidores en los raigones de los árboles.- Este método se utiliza para eliminar el material infectado con hongos. En California se controla a Armillariella mellea en cítricos, removiendo mecánicamente la mayoría del material infectado y fumigando el suelo con bisulfuro de carbono; pero, además el suelo es tratado con Trichoderma viride, la cual reemplaza a A. mellea en los fragmentos de los raigones que aun puedan

+ f.sp. = forma especial

quedar (Borges, 1981).

En el caso de los patógenos aéreos, son más vulnerables a las medidas de control durante el proceso de establecimiento de nuevas infecciones, ya que una vez dentro del tejido vegetal están frecuentemente protegidos de los compuestos químicos y de la microflora, por lo que los métodos que se usan en el biocontrol son los siguientes: a) destrucción del inóculo en el suelo; b) preinoculación y c) protección de heridas.

a) Destrucción del inóculo en el suelo.- Debido a que algunos patógenos aéreos pasan parte de su ciclo en el suelo, sobre hojas muertas u otros desechos vegetales, es ahí donde pueden ser ampliamente destruidos por la microflora del suelo (Borges, 1981).

b) Preinoculación.- Es un caso similar al que ocurre con patógenos de la raíz; se utilizan uno o más antagonistas contra el patógeno de las partes aéreas de la planta. Por ejemplo, se inoculan hojas de tabaco con Alternaria sp. no patogénica, antes de la inoculación con la patógena Alternaria alternata, con lo cual se reduce la enfermedad de la mancha café del tabaco por cerca del 65%. Otro caso es el del tizón del fuego causado por Erwinia amylovora, en el cual se utiliza una cepa avirulenta de la misma especie o cepas de Pseudomonas saprofíticas o fitopatógenas (para otros cultivos), las cuales interactúan inhibiendo solamente en dosis altas o en un número relativamente mayor que el del patógeno (Borges, 1981).

c) Protección de heridas.- Algunos patógenos invaden los retoños a través de lesiones hechas cuando se podan las yemas o se deshojan los árboles. En el caso de Nectria galligena que

produce el chancro sobre el manzano, se utilizó B. subtilis y a diversos organismos aislados del tejido ulcerado, los cuales redujeron (independientemente) el número de infecciones (Burges, 1981).

1.2 Compuestos Orgánicos Relacionados con la Asimilación y Transporte del Hierro

Existen distintos compuestos orgánicos relacionados con la asimilación y el transporte del hierro. En animales, fue hasta entrado el siglo veinte cuando los detalles del metabolismo del hierro empezaron a aclararse gracias a la cristalización de la ferritina, al primer modelo ferrocínético en 1937 (que involucraba plasma, médula ósea e hígado), y al descubrimiento de la transferrina y su función en los cuarentas (Bezkorovainy, 1980).

La ferritina es una proteína compleja formada por 24 subunidades idénticas, que tiene un peso molecular de 450000 d. y cuya función es ayudar a la absorción del hierro; así como el almacenamiento de este elemento. La transferrina es aparentemente una sola cadena polipeptídica de peso molecular aproximado de 80000 d., y su función es transportar al hierro (Emery, 1977).

La absorción del hierro ocurre preferentemente en la parte superior del intestino delgado, en donde en estado ferroso (Fe^{++}) se absorbe más fácilmente que en forma férrica (Fe^{+++}), por lo que los agentes reductores como la cisteína o el ácido ascórbico suelen aumentar su absorción. Las células de la mu-

cosa pasan parte del hierro directamente a la sangre, pero la mayor parte se combina con la apoferritina (molécula libre de hierro) para formar ferritina (molécula asociada al hierro), la cual libera al hierro al plasma, en donde es atrapado por la transferrina (Emery, 1977; y Ganong, 1976) o puede participar en la biosíntesis de una variedad de proteínas hemo. Las transferrinas están presentes en fluidos biológicos como es el torrente sanguíneo (serotransferrina), la leche (lactoferrina) y la clara del huevo de las aves (conalbumina) (Bezkorovainy, 1980).

Las principales proteínas que almacenan el hierro en los mamíferos son la ferritina y la hemosiderina, esta última es una ferritina parcialmente degradada (Bezkorovainy, 1980; y Ganong, 1976). Cuando existen los niveles normales de este elemento en el organismo, hay más ferritina que hemosiderina, pero cuando aumenta la cantidad de hierro absorbido, la ferritina se incrementa en el hígado y mucha es convertida a hemosiderina (Bezkorovainy, 1980). La ferritina se ha encontrado tanto en animales vertebrados e invertebrados como en algunas plantas y hongos (Bezkorovainy, 1980; y Richter, 1978).

Aun cuando casi todos los suelos contienen hierro en cantidades suficientes, éste se encuentra en forma no asimilable a las plantas, formando óxidos como la hematita (Fe_2O_3), la magnetita (Fe_3O_4), la siderosa ($FeCO_3$), la piritita (FeS_2), etc., por lo que uno de los problemas que con mayor frecuencia enfrentan los vegetales es la baja asimilación del hierro, que trae como consecuencia clorosis (Brown, 1976; Page,

1966; y Teuscher y Adler, 1965). Este problema se debe a que la solubilidad de las sales de hierro está en estrecha dependencia con el pH del suelo; en suelos alcalinos la solubilidad disminuye, especialmente en donde el pH puede alcanzar valores de 10; y por otro lado, la presencia de elementos como el cobre, manganeso, níquel y zinc, interfieren fisiológicamente en el aprovechamiento del hierro, dando como resultado que el elemento llegue a ser inaccesible para la planta (Brown, 1976; Emery, 1977; y Teuscher y Adler, 1965).

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

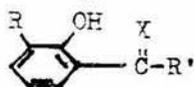
Entre los métodos para controlar la clorosis el más usado es el de los quelantes químicos, que son compuestos orgánicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que tiene afinidad por metales como el hierro, manganeso, magnesio, cobre, zinc y aluminio, es decir no son específicos; al unirse con estos metales los hacen asimilables a las plantas (Brown, 1976; y Teuscher y Adler, 1965). Por otra parte, las plantas producen ácidos húmicos 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 consecuentemente el hierro se solubiliza. El ácido cítrico forma quelatos estables que incrementan los procesos de solubilización (Emery, 1977).

1.2.1. Sideróforos, moléculas microbianas que intervienen en la asimilación del hierro.

Siendo el hierro el cuarto elemento más abundante en la biósfera, es extremadamente difícil de adquirir por la mayoría de las células, sobre todo en medios aeróbicos (Emery, 1977; y Neilands, 1982). Para superar tales obstáculos la mayoría de los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos han desarrollado la habilidad de sintetizar sideróforos (Bezkorovainy, 1980; Davis et al, 1978; Neilands, 1982; y Stuart et al, 1982). Los sideróforos son moléculas orgánicas altamente específicas para asociarse al Fe^{+++} , producidas por los microorganismos cuando en el medio existen condiciones limitantes de hierro, y que tienen un peso molecular alrededor de los 1000 d. (Armstrong y Baalen, 1979; Bezkorovainy, 1980; Burnham y Neilands, 1961; Emery, 1977; Neilands, 1957, 1981 y 1982; y Reeves et al, 1983). El término sideróforo, propuesto por Lankford en 1973 para substituir los primeros nombres triviales como siderocromo, denota la molécula libre de hierro, mientras que la forma asociada al hierro es referida como ferrisideróforo (Neilands, 1981 y 1982). Químicamente estos compuestos son fundamentalmente catecoles o ácidos hidroxámicos. El primer sideróforo tipo fenol-catecol que se aisló fue el ácido itoico en 1958; y el primero del tipo hidroxamato cuya estructura se conoció fue el desferal en 1960 (Bezkorovainy, 1980; y Neilands, 1981).

Clasificación. Aunque los sideróforos como entidades químicas despliegan una variación estructural considerable, la mayoría de ellos pueden clasificarse como compuestos tipo hidro

xamato, $[-CO-N(O^-)-]$, o compuestos tipo fenol-catecol,



donde R = H, OH

X = O, N

(Bezkorovainy, 1980; Emery, 1977; Mullis et al, 1971; Neilands, 1981 y 1982; Reeves et al, 1983); sin embargo, hay sideróforos que no corresponden a estas clasificaciones, como es el caso de la esquizoquinona producida por Bacillus megaterium (Neilands, 1981) y el sideróforo de Rhizobium phaseoli (Peralta, 1986).

Sideróforos tipo fenol-catecol. El miembro mejor conocido de este grupo fue aislado en 1970 de cultivos pobres en hierro de Salmonella typhimurium y Escherichia coli, y se denominó enterobactina y enteroquelina respectivamente (Bezkorovainy, 1980; y Neilands, 1981). Este compuesto parece ser común a todas las enterobacterias y es considerado el prototipo del sideróforo tipo fenol-catecol (Neilands, 1981).

Sideróforos tipo hidroxamato. Existen diversas clases de sideróforos tipo hidroxamato, las cuales, según Bezkorovainy, pueden clasificarse en:

La familia de las Ferrioxaminas. Compuestos caracterizados por la presencia de α -amino- ω -hidroxiaminoalcano, que pueden ser tanto cíclicos como lineales, están presentes en los cultivos de los actinomicetos.

La familia de los Ferricromos. Un aminoácido común a estos compuestos es la L-ornitina. Se encuentran en los ascomicetos (Neurospora), basidiomicetos (Ustilago) y hongos imperfectos (Penicillium).

La familia del Acido Rodotorúlico. Son péptidos cíclicos (di-

cetopiperazinas) de δ -N-hidroxi-L-ornitina substituida; son producidos por Neurospora, varias especies de levaduras y Penicillium.

La familia de las Aerobactinas. Compuestos caracterizados por contener cítrato, están representados por la aerobactina (Aerobacter aerogenes).

La familia de las Micobactinas. Sideróforos que estructuralmente comprenden elementos tipo hidroxamato, como el fenolato, y tienen ácidos grasos substituyentes, por lo que son liposolubles; son producidos por varias especies de micobacterias. La familia de las Exoquelinas. Su estructura no ha sido todavía definida, pero se piensa que son hexapéptidos cíclicos cuyo principal componente es la ϵ -acetil- δ -N-hidroxisina; se descubrieron en Mycobacterium smegmatis; parece que interactúan con las micobactinas (que están restringidas a la membrana celular o capa cerosa asociada con ella) sediéndoles el hierro que transportan desde el exterior.

La familia de las Fusarininas. Compuestos consistentes de unidades fusarinina (complejo de δ -N-hidroxi-L-ornitina y ácido *cis*- β -metilglutácónico), presentes en cultivos de Fusarium sp.

Existen otros compuestos tipo hidroxamato cuyo papel en el metabolismo del hierro es incierto (Bezkorovainy, 1980).

Propiedades químicas y físicas. La solubilidad de los sideróforos es variable, los compuestos fenol-catecol son solubles en compuestos orgánicos típicos (etilacetato), o en solventes como la acetona y el etanol a pH 2 o menos. Mientras que los compuestos tipo hidroxamato son hidrosolubles, excepto las micobactinas que, como ya se indicó, se disuelven en

compuestos orgánicos (Bezkorovainy, 1980; Emery, 1977; y Neilands, 1981).

Las constantes de estabilidad del complejo sideróforo- Fe^{+++} se encuentran en el rango de 10^{20} - 10^{50} M (Neilands, 1982), muy superiores a las presentadas en ácidos orgánicos naturales (citrato férrico 10^{12} M), fenolatos (p-hidroxibenzoatoférrico 10^{15} M) y diversos quelantes sintéticos, aunque el EDTA tiene una constante de estabilidad de 10^{26} M, no puede retener el hierro a un pH arriba de 6 por la competencia con otros cationes; mientras que los sideróforos hidroxamatos quelan hierro tanto en medios ácidos como alcalinos (Powel et al, 1980; y Cline et al, 1983).

Todos los sideróforos tienen absorción máxima en el rango de luz ultravioleta y en el visible cuando se coordinan con hierro (Bezkorovainy, 1980).

Mecanismos de la asimilación del hierro. Con respecto al transporte de hierro mediado por sideróforos, existen esencialmente tres mecanismos; el primero está ejemplificado por la enterobactina, en donde ésta adquiere el hierro del medio, lo introduce a la célula y allí, por hidrólisis, lo libera; con lo que el sideróforo sólo puede ser utilizado una vez. En el segundo, el ferrisideróforo también es introducido a la célula, pero el hierro es liberado por reducción (del estado Fe^{+++} al Fe^{++}), con lo que el sideróforo puede ser reexcretado al medio; es el caso de los ferricromos. El tercer mecanismo ocurre en las micobacterias y organismos que utilizan ácido rodotorúlico. En las micobacterias el hierro del medio es secuestrado por las exoquelinas, que posteriormente lo seden a las mico--

bactinas (localizadas en las porciones lipofílicas de la superficie celular), las cuales lo translocan al interior de la célula, en donde es reducido (Fe^{++}) para ser removido de las micobactinas (Bezkorovainy, 1980).

