

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**OBTENCIÓN DEL SIDERÓFORO DE *Pseudomona fluorescens*
PARA SU APLICACIÓN COMO CONTROLADOR
FITOPATÓGENO DEL HONGO *Fusarium oxysporum* EN
CULTIVOS DE *Solanum lycopersicum* (TOMATE)**

Tesis presentada por la Bachiller:
Irma Patricia Valdivia Carbajal

Para optar el Título Profesional de:
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

Asesor:
Ing. Cinthia Córdova Barrios

AREQUIPA – PERÚ
2017

DEDICATORIA

*Dedicado a los seres que me acompañan
y me acompañaron todo este tiempo,
quienes a lo largo de los años me
enseñaron que todo es posible cuando
hacemos la voluntad de Dios y
trabajamos con esfuerzo, alegría y
pasión.*

*Con su bendición sé que lograré lo que
me proponga*

*En memoria de mis abuelos, y otros
seres que ya no se encuentran
conmigo, a los cuales los amo y
extraño mucho.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios, que a lo largo de este tiempo me ha enseñado a ser una mujer mucho más fuerte; a enfrentar la vida con una sonrisa, y por mostrarme que puedo ser capaz de muchas más cosas de las que me propongo.

A mis amados padres; Eduardo y Patricia; por cuidarme, apoyarme siempre y enseñarme que no hay límites para lograr lo que te propones.

A mi amado hermano Jorge; por ser más que mi hermano, mi mejor amigo y cómplice incondicional.

A mis queridos y amados abuelitos; Manuel, Irma, Jorge y Rosa; por guiarme desde el cielo y mostrarme siempre que están conmigo.

A mi querido Colegio Esclavas del Sagrado Corazón de Jesús; por acogerme en sus aulas once años de mi vida y enseñarme no solo materias, sino también valores que han hecho de mí, una mujer de principios.

A mi estimada Universidad Católica de Santa María, pero sobre todo a mi Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica; por brindarme en estos cinco años los conocimientos necesarios para salir al mundo y ser una profesional de éxito con principios morales y éticos.

A la Dra. María del Rosario Sun Kou, por todos los conocimientos brindados, el cariño y la ayuda necesaria a lo largo de la investigación.

Al Dr. José Villanueva; por su apoyo incondicional y brindarme su gran amistad.

A la Ing. Cinthia Córdova; por su amistad y brindarme la confianza necesaria para desarrollar el presente trabajo de investigación.

A la Dra. Mercedes Jave; por su gran apoyo, confianza y contribuir en mi formación profesional.

Al Dr. Iván Paz; por sus consejos y compartir sus conocimientos.

... y a todos aquellos que me brindaron un poquito de sus conocimientos a lo largo de mi vida, les estoy eternamente agradecida.

INDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN	iii
OBJETIVOS	v
HIPÓTESIS	vi
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1. SIDERÓFORO	1
1.1. DEFINICIÓN.....	1
1.2. TIPOS DE SIDERÓFOROS.....	2
1.2.1. SIDERÓFOROS MICROBIANOS.....	2
1.2.2. FOTOSIDERÓFOROS.....	4
1.3. MECANISMO DE LOS SIDERÓFOROS.....	5
1.4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DEL SIDERÓFORO.....	10
2. SIDERÓFOROS MICROBIANOS	13
2.1. <i>Pseudomona fluorescens</i>	13
3. METODOLOGÍA APLICADA A LOS SIDERÓFOROS	18
3.1. ENSAYO PARA LA DETECCIÓN Y ESTIMACIÓN DEL SIDERÓFORO.....	18
3.1.1. MEDIO CROMO AZUROL S (CAS).....	18
3.2. ENSAYOS PARA LA SEPARACIÓN DEL SIDERÓFORO.....	19
3.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	19
3.2.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	21
3.2.3. ELECTROFORESIS CAPILAR.....	21
3.3. ENSAYO DE IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURA QUÍMICA DEL SIDEROFÓRO.....	22
3.3.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	22

1.1.	INSUMOS.....	37
1.2.	MATERIALES DE LABORATORIO.....	37
1.3.	MATERIAL DE VIDRIO.....	38
1.4.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	38
1.5.	REACTIVOS QUÍMICOS.....	38
1.6.	MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO.....	40
1.7.	EQUIPOS DE LABORATORIO.....	40
1.8.	OTROS MATERIALES.....	41
2.	MÉTODOS.....	42
2.1.	AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA Y BIOQUÍMICA DE <i>Pseudomona fluorescens</i>	42
2.2.	AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA DE <i>Fusarium oxysporum</i>	42
2.3.	PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA LA PRODUCCIÓN DEL SIDERÓFORO A PARTIR DE <i>Pseudomona fluorescens</i>	43
2.4.	OBTENCIÓN, DETECCIÓN Y ESTIMACIÓN DEL SIDERÓFORO.....	43
2.5.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL CULTIVO.....	44
	2.5.1. Optimización del pH del medio.....	44
	2.5.2. Suplementación de la fuente de carbono.....	44
	2.5.3. Influencia de la concentración de hierro.....	44
2.6.	OBTENCIÓN OPTIMIZADA DEL SIDERÓFORO A PARTIR DE LA <i>Pseudomona fluorescens</i>	44
2.7.	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SIDERÓFORO OBTENIDO A PARTIR DE <i>Pseudomona fluorescens</i>	46
2.8.	DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL SIDERÓFORO OBTENIDO A PARTIR DE <i>Pseudomona fluorescens</i>	46

2.9.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICÓTICA <i>IN VITRO</i> DEL SIDERÓFORO OBTENIDO POR <i>Pseudomona fluorescens</i>	46
2.10.	UTILIZACIÓN DEL SIDERÓFORO COMO INHIBIDOR DEL <i>Fusarium oxysporum</i> EN CULTIVOS DE <i>Solanum lycopersicum</i> (TOMATE) INFECTADAS.....	47
CAPÍTULO III.....		48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		48
3.1.	AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA Y BIOQUÍMICA DE <i>Pseudomona fluorescens</i>	49
3.2.	AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA DE <i>Fusarium oxysporum</i>	59
3.3.	PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA LA PRODUCCIÓN DEL SIDERÓFORO A PARTIR DE <i>Pseudomona fluorescens</i>	61
3.4.	OBTENCIÓN, DETECCIÓN Y ESTIMACIÓN DEL SIDERÓFORO.....	61
3.5.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL CULTIVO.....	62
3.5.1.	Optimización del pH del medio.....	63
3.5.2.	Suplementación de la fuente de carbono.....	64
3.5.3.	Influencia de la concentración de hierro.....	65
3.6.	OBTENCIÓN OPTIMIZADA DEL SIDERÓFORO A PARTIR DE LA <i>Pseudomona fluorescens</i>	68
3.7.	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SIDERÓFORO OBTENIDO A PARTIR DE <i>Pseudomona fluorescens</i>	70
3.8.	DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL SIDERÓFORO OBTENIDO A PARTIR DE <i>Pseudomona fluorescens</i>	70

3.9. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICÓTICA <i>IN VITRO</i> DEL SIDERÓFORO OBTENIDO POR <i>Pseudomona fluorescens</i>	73
3.10. UTILIZACIÓN DEL SIDERÓFORO COMO INHIBIDOR DEL <i>Fusarium oxysporum</i> EN CULTIVOS DE <i>Solanum lycopersicum</i> (TOMATE) INFECTADAS.....	74
CONCLUSIONES	77
RECOMENDACIONES	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	89



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras Químicas de las unidades formadoras de los sideróforos microbianos.....	2
Figura 2. Estructuras químicas de algunos ejemplos representativos de sideróforos microbianos.....	3
Figura 3. Estructura química del ácido mugineico realizado con el software ChemSketch.....	4
Figura 4. Mecanismos de los sideróforos microbianos para la captura y solubilización de hierro.....	6
Figura 5. Mecanismo de la captura de hierro en bacterias Gram Negativas.....	9
Figura 6. Estructura de las bacterias Gram negativas.....	13
Figura 7. Comparación de la Membrana y Pared Celular de las Bacterias Gram Negativas y Gram Positivas.....	14
Figura 8. Ámbito funcional y nichos ambientales del género <i>Pseudomonas</i> , destacando la amplia distribución del complejo de especies de <i>Pseudomona fluorescens</i>	17
Figura 9. Viraje de coloración de la solución de Cromo Azurol S (CAS) debido a la presencia de un quelante de hierro.....	18
Figura 10. Viraje de coloración en placa del medio Cromo Azurol S (CAS).....	19
Figura 11. Distribución de un HPLC.....	20
Figura 12. Diagrama de un espectrómetro de masas.....	22
Figura 13. Plantaciones de <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate) a nivel Industrial.....	26
Figura 14. Características macro y microscópicas para la caracterización taxonómica del <i>Fusarium oxysporum</i>	34
Figura 15. Ciclo Biológico de la acción del <i>Fusarium oxysporum</i> sobre <i>Solanum lycopersicum</i>	36
Figura 16. Sistema de Reacción para la obtención optimizada del sideróforo a partir de <i>Pseudomona fluorescens</i>	45

Figura 17. <i>Pseudomona</i> aislada a partir de la rizosfera de <i>Capsicum pubescens</i> : A) Medio Cetrimide sin luz UV. B) Medio Cetrimide bajo luz UV de rango corto.....	50
Figura 18. Caracterización Microscópica mediante la aplicación de la Tinción de Gram a 100x.....	51
Figura 19. Caracterización Bioquímica en Medio TSI.....	52
Figura 20. Caracterización Bioquímica en Medio LIA.....	53
Figura 21. Caracterización Bioquímica en Medio CS.....	54
Figura 22. Caracterización Bioquímica en Medio Urea.....	55
Figura 23. Caracterización Bioquímica en Medio SIM.....	56
Figura 24. Prueba rápida de Catalasa.....	57
Figura 25. Prueba rápida en Tira de Oxidasa.....	58
Figura 26. <i>Fusarium oxysporum</i> aislado en Medio PDA a partir de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> infectadas.....	59
Figura 27. Características Microscópicas con Tinción de Azul de Lactofenol a 40X.....	60
Figura 28. Medio CAS sembrado con <i>Pseudomona fluorescens</i> obtenida mediante el Medio de Ácido Succínico deficiente en hierro.....	61
Figura 29. Estimación mediante la aplicación del Reactivo Cromo Azurol S (CAS).....	62
Figura 30. Evaluación de la acción del pH sobre la obtención de unidades de sideróforo obtenidas.....	63
Figura 31. Evaluación de las diversas fuentes e carbono sobre el porcentaje de unidades de sideróforo obtenido.....	65
Figura 32. Influencia de las diversas Concentraciones de Cloruro de Hierro sobre el porcentaje de unidades de sideróforo obtenidas y el crecimiento microbiano de la <i>Pseudomona fluorescens</i>	67
Figura 33. Evaluación de la Cinética de Crecimiento vs el Porcentaje de Unidades de sideróforo obtenido.....	69

Figura 34. Cristales de sideróforo obtenido a partir del Medio de Ácido Succínico deficiente en hierro.....	70
Figura 35. Análisis Espectral del sideróforo aislado en Medio de Ácido Succínico	71
Figura 36. Cromatograma del sideróforo producido por la <i>Pseudomona fluorescens</i>	72
Figura 37. Actividad antimicótica del sideróforo sobre el <i>Fusarium oxysporum</i>	73
Figura 38. Sistema Vasculare de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate) a diversos estadios infectadas con <i>Fusarium oxysporum</i>	76



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características Bioquímicas Diferenciales de algunas especies de <i>Pseudomona</i>	15
Tabla 2.	Taxonomía del Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	23
Tabla 3.	Resultados del Medio TSI (Triple Azúcar Hierro).....	51
Tabla 4.	Resultados del Medio LIA (Lisina Hierro Agar).....	53
Tabla 5.	Resultados del Medio CS (Citrato de Simmons).....	54
Tabla 6.	Resultados del Medio Urea.....	55
Tabla 7.	Resultados del Medio SIM (Ácido Sulfhídrico, Indol, Movilidad).....	56
Tabla 8.	Porcentaje de Unidades de sideróforo obtenidas a diversos pH.....	63
Tabla 9.	Porcentaje de Unidades de sideróforo obtenidas dependiendo de las diversas fuentes de carbono.....	64
Tabla 10.	Porcentaje de Unidades de sideróforo obtenidas dependiendo de las diversas concentraciones de $FeCl_3$	66
Tabla 11.	Cinética de Crecimiento de la <i>Pseudomona fluorescens</i> y la obtención del sideróforo.....	68
Tabla 12.	Actividad Antimicóticas del sideróforo.....	73
Tabla 13.	Condiciones iniciales que se encuentran las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate).....	74
Tabla 14.	Condiciones finales que se encuentran las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