Por otra parte, es interesante notar que aunque los enterobacilos (como S. typhimurium y E. coli) no producen sideróforos tipo hidroxamato, pueden adquirir hierro de compuestos tales como el ferricromo, ya que poseen receptores de membrana para tales sideróforos, así como para el citrato, lo que aparentemente es una ventaja evolutiva (Bezkorovainy, 1980; Emery, 1977; Leong y Neillands, 1976; y Pollack et al, 1970).

La obtención del hierro por estos mecanismos es un proceso que requiere energía (Emery, 1977; Meyer y Hornsperger, 1978; y Peters y Warren, 1968), lo cual se demostró usando inhibidores metabólicos (dinitrofenol) y condiciones anaeróbicas en E. coli y M. smegmatis (Bezkorovainy, 1980).

Biosíntesis de sideróforos. A mediados de los cincuenta se descubrió que la biosíntesis de los sideróforos es usualmente inducida en medios deficientes en hierro (Neillands, 1981), lo cual induce la formación de sistemas enzimáticos y proteínas receptoras de membrana relacionados con el proceso de asimilación de hierro (Bezkorovainy, 1980).

En la biosíntesis de los sideróforos tipo fenol-catecol, el compuesto precursor es el ácido corísmico, el cual a su vez es un intermediario en la biosíntesis de la fenilalanina y tirosina. Mientras que la biosíntesis de los sideróforos tipo hidroxamato, debe examinarse sobre la base de cada caso en particular, debido a la gran variedad de estos compuestos, pe

ro se cree en general que la hidroxilación de los grupos amino ocurre enzimáticamente usando como sustrato aminoácidos libres y oxígeno. Los N-hidroxiaminoácidos y otros hidroxamatos pueden entonces formar uniones peptídicas, aunque el mecanismo de síntesis no es ribosómico (Bezkorovainy, 1980).

Control biológico mediado por sideróforos. El papel del hierro en el desarrollo de ciertas enfermedades animales se empezó a estudiar a mediados de los cincuentas (Kochan, 1973); en mamíferos se conoce un mecanismo llamado "inmunidad nutricional", el cual consiste en "retirar" el hierro a los microorganismos invasores por medio de las transferrinas, y de esta forma detener su crecimiento (Bezkorovainy, 1980; Kochan, 1973; Murphy et al, 1976; Stuart et al, 1982; y Weinberg, 1971 y 1978). Ciertos microorganismos superan tal inhibición produciendo sideróforos capaces de combinarse con el hierro de las transferrinas (Bezkorovainy, 1980). Esta competencia por el hierro se presenta en una amplia variedad de organismos; se ha encontrado que la cianofícea Anabaena flos-aquae, que produce sideróforos, puede inhibir el crecimiento de la clorofícea Scenedesmus basiliensis en un 80% (Emery, 1977; y Murphy et al, 1976). También se ha reportado que el crecimiento de algunos microorganismos (Legionella) es inhibido completamente cuando se adicionan sideróforos de otras especies (enterobactina, ferricromo, etc.) al medio, y que el crecimiento de éstos se recupera al agregar sulfato ferroso (Reeves et al, 1983).

El incremento en la producción de cultivos, como la papa y el rábano, se ha relacionado con la presencia de Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas putida en el rizoplaneo, las cua

les inhibieron el crecimiento de otros microorganismos (hongos y bacterias) en esta zona, por lo que al interferir también en el desarrollo de aquellos microorganismos fitopatógenos específicos, los cultivos se desarrollan en mejores condiciones fitosanitarias (Burr et al, 1978; y Kloepper et al, 1980a). Aunque en los primeros trabajos no se conocía la causa de tal inhibición (Burr et al, 1978), estudios posteriores revelaron que la presencia del sideróforo de estas Pseudomonas (pseudobactina), impedía el crecimiento de la microflora nativa, al privarla del hierro (Kloepper et al, 1980a y 1980b). Otro interesante trabajo probó que en suelos represivos de enfermedades causadas por hongos, como Fusarium oxysporum y Gaeumannomyces graminis var tritici, se encontraban presentes cepas de Pseudomonas fluorescentes, y que la aplicación de estas bacterias o el sideróforo específico en suelos conductores de la enfermedad, los convertían en suelos represivos; con la adición de hierro se transformaron suelos represivos en conductores (Kloepper et al, 1980b; y Teintze et al, 1981). Esto parece indicar que los microorganismos inhibidos son incapaces de obtener hierro en cantidades esenciales para crecer, lo que puede deberse a tres razones: que éstos no producen sideróforos; que producen comparativamente menos que los otros microorganismos; y/o que son menos potentes que los de las especies competidoras (Kloepper et al, 1980a; y Murphy et al, 1976). En base a lo anterior y considerando la importancia que este mecanismo de inhibición tendría en el control de las enfermedades en la agricultura, los objetivos del trabajo fueron: 1.- Incrementar la evidencia experimental de es-

te fenómeno de inhibición. 2.- Establecer condiciones experimentales económicas y adecuadas para seleccionar microorganismos capaces de inhibir a otros en medios deficientes en hierro, simplificando la metodología. 3.- Analizar las características generales del mecanismo de inhibición.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. Reactivos

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron sales inorgánicas de grado analítico compradas en las casas Merck, Baker y Técnica Química. Las sustancias orgánicas para fines bioquímicos se obtuvieron de las casas Eastman, ICN, Merck, Baker y Sigma. Con respecto a los antibióticos, la Kanamicina (Kantrex) se adquirió de la casa Bristol; el ácido nalidíxico (Wintomylon) en The Sydney Ross; y la tetraciclina en Carlo Erba. El agua tridestilada que se utilizó fue de la casa Sigma, y el agua deionizada se obtuvo de un deionizador Water I modelo 15300.

2.2. Material Biológico

En este trabajo se utilizaron 24 cepas de microorganismos, las cuales se mencionan a continuación:

Cepas de organismos fitopatógenos.

Agrobacterium tumefaciens (Smith y Townsend) Conn

Corynebacterium fascians (Tilford) Dowson

Erwinia atroseptica (van Hall) Jennison

E. carotovora (Jones) Holland

E. herbicola (Lohnis) Dye

Pseudomonas syringae van Hall

Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson

X. phaseoli (Erw. Smith) Dowson; cepas CBP-123, CBP-140 y
CBP-147

Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen
(fsp. = forma especial)

Phytophthora capsici Leonian, cepa 6554

De las cuales las primeras siete y los hongos fueron donados por el Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados (C.P.) Montecillos, México. Las cepas de X. phaseoli fueron enviadas del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia.

Cepas de organismos no fitopatógenos

Pseudomonas fluorescens Migula, cepa 7SRI

Rhizobium phaseoli Dangeard, cepas C.P.Mex 3, C.P.Mex 7 y
C.P.Mex 46

Aislamientos: A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 y A10

Las cepas de R. phaseoli se adquirieron en el Centro de Edafología del C.P.; la cepa P. fluorescens y los aislamientos forman parte de la colección del cepario del laboratorio de Genética Molecular del Centro de Genética del C.P.

2.3. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron preparados fundamentalmente para conservar, determinar y caracterizar a los microorganismos en estudio.

Medios para la conservación de microorganismos:

Medio de caldo levadura manitol (CLM) y medio agar leva-

dura manitol (ALM).

Medios para la determinación de sideróforos:

Medio mínimo para Rhizobium (M); medio M sin FeCl_3 (M-Fe); medio M con el triple de la concentración de FeCl_3 (M+3Fe); medio M con glucosa (MG); medio MG sin FeCl_3 (MG-Fe); medio MG con el triple de la concentración de FeCl_3 (MG+3Fe); medio M con sobrenadante gastado (SG_xM); medio M-Fe con sobrenadante gastado ($\text{SG}_x\text{M-Fe}$); medio M+3Fe con sobrenadante gastado ($\text{SG}_x\text{M+3Fe}$); en donde el subíndice x corresponde a la cepa de la que se obtuvo el sobrenadante gastado.

Medios para la determinación de cepas:

Medio extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (EDC); medio B de King (BK); medio de Hugh y Leifson (HL); medio para producción de levana; medio Thornley; y medio ALM con antibióticos: ALM con kanamicina (ALM Kn), ALM con ácido nalidíxico (ALM Nal) y ALM con tetraciclina (ALM Tc).

Para la preparación de los medios de cultivo, así como para la esterilización de los mismos, de las soluciones y del material, consultar el Apéndice I.

2.4. Métodos

Existieron una serie de procedimientos rutinarios que fueron practicados a lo largo del desarrollo del trabajo, los cuales se anotan a continuación:

Los cultivos se incubaron durante 24 ó 48 h, a una temperatura de $28 \pm 1^\circ \text{C}$. La agitación, para los cultivos en medios

líquidos, fue de 100 oscilaciones por minuto, con un desplazamiento de 5 cm.

El material de vidrio que se usó en las pruebas para la determinación de sideróforos y establecimiento de grupos antagónicos, se lavó de la siguiente manera: tubos y matraces se llenaron con una solución de HCl 1N y se dejaron reposar por 72 h, al término de este tiempo se enjuagaron diez veces con agua de la llave y dos con agua destilada.

El grado de desarrollo de los cultivos en medio líquido se cuantificó por el método turbidimétrico, en un espectrofotómetro Coleman Jr. a una longitud de onda de 660 nm.

Para la preparación de los sobrenadantes de medio gastado, el cultivo se ajustó a pH 7 y se centrifugó a 25900 g, durante 15 minutos a 4° C. La esterilización del sobrenadante se llevó a cabo por filtración a través de una membrana Millipore con un diámetro de poro de 0.45 μ m.

2.4.1. Pruebas para la determinación de sideróforos y establecimiento de grupos antagónicos.

Las siguientes son pruebas generales que ayudan a determinar la presencia de sideróforos en el cultivo, y para establecer pares de organismos antagónicos, mediante la determinación del grado de desarrollo del organismo a prueba, en presencia de la solución que contiene el sideróforo.

2.4.1.1. Prueba para evaluar la capacidad del microorganismo de asimilar hierro en medios con deficiencia de este elemento. Con el fin de uniformizar las condiciones experimentales, se seleccionaron a aquellos microorganismos capaces de desarrollarse en los medios M y M-Fe (este último una modificación

del primero), por tener una composición química definida. Para esta prueba los microorganismos inicialmente se crecieron en tubos con 5 ml de medio CLM, durante 24 h con agitación; luego se tomaron 0.1 ml de estos cultivos y se agregaron a los tubos con 3 ml de medio M, dejándose en agitación por 24 h, al término de las cuales se tomó 0.1 ml de inóculo para cada tubo con 5 ml de medio M y M-Fe. A estos últimos tubos se les tomó la lectura inicial de absorbencia, antes y después del inóculo, se utilizó como blanco un tubo con medio M-Fe; la lectura final se obtuvo después de 72 h de incubación en agitación (Figura 1). Se hicieron tres ensayos para cada cepa, con los cuales se sacó el promedio (la media \bar{X}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de dispersión ($V = S/\bar{X} \cdot 100$). Este último se utilizó para descartar aquellas cepas con un pobre crecimiento o cuya viabilidad se fue perdiendo, lo que se vió reflejado en un coeficiente de dispersión (V) mayor o igual al 80%.

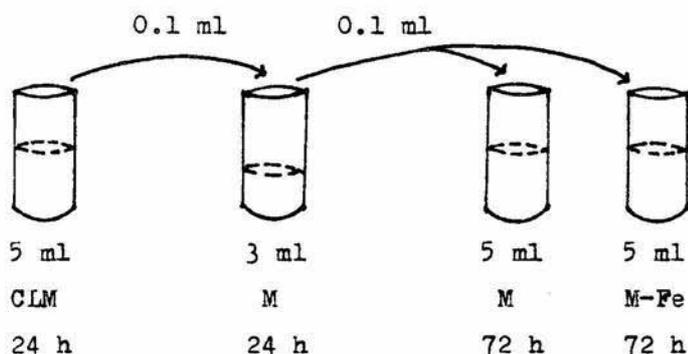


Figura 1.- Prueba para evaluar la capacidad del microorganismo de asimilar hierro.

2.4.1.2. Obtención de sobrenadante gastado (SG). El procedimiento para obtener el SG fue el siguiente:

- a) Con cultivos desarrollados en cajas con medio ALM, se inocularon tubos con 3 ml de medio M y se dejaron crecer durante 24 h, para obtener el primer inóculo.
- b) De los cultivos anteriores se agregó 0.1 ml de inóculo a cada tubo con 5 ml de medio M-Fe y se incubaron durante 24 h.
- c) Del tubo anterior se tomaron 0.75 ml por cada 25 ml de medio M-Fe y se incubaron en matraces por 24 h, o hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial tardía.
- d) El cultivo se ajustó a pH 7, se centrifugó y el sobrenadante se esterilizó por filtración (Figura 2).