- (NH₄)₂SO₄**: Sulfato de Amonio.
- CAS**: Cromo Azurol S.
- CS**: Medio Citrato de Simmons.
- FeCl₃.6H₂O**: Cloruro de Hierro (III) Hexahidratado.
- FeCl₃.H₂O**: Cloruro de Hierro (III) Monohidratado.
- HCl**: Ácido Clorhídrico.
- HDTMA**: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio.
- HPLC**: Cromatografía Líquida de Alta Performance.
- K₂HPO₄**: Fosfato dipotásico.
- KH₂PO₄**: Fosfato de potasio monobásico.
- LIA**: Lisina Hierro Agar.
- MECV**: Microorganismos Mejoradores del Crecimiento Vegetal.
- MgSO₄**: Sulfato de Magnesio.
- NaCl**: Cloruro de Sodio.
- NADH**: Nicotidamina Adenina Dinucleótido de Hidrógeno.
- NADPH**: Nicotidamina Adenina Dinucleótido de Fosfato.
- NaOH**: Hidróxido de Sodio.
- NH₄Cl**: Cloruro de Amónio.
- PBP**: Proteína de Unión Periplasmática.
- PDA**: Medio Papa Dextrosa Agar.
- PIPES**: piperazina- N, N- bis (2 – etanosulfónico)
- SIM**: Movilidad, Indol, Ácido Sulfhídrico.
- SM**: Medio de Ácido Succínico.
- TSI**: Triple Azúcar Hierro.

RESUMEN

Las plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate) son atacadas por diversas enfermedades, siendo una de ellas la causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, generando marchitamiento vascular lo cual deja cuantiosas pérdidas económicas en el sector agrícola, por ello, el presente trabajo de investigación pretende aislar, purificar y detectar el sideróforo obtenido a partir de la *Pseudomona fluorescens*, aplicado como un controlador fitopatógeno sobre la inhibición *in vitro* e *in vivo* del *Fusarium oxysporum*.

La *Pseudomona fluorescens* y el *Fusarium oxysporum* fueron aislados, identificados y caracterizados. A partir de *Pseudomona fluorescens* se obtuvo el sideróforo en el medio de ácido succínico deficiente de hierro, el cual dio positivo en el Medio Cromo Azurol S (CAS) y tuvo una estimación de 84.3% de unidades de sideróforo luego de 24 horas. La optimización de los parámetros del medio del cultivo para la extracción del sideróforo, se obtuvo que un pH 7, la utilización de la glucosa como fuente de carbono y la ausencia de fuente de hierro, producen mayor cantidad del sideróforo. Se consiguió un 4.4% p/v de cristales con coloración amarillo fluorescente mediante operaciones de evaporación y filtración. El análisis espectral indicó una máxima absorbancia a 403 nm, esta longitud de onda se utilizó para realizar un HPLC donde se generó tres tiempos de retención (14.91 min, 16.98 min y 18.44 min) característicos del sideróforo. También se vio que 65 ppm del sideróforo generaron la inhibición del *Fusarium oxysporum*, evidenciado con un halo de 42 mm y mejorando la turgencia y el crecimiento de hojas y tallos de *Solanum lycopersicum* infectadas en estadios iniciales.

PALABRAS CLAVES: sideróforo, marchitamiento vascular, *Pseudomona fluorescens*, *Fusarium oxysporum*, *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

The plants of *Solanum lycopersicum* (Tomato) are attacked by several diseases, one of them being caused by the fungus *Fusarium oxysporum*, generating vascular wilting which leaves considerable economic losses in the agricultural sector, for this reason, the present research work tries to isolate, To purify and to detect the siderophore obtained from *Pseudomonas fluorescens*, applied like a phytopathogenic controller on the inhibition *in vitro* and *in vivo* of *Fusarium oxysporum*.

Pseudomonas fluorescens and *Fusarium oxysporum* were isolated, identified and characterized. From the *Pseudomonas fluorescens* the siderophore was obtained in the iron deficient succinate medium, which was positive in the Chrome Azurol S Medium and had an estimate of 84.3% of siderophore units after 24 hours. The optimization of the parameters of the culture medium for the extraction of the siderophore, was obtained that a pH 7, the use of the glucose as carbon source and the absence of iron source, produce greater quantity of the siderophore. 4.4% w / v of crystals with fluorescent yellow color were obtained by evaporation and filtration. The spectral analysis indicated a maximum absorbance at 403 nm, this wavelength was used in the HPLC where three retention times (14.91 min, 16.98 min and 18.44 min) characteristic of siderophore were generated. It was also observed that 65 ppm of siderophore generated inhibition of *Fusarium oxysporum*, evidenced with a halo of 42 mm and improving the turgidity and growth of infected leaves and stems of *Solanum lycopersicum* in the early stages.

KEYWORDS: *siderophore, vascular wilt, Pseudomonas fluorescens, Fusarium oxysporum, Solanum lycopersicum*

INTRODUCCIÓN

Los sideróforos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, producidos por microorganismos y plantas, que se producen en medios que tienen condiciones de escasez o ausencia de hierro. La función primaria de estos compuestos es la de quelar el ion hierro (Fe^{+3}) de diferentes hábitats tanto terrestres como acuáticas. ⁽¹⁾

Dependiendo del organismo que lo produce, existen dos grandes familias: los sideróforos microbianos y los fitosideróforos. ⁽²⁾⁽³⁾

Los microorganismos producen una variedad de sideróforos, los cuales se pueden clasificar según el grupo ligando que tenga: el ácido hidraxámico, catecol ácido carboxílico. También hay ciertos tipos de sideróforos bacterianos que contienen una mezcla de los grupos funcionales antes mencionados, el cual lleva como nombre pioverdina, que generalmente se encuentra en el género *Pseudomona*. ⁽⁴⁾⁽⁵⁾

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* participa en el control biológico de fitopatógenos de cultivos agrícolas, la cual es un habitante común de la rizosfera, y se caracteriza por producir agentes quelantes denominados sideróforos. ⁽⁶⁾

Dichos compuestos han recibido mucha atención en los últimos años, debido a las diferentes aplicaciones que tienen en diversas áreas de investigación, sobre todo en el lado ambiental. ⁽⁷⁾

Por tal motivo, los sideróforos pueden suplir funciones como biocontroladores, biosensores, aplicados en mecanismos de biorremediación y hasta en el blanqueado del papel. ⁽⁸⁾⁽⁹⁾

En cuanto a la función del sideróforo como biocontrolador, lo que hace es competir con el agente patógeno por la disponibilidad del hierro; y al encontrarse el agente patógeno deficiente en dicho elemento, se ve inhibida su proliferación. ⁽⁷⁾

Un ejemplo de agente patógeno es el *Fusarium oxysporum*, el cual es un hongo que afecta las cosechas de una gran variedad de plantas; entre ellas las plantaciones de *Solanum lycopersicum* (tomate); dando como resultado el marchitamiento vascular de la misma, lo cual genera pérdidas severas en los cultivos susceptibles, cuando las temperaturas del suelo son superiores a 22 °C. ⁽¹⁰⁾

La investigación a realizar, tiene como justificación tecnológica la generación de datos aplicativos que pueden ser utilizados en otros trabajos de investigación relacionados a la utilización de sideróforos. Como justificación ambiental, determinar la actividad del sideróforo como agente inhibidor del crecimiento del *Fusarium oxysporum* sobre las plantaciones de *Solanum lycopersicum* (Tomate) infectadas por tal hongo. En cuanto a la justificación social, pretende evitar que los agricultores pierdan los cultivos de *Solanum lycopersicum* (Tomate), por acción del *Fusarium oxysporum*. Finalmente, se tiene como justificación cultural ampliar los conocimientos y las aplicaciones de los sideróforos, obtenida a partir de la *Pseudomona fluorescens*.

En el presente trabajo de investigación se pretende extraer, aislar y purificar el sideróforo a partir de *Pseudomona fluorescens*; para luego en una segunda etapa, dicho sideróforo pueda ser aplicado como un biocontrolador en las plantaciones de *Solanum lycopersicum* afectadas por el patógeno *Fusarium oxysporum*. ⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

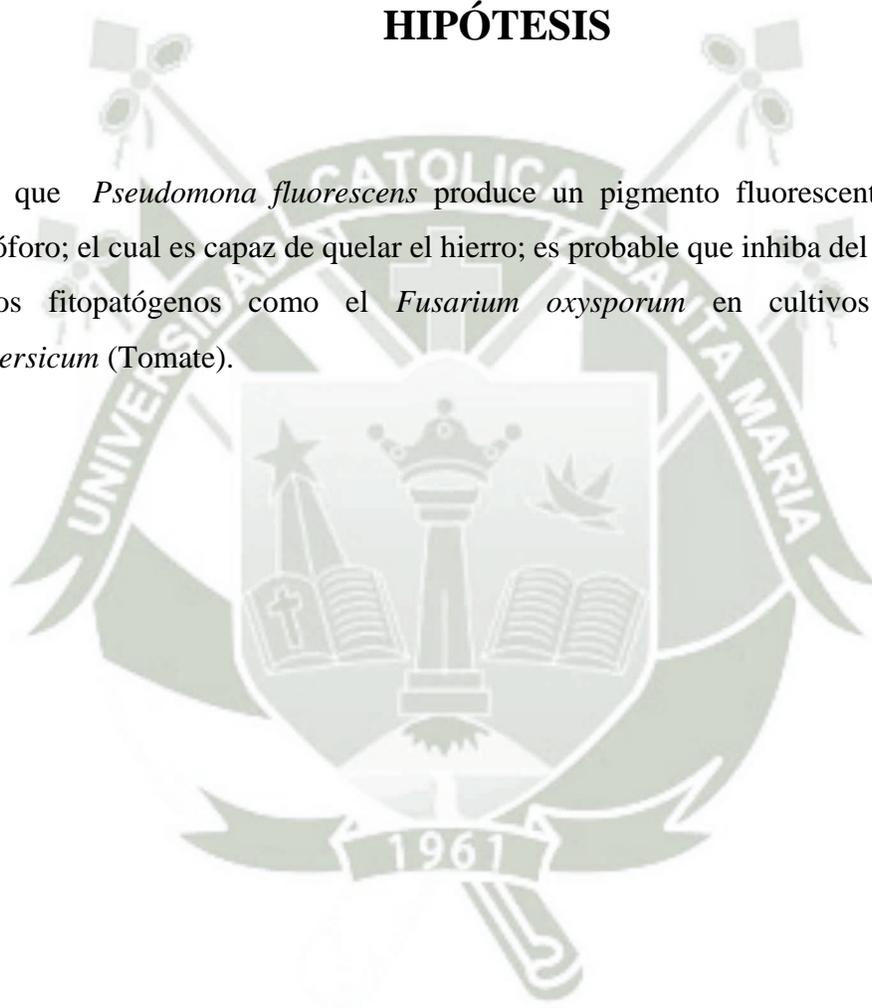
- Obtener el sideróforo de *Pseudomona fluorescens* para la aplicación como controlador fitopatógeno del hongo *Fusarium oxysporum* en cultivos de *Solanum lycopersicum* (Tomate)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar, caracterizar e identificar *Pseudomona fluorescens* y *Fusarium oxysporum*.
2. Obtener, detectar y estimar la cantidad de sideróforo a partir de la *Pseudomona fluorescens*.
3. Optimizar las condiciones del cultivo para la extracción del sideróforo obtenido a partir de la *Pseudomona fluorescens*.
4. Extraer, purificar y detectar el sideróforo obtenido a partir de *Pseudomona fluorescens*.
5. Determinar la presencia del sideróforo mediante HPLC.
6. Evaluar la capacidad antimicótica del sideróforo contra el *Fusarium oxysporum* tanto *in vitro* como *in vivo* en cultivos de *Solanum lycopersicum*.