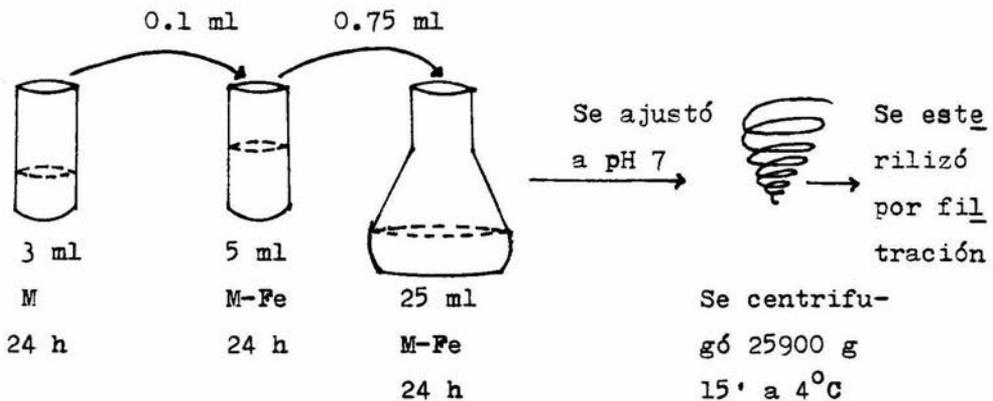


Figura 2 .- Obtención de sobrenadante gastado (SG).

2.4.1.3. Preparación del inóculo de las cepas fitopatógenas. Cultivos desarrollados en cajas con medio ALM se pasaron a tubos con 3 ml de medio CLM y se mantuvieron en agitación cons-

tante de 24 a 48 h (Figura 3).

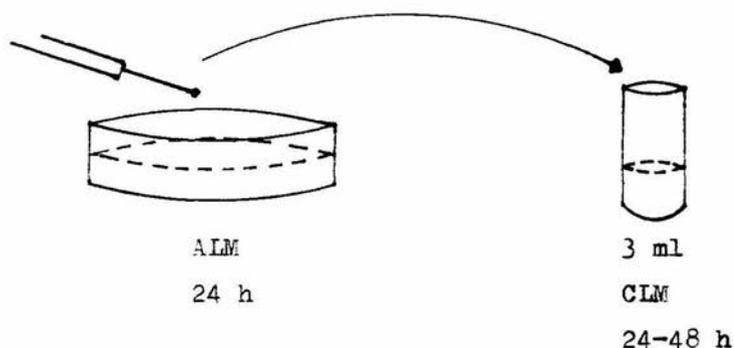


Figura 3.- Preparación del inóculo de las cepas fitopatógenas.

2.4.1.4. Prueba para la determinación de la inhibición de microorganismos. Para definir el grado de inhibición causada por los sobrenadantes de medio gastado sobre los microorganismos, se prepararon tubos con 5 ml de los medios M-Fe y SG_x M-Fe. A cada tubo se le tomó la lectura de absorbencia inicial utilizando como blanco un tubo con medio M-Fe; después fueron inoculados con 0.1 ml del cultivo del organismo fitopatógeno, haciéndose la lectura de absorbencia tan pronto los medios fueron inoculados ($t = 0$) y las siguientes a las 24, 48 y 72 h (Figura 4), tomando la última lectura para calcular los porcentajes de inhibición de la forma siguiente:

- Se tomó como 100 por ciento el crecimiento (absorbencia) alcanzado por el cultivo en el medio M-Fe.
- Se obtuvo el por ciento de crecimiento (absorbencia) alcanzado por el microorganismo en el medio SG_x M-Fe.
- Al 100 se le resta el valor calculado en el paso anterior

y nos da el por ciento de inhibición.

Se obtuvo el promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (S) de tres experimentos independientes; y se seleccionó a los pares de organismos antagonísticos cuyo grado de inhibición fue de un 40% o más.

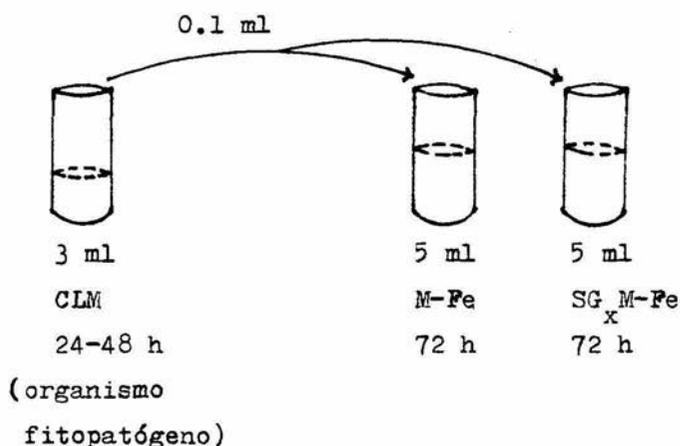


Figura 4.- Prueba para determinar inhibición.

2.4.1.5. Prueba para determinar la reversión de la inhibición.

En esta prueba se utilizaron tubos que contenían 5 ml de los medios M-Fe, SG M-Fe, SG M_x y SG M+3Fe (Figura 5). Se siguió el mismo procedimiento que en la prueba anterior, pero ya no hubo selección de organismos.

2.4.1.6. Prueba para determinar efecto bacteriostático o bactericida del SG.

Para el cultivo fitopatógeno se usaron cuatro tubos con 5 ml de medio M-Fe. A cada uno se le tomó la lectura de absorbencia antes de inocularlos con 0.1 ml del

cultivo del fitopatógeno. Se incubaron con agitación durante 24 h, se tomó la lectura de absorbencia, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante, esto último en condiciones estériles. Después se agregaron 5 ml de los medios SG_{xM+3Fe} y M-Fe, dos tubos por cada medio, se resuspendieron las células se tomó la lectura de absorbencia inicial (blanco M-Fe) y se hicieron diluciones (10^{-7} y 10^{-8}) a partir de uno de los dos tubos, para determinar la viabilidad utilizando cajas con medio ALM. El otro tubo se dejó en agitación durante 37 h, al término de las cuales se se volvieron a tomar las lecturas de absorbencia y hacer las diluciones. Se compararon las lecturas de absorbencia y el número de colonias del tiempo 0 con las de 37 h después (Figura 6). Se hicieron dos repeticiones en las lecturas de absorbencia obteniendo el promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (S) para cada caso.

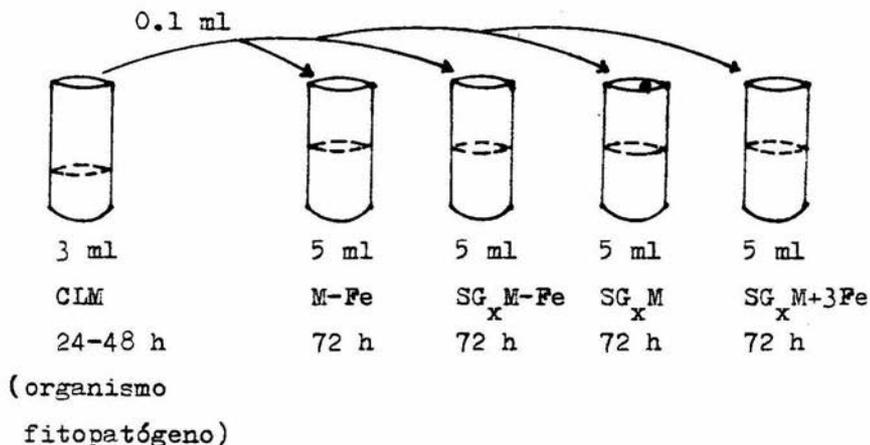


Figura 5.- Prueba para determinar reversión en la inhibición.

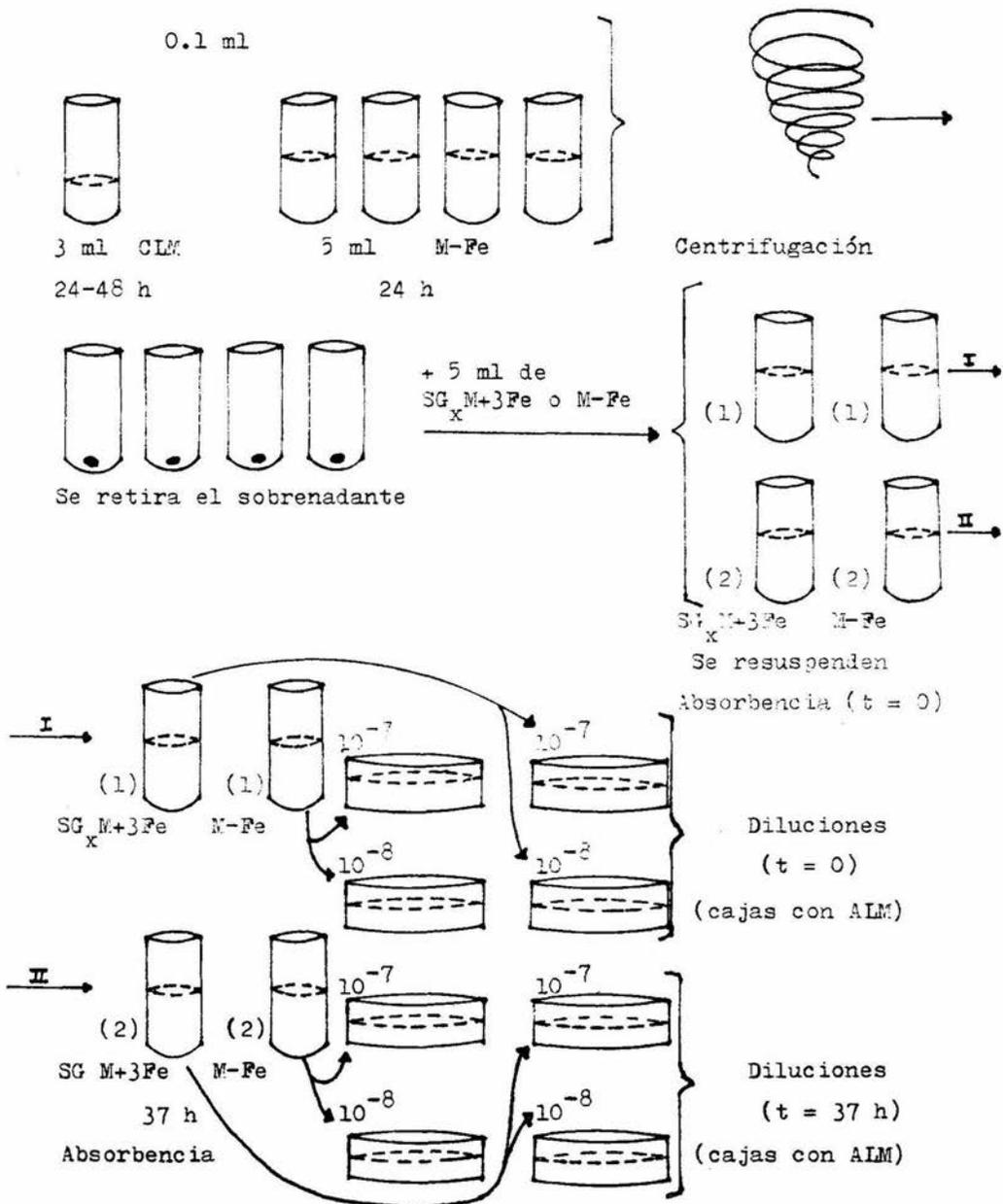


Figura 6.- Prueba para descartar efecto bactericida del SG.

2.4.1.7. Curvas de crecimiento. El procedimiento para determinar las cinéticas de crecimiento fue el siguiente:

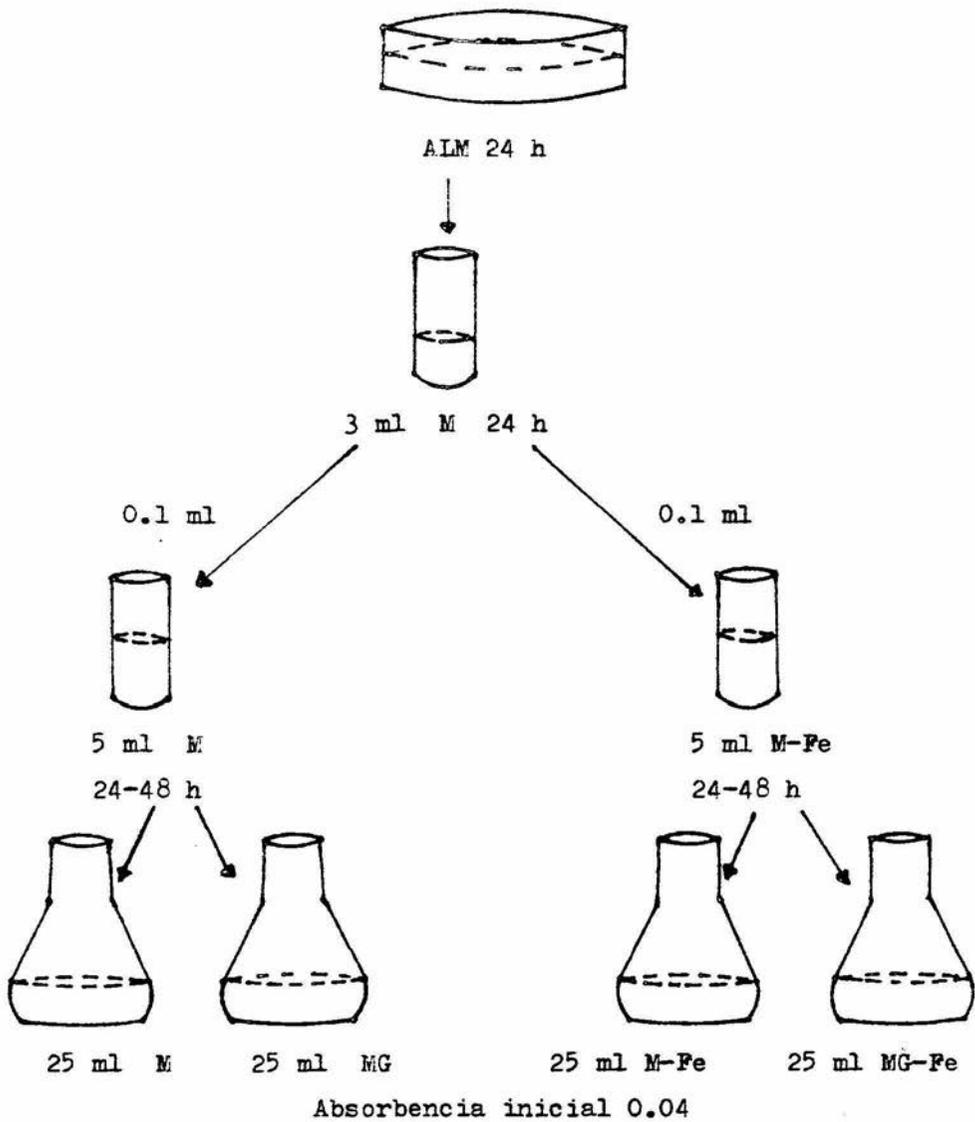
a) Se sembraron los cultivos en cajas con medio ALM y se incubaron.

b) De estos cultivos se inocularon tubos conteniendo 3 ml de medio M, y se dejaron en agitación constante por 24 h.

c) De los anteriores cultivos desarrollados se tomaron inóculos de 0.1 ml para cada tubo conteniendo 5 ml de medio M o M-Fe, y se incubaron con agitación durante 24 ó 48 h.

d) En matraces de tubo lateral con 25 ml de medio M, MG, M-Fe o MG-Fe, se agregó el volumen de inóculo necesario para alcanzar una absorbencia inicial de 0.04. Se agregó inóculo procedente del medio M a los matraces con medio M y MG; y el inóculo procedente de M-Fe para los medios M-Fe y MG-Fe. Se tomaron lecturas de absorbencia cada 2 h, hasta llegar a la fase estacionaria (Figura 7); se hicieron tres repeticiones, y las curvas de crecimiento fueron primero linealizadas y luego ajustadas por mínimos cuadrados, para poder calcular el valor de la pendiente (m) y dar la ecuación que representa el crecimiento de la población, antes de llegar a la fase estacionaria.

2.4.1.8. Análisis espectrofotométrico. Después de crecer las cepas no fitopatógenas en los medios: M, M-Fe, MG y MG-Fe; se obtuvo el SG de la forma antes mencionada, pero sin ajustar el pH (Ver 2.4.1.2); además de SG autoclaveado, proveniente del obtenido en el medio M-Fe (M-FeA). A cada muestra del SG se le tomó el espectro de absorción desde los 330 nm hasta los 840 nm, con intervalos de 10 nm.



Lectura de absorbencia cada 24 h hasta llegar a la fase estacionaria

Figura 7.- Curvas de crecimiento.

2.4.2. Pruebas para la identificación de los aislamientos.

Las pruebas a las que se sometieron los aislamientos (que inhibieron el desarrollo de las cepas fitopatógenas) para su identificación, fueron las siguientes: morfología de las colonias; tinción de Gram; fluorescencia; medio selectivo para *Xanthomonas*; óxido-fermentación; tinción de flagelos; hipersensibilidad; pudrición de papa; hidrolasa de arginina; oxidasa; producción de levana; y respuesta a antibióticos, esta última como complementaria. La cepa testigo fue *P. fluorescens* 7SRI. Para revisar la elaboración de cada una de estas pruebas, ver apéndice I parte 2.

III. RESULTADOS

3.1. Capacidad del Microorganismo para Asimilar Hierro en Medios con Cantidades Limitantes de este Elemento

En el cuadro 1 aparecen los resultados de esta prueba, las cepas con un coeficiente de dispersión ($V = S/\bar{X} \cdot 100$) igual o mayor al 80% (en cualquiera de los dos medios) se eliminaron, ya que, como se mencionó en el método, este coeficiente refleja tanto la pérdida de viabilidad como un pobre crecimiento en el medio. En el primer caso tenemos a E. carotovora y a E. herbicola, lo cual se nota más claramente si comparamos la media (\bar{X}) y la desviación estándar (S) junto con el coeficiente de dispersión (V) (Cuadro 1). En el segundo caso tenemos a E. atroseptica, X. campestris, X. phaseoli CBP-123, CBP-140 y CBP-147, los aislamientos 6 y 8 (el aislamiento 6 ni siquiera mostró un mínimo de crecimiento, por lo que no se pudo sacar el coeficiente de dispersión), y el hongo F. capsici (Cuadro 1). Además, este último y F. oxysporum, el otro hongo, presentaron el problema de que su crecimiento no se pudo medir con precisión utilizando el espectrofotómetro, por lo que también se eliminaron.

Los microorganismos con los que se siguió trabajando aparecen en el cuadro 2, el cual muestra el por ciento de crecimiento en el medio M-Fe en comparación con el medio M; las tres cepas con los más altos porcentajes fueron: C. fascians y los aislamientos 4 y 7.

Cuadro 1. Crecimiento alcanzado por los microorganismos, a las 72 h de incubación, en los medios M y M-Fe. (\bar{X} = promedio; S = desviación estándar; y V = coeficiente de dispersión)

Cepa	Medios de cultivo					
	M			M-Fe		
	\bar{X}	S	V	\bar{X}	S	V
<u>A. tumefaciens</u>	0.79	0.04	5	0.66	0.21	32
<u>C. fascians</u>	0.74	0.18	24	0.69	0.08	12
<u>E. atroseptica</u>	0.06	0.10	167	0.06	0.08	133
<u>E. carotovora</u>	0.28	0.24	86	0.27	0.24	89
<u>E. herbicola</u>	0.24	0.23	96	0.08	0.08	100
<u>P. syringae</u>	0.60	0.12	20	0.50	0.14	28
<u>X. campestris</u>	0.05	0.04	80	0.06	0.04	67
CBP-123	0.09	0.12	133	0.04	0.06	150
CBP-140	0.08	0.11	138	0.09	0.11	122
CBP-147	0.07	0.06	86	0.04	0.04	100
<u>F. oxysporum</u>	0.22	0.06	27	0.35	0.26	74
<u>P. capsici</u>	0.02	0.03	150	0.04	0.02	50
C.P.Mex 3	0.50	0.08	16	0.38	0.13	34
C.P.Mex 7	0.47	0.05	11	0.36	0.06	17
C.P.Mex 46	0.66	0.08	12	0.40	0.02	5
7SRI	0.44	0.14	32	0.31	0.12	39
A3	0.38	0.06	16	0.20	0.02	10
A4	0.47	0.07	15	0.48	0.02	4
A5	0.38	0.05	13	0.26	0.05	19
A6	0.00	0.00	—	0.00	0.00	—
A7	0.47	0.06	13	0.44	0.04	9
A8	0.02	0.02	100	0.01	0.01	100
A9	0.39	0.17	44	0.27	0.14	52
A 10	0.38	0.02	5	0.26	0.01	4

Cuadro 2. Lista de microorganismos seleccionados, en base al cuadro 1, y por ciento de desarrollo alcanzado en el medio M-Fe, en comparación con el medio M.

Cepa	Medios de cultivo	
	M	M-Fe
<u>A. tumefaciens</u>	100	84
<u>C. fascians</u>	100	93
<u>P. syringae</u>	100	83
C.P.Mex 3	100	76
C.P.Mex 7	100	76
C.P.Mex 46	100	61
7SRI	100	70
A3	100	53
A4	100	102
A5	100	68
A7	100	94
A9	100	69
A10	100	68

3.2. Prueba Microbiológica para Establecer Grupos Antagónicos

Con los microorganismos seleccionados se trató de determinar cuales de las cepas de R. phaseoli, P. fluorescens 7SRI y los aislamientos causaban inhibición del desarrollo de los organismos fitopatógenos A. tumefaciens, C. fascians y P. sy-

ringae. Los resultados aparecen en el cuadro 3, en donde podemos apreciar que las cepas con mayor capacidad de inhibición fueron los aislamientos A3, A5, A9 y A10, mientras que los de menor capacidad fueron la cepa C.P.Mex 7 y los aislamientos A4 y A7; también se puede observar que sólo en 15 de los 30 casos (la mitad) la inhibición fue mayor del 40%. En el cuadro 4 aparecen estos 15 pares de organismos antagónicos.

3.3. Prueba de Reversión de la Inhibición

En el cuadro 5 aparecen la media y la desviación estándar de tres ensayos independientes, aunque para los casos de R. phaseoli sólo se tiene los datos de dos experimentos, debido a la presencia de mucilago en el sobrenadante de medio gastado, especialmente en el caso de C.P.Mex 46, lo que hizo difícil la esterilización por filtración. Los casos en donde se vió reversión de la inhibición fueron: A. tumefaciens con el SG de A5, A9 y A10; C. fascians con el SG de C.P.Mex 46, 7SRI y A5; y P. syringae con el SG de C.P.Mex 3, A3, A5, A9 y A10. Como puede apreciarse en el cuadro 5, en la mayoría de los casos esta reversión es gradual, observándose la mayor inhibición en el medio sin FeCl_3 y la menor en el medio con el triple de FeCl_3 . También tenemos los casos en donde no hubo reversión: A. tumefaciens con el SG de A3; y C. fascians con el SG de A3, A9 y A10.

Cuadro 3. Efecto inhibitorio causado a A. tumefaciens, C. fascians y P. syringae, por la presencia de SG en el medio M-Fe. Los datos (\bar{X} y S) se obtuvieron del porcentaje de inhibición en dichos medios en relación al desarrollo de los cultivos en el medio M-Fe.

Medios de cultivo	Cepas fitopatógenas					
	<u>A. tumefaciens</u>		<u>C. fascians</u>		<u>P. syringae</u>	
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S
SG ₃ M-Fe	37	8	20	1	56	10
SG ₇ M-Fe	7	5	30	12	29	6
SG ₄₆ M-Fe	30	13	64	4	31	9
SG _{7SR1} M-Fe	36	15	70	8	34	14
SG _{A3} M-Fe	72	11	98	2	93	4
SG _{A4} M-Fe	24	3	15	7	8	6
SG _{A5} M-Fe	56	7	97	3	85	4
SG _{A7} M-Fe	6	5	14	6	1	5
SG _{A9} M-Fe	69	10	98	4	93	5
SG _{A10} M-Fe	60	16	92	8	78	7

Nota.- Los SG de las cepas de R. phaseoli C.P.Mex 3, C.P.Mex 7 y C.P.Mex 46, aparecen sólo con el número como subíndice (los tres primeros medios).

Cuadro 4. Pares de microorganismos antagonicos determinados por una inhibición mayor o igual al 40%, causada por el SG sobre los organismos fitopatogenos.

Medios de cultivo	Cepas fitopatogenas		
	<u>A. tumefaciens</u>	<u>C. fascians</u>	<u>P. syringae</u>
SG ₃ M-Fe	-	-	X
SG ₄₆ M-Fe	-	X	-
SG _{7SRI} M-Fe	-	X	-
SG _{A3} M-Fe	X	X	X
SG _{A5} M-Fe	X	X	X
SG _{A9} M-Fe	X	X	X
SG _{A10} M-Fe	X	X	X

3.4. Prueba para Definir el Efecto Bacteriostático o Bactericida del SG

En los cuadros 6 y 7 podemos notar que el SG de los aislamientos A3 y A5, presentó un efecto bacteriostático sobre A. tumefaciens; ya que hubo un aumento en las lecturas de absorbencia (Cuadro 6) y en el número de colonias (cuadro 7).