HIPÓTESIS

Dado que *Pseudomona fluorescens* produce un pigmento fluorescente denominado sideróforo; el cual es capaz de quelar el hierro; es probable que inhiba del crecimiento de hongos fitopatógenos como el *Fusarium oxysporum* en cultivos de *Solanum lycopersicum* (Tomate).



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. SIDERÓFORO

1.1. DEFINICIÓN

Hasta el momento se han identificado más de 500 tipos de sideróforos y alrededor de 270 se encuentran caracterizados estructuralmente. Dichos componentes son quelantes orgánicos producidos por microorganismos y plantas para que el hierro se encuentre accesible. Tienen bajo peso molecular, y presentan una alta y específica afinidad por el Fe (III). Además poseen una elevada constante de formación de complejos férricos, lo que permite disociar fácilmente a ese metal de la proteína acarreadora de hierro. ⁽¹³⁾

La gran afinidad y selectividad del sideróforo por el Fe (III) es debido a tres razones: 1) la estricta selección de los grupos de metales que se unen, 2) el número de unidades de unión y 3) la composición estereoquímica.

Los sideróforos han recibido mucha atención en los últimos años debido a su potencial rol y aplicaciones en varias áreas de investigación ambiental. ^{(14) (15)}

1.2. TIPOS DE SIDERÓFOROS

Los sideróforos se dividen dependiendo del organismo que los produce; por lo tanto existen 2 grandes familias: los sideróforos microbianos y los fitosideróforos. ^{(7) (16)}

1.2.1. SIDERÓFOROS MICROBIANOS

Tienen un peso molecular de 200 a 2000 Da. Los sideróforos identificados pueden contener uno de los siguientes grupos ligando: el ácido hidraxámico, catecol, el ácido carboxílico o α - hidroxocarboxílico. Dependiendo de ello se encuentran los catecolatos, hidroxamatos y carboxilatos; los cuales forman complejos estructurales octaédricos hexadentados con el metal. ^{(17) (18)} Dependiendo del sideróforo algunos son más eficaces que otros al quelar el hierro; además algunos microorganismos solo producen una clase de sideróforo, mientras que otros producen más de dos para colonizar diferentes ambientes. Por ejemplo el género *Pseudomonas* produce sideróforos del tipo hidroximato (ferribactina, pseudobactina), pero también producen del tipo catecol y otros que son una mezcla (pioverdina). ⁽¹⁷⁾

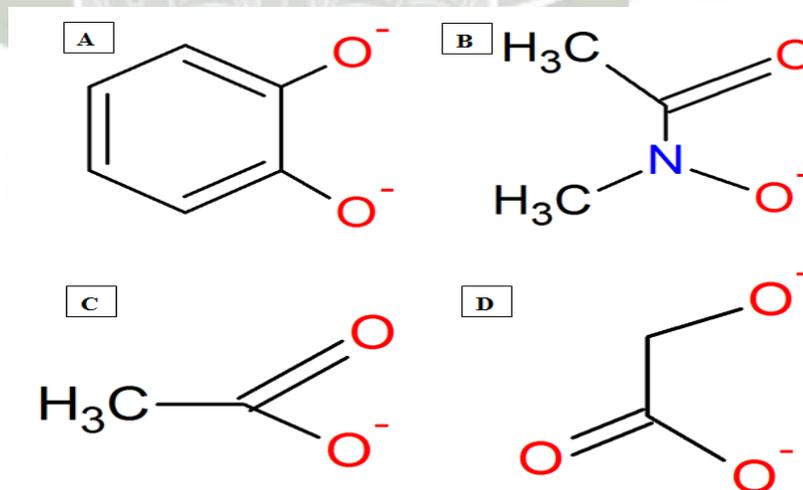


Figura 1. Estructuras Químicas de las unidades formadoras de los sideróforos microbianos. ⁽¹⁴⁾

En la figura 1 se muestran las unidades formadoras de los sideróforos, las cuales son A) Catecolatos, B) Hidroxamatos, C) Carboxilatos D) α -Hidroxicarboxilatos. Todas las estructuras químicas se realizaron utilizando el software ChemSketch.

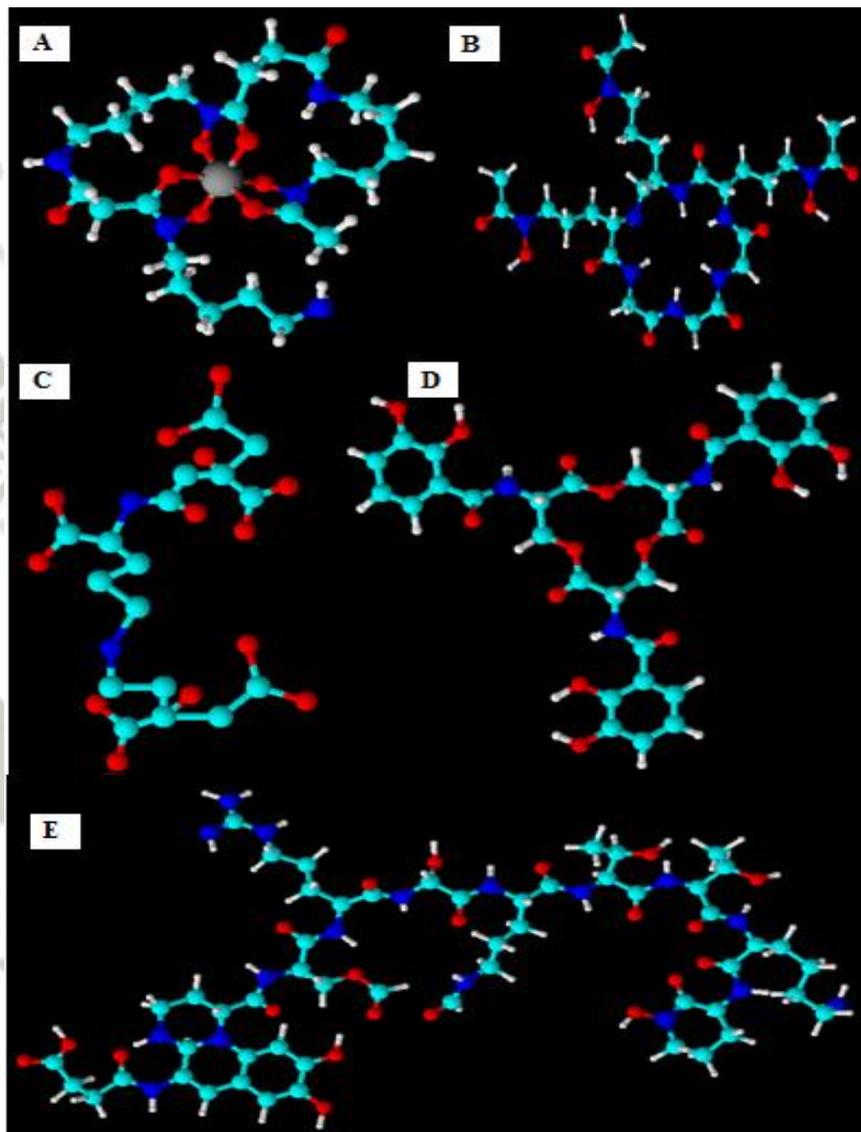


Figura 2. Estructuras químicas de algunos ejemplos representativos de sideróforos microbianos. ⁽⁷⁾

En la Figura 2 se muestran diversos ejemplos dependiendo de las unidades formadoras. En el caso de los hidroxamatos tenemos que

la ferrioxamina B ⁽¹⁹⁾ (Figura A), la cual es producida por una bacteria, el ferricromo ⁽²⁰⁾ (Figura B), que es producido por hongos. Para los catecolatos tenemos como ejemplo la staphyloferrina A ⁽²¹⁾ (Figura C), carboxilatos la enterobactina ⁽²²⁾ (Figura D), y en el caso de sideróforos mixtos a la pioverdina ⁽²³⁾ (Figura E). Todas las estructuras químicas se realizaron utilizando el software ChemSketch.

1.2.2. FITOSIDERÓFOROS

Son grupos ligando hexadentados que coordinan el Fe (III) con los grupos carboxilos y amino.

El ácido mugineico es el más común y el primer fitosideróforo identificado.

Además pueden ser aislados a partir de plantas gramíneas como el ácido avénico a partir de la avena (*Avena sativa*). Varios estudios mostraron que especies vegetales como la cebada, centeno y trigo, que producen una alta concentración de fitosideróforos, son más resistentes a la deficiencia de hierro, en comparación con otras especies como el maíz, el sorgo y el arroz, las cuales producen baja concentración de sideróforos. ^{(7) (24)}

En comparación con los sideróforos microbianos, los fitosideróforos poseen un peso molecular de 500 a 1000 Da. ⁽¹⁴⁾

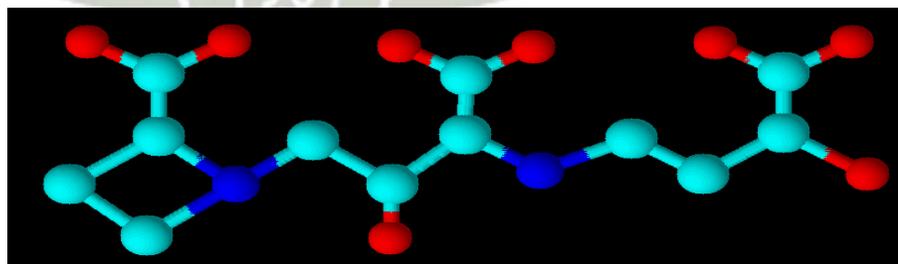


Figura 3. Estructura química del ácido mugineico realizado con el software ChemSketch. ⁽⁷⁾

1.3. MECANISMO DE LOS SIDERÓFOROS

Debido a la baja disponibilidad del hierro en el ambiente, hay algunos genes involucrados en la obtención y captura de sideróforos microbianos; los cuales son descomprimidos, generando un incremento en la producción de estas moléculas; y a su vez de las proteínas involucradas en su captura. En ocasiones donde hay elevadas concentraciones de hierro en el medio, las proteínas microbianas represoras que dependen de Fe (II) se unen al ADN situado antes de los genes involucrados en la obtención de sideróforos, lo que impide su síntesis. Por otro lado cuando hay bajas concentraciones de hierro, el Fe (II) se separa de las proteínas represoras, lo que activa la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de los sideróforos microbianos. ⁽²⁴⁾

En bacterias Gram Negativas y Gram Positivas ricas en adenina y timina, la síntesis de los sideróforos es usualmente regulado por el represor Fur (*regulador de la captura de hierro férrico*), el cual es una metaloproteína de Zinc; mientras que el gen regulador denominado DtxR realiza esta función solo en bacterias Gram positivas ricas en guanina y citosina. ^{(7) (24)}

Los sideróforos son secretados al ambiente extracelular donde capturan y solubilizan el hierro. Luego, los sideróforos son reconocidos por receptores específicos que se encuentran en la membrana externa de la célula. En este punto, el complejo Fe (III) - sideróforo puede ser utilizado por las bacterias a través de dos mecanismos. ⁽²⁴⁾

En la mayoría de bacterias, todo el complejo Fe (III) - sideróforo es transportado activamente a través de la membrana celular, mientras que en hongos y otros organismos eucariotas dicho complejo puede ser reducido extracelularmente a Fe (II). ^{(3) (17) (24)}

Unidos a los mecanismos de captación, se encuentran los sistemas encargados de transportar el hierro hacia el interior de la célula. Por ello, existen dos mecanismos generales a través de los cuales los microorganismos asimilan el hierro del organismo hospedero. El primero involucra la obtención de hierro a través de receptores semejantes que utilizan queladores

La principal diferencia entre estos dos mecanismos consiste que en el primer caso, los sideróforos y el Fe (II) pueden ser tomadas por las células bacterianas como moléculas intactas; mientras que en el segundo caso el hierro debe ser extraído de la proteína acarreadora de hierro (transferrina o lactoferrina) antes de ser transportadas hacia las células bacterianas. La captura del hierro a partir de la transferrina, lactoferrina y sideróforos se ha identificado tanto en bacterias Gram Negativas y Gram Positivas. ^{(18) (24)}