Cuadro 5. Comparación del efecto inhibitorio en los medios SG_{xM-Fe} , SG_{xM} y SG_{xM+3Fe} . Los datos (\bar{X} y S) se obtuvieron del por ciento de inhibición en relación con el medio M-Fe .

Medios de cultivo	Cepas fitopatógenas					
	<u>A. tumefaciens</u>		<u>C. fascians</u>		<u>P. syringae</u>	
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S
SG_{3M-Fe}	-	-	-	-	46	10
SG_{3M}	-	-	-	-	44	12
SG_{3M+3Fe}	-	-	-	-	18	8
SG_{46M-Fe}	-	-	62	6	-	-
SG_{46M}	-	-	36	4	-	-
$SG_{46M+3Fe}$	-	-	31	5	-	-
$SG_{7SRI M-Fe}$	-	-	62	10	-	-
$SG_{7SRI M}$	-	-	43	7	-	-
$SG_{7SRI M+3Fe}$	-	-	40	6	-	-
$SG_{A3 M-Fe}$	81	8	100	0	92	1
$SG_{A3 M}$	80	6	100	0	87	9
$SG_{A3 M+3Fe}$	84	3	99	1	69	1
$SG_{A5 M-Fe}$	61	2	96	2	85	2
$SG_{A5 M}$	59	6	90	4	81	10
$SG_{A5 M+3Fe}$	46	4	75	6	34	9
$SG_{A9 M-Fe}$	62	5	99	1	93	5
$SG_{A9 M}$	56	8	99	2	88	8
$SG_{A9 M+3Fe}$	37	10	98	3	76	11
$SG_{A10 M-Fe}$	65	12	94	5	84	6
$SG_{A10 M}$	60	6	95	5	62	15
$SG_{A10 M+3Fe}$	44	9	96	5	47	20

Cuadro 6. Determinación del efecto del SG de A3 y A5 sobre el desarrollo de A. tumefaciens. Los resultados están dados en valores de absorbencia a 660 nm.

Medios de cultivo	<u>A. tumefaciens</u>			
	$t_1 = 0$ h		$t_2 = 37$ h	
	\bar{X}	S	\bar{X}	S
SG _{A3} M+3Fe	0.24	0.01	0.48	0.08
SG _{A5} M+3Fe	0.25	0.01	0.64	0.03
M-Fe	0.24	0.00	0.75	0.01

Cuadro 7. Determinación del efecto del SG de A3 y A5 sobre el desarrollo de A. tumefaciens. Los resultados se dan en células ml⁻¹.

Medios de cultivo	<u>A. tumefaciens</u>	
	$t_1 = 0$ h	$t_2 = 37$ h
	SG _{A3} M+3Fe	6.9×10^6
SG _{A5} M+3Fe	6.9×10^6	32×10^7
M-Fe	6.4×10^6	32×10^7

3.5 Cinéticas de Crecimiento

Se determinaron las cinéticas de crecimiento de las cepas R. phaseoli C.P.Mex 46, P. fluorescens 7SRI, y los aisla-

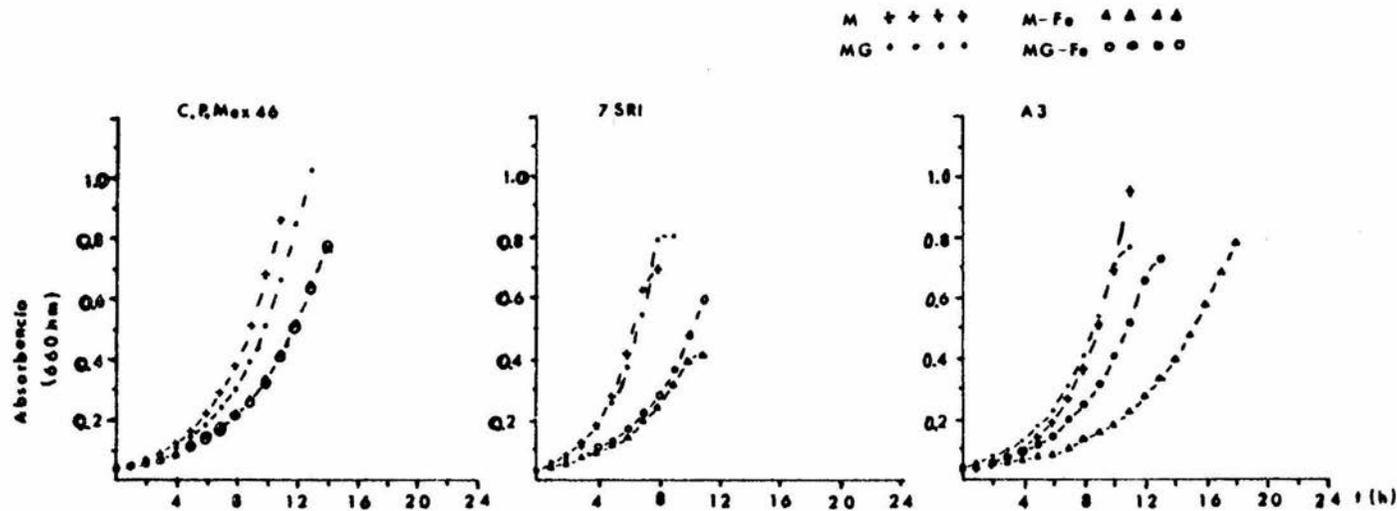
mientos A3, A5, A9 y A10, en los medios de cultivo: M, M-Fe, MG y MG-Fe; así como las curvas de crecimiento de los cultivos fitopatógenos A. tumefaciens, C. fascians y P. syringae, en los medios M y M-Fe. Los resultados de las primeras cepas aparecen en las figuras 8 y 9, en donde se puede observar que hubo una disminución en la velocidad de crecimiento (m) en los medios deficientes en FeCl_3 ; además, en estos medios se presentó una marcada producción de pigmento. En las cepas P. fluorescens 7SRI y los aislamientos A3, A5, A9 y A10, el pigmento fue fluorescente: amarillo-verdoso para 7SRI, A5 y A10; y azul-verdoso para A3 y A9. En la cepa C.P.Mex 46, el pigmento fue ámbar.

Analizando gráficamente cada caso, y comparando los valores de la pendiente (m), tenemos que en las cepas C.P.Mex 46, 7SRI y A10 no hubo diferencias debidas a la fuente de carbono (glucosa o manitol); en cambio, en los aislamientos A3, A5 y A9 sí las hubo, y se presentaron en los medios deficientes en FeCl_3 (M-Fe y MG-Fe). En los últimos tres casos la velocidad de crecimiento (m) fue menor en el medio sin glucosa (M-Fe).

En el caso de las cepas fitopatógenas (Figura 10), también observamos una disminución en la velocidad de crecimiento en el medio M-Fe; y P. syringae además, presentó producción de pigmento fluorescente amarillo-verdoso en este medio.

3.6. Análisis Espectrofotométrico del SG

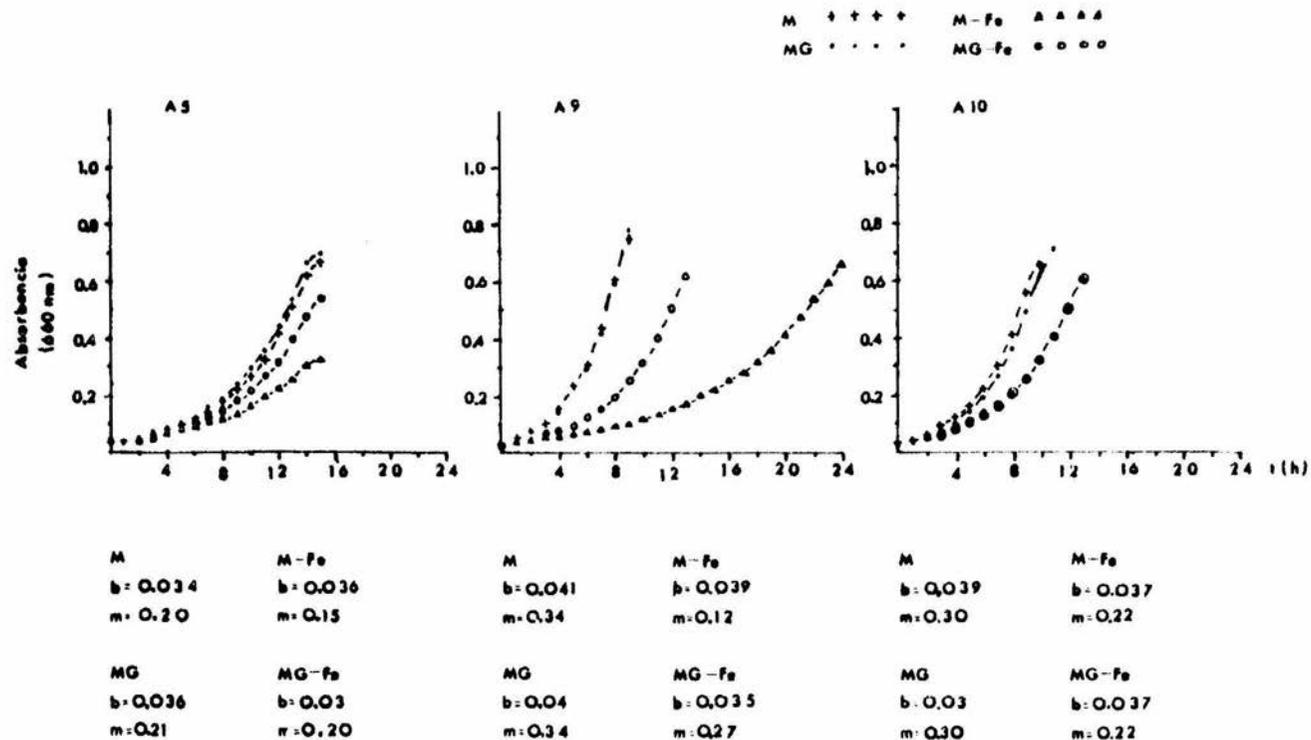
En las figuras 11 y 12 aparecen las gráficas del análisis



M	M-Fe	M	M-Fe	M	M-Fe
b = 0.04	b = 0.038	b = 0.039	b = 0.037	b = 0.028	b = 0.033
m = 0.29	m = 0.22	m = 0.4	m = 0.24	m = 0.31	m = 0.18
MG	MG-Fe	MG	MG-Fe	MG	MG-Fe
b = 0.04	b = 0.038	b = 0.039	b = 0.036	b = 0.044	b = 0.036
m = 0.26	m = 0.22	m = 0.38	m = 0.26	m = 0.28	m = 0.24

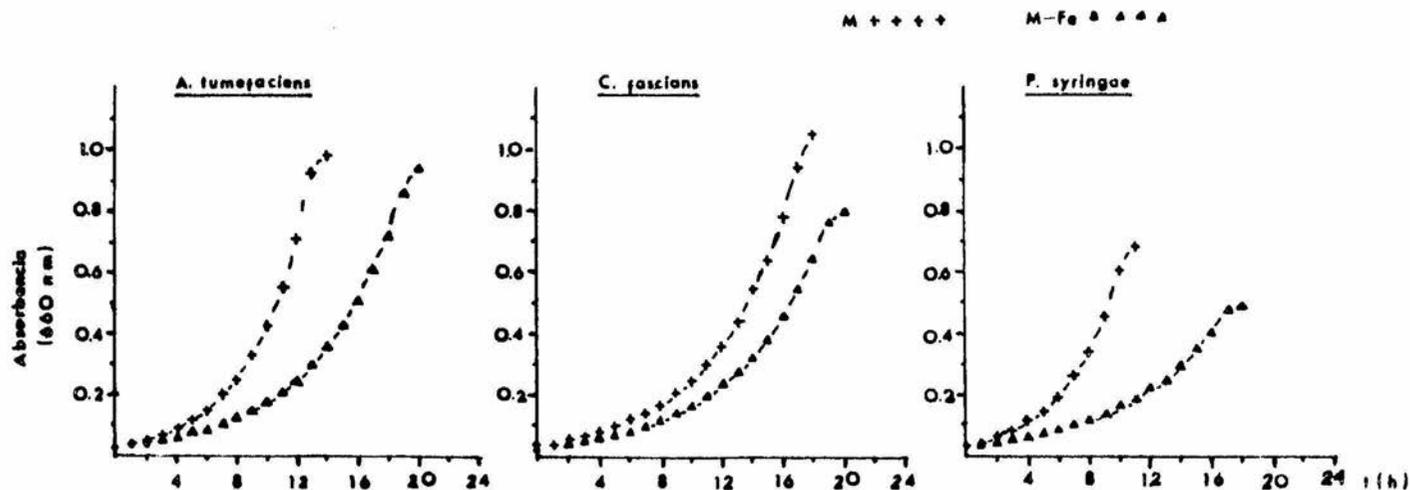
Ecuación General $y = be^{mx}$

Figura B.- Fase exponencial de las cinéticas de crecimiento de las cepas C.P.Mex 46, 7 SRI y A3, en los medios M, M-Fe, MG y MG-Fe.