En el caso de las bacterias Gram Negativas la membrana externa es una membrana permeable, la cual cumple la función de proteger a las bacterias de toxinas, enzimas y detergentes. Además, cuenta con la presencia de porinas en la membrana externa, lo cual permite la difusión pasiva de pequeños solutos. La transferrina, lactoferrina y los complejos Fe (III) - sideróforo tienen mayor tamaño que las aberturas de las porinas y por tanto, requieren receptores específicos externos de membrana para la internalización al espacio periplásmico. A diferencia del transporte de solutos por la vía de las porinas, los complejos sideróforo-receptor presentan constantes de disociación extremadamente pequeñas que van de 10^6 a 10^9 , lo cual genera una máxima eficiencia en la internalización cuando hay concentraciones muy bajas del ligando. ^{(16) (24)}

A continuación, se requiere de un receptor de membrana externo, una proteína de unión periplásmica (*PBP*) y un transportador membranar interno del tipo ABC (*proteínas de unión al casete de ATP*). Las bacterias Gram Negativas carecen de un gradiente de iones o ATP establecido para lograr la energía requerida para el transporte, debido a esta diferencia, el requerimiento energético es obtenido a través del acoplamiento de la fuerza protón de la membrana citoplásmica a la membrana externa a través de las proteínas TonB, ExbB y ExbD. ⁽²⁴⁾

A diferencia de las bacterias Gram Negativas, las Gram Positivas carecen de membrana externa, pero la envoltura celular comprende una gruesa capa de peptidoglicanos. La pared celular se une a la membrana citoplásmica

mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La pared celular está compuesta de mureína, polisacáridos, ácidos teicoicos y proteínas propias de la pared celular es todo lo que separa al citoplasma de las bacterias de su entorno. Esto sugiere que el tamaño relativamente pequeño de los sideróforos producidos les permite difundirse libremente a través de la pared bacteriana, desde el interior celular hacia el medio externo. Sin embargo, existen mecanismos de recepción específica, donde el complejo Fe (III) – sideróforo es reconocido por proteínas específicas ancladas en la membrana plasmática (semejantes a las proteínas PBP de las bacterias Gram Negativas) y posteriormente transportado por el complejo ABC-dependiente de permeasas al interior de la célula. El paso a través de la membrana citoplasmática es menos específico que la traslocación a través de la membrana externa. ^{(7) (16)}
(24)

Una vez que el complejo Fe (III) - sideróforo ha ingresado al citoplasma, puede llevarse a cabo su reducción a través de una reductasa de membrana aprovechando un entorno periplásmico con pH bajo o mediante la utilización de un gran número de reductasas citoplásmicas del complejo Fe (III) - sideróforo. En todos estos casos se utiliza como agente reductor al NADH y al NADPH como fuente de electrones. Una vez ubicado en el citoplasma de las células, el complejo Fe (III) - sideróforo es reducido lentamente para formar un complejo Fe (II) - sideróforo a partir del cual el Fe (II) es liberado finalmente en el citoplasma. Esto ocurre principalmente en el caso de ligandos de sideróforo débiles, como hidroxamatos y carboxilatos. ^{(16) (24)}

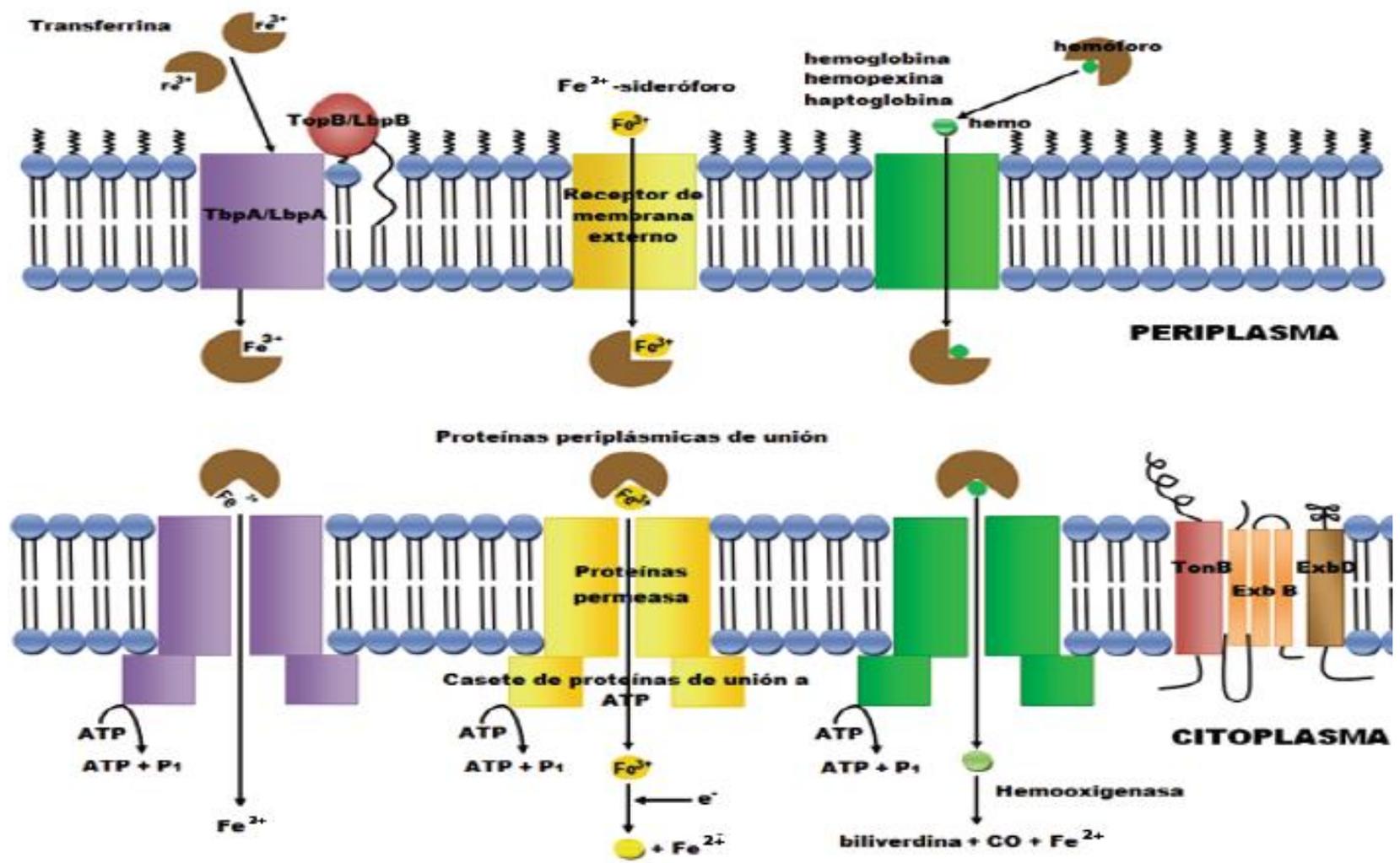


Figura 5. Mecanismo de la captura de hierro en bacterias Gram Negativas. ⁽²⁴⁾

1.4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DEL SIDERÓFORO

A continuación veremos algunas aplicaciones del sideróforo microbiano en diversas áreas de la biotecnología:

- **Mejorar el crecimiento y el control de agentes patógenos en plantas:** Se ha sugerido que los sideróforos son una alternativa ecológica a los pesticidas peligrosos. Durante más de tres décadas se ha sabido que diferentes especies de *Pseudomonas* pueden mejorar el crecimiento de las plantas produciendo sideróforos y / o protegiéndolos de patógenos, por lo que este grupo se clasificó como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas. Además, el papel significativo de los sideróforos en el mecanismo de control biológico. Este mecanismo depende del papel de los sideróforos como competidores por el hierro con el fin de reducir la disponibilidad para los fitopatógenos. ^{(7) (16)}
- **Biocontrol de patógenos en peces:** Los sideróforos juegan un papel importante en el control de la enfermedad de los peces limitando el hierro que es necesario en la virulencia y las interacciones bacterianas. La bacteria patógena media la producción de enzimas nocivas tales como proteasas y colesterol acil transferasa para resistir los mecanismos de defensa del huésped y mediante la producción de transferrina para competir el hierro con el huésped y suprimir su crecimiento como mecanismo de biocontrol. Depende principalmente de la competencia entre la transferrina producida por patógenos y el sideróforo producido por agentes de control biológico en la formación de complejos con el hierro. ⁽¹⁶⁾
El sideróforo es siempre el ganador debido a que sus constantes de estabilidad del mismo son mucho más altas.
- **Ecología y Taxonomía Microbiana:** La tipificación de sideróforos se define como la caracterización de microorganismos de acuerdo con los tipos de sideróforos que producen. Hay dos métodos diferentes

para dicha tipificación: los métodos analítico y biológico. Estos hallazgos sugieren que la tipificación de los sideróforos podría convertirse en una poderosa herramienta en la investigación ambiental porque puede proporcionar una identificación rápida e inequívoca de microbios a nivel de especie. ⁽⁷⁾

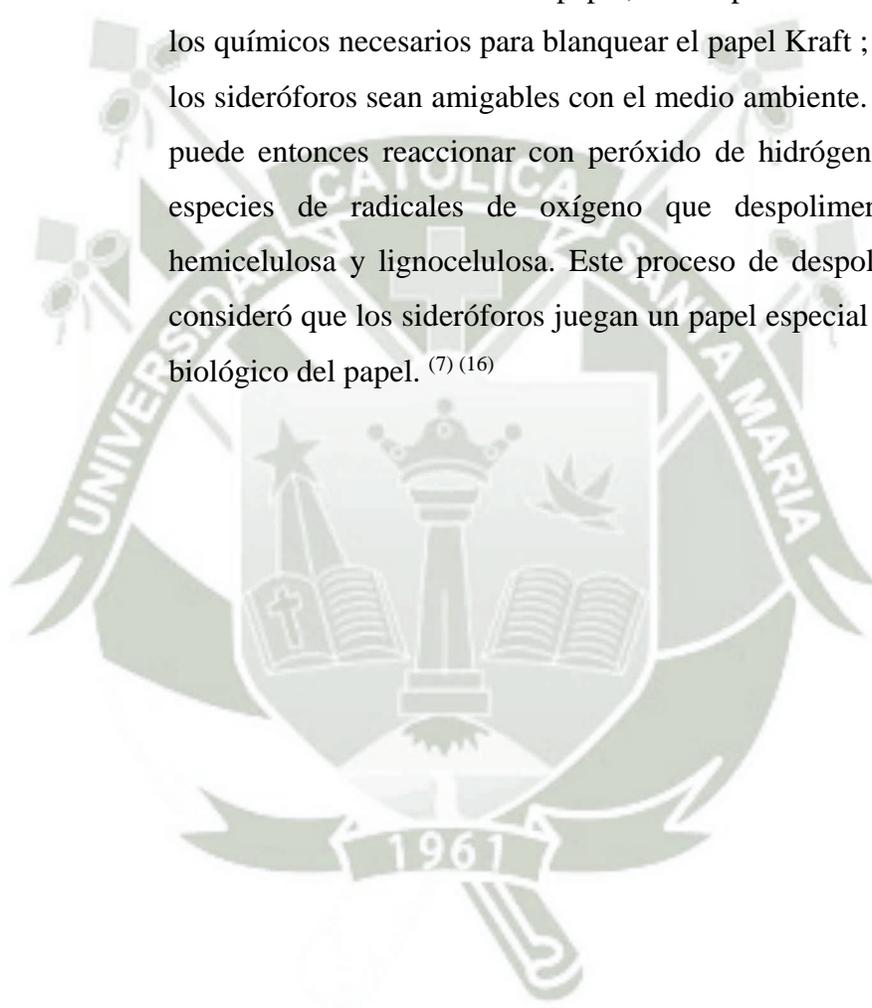
- **Biorremediación de contaminantes ambientales:** En cuanto a los metales los sideróforos son extremadamente eficaces para solubilizar y aumentar la movilidad de una amplia gama de metales tales como Cd, Cu, Ni, Pb, Zn y los actínidos Th (IV), U (IV) y Pu (IV). Esta capacidad de los sideróforos depende principalmente de sus funcionalidades de ligando, por lo que los sideróforos pueden tener una fuerte afinidad o selectividad para un metal particular distinto del Fe con respecto a las constantes de estabilidad de este complejo metal-sideróforo. ⁽⁷⁾

En cuanto a los efluentes del petróleo los sideróforos microbianos también participan en la biodegradación de hidrocarburos de petróleo a través de un mecanismo indirecto, facilitando la adquisición del hierro en condiciones limitadas. La petrobactina fue el primer sideróforo estructuralmente caracterizado producido por la bacteria marina *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. ⁽¹⁶⁾

- **El reprocesamiento del combustible nuclear:** Los sideróforos contienen hidroxamato aniónico o catecolato los cuales son grupos funcionales que forman oxodonores que se unen a ácidos de Lewis, dando como resultado complejos con constantes de estabilidad alta. Recientemente, informaron que la baja concentración de sideróforos fue suficiente para influir potencialmente la disolución del combustible nuclear usado. ⁽¹⁶⁾
- **Biosensores ópticos:** La pioverdina es un fluoróforo amarillo verdoso soluble en agua, caracterizados por las siguientes propiedades: 1) Forman un fuerte complejo con el Fe (III) y tienen una afinidad débil

o despreciable para Fe (II), 2) Los complejos Fe (III) tienen constantes de estabilidad muy elevadas lo cual hacen de la pioverdina un agente prometedora para la construcción de biosensores ópticos usando sideróforo un sensor que podría aplicarse en la determinación de la biodisponibilidad de hierro en agua oceánica o suelos. ^{(7) (16)}

- **Blanqueo biológico del papel:** Los sideróforos se consideran agentes eficaces en el tratamiento del papel, donde pueden reducir el 70% de los químicos necesarios para blanquear el papel Kraft ; y eso hace que los sideróforos sean amigables con el medio ambiente. El Fe reducido puede entonces reaccionar con peróxido de hidrógeno para generar especies de radicales de oxígeno que despolimerizan celulosa, hemicelulosa y lignocelulosa. Este proceso de despolimerización se consideró que los sideróforos juegan un papel especial en el blanqueo biológico del papel. ^{(7) (16)}



2. SIDERÓFOROS MICROBIANOS

Los sideróforos pueden ser obtenidos a partir de diversas especie, tanto de plantas como microbianas tales como *Aspergillus flavus*, *Mucor hiemales*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma koninguii*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona fluorescens*, *Serratia marscescens*; solo por nombrar algunas. ⁽²⁵⁾ ⁽²⁶⁾

2.1. *Pseudomona fluorescens*

El género *Pseudomona* es una bacteria Gram Negativa, que mediante Tinción de Gram no se tiñen de violeta por acción del colorante Cristal Violeta, sino que lo hacen de un color rosado tenue debido a la Safranina. ⁽²⁷⁾ ⁽²⁸⁾ Dicha reacción se debe a que las bacterias Gram Negativas presentan una pared celular constituida por petidoglicano y dos membranas lipídicas tanto interna como externa que al agregar la solución decolorante alcohol – acetona disuelve los lípidos que se encuentran en ambas membranas, dejando poros, por donde se pierde el colorante Cristal Violeta. ⁽²⁹⁾

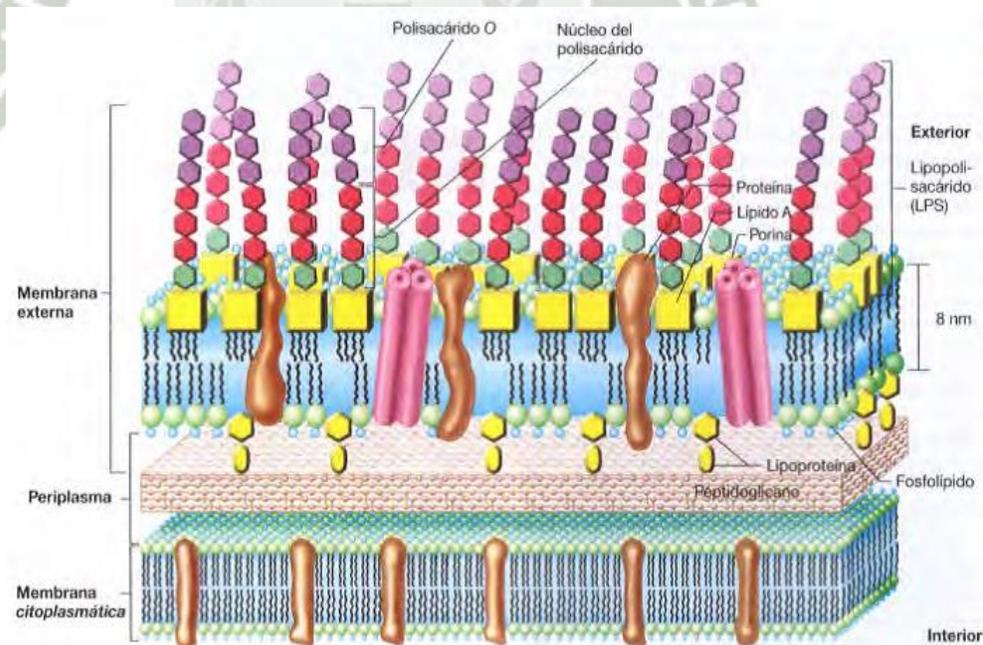


Figura 6. Estructura de las bacterias Gram negativas. ⁽²⁸⁾

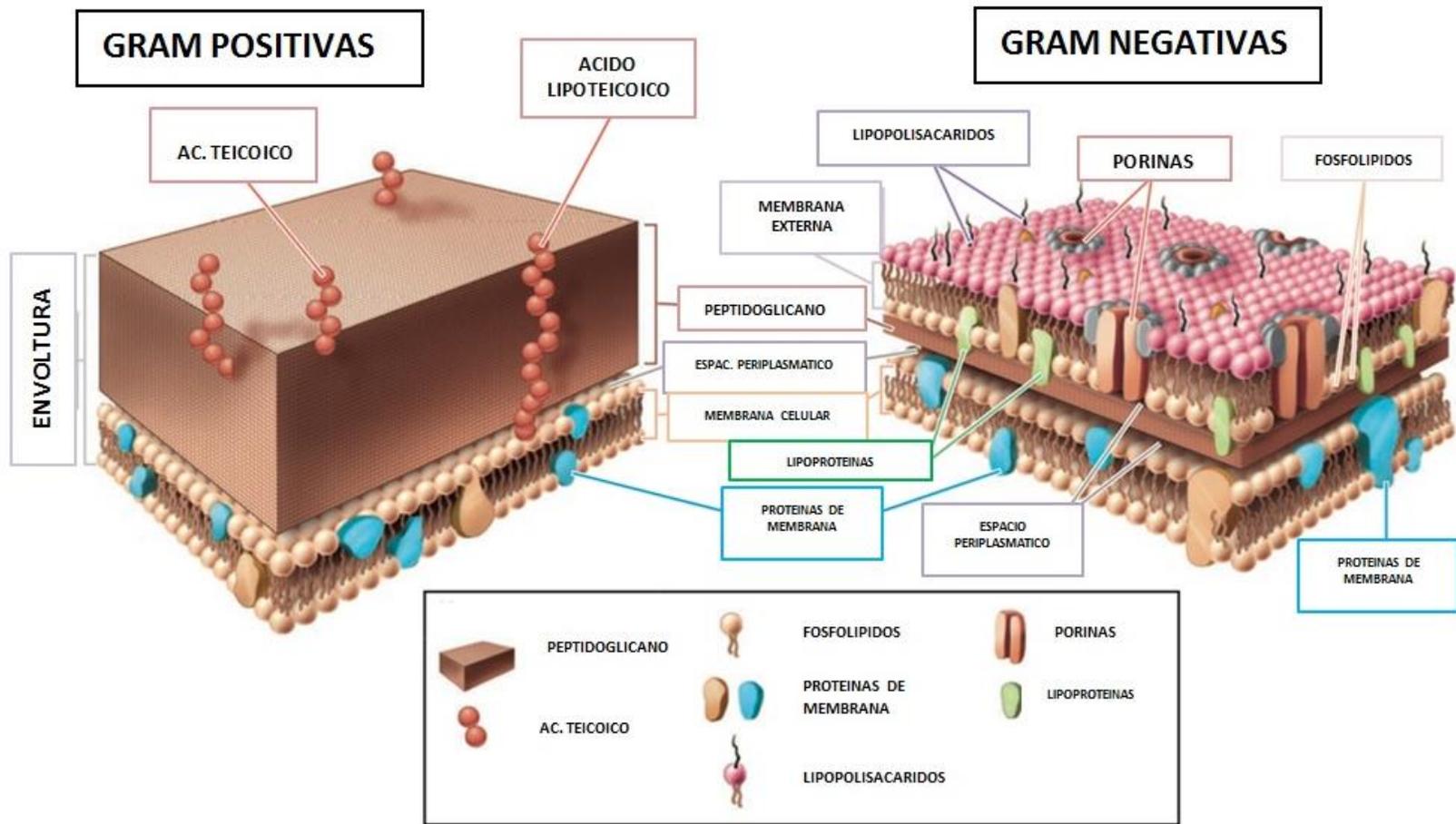


Figura 7. Comparación de la Membrana y Pared Celular de las Bacterias Gram Negativas y Gram Positivas. (27)

A demás de ser bacterias Gram-negativas tienen una forma recta o ligeramente curvos, no formadores de esporas, no encapsulados, siempre móviles con flagelación polar monotrica o lofotrica, oxidan glucosa y son oxidasa positiva. ⁽³⁰⁾ ⁽³¹⁾ ⁽³²⁾ Además de estas características, se muestran otras características bioquímicas diferenciales dependiendo de cada especie. ⁽³³⁾

Tabla 1. Características Bioquímicas Diferenciales de algunas especies de *Pseudomona*. ⁽²⁹⁾

	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Pseudomona fluorescens</i>	<i>Pseudomona putida</i>	<i>Pseudomona stutzeri</i>
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
O/F Glucosa	Ox	Ox	Ox	Ox
O/F Lactosa	K	K	K	K
O/F Maltosa	K	K	K	A
O/F Xilosa	A	A	A	A
O/F Manitol	A	A	K	A
Piocianina	+	-	-	-
Pioverdina	+	+	+	-
Movilidad	+	+	+	+
Nitrato	+	-	+	-
Reductasa	+	-	+	-
Fluorescencia	+	+	+	-
Colonias rugosas	-	-	-	+
N° flagelos	1 polar	>1 polar	>1 polar	1 polar
Desarrollo a 42°C	+	-	-	V

Debido a su presencia en la rizosfera se le conoce al género *Pseudomona* como “microorganismos estimuladores del crecimiento vegetal (MECV)” que tienen la propiedad de producir ciertas sustancias, cuyas principales ventajas son las de estimular la germinación de las semillas, acelerar el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios, inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares. Estas ventajas se dan gracias a la producción de sustancias estimuladoras de tipo hormonal como auxinas, giberelinas y citoquininas, pero también producen sustancias de otro tipo como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento. ^{(28) (34) (35)}

En la figura 8 se muestra las capacidades metabólicas extremadamente versátiles de la *Pseudomona fluorescens* que imparten esta bacteria, con la capacidad de persistir en una amplia gama de ambientes más allá de huéspedes mamíferos, incluyendo el suelo, las rizosferas y superficies de plantas, productos farmacéuticos no estériles, cabezales de ducha e incluso interiores de superficies de pared. La *Pseudomona fluorescens* ha sido estudiado más ampliamente como un microbio ambiental, especialmente por su papel en la promoción de la salud vegetal a través de una serie de mecanismos antimicrobianos codificados. Sin embargo, la *Pseudomona fluorescens* también posee una serie de rasgos funcionales que le proporcionan la capacidad de crecer y prosperar en huéspedes mamíferos, incluyendo la producción de metabolitos secundarios como bioactivos, sideróforos, capacidad de formar biofilms y la adaptividad de algunas cepas para el crecimiento a elevadas temperaturas. ⁽³⁵⁾