Ecuación General $y = b e^{mx}$

Figura 9.- Fase exponencial de las cinéticas de crecimiento de las cepas A5, A9 y A10, en los medios M, M-Fe, MG y MG-Fe.



M
 b=0.032
 m=0.25

M-Fe
 b=0.032
 m=0.18

M
 b=0.038
 m=0.19

M-Fe
 b=0.031
 m=0.17

M
 b=0.038
 m=0.28

M-Fe
 b=0.038
 m=0.15

Ecuación General $y = be^{mx}$

Figura 10.- Fase exponencial de las cinéticas de crecimiento de las cepas A. tumefaciens, C. fascians y P. syringae, en los medios M y M-Fe.

sis espectrofotométrico de los SG de las cepas no fitopatógenas; si comparamos estas gráficas podemos dividir a los SG en dos grupos, los que muestran la absorción máxima antes de los 370 nm y los que la muestran después; en el primer grupo sólo tenemos a la cepa R. phaseoli C.P.Mex 46, en el que los picos se encuentran entre los 340 y 350 nm, y los más altos son los de los SG obtenidos en los medios sin FeCl₃ (M-Fe, MG-Fe y M-FeA). Todos los restantes son del segundo grupo, en general podemos decir que tiende a haber dos picos: uno a 380 nm, más pequeño, y otro entre los 410 y 430 nm.

3.7. Identificación de los Aislamientos

El conjunto de pruebas (Cuadro 8) reveló que los aislamientos pertenecen a cepas saprofíticas del género Pseudomonas, cuya especie puede ser P. fluorescens o P. putida, según la guía del manual de Bergey (Krieg y Holt, 1984).

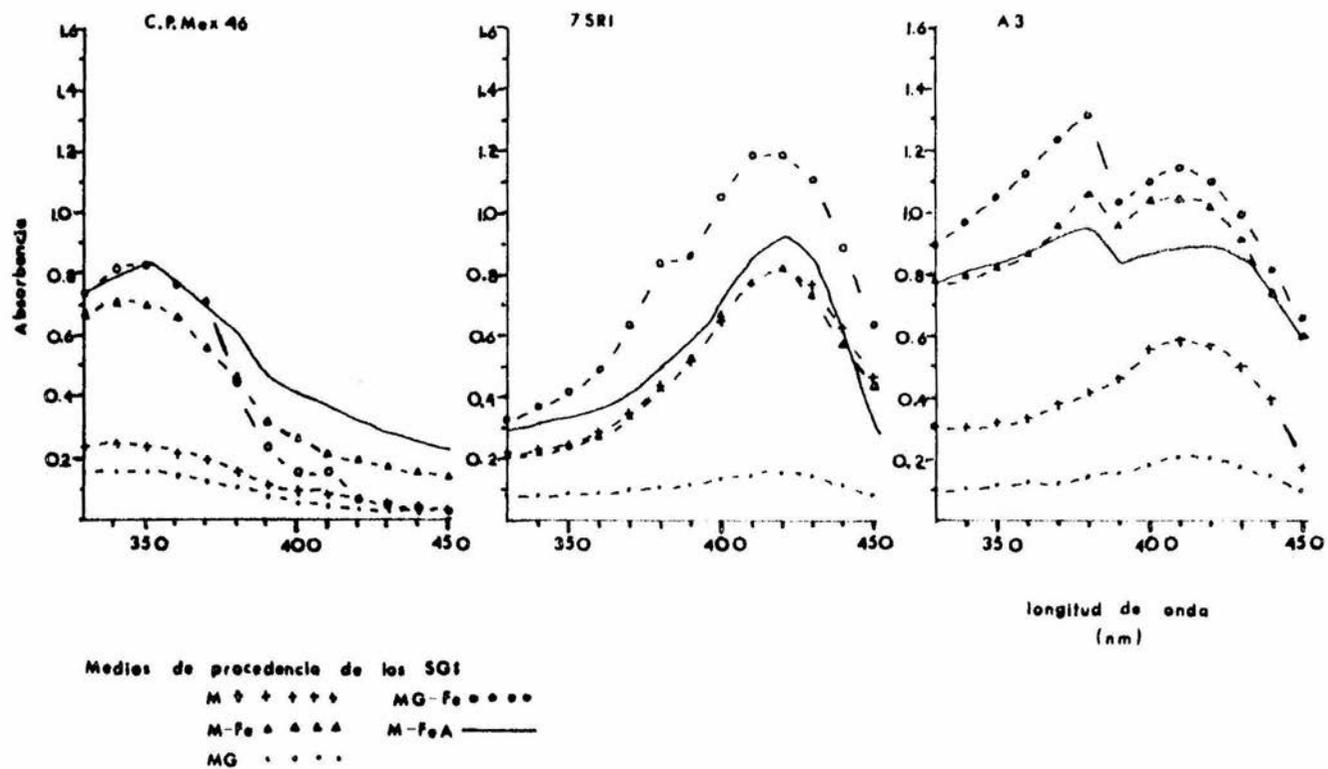
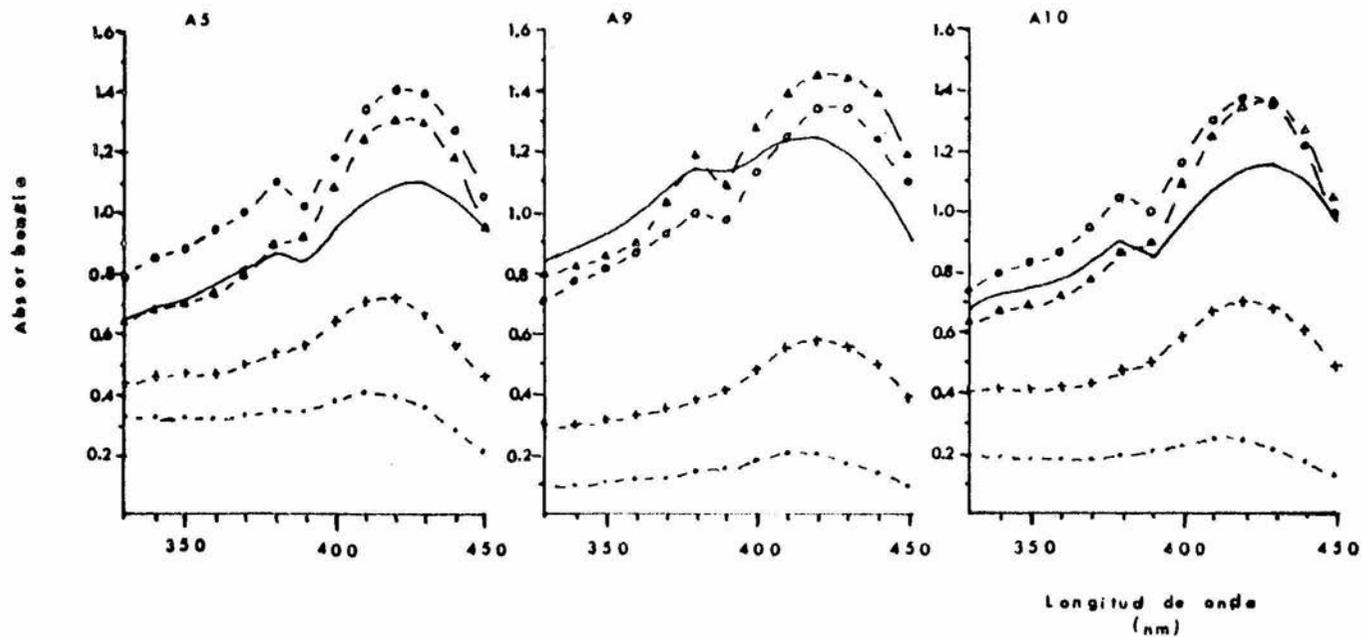


Figura 11.- Curvas espectrofotométricas de los SG de las cepas C.P.Mex 46, 75R1 y A3.



Medios de procedencia de los SG:

M + + + + MG-Fe o o o o
M-Fe Δ Δ Δ Δ M-FeA ———
MG

Figura 12.- Curvas espectrofotométricas de los SG de las cepas A5, A9 y A10

Cuadro 3. Resultados de las pruebas para identificar los aislamientos.

Prueba	Cepas		
	A3	A5	A9
Morfología colonial:			
Olor	sosa	leche	sosa
Color	verdoso	blanquecino-verdoso	verde-azuloso
Forma	circular	circular	circular
Borde	ondulado	ondulado	ondulado
Elevación	plana	plana	plana
Superficie	brillante	brillante	brillante
	polvosa	polvosa	polvosa
Diámetro	4 mm	3-4 mm	3-5 mm
Morfología bacteriana	bacilo	bacilo	bacilo
Tinción de Gram	-	-	-
Xanthomonas	-	-	-
Fluorescencia	+	+	+
Oxido-fermentación	-	-	-
Tinción de flagelos:			
Número	3	-	3
Posición	polar	-	polar
Hipersensibilidad	-	-	-
Fudrición de papa	-	-	-
Hidrolasa de			
arginina	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Producción de levana	-	-	-
Respuesta a antibióticos:			
Ac. Nalidíxico	+	+	+
Kanamicina	-	-	-
Tetraciclina	±	±	±

+ = resultado positivo; - = resultado negativo; y ± = resultado intermedio.

Cuadro 8. Continuación...

Prueba	Cepas	
	A10	7SRI
Morfología colonial:		
Olor	leche	inoloro
Color	blanquecino-verdoso	verde brillante
Forma	circular	circular
Borde	ondulado	entero
Elevación	plana	convexa
Superficie	brillante polvosa	brillante polvosa
Diámetro	2 mm	3 mm
Morfología bacteriana	bacilo	bacilo
Tinción de Gram	-	-
Xanthomonas	-	-
Fluorescencia	+	+
Oxido-fermentación	-	-
Tinción de flafelos:		
Número	-	3
Posición	-	polar
Hipersensibilidad	-	-
Pudrición de papa	-	-
Hidrolasa de arginina	+	+
Oxidasa	+	+
Producción de levana	-	+
Respuesta a antibióticos:		
Ac. Nalidíxico	+	+
Kanamicina	-	-
Tetraciclina	±	±

+ = resultado positivo; - = resultado negativo; y ± = resultado intermedio.

IV. DISCUSION DE RESULTADOS

En los resultados de los cuadros 1 y 2 observamos que la mayoría de los microorganismos crecieron mejor en el medio M, a excepción de los aislamientos 4 y 7 y la cepa C. fascians, que prácticamente crecieron igual en ambos medios; lo que puede indicarnos la posible presencia de un mecanismo altamente eficiente en la asimilación del hierro (sideróforos), o que existe un requerimiento diferencial de este elemento por los diversos microorganismos, dado que algunos podrían hacer un uso más eficiente de él que otros. El hecho de que las otras cepas tengan un crecimiento menor en el medio M-Fe, no indica que no produzcan sideróforos, ya que todas mostraron un crecimiento arriba del 50%, el cual ha sido reportado para algunas cepas productoras de sideróforos en medios carentes de hierro (Meyer y Abdallah, 1978). La cepa control P. fluorescens 7SRI, productora de sideróforos, creció un 70% en el medio M-Fe (Cuadro 2); además, se han reportado como cepas productoras de sideróforos; entre otras, a A. tumefaciens (Bezkorovainy, 1980; y Ong et al, 1979), P. syringae (Meyer y Abdallah, 1978; y Philson y Llinas, 1982) y R. phaseoli (Peralta, 1986), que alcanzaron valores de crecimiento entre el 61% y 84% en el medio deficiente en $FeCl_3$ (Cuadro 2). Si bien los resultados nos dan cierta idea sobre la capacidad de los microorganismos de producir sideróforos, entonces se debería esperar que las dos cepas que tuvieron el más alto desarrollo en el medio M-Fe (A4 y A7) causaran una marcada inhibición en los organismos fitopatógenos, cosa que no ocurrió (Cuadro 3), mientras que

A3, que mostró el menor crecimiento (53%), los inhibió fuertemente (Cuadro 3); lo cual no quiere decir que A4 y A7 no produzcan sideróforos, sino simplemente que éstos no interfieren con la asimilación del hierro de los organismos fitopatógenos probados.