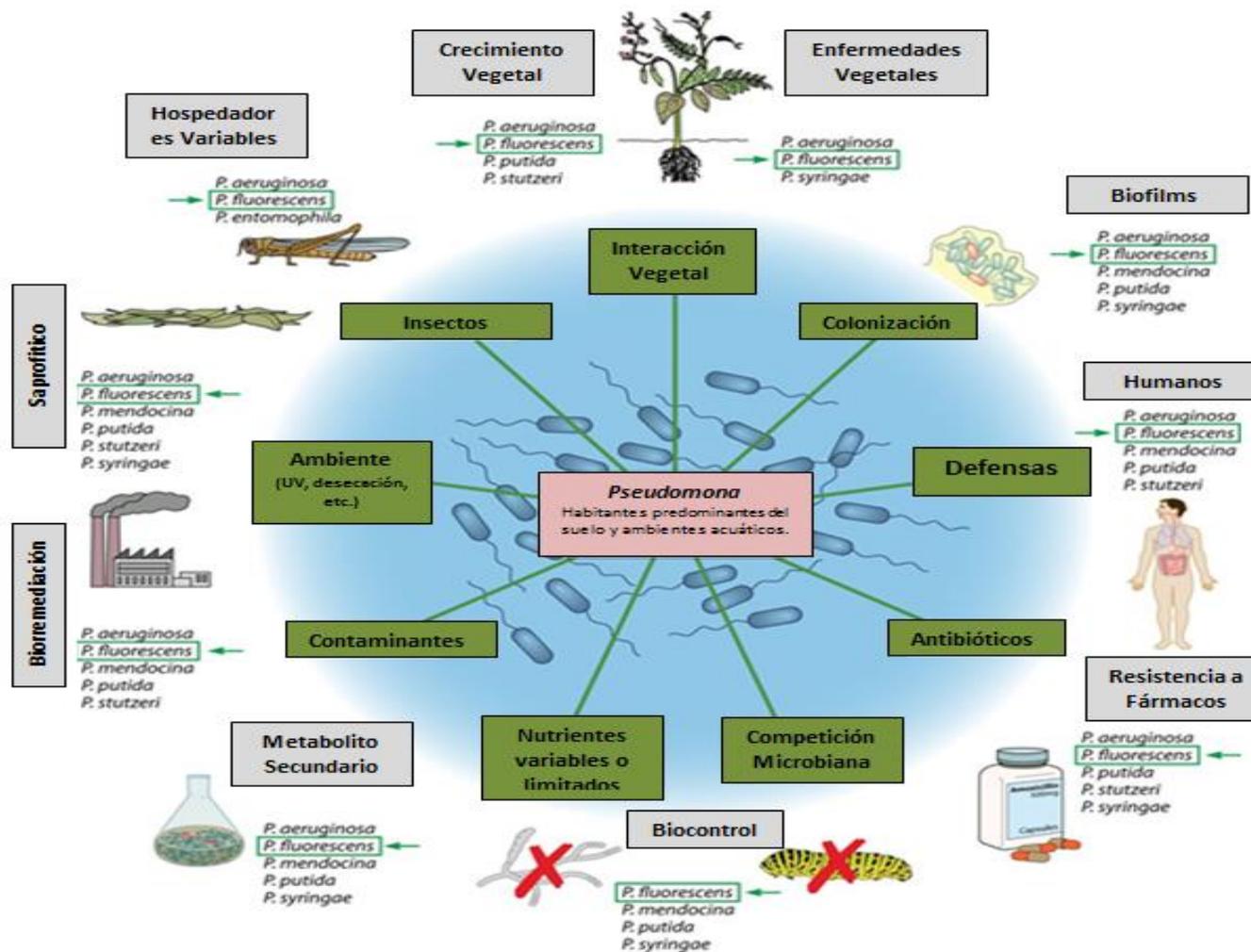


Figura 8. Ámbito funcional y nichos ambientales del género *Pseudomonas*, destacando la amplia distribución del complejo de especies de *Pseudomonas fluorescens*.⁽³⁵⁾

3. METODOLOGÍA APLICADA A LOS SIDERÓFOROS

3.1. ENSAYO PARA LA DETECCIÓN Y ESTIMACIÓN DEL SIDERÓFORO

3.1.1. MEDIO CROMO AZUROL S (CAS)

Se han desarrollado diversos ensayos para detectar diferentes fenotipos de sideróforos. Aunque estos ensayos son útiles para identificar varios sideróforos, habría que realizar numerosos ensayos para detectar todas las formas posibles. ⁽³⁶⁾

Schwyn y Neiland desarrollaron un ensayo universal de sideróforos usando cromo azurol S (CAS) y Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) como indicadores. El HDTMA tiene un grado moderado de salud y contacto, por tanto se debe usar equipo de protección personal apropiado. El CAS / HDTMA se compacta firmemente con hierro férrico para producir un color azul. Cuando un quelador de hierro fuerte como un sideróforo elimina el hierro del complejo de colorantes, el color cambia de azul a naranja. ^{(37) (38)}

En la figura 9 se muestra el cambio de color de la solución azul del colorante cromo azurol sulfonato (CAS) a naranja que indica la presencia de la producción de sideróforo (compuestos quelantes de hierro)

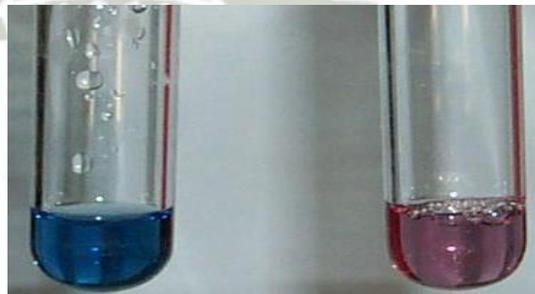


Figura 9. Viraje de coloración de la solución de Cromo Azurol S (CAS) debido a la presencia de un quelante de hierro. ⁽³⁸⁾

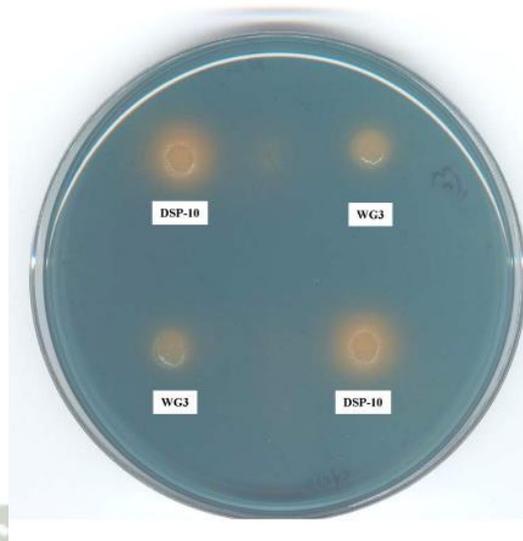


Figura 10. Viraje de coloración en placa del medio Cromo Azurol S (CAS). ⁽³⁴⁾

En la figura 10 se evidencia el complejo quelante-hierro (III), el cual tiñe el agar con un rico fondo azul. El halo naranja que rodea a la colonia indica la excreción de sideróforo y su dimensión se aproxima a la cantidad de siderofores excretado. ⁽³⁴⁾

3.2. ENSAYOS PARA LA SEPARACIÓN DEL SIDERÓFORO:

3.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación que involucra la inyección de una pequeña muestra ó analito (fase móvil) a una columna porosa con empaquetado cromatográfico (fase estacionaria) donde los componentes individuales de la muestra se mueven hacia abajo de la columna debido a la alta presión suministrada. ⁽³⁹⁾

Estos compuestos son separados de otros debido al empaquetamiento de la columna que envuelve varias interacciones químicas y físicas

entre las moléculas y las partículas de la columna. Dichos componentes son evidenciados a la salida de la columna mediante el detector, generando picos que pueden ser observados finalmente en un cromatograma. ⁽⁴⁰⁾

El tiempo de retención de la muestra puede variar dependiendo de la interacción entre la fase estacionaria, las moléculas que se analizan, y el disolvente, o disolventes utilizados. A medida que la muestra pasa a través de la columna en que interactúa entre las dos fases a una velocidad diferente, debido principalmente a diferentes polaridades en los analitos. Los analitos que tienen la menor cantidad de interacción con la fase estacionaria o la mayor cantidad de interacción con la fase móvil se sale de la columna más rápido. ^{(39) (40)}

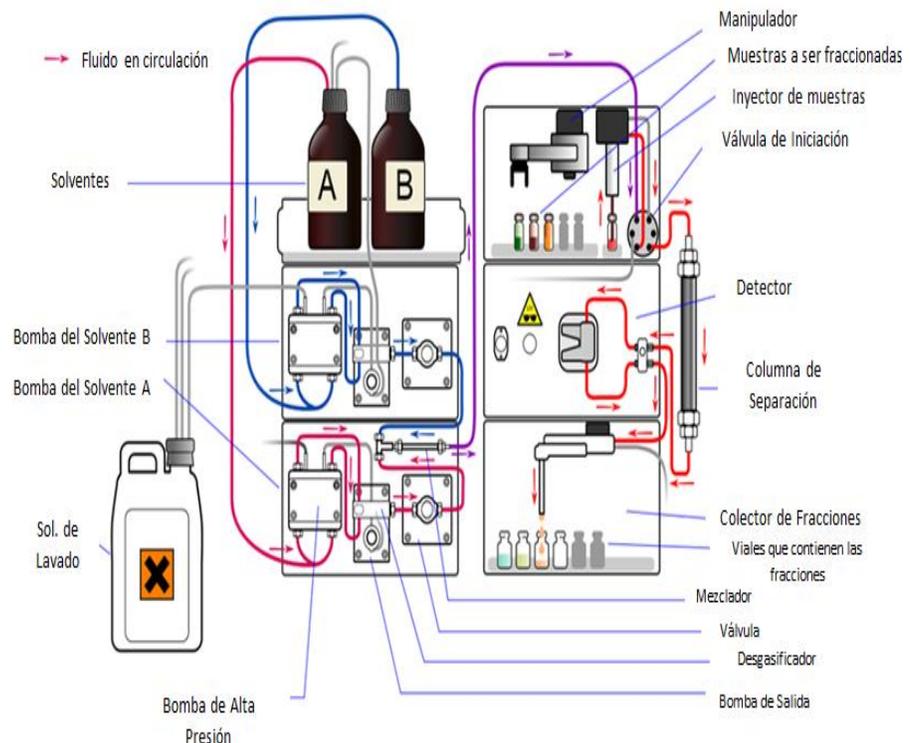


Figura 11. Distribución de un HPLC. ⁽³⁹⁾

3.2.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Es una técnica de separación de moléculas que se fundamenta en sus propiedades de carga eléctricas. ⁽⁴¹⁾

Como todos los tipos de cromatografía, esta también se compone por dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria o de intercambio iónico; esta última fase lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que inmovilizan iones que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil, la cual generalmente es una disolución acuosa con cantidades moderadas de algún disolvente orgánico que actúa como buffer. Los iones de la disolución compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria. ^{(42) (43)}

3.2.3. ELECTROFORESIS CAPILAR

Es una técnica de separación que se fundamenta en las diferentes velocidades de migración de las diversas especies cargadas, bajo la acción de un campo eléctrico. ⁽⁴⁴⁾

Esta técnica se lleva a cabo en un capilar de sílice fundido de un diámetro de 10 – 200 μm . El capilar se llena con un buffer, mientras que la muestra o analito conforma un conjunto de aniones y cationes que se introducen dentro del sistema. Al someterlo a un campo electrónico estos migran al electrodo correspondiente, lo cual establece un movimiento de iones, generando la separación de los compuestos. ⁽⁴⁵⁾

Requiere pequeños volúmenes de muestras por lo que ha despertado gran interés además que es un procedimiento intermedio entre una electroforesis de zona y un HPLC. ^{(44) (45)}

3.3. ENSAYO DE IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURA QUÍMICA DEL SIDERÓFORO

3.3.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Técnica microanalítica que se utiliza para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos, revelar estructuras y propiedades químicas de las moléculas. ⁽⁸⁾

Se trabaja con pequeñas cantidades de muestras y se logra obtener valiosa información. ⁽⁴⁶⁾

El proceso de la espectrometría de masas comprende fundamentalmente cuatro etapas: La primera es la ionización de la muestra, luego la aceleración de los iones debido a un campo eléctrico, seguido por la dispersión de los iones mediante sus características de masa / carga, para finalmente ocurra la detección de los iones y la producción de la señal eléctrica. ⁽⁴⁷⁾

Esta técnica sirve para la determinación del Peso Molecular, formula molecular, identificación del producto, caracterización y análisis. ⁽⁴⁶⁾