En el cuadro 3 se muestran los diferentes grados de inhibición de los microorganismos fitopatógenos, provocados por los SG. La inhibición alcanzó valores arriba del 90% en los casos de C. fascians con los aislamientos A3, A5, A9 y A10; y P. syringae con los aislamientos A3 y A9; mientras que en otros casos, prácticamente no hubo inhibición, como ocurrió a A. tumefaciens con la cepa C.P.Mex 7 y el aislamiento A7, o a P. syringae con los aislamientos A4 y A7. Como puede observarse un mismo SG presenta diferente grado de inhibición con los diferentes microorganismos probados; esto concuerda con lo mencionado por algunos autores (Neilands, 1981), de que la respuesta particular a los sideróforos (estimulación, inhibición o no interferencia del crecimiento) es consecuencia del grado de especificidad de estos compuestos.

Existe la evidencia para creer que el fenómeno de inhibición observado en las pruebas anteriores es causado, en algunos casos, por sideróforos, esta evidencia está representada en el cuadro 5, en donde el grado de inhibición está relacionado con los niveles de $FeCl_3$ en el medio, como se observa, por ejemplo en A. tumefaciens con A9; y en P. syringae con A5 y A10 (Cuadro 5); este fenómeno ha sido reportado ampliamente (Kloepper et al., 1980a y 1980b; Murphy et al., 1976; y Reeves et al., 1983), ya que al agregar un exceso de hierro al medio,

se saturan los sideróforos y cesa su biosíntesis, quedando el hierro restante libre para ser utilizado por todos los microorganismos.

En los cuadros 6 y 7, podemos ver que el efecto de los SG de A3 y A5 no es letal para A. tumefaciens, por lo que no se descarta que los sideróforos sean los causantes de la inhibición, dado que el mecanismo que utilizan es por competencia nutricional, y en los casos en donde no disminuyó al agregar $FeCl_3$ pudo deberse a que no fue suficiente para saturar a los sideróforos presentes en el medio.

Mientras que las cinéticas de crecimiento son más lentas en medios deficientes en hierro, en contraste, la producción de pigmento es muy marcada, e independiente de la fuente de carbono, en las cepas P. fluorescens 7SRI, Pseudomonas fluorescentes A3, A5, A9 y A10, y R. phaseoli C.P.Mex 46; lo que concuerda con lo ya reportado por algunos autores (Meyer y Abdallah, 1978; Teintze et al., 1981; y Peralta, 1986), que indican que la producción de pigmentos está relacionada, en algunas cepas, con la producción de sideróforos, por lo que se presenta en medios deficientes en hierro y es independiente de la fuente de carbono, u otros elementos, que lo único que hacen es disminuir los requerimientos de hierro, ya que por ejemplo, la glucosa al ser la fuente energética básica, es utilizada por los organismos directamente, mientras que otros azúcares, o compuestos, necesitan ser transformados por enzimas, algunas de las cuales pueden requerir hierro para su funcionamiento. Esto explica también que las cepas A3, A5 y A9 crecieran mejor en el medio MG-Fe que en el M-Fe.

El análisis espectrofotométrico del SG de las cepas (Figuras 11 y 12) reveló la presencia de los sideróforos, tanto en el caso de las Pseudomonas fluorescentes (7SRI, A3, A5, A9 y A10) como en el R. phaseoli (C.P.Mex 46); ya que las primeras mostraron el patrón determinado por Meyer y Abdallah en 1978, y la segunda el reportado por Peralta en 1986; así como los picos más altos en los medios deficientes en $FeCl_3$.

La identificación de los aislamientos reveló que pertenecen al género Pseudomonas, son cepas saprofiticas y la especie está entre P. fluorescens y P. putida; es interesante notar que los cuatro aislamientos, aun perteneciendo a la misma especie, presentaron algunas diferencias, como en el caso de los flagelos, en donde A3 y A9, al igual que la cepa P. fluorescens 7SRI, presentaron tres flagelos en posición polar; mientras que los aislamientos A5 y A10, no los presentaron; sin embargo, pudo deberse a que los flagelos se pierden con mucha facilidad durante la manipulación de las cepas para su tinción. Otra diferencia entre los aislamientos se encuentra en la forma e intensidad de inhibir a las cepas fitopatógenas, mostrando diferencias entre sí y la cepa P. fluorescens 7SRI (Cuadro 5). Ya que, aunque se comporten en forma parecida con una o dos de las cepas fitopatógenas, no ocurre lo mismo con la tercera; como es el caso de los aislamientos A3 y A9, en donde inhiben en forma muy similar a C. fascians y P. syringae, pero a A. tumefaciens (Cuadro 5); por lo que el comportamiento inhibitorio de los cuatro aislamientos es diferente. Tomando en cuenta esto último, si se quisiera, por ejemplo, prevenir o controlar la agalla de la corona (A. tumefa-

ciens) podrían utilizarse los aislamientos A3, A5, A9 ó A10, en donde la eficiencia de inhibición de los tres últimos dependería de la disponibilidad de hierro en el medio, y la del primero sería independiente de los niveles de este elemento; de esta forma, tomando en cuenta el tipo de suelo, podría elegirse el mejor organismo, o combinación de organismos, a utilizar para el control de esta enfermedad; lo mismo ocurriría en los casos del cáncer de yemas y ramas (P. syringae) y la fasciación (C. fascians), en donde se tomaría en cuenta que cepas inhiben el desarrollo de los patógenos, en que grado y si la inhibición depende de los niveles de hierro.

V. CONCLUSIONES

1.- La metodología empleada aquí es suficientemente sensible para identificar microorganismos capaces de causar interferencia sobre otros, y permite diferenciar, con cierta seguridad, cuando dicho mecanismo de inhibición está mediado por sideróforos.

2.- La inhibición observada en 11 de los 15 casos fue mediada por sideróforos, lo cual hace pensar que este mecanismo de interferencia está muy generalizado entre los microorganismos.

3.- La magnitud de la inhibición de microorganismos fitopatógenos, en algunos casos, puede alcanzar valores arriba del 90%.

4.- Es factible, por consiguiente, el control de enfermedades bacterianas en la agricultura empleando cepas de microorganismos saprofíticos o no fitopatógenos capaces de causar inhibición en los primeros.

A P E N D I C E I

PARTE I

Preparación de Medios de Cultivo y Esterilización

Para la preparación de los medios de cultivo se siguieron los procedimientos generales que a continuación se anotán: se utilizaron matraces del doble de la capacidad, en relación a la cantidad de medio; los componentes sólidos y el agar se pesaron y depositaron en el matraz y a continuación se le agregó el volumen correspondiente de agua, la cual fue destilada, excepto en los casos del medio M y sus modificaciones, en donde se utilizó agua tridestilada o deionizada.

La esterilización de las soluciones de glucosa y manitol se efectuó en autoclave eléctrica de vapor a 0.7 Kg cm^{-2} durante 15 minutos; la de las soluciones de vitaminas, antibióticos, FeCl_3 y HCl se efectuó por filtración utilizando membranas Millipore de $0.45 \mu\text{m}$; el agua, los medios, las soluciones restantes y el material de vidrio se esterilizaron a 1.05 Kg cm^{-2} durante 15 minutos.

Para la preparación de los medios que requerían la adición de soluciones previamente esterilizadas, así como el servido de los mismos a cajas de Petri (100 X 20 mm con aproximadamente 25 ml de medio), tubos (15 X 125 mm, con tapón de rosca) y matraces (125 ml con 25 ml de medio), se realizó en la campana de flujo laminar Veco.

Medio CLM y modificaciones.

Las cantidades expresadas a continuación están dadas en relación a 1000 ml de medio.

El procedimiento para la preparación de este medio fue el siguiente: 10 g de manitol y 1 g de extracto de levadura se mezclaron en el matraz con un litro de agua. Una vez estéril se agregaron 0.8 ml de la solución de C-a y 10 ml de la solución C-b (Ver apéndice II), después el medio se sirvió en tubos estériles.

Modificaciones: medio ALM, junto con la levadura y el manitol se agregaron 18 g de agar, este medio se usó para preparar cajas y tubos con medio inclinado; medio ALM Kn, una vez preparado el medio ALM se agregaron 5 ml de la solución de kanamicina (Apéndice II), que dan una concentración final de 50 mg l^{-1} ; medio ALM Nal, al medio ALM se le agregaron 16.5 mg de la pastilla finamente molida de Wintomylon, que da una concentración final de 11 mg l^{-1} de ácido nalidíxico; ALM Tc, al medio ALM se le agregaron 5 ml de la solución de tetraciclina (Apéndice II), que da una concentración de 5 mg l^{-1} , estos tres medios con antibióticos se sirvieron en cajas.

Medio M y modificaciones.

A 900 ml de agua deionizada estéril, se agregaron 10 ml de cada una de las soluciones M-a a M-h (Apéndice II), se sirvió en tubos y matraces.

Modificaciones: M-Fe, al agua se le agregaron las soluciones omitiéndose la M-g, en su lugar se agregó la solución M-i (Apéndice II); medio M+3Fe, en este medio en lugar de la solución M-g se agregó la M-j (Apéndice II); medios MG, MG-Fe y MG+3Fe, en estos casos la solución M-b se sustituyó por 5 ml de la solución de glucosa (Apéndice II); medios SG_xM , $\text{SG}_x\text{M-Fe}$ y $\text{SG}_x\text{M+3Fe}$, en estos medios el volumen de agua fue sustituido

por el sobrenadante de medio gastado (SG) esterilizado por filtración.

Medio BK.

En un matraz que contenía 200 ml de agua, se agregaron en el siguiente orden y disolviendo cada reactivo: 1.5 g de K_2HPO_4 , 1.5 g de $MgSO_4$, 10 ml de glicerol y 20 g de polipeptona, aforando a continuación a un litro de agua. Posteriormente se agregaron 15 g de agar, se esterilizó y sirvió en cajas.

Medio EDC.

En un matraz con 200 ml de agua se disolvieron 10 g de extracto de levadura, 20 g de dextrosa y 20 g de $CaCO_3$, y después de aforar a un litro, se agregaron 15 g de agar. Luego se esterilizó, se agitó y se sirvió en las cajas.

Medio HL.

A un matraz se le agregaron 2 g de peptona, 5 g de NaCl, 0.3 g de K_2HPO_4 , 0.03 g de azul de bromotimol y 10 g de glucosa. El medio se aforó a un litro y se agregaron 3 g de agar. Después se esterilizó y sirvió en tubos.

Medio para producción de levana.

Se agregaron a un matraz 3 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 50 g de sacarosa y se aforó a un litro. A la preparación se le adicionaron 20 g de agar, la cual a continuación se esterilizó y sirvió en cajas.

Medio Thornley.

En un matraz se agregaron: 1 g de peptona, 5 g de NaCl, 0.3 g de K_2HPO_4 , 0.01 g de rojo de fenol y 10 g de L-arginina acidificada con HCl; se aforó a un litro y se agregaron 5 g de agar. Después de esterilizarse se sirvió en tubos.

PARTE II

Elaboración de las Pruebas para la Identificación de los Aislamientos

En las siguientes pruebas todos los inóculos iniciales se tomaron de cultivos de 24 h desarrollados en el medio BK.

Morfología de las colonias.

Las cepas problema fueron sembradas en el medio ALM e incubadas por 72 h; después, las colonias desarrolladas, se observaron al microscopio estereoscópico y se identificó el color, la forma, el borde, el tamaño, el olor, la elevación y la apariencia de la superficie.

Tinción de Gram.

A partir de cultivos crecidos en el medio BK se prepararon frotis bacterianos, los cuales se fijaron al calor; sobre el frotis se agregaron unas gotas de la solución de cristal violeta (Ver apéndice II) dejándolas en contacto por un minuto, los portaobjetos se escurrieron y sobre el frotis se adicionó la solución de lugol (Ver apéndice II). La solución se dejó un minuto y a continuación se decantó, se lavó con etanol al 70% y se agregaron unas gotas de la solución de safranina (Ver apéndice II). Al cabo de 30 segundos, las preparaciones se lavaron con agua de la llave, se secaron y se observaron al microscopio con el objetivo de inmersión. Reacción positiva, se tiñen de violeta; reacción negativa, se tiñen de rojo.

Prueba de fluorescencia.

Esta prueba es específica para Pseudomonas fluorescentes. Las cepas se sembraron en el medio BK, se incubaron y a las 24 h se hizo la observación directa para determinar fluorescencia.

Prueba de óxido-fermentación.

Dos tubos con medio HL se inocularon mediante punción, a uno de ellos se le agregó 1 ml de aceite mineral estéril, se incubaron y a las 72 h se hicieron las observaciones.

Tinción de flagelos.

La tinción se efectuó según el método de Peppler: en un tubo de ensayo con 5 ml de agua estéril se introdujo el asa de siembra con bacterias, la cual se giró "muy suavemente"; se siguió agregando inóculo hasta que la suspensión fue aproximadamente de 3×10^6 células por ml (método nefelométrico). Una gota de esta suspensión se colocó sobre un portaobjetos limpio y se dejó secar al aire, se adicionó el mordente (Ver apéndice II) dejándolo 5 minutos, después la superficie se lavó con agua destilada, se le adicionaron unas gotas de la solución de cristal violeta (Ver apéndice II) dejándolas 2 minutos. A continuación la preparación se lavó con agua destilada, se dejó secar al aire y se observó al microscopio con el objetivo de inmersión.