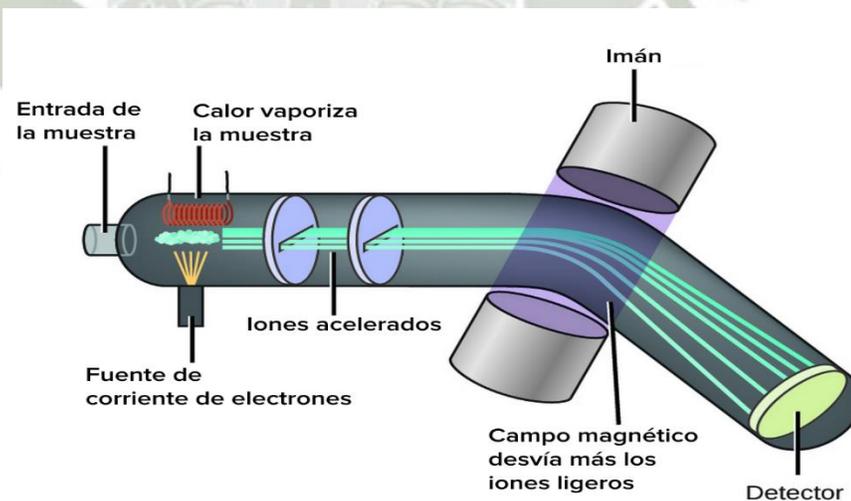


Figura 12. Diagrama de un espectrómetro de masas. ⁽⁴⁶⁾

4. *Solanum lycopersicum* (TOMATE)

Solanum lycopersicum, conocido comúnmente como tomate es una especie de la familia de las Solanáceas originaria entre el Sur de Colombia y el Norte de Chile. ⁽⁴⁸⁾

Tabla 2. Taxonomía del Tomate (*Solanum lycopersicum*). ⁽⁴⁹⁾

TAXONOMÍA	
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Subgénero:	<i>Potatoe</i>
Sección:	<i>Petota</i>
Especie:	<i>Solanum lycopersicum</i>

La planta de *Solanum lycopersicum* (Tomate) puede mostrar básicamente dos formas de crecimiento: INDETERMINADO Y DETERMINADO. ⁽⁴⁹⁾ ⁽⁵⁰⁾

El crecimiento DETERMINADO O LIMITADO es cuando los tallos tienen una serie de segmentos, además cuentan con menos hojas, las cuales finalizan en una inflorescencia. En cambio, el crecimiento INDETERMINADO O ILIMITADO, el cual es el norma; se caracteriza por tener un crecimiento desordenado además de excesivo, los tallos presentan segmentos con yemas, los cuales al finalizar hay un ápice vegetativo. ⁽⁴⁸⁾ ⁽⁵⁰⁾

En cuanto al sistema radicular, este llega a alcanzar hasta una profundidad de dos metros, con un sistema fasciculado en el que dominan raíces adventicias.

Los tallos son semi leñosos, ligeramente angulados y medianamente gruesos. Además poseen pilosidades simples y glandulares, desarrollando sobre su base hojas y tallos secundarios e inflorescencias. ⁽⁵⁰⁾

Las hojas de la planta de *Solanum lycopersicum* (Tomate) son compuestas, lobuladas y tienen bordes dentados; además su disposición es alterna sobre el tallo.

La flor tiene cinco pétalos dispuestos helicoidalmente de color amarillo. La primera flor se forma cerca de la yema apical. ⁽⁴⁸⁾ ⁽⁵⁰⁾

El fruto es una baya está formada por tres partes: las semillas, el pericarpio y el tejido placentario. ⁽⁵⁰⁾

4.1. CONDICIONES DEL CULTIVO DE *Solanum lycopersicum* (TOMATE)

Es un tipo de planta que se adapta bien a diversas variedades de clima. La excepción radica en climas propensos a sufrir heladas, fenómeno al que es sensible. Definitivamente, según el desarrollo vegetativo del tomate, requiere un periodo libre de heladas de 110 días, para que no se sufra pérdidas. ⁽⁴⁸⁾

La franja de temperaturas óptimas es la que se muestra a continuación:

- Temperaturas nocturnas: 15-18 °C
- Temperaturas diurnas 24-25 °C
- Temperatura ideal de floración: 21 °C
- Temperatura ideal para el desarrollo vegetativo: 22-23 °C
- Temperatura de parón de desarrollo vegetativo: 12 °C
- Temperatura por debajo de los 7 °C no es beneficioso.

Como se aprecia, el rango de temperaturas que necesita para crecer es alto, encontrándose los valores óptimos superior a los 15 °C

Con respecto a la humedad, la planta requiere entre el 50% al 70 %, ya que si se superan estos valores, favorecerá el desarrollo de hongos. Normalmente el riego se da 3 veces a la semana. ⁽⁴⁹⁾

Solanum lycopersicum (Tomate) no es una planta muy exigente en cuanto a suelos, pero se prefiere suelos profundos, con materia orgánica alrededor del 1,5% al 2% y con buen drenaje.

Se recomienda en casos en el que la tierra tenga niveles muy bajos de nitrógeno agregar cantidades de sulfato de amonio en proporción de 300-400 kg/ha para corregir dicha deficiencia. ⁽⁵¹⁾

También es aconsejable la incorporación de fósforo, ya que contribuye enormemente al desarrollo de las raíces del tomate y en la floración. Para que el fruto se desarrolle de forma correcta necesita un abonado a base de potasio. Son aconsejables incorporar sulfato potásico en una proporción de 400-500 kg/ha. ^{(50) (51)}

En cuanto al pH ideal para el cultivo es el cercano al neutro, debiendo corregir con enmiendas en el caso de suelos ácidos o básicos. ⁽⁵¹⁾

4.2. PROPIEDADES NUTRICIONALES

Solanum lycopersicum (Tomate) es un alimento que por cada 100 gramos aporta 18 kcal. La mayor parte de su peso es agua, pero también contiene una cantidad considerable de hidratos de carbono. Además de azúcares simples que le confieren un ligero sabor dulce y algunos ácidos orgánicos que le otorgan el sabor ácido característico. El tomate es una fuente valiosa de ciertos minerales (como el potasio y el magnesio). También destaca su contenido en vitaminas B1, B2, B5 y la C. Además de la presencia de carotenoides como el licopeno, el cual es un pigmento que da el color rojo característico al tomate. Tanto el licopeno como la vitamina C son antioxidantes con una función protectora del organismo humano. ⁽⁴⁸⁾



Figura 13. Plantaciones de *Solanum lycopersicum* (Tomate) a nivel Industrial. ⁽⁴⁸⁾

4.3. PLAGAS Y ENFERMEDADES

4.3.1. PLAGAS

4.3.1.1. Araña roja (*Tetranychus urticae*)

Se desarrolla en el envés de las hojas generando decoloraciones, manchas amarillentas que pueden observarse en el haz como primeros síntomas. Con mayores poblaciones se produce desecación. Los ataques más graves se producen en los primeros estados fenológicos. Las temperaturas elevadas y la escasa humedad relativa favorecen el desarrollo de la plaga. Pueden llegar a producir daños en los frutos. ⁽⁵²⁾

4.3.1.2. Vasate (*Aculops lycopersici*)

En la provincia de Almería es una plaga exclusiva del tomate. Aparecen primeramente manchas oscuras en el

tallo y posteriormente en las hojas e incluso frutos. Evoluciona rápidamente desde la parte basal de la planta. Aparece en diversas partes de la planta y se dispersa de forma mecánica debido a la elevada temperatura y la baja humedad ambiental. ⁽⁵²⁾

4.3.1.3. Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*)

Las partes jóvenes de las plantas son colonizadas por las adultas, realizando las puestas en el envés de las hojas. De éstas emergen las primeras larvas, que las cuales poseen movilidad. Tras fijarse en la planta pasan por tres estados larvarios y uno de pupa, este último característico de cada especie. Los daños directos son ocasionados por larvas y adultos al alimentarse, absorbiendo la savia de las hojas. Los daños indirectos se deben a la proliferación de negrilla sobre la melaza generada en la alimentación, manchando y depreciando los frutos y dificultando el normal desarrollo de las plantas. Ambos tipos de daños son relevantes cuando los niveles de población son altos. Otro daño indirecto es que transmiten el virus del amarillamiento en cucurbitáceas. ⁽⁵²⁾

4.3.1.4. Pulgón (*Aphis gossypii*)

Son las especies de pulgón más comunes y abundantes en los invernaderos. Presentan polimorfismo, con hembras aladas y ápteras de reproducción vivípara. Las formas áptera del primero presentan sifones negros en el cuerpo verde o amarillento. Forman colonias y se distribuyen en focos que se dispersan, principalmente en primavera y otoño, mediante las hembras aladas. ⁽⁵²⁾

4.3.1.5. Trips (*Frankliniella occidentalis*)

Los adultos colonizan los cultivos dentro de los tejidos vegetales en hojas, frutos y, preferentemente, en flores, donde se localizan los mayores niveles de población de adultos y larvas nacidas de las puestas. Los daños directos se producen por la alimentación de larvas y adultos, sobre todo en el envés de las hojas, dejando un aspecto plateado en los órganos afectados que luego se necrosan. Estos síntomas pueden apreciarse cuando afectan a frutos y cuando son muy extensos en hojas. El daño indirecto es el que acusa mayor importancia y se debe a la transmisión del virus del bronceado del tomate, que afecta a esta especie.

(49) (52)

4.3.1.6. Minadores de hoja (*Liriomyza trifolii*)

Las hembras adultas realizan las puestas dentro del tejido de las hojas jóvenes, donde comienza a desarrollarse una larva que se alimenta del parénquima, ocasionando las típicas galerías. La forma de las galerías es diferente, aunque no siempre son distinguibles, entre especies y cultivos. Una vez finalizado el desarrollo larvario, las larvas salen de las hojas para pupar, en el suelo o en las hojas, para dar lugar posteriormente a los adultos. (52)

4.3.1.7. Orugas (*Spodoptera exigua*)

La biología de estas especies es bastante similar, pasando por estados de huevo, 5-6 estados larvarios y pupa. Los huevos son depositados en las hojas, preferentemente en el envés, en plastones con un número elevado de especies del género. Los daños son causados por las larvas al alimentarse, los cuales pueden clasificarse de la siguiente

forma: daños ocasionados a la vegetación, daños ocasionados a los frutos y daños ocasionados en los tallos.⁽⁵²⁾

4.3.1.8. Nemátodos (*Meloidogyne spp.*)

Penetran en las raíces desde el suelo. Las hembras al ser fecundadas se llenan de huevos tomando un aspecto globoso dentro de las raíces. Esto unido a la hipertrofia que producen en los tejidos de las mismas, da lugar a la formación de los típicos “rosarios”. Estos daños producen la obstrucción de vasos e impiden la absorción por las raíces, traduciéndose en un menor desarrollo de la planta y la aparición de síntomas de marchitez, clorosis y enanismo. Se distribuyen por rodales o líneas y se transmiten con facilidad por el agua de riego, con el calzado, con los aperos y con cualquier medio de transporte de tierra. Además, los nematodos interactúan con otros organismos patógenos de manera activa como vectores de virus, o de manera pasiva facilitando la entrada de bacterias y hongos por las heridas que han provocado.⁽⁵²⁾

4.3.2. ENFERMEDADES

4.3.2.1. Oidiopsis (*Leveillula taurica*)

Es un parásito de desarrollo semi-interno. Los síntomas que aparecen son manchas amarillas en el haz que se necrosan por el centro, observándose una mancha blanquecino por el envés. En caso de un ataque fuerte la hoja se seca y se desprende. Se desarrolla a 10-35°C con un óptimo de 26°C y una humedad relativa del 70%.⁽⁵²⁾

4.3.2.2. Podredumbre gris (*Botryotinia fuckeliana*)

Ataca en hojas y flores produciendo lesiones pardas. En frutos tiene lugar una podredumbre blanda, en los que se observa el micelio gris del hongo. Las principales fuentes de inóculo las constituyen las conidias y los restos vegetales que son dispersados por el viento, salpicaduras de lluvia, gotas de condensación en plástico y agua de riego. La temperatura, la humedad relativa y fenología influyen en la enfermedad de forma separada o conjunta. La humedad relativa óptima oscila alrededor del 95% y la temperatura entre 17°C y 23°C. Los pétalos infectados y desprendidos actúan dispersando el hongo. ⁽⁵²⁾