Prueba de hipersensibilidad.

En el envés de una hoja de tabaco sana, se inyectó aproximadamente 0.5 ml de suspensión bacteriana (10^8 células por ml), con ayuda de una jeringa de insulina estéril.

Prueba de pudrición de papa.

Se utilizó una papa variedad "Alpha" de apariencia sana, la cual se desinfectó lavando la superficie con estropajo y jabón. La papa se enjuagó con agua corriente, pasando a continuación un algodón empapado con hipoclorito de calcio al 3% (Ver apéndice II), el cual se retiró mediante enjuague con agua destilada estéril. En condiciones de esterilidad se cortaron rodajas de aproximadamente 5 mm de espesor; tres se colocaron sobre papel filtro en cada caja Petri (150 X 20 mm). A cada rodaja se le hizo en el centro una incisión con un bisturí; en dos de ellas se untaron tres asadas de un cultivo, distinto para cada rebanada, y al control se le pasó el asa de siembra sin bacterias. Los resultados se obtuvieron a las 24 ó 48 h.

Prueba de hidrolasa de arginina.

Utilizando tubos de medio Thornley, se hicieron inoculaciones mediante punción por duplicado, uno de ellos se cubrió con aceite mineral estéril y ambos se incubaron por 72 h. La prueba es positiva cuando el medio cambia de rosa a rojo.

Prueba de oxidasa.

Se preparó una solución al 1% de monoclórhidrato de N-N-dimetil-p-fenilenediamino (Ver apéndice II), con la cual se mojaron, utilizando unas pinzas, trozos de papel filtro de 2 X 5 cm. Inmediatamente después con una asa de siembra se untó sobre el papel una muestra del cultivo, anotando a los 10 segundos si el papel había virado a rojo-negrizo.

Prueba de producción de levana.

Se tomó una muestra de cada colonia utilizando palillos estériles y se inocularon, tocando con la punta del palillo,

en el medio para producción de levana. Después de 24 h se observaron los resultados; si la colonia se presentaba convexa, amarilla y musilaginosa, la prueba era positiva.

Respuesta a antibióticos.

Esta prueba se hizo para determinar el tipo de resistencia que presentaban las bacterias al ser crecidas en el medio ALM con los antibióticos: Kanamicina (Kn), Acido nalidíxico (Nal) y Tetraciclina (Tc). Sobre la superficie del medio se extendió, con la ayuda de una varilla de vidrio, 0.1 ml de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} de los cultivos bacterianos.

A P E N D I C E I I

PREPARACION DE SOLUCIONES

Las cantidades están consideradas para preparar 100 ml de solución. Las soluciones se esterilizaron en la forma señalada en el apéndice I.

Soluciones para el Medio CIM y Modificaciones

Solución C-a: Contiene 12.03 g de $MgSO_4$

Solución C-b: Contiene 5 g de K_2HPO_4 y 1 g de NaCl

Soluciones para el Medio M y Modificaciones

Solución M-a: 10 g de ác. L-glutámico se disolvieron utilizando una solución 5 M de KOH, ajustando el pH a 6.5, después se aforó con agua deionizada.

Solución M-b: Contiene 10 g de manitol

Solución M-c: Contiene 3 g de KH_2PO_4 y 3 g de Na_2HPO_4

Solución M-d: Contiene 1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Solución M-e: Contiene 5 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

Solución M-f: Para la solución de elementos traza, primero se preparó una solución con 1 g en 100 ml de agua de cada uno de los componentes por separado: H_3BO_3 ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; y se esterilizaron. A parte se esterilizó 88 ml de agua para luego agregarle las soluciones

en la siguiente proporción: 10 ml de H_3BO_3 ;
1 ml de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.5 ml de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$;
0.5 ml de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; y 0.1 ml de $Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$.

Solución M-g: Contiene 10 mg de $FeCl_3$ en 100 ml de HCl
0.1 N

Solución M-h: Esta solución se preparó disolviendo cada una de las vitaminas por separado, en un poco de agua, excepto la Biotina, a la que se le agregaron dos gotas de NaOH 1 N y luego un poco de agua. Se pesaron 10 mg de Biotina, se disolvieron; 10 mg de Tiamina, se disolvieron; y 10 mg de Pantotenato de Calcio, se disolvieron; se reunieron en un sólo matraz y se aforaron a 100 ml.

Solución M-i: Esta solución contiene HCl 0.1 N

Solución M-j: Contiene 30 mg de $FeCl_3$ en HCl 0.1 N

Colorantes y Reactivos

- Cristal violeta: Se pesaron 0.25 g de cristal violeta y 1.25 g de fenol, a los cuales se les agregaron 10 ml de etanol al 97% y 40 ml de glicerina; se aforó con agua.+

- Lugol: Contiene 0.1 g de yodo y 0.2 g de KI.+

- Mordente: 20 g de ácido tánico se disolvieron en 80 ml de agua destilada caliente, se adicionaron 15 ml de la solución de trióxido de cromo; se dejó reposar 4 días a $18^{\circ}C$ y se filtró, utilizando papel filtro.+

- Solución de trióxido de cromo: Contiene 2.5 g de trióxido de cromo.+

- Reactivo para prueba de oxidasa: Contiene 1 g de monoclóhidrato de N-N-dimetil-p-fenilenediamino.+

- Safranina: Contiene 1 g de safranina.+

Soluciones Generales

- Solución de glucosa: Contiene 20 g de glucosa

- Solución salina: Contiene 0.85 g de NaCl

- Solución de Kanamicina: Contiene 1 g de Kanamicina.++

- Solución de Tetraciclina: Contiene 1 g de Tetraciclina.++

- Solución desinfectante: Contiene 3 g de hipoclorito de calcio. Esta solución tiene que ser fresca, máximo de 3 días.+

+ = soluciones que no se esterilizan

++ = soluciones que se renuevan cada 30 días

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. 1985. Fitopatología. Limusa, México. 756 p.
- Armstrong, J.E. and C.V. Baalen. 1979. Iron transport in microalgae: the isolation and biological activity of a hidroxamate siderophore from the blue-green algae Agmenellum quadruplicatum. J. Gen. Microbiol. 111: 253-262.
- Bezkorovainy, A. 1980. Biochemistry of nonheme iron: in biochemistry of the elements. Vol. 1. Plenum Press, New York. 435 p.
- Brown, J.C. 1976. Iron deficiency and boro toxicity in alkaline soils: in plant adaptation to mineral stress in problem soils. Proceedings of a workshop held at the National Agricultural Library, Maryland. pp 83-94.
- Burges, H.D. 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press, London. 949 p.
- Burnham, B.F. and J.B. Neilands. 1961. Studies on the metabolic function of the ferrichrome compounds. J. Biol. Chem. 236: 554-559.
- Burr, T.J., M.N. Schroth and T. Suslow. 1978. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of Pseudomonas fluorescens and P. putida. Phytopathology. 68: 1377-1383.
- Cline, G.R., P.E. Powell, P.J. Szaniszlo and C.P.P. Reid. 1983. Comparison of the abilities of hydroxamic and other natural organic acids to chelate iron and ions in soil. Soil Sci. 136: 145-157.

- Coronado, R. 1965a. Breve historia del uso de enemigos naturales para el combate de plagas agrícolas en México. Fitófilo. 18: 5-9.
- Coronado, R. 1965b. Medios que el ingenio del hombre y la naturaleza ponen a nuestro alcance para el combate de plagas. Fitófilo. 18: 4-20.
- Coronado, R. 1981. Comentarios sobre la evolución de la parasitología agrícola en México. Fitófilo. 34: 59-100.
- Davis, B., R. Dulbecco, H. Eisen, H. Ginsberg, B. Wood y M. McCarty. 1978. Tratado de microbiología. 2a. ed. Salvat, Barcelona. 1559 p.
- Emery, T. 1977. The storage and transport of iron: in metal ions in biological system. Vol. 7. Marcel Dekker, Inc., New York. pp 77-125.
- Ganong, W. 1976. Manual de fisiología médica. 5a. ed. El Manual Moderno, México. 690 p.
- García, M. 1967. Enfermedades de las plantas en la República Mexicana. Limusa, México. 93 p.
- Jaimes, F. 1977. Manual de prácticas de bacterias fitopatógenas. ENA, Chapingo, México. 119 p.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze and M.N. Schroth. 1980a. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature. 286: 885-886.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze and M.N. Schroth. 1980b. Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. Curr. Microbiol. 4: 317-320.
- Kochan. I. 1973. The role of iron in bacterial infections,

- with special consideration of host-tubercle Bacillus interactions. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 60: 1-30.
- Krieg, N. and J. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore. 964 p.
- Leong, J. and J.B. Neilands. 1976. Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria. J. Bacteriol. 126: 823- 830.
- Messiaen, C.M. y R. Lafon. 1968. Enfermedades de las hortalizas. Oikos-tau, Barcelona. 361 p.
- Meyer, J.M. and M.A. Abdallah. 1978. The fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens: biosynthesis, purification and physicochemical properties. J. Gen. Microbiol. 107: 319-328.
- Meyer, J.M. and J.M. Hornsperger. 1978. Role of pyoverdine_{pf}, the iron-binding fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens, in iron transport. J. Gen. Microbiol. 107: 329-331.
- Mullis, K.B., J.R. Pollack and J.B. Neilands. 1971. Structure of schizokinen, an iron-transport compound from Bacillus megaterium. Biochemistry. 10: 4894-4898.
- Murphy, T.P., D.R.S. Lean and C. Nalewajko. 1976. Blue-green algae: their excretion of iron-selective chelators enables them to dominate other algae. Science. 192: 900-902.
- National Academy of Sciences. 1978. Manejo y control de plagas de insectos: en control de plagas de plantas y animales. Vol. 3. Limusa, México. 522 p.

- Neilands, J.B. 1957. Some aspects of microbial iron metabolism. *Bacteriol. Rev.* 21: 101-111.
- Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compound. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.
- Neilands, J.B. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 285-309.
- Ong, S.A., T. Peterson and J.B. Neilands. 1979. Agrobactina, a siderophore from Agrobacterium tumefaciens. *J. Biol. Chem.* 254: 1860-1865.
- Page, E.R. 1966. Sideramines in plants and their possible role in iron metabolism. *Biochem. J.* 100, 34 p.
- Peralta, J.R. 1986. El fenómeno de interferencia en Rhizobium phaseoli (Dangeard). La biología, aspectos evolutivos y posibles aplicaciones. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. 131 p.
- Peters, W.J. and R.A.J. Warren. 1968. Phenolic acids and iron transport in Bacillus subtilis. *Biochim. Biophys. Acta.* 165: 225-232.
- Pollack, J.R., B.N. Ames and J.B. Neilands. 1970. Iron transport in Salmonella typhimurium: mutants blocked in the biosynthesis of enterobactin. *J. Bacteriol.* 104: 635-639.
- Philson, S.B. and M. Llinas. 1982. Siderochromes from Pseudomonas fluorescens isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 257: 8081-8085.
- Powell, P.E., G.R. Cline, C.P.P. Reid and P.J. Szaniszlo. 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature.* 287: 833-834.

- Primo, E. y J.M. Carrasco. 1977. Química agrícola II: Plaguicidas y fitorreguladores. Alhambra, Madrid. 639 p.
- Primo, E. y J.M. Carrasco. 1981. Productos para el campo y propiedades de los alimentos: Tecnología química y agroindustrial. 3a. ed. Alhambra, Madrid. 520 p.
- Reeves, M.W., L. Pine, J.B. Neilands and A. Balows. 1983. Absence of siderophore activity in Legionella species grown in iron deficient media. J. Bacteriol. 154: 324-329.
- Richter, G.W. 1978. The iron-loaded cell-the cytopathology of iron storage. Am. J. Pathol. 91: 361-404.
- Stuart, S.J., K.T. Greenwood and R.K.J. Luke. 1982. Iron-suppressible production of hydroxamate by Escherichia coli isolates. Infect. Immun. 36: 870-875.
- Teuscher, H. y R. Adler. 1965. El suelo y su fertilidad. CECSA, México. 510 p.
- Teintze, M., M.B. Hossain, C.L. Barnes, J. Leong and D. van der Helm. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting Pseudomonas. Biochemistry. 20: 6446-6457.
- Walker, J.C. 1973. Patología vegetal. 2a. ed. Omega, Barcelona. 818 p.
- Weinberg, E.D. 1971. Roles on iron in host-parasite interactions. J. Infect. Dis. 124: 401-410.
- Weinberg, E.D. 1978. Iron and infection. Microbiol. Rev. 42: 45-66.