4.3.2.3. Podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*)

Produce una podredumbre blanda acuosa al principio que posteriormente se seca más o menos según la succulencia de los tejidos afectados, cubriéndose de un abundante micelio algodonoso blanco, observándose la presencia de numerosos esclerocios, blancos al principio y negros más tarde. Los ataques al tallo con frecuencia colapsan la planta, que muere con rapidez, observándose los esclerocios en el interior del tallo. La enfermedad comienza a partir de esclerocios del suelo procedentes de infecciones anteriores, que germinan en condiciones de humedad relativa alta y temperaturas suaves, produciendo un número variable de apotecios. El apotecio cuando está maduro descarga numerosas esporas, que afectan sobre todo a los pétalos. Cuando caen sobre tallos, ramas u hojas producen la infección secundaria. ⁽⁵²⁾

4.3.2.4. Alternariosis (*Alternaria solani*)

En plántulas produce una pigmentación negra en el tallo a nivel del suelo. En pleno cultivo las lesiones aparecen tanto en hojas como tallos, frutos y pecíolos. En hoja se generan manchas pequeñas circulares o angulares, con marcados anillos concéntricos. En tallo y pecíolo se producen lesiones negras alargadas, en las que se pueden observar a veces anillos concéntricos. Los frutos son atacados a partir de las cicatrices del cáliz, provocando lesiones pardo-oscuros ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas del hongo. Las conidias pueden ser dispersadas por salpicaduras de agua, lluvia, etc., o el viento. El rango de temperatura: 3-35°C. La esporulación está favorecida por noches húmedas seguidas de días soleados y con temperaturas elevadas. ⁽⁵²⁾

4.3.2.5. *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

Comienza con la caída de pecíolos de hojas superiores. Las hojas inferiores amarillean avanzando hacia el ápice y terminan por morir. Puede manifestarse como una primera fase marchitez en verde de la parte aérea, pudiendo ser reversible. Después se hace permanente y la planta muere. También puede ocurrir que se produzca un amarilleo que comienza en las hojas más bajas y que termina por secar la planta. Si se realiza un corte transversal al tallo se observa un oscurecimiento de los vasos. El hongo puede permanecer en el suelo durante años y penetrar a través de las raíces hasta el sistema vascular. La diseminación se realiza mediante semillas, viento, labores de suelo, plantas enfermas o herramientas contaminadas. La temperatura

óptima de desarrollo es de 28°C. Más adelante se explicara más detalladamente esta enfermedad. ⁽⁴⁹⁾ ⁽⁵²⁾

4.3.2.6. Mancha negra del tomate (*Pseudomonas syringae* pv.)

Afecta a todos los órganos aéreos de la planta. En hoja, se forman manchas negras de pequeño tamaño (1-2 mm de diámetro) y rodeadas de halo amarillo, llegando incluso a secar el foliolo. En tallos, pecíolos y bordes de los sépalos, también aparecen manchas negras de borde y contorno irregular. Las inflorescencias afectadas se caen. Tan sólo son atacados los frutos verdes, en los que se observan pequeñas manchas. Las principales fuentes de infección las constituyen: semillas contaminadas, restos vegetales contaminados y la rizosfera de numerosas plantas silvestres. El viento, la lluvia, las gotas de agua y riegos por aspersión diseminan la enfermedad que tiene como vía de penetración tanto estomas y las heridas de las plantas. Las condiciones óptimas de desarrollo son temperaturas de 20 a 25°C y períodos húmedos. ⁽⁵²⁾

4.4.MARCHITAMIENTO VASCULAR

Como se vio en el punto anterior uno de los mayores problemas en las plantaciones de Tomate es la incidencia del patógeno *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici*, que al estar en un estado avanzado se conoce la enfermedad como “marchitamiento vascular”, debido a que ataca los tejidos de conducción de la planta. ⁽⁴⁹⁾

El *Fusarium oxysporum* permanece en el suelo como un saprófito, sin embargo, tienen la capacidad para ingresar a la planta por medio de la raíz y atacar los tejidos vasculares. Las clamidosporas del *Fusarium oxysporum*

están especializadas para sobrevivir en condiciones adversas, lo cual les permiten permanecer por largos períodos en latencia en el suelo. ⁽⁵³⁾

Tabla 3. Taxonomía del *Fusarium oxysporum*. ⁽⁵⁴⁾

TAXONOMÍA

Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Deuteromycota</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Nectriaceae</i>
Género:	<i>Fusarium</i>
Especie:	<i>Fusarium oxysporum</i>

4.4.1. *Fusarium oxysporum*

Se encuentra ampliamente distribuido, y se desarrolla en climas tropicales, templados y lluviosos.

Uno de los medios donde se examina sus características microbiológicas es el agar PDA, donde los cultivos de *Fusarium oxysporum* son reportados de color crema con micelio algodonoso.

Microscópicamente las células basales tienen forma de una vaina o media luna, la cual presenta septos o tabiques; mientras que las microconidias tienen forma oval o elipsoidal que tiene de cero a dos septos. ⁽⁵⁴⁾

Su reproducción es asexual, y el hongo produce tres clases de esporas: ⁽⁵⁵⁾

- **Microconidias:** Esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se

forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Las microconidias tienen 5- 12 μm de largo por 2.5- 3.5 μm de ancho. ^{(56) (57)}

- **Macroconidias:** Esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, someramente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tiene un tamaño de 27 a 46 μm de largo por 3.0 a 4.5 μm de ancho. ^{(56) (57)}
- **Clamidosporas:** Esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se forman simples o en pares, terminales intercalares: poseen un tamaño de 5 a 15 μm de diámetro. Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes. ^{(56) (57)}

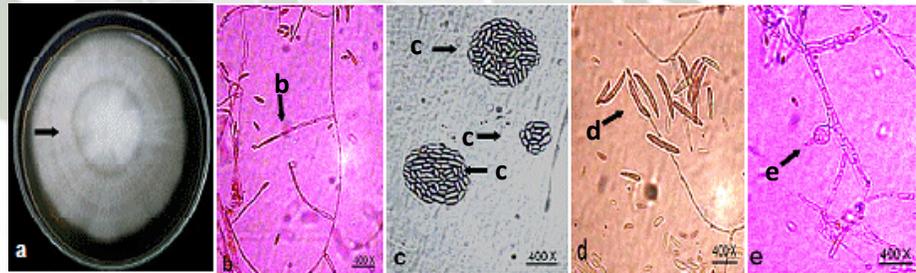


Figura 14. Características macro y microscópicas para la caracterización taxonómica del *Fusarium oxysporum*. ⁽⁵⁷⁾

En la figura 14 se aprecia en la imagen **a)** Colonias del hongo con formación de micelio blanco algodonoso. **b)** Fialídes laterales. **c)** Microconidas unicelulares o con un septo, de forma oval o elipsoidal agrupadas en masa o solitarios. **d)** Macroconidias con 3 a 5 septos

transversales, de forma falcada. e) Clamidiasporas globosas y solitarias.

4.4.1.1. Ciclo biológico de infección del *Solanum lycopersicum* por el *Fusarium oxysporum*.

La enfermedad comienza con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidiosporas en latencia presentes en los tejidos muertos del hospedante y que son estimuladas por los exudados secretados de las raíces de las plantas recién sembradas. Las hifas del hongo penetran directamente la epidermis de las raíces, pasan a la corteza y a la endodermis e ingresan a los vasos del xilema. ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁵⁹⁾

Las hifas pueden penetrar también, a través de heridas realizadas de forma mecánica o por nematodos, insectos o miriódodos. Sin embargo la penetración directa a través de las raíces es el método más común de ingreso del patógeno. El hongo una vez dentro de la planta se desplaza hacia el tejido vascular por colonización intercelular de los vasos del xilema y los invade cuando están maduros o si la penetración es por herida se sitúa en ellos. El patógeno coloniza los vasos del xilema mediante el desarrollo del micelio o por medio del transporte pasivo de las microconidias producidas en dichos vasos, lo cual genera una colonización rápida y discontinua. ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁵⁹⁾

La colonización inicial está limitada a los tejidos vasculares y cuando el hospedante está muy afectado, ocurre la infección a los tejidos adyacentes. ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁵⁹⁾

La colonización del tallo es unilateral dado que la diseminación lateral y radial del hongo parece inhibida por las paredes celulares y otras barreras laterales. ⁽⁵⁸⁾

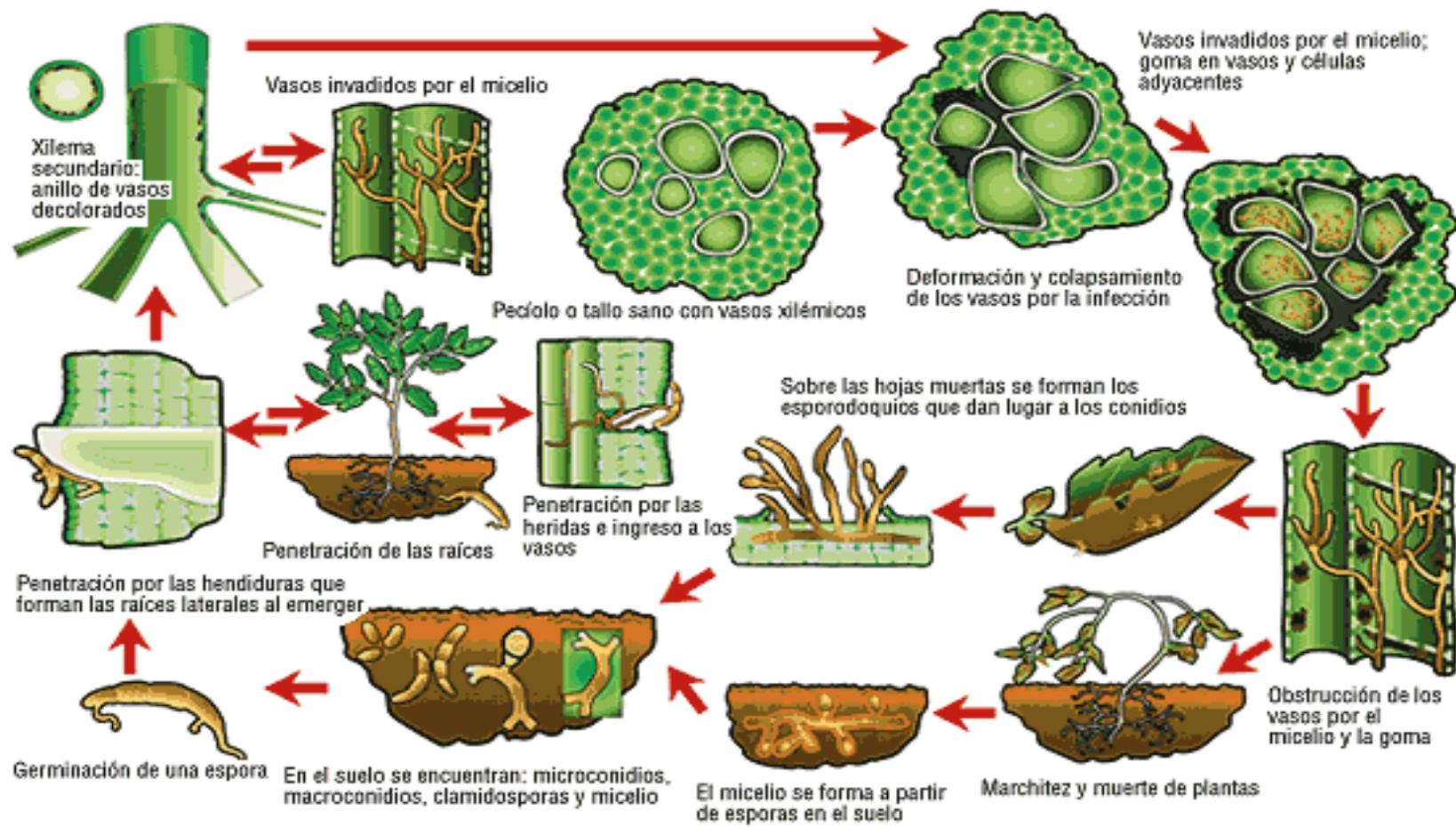


Figura 15. Ciclo Biológico de la acción del *Fusarium oxysporum* sobre *Solanum lycopersicum*.⁽⁵⁸⁾

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. INSUMOS

- Agua bidestilada
- Agua desionizada

1.2. MATERIALES DE LABORATORIO

- Asa de Kohl.
- Cubeta de 1 mL para espectrofotómetro.
- Estuche de disección.
- Gradilla por 24 tubos
- Guantes de latex.
- Mechero.
- Micropipeta de rango variable de 20 - 100 μ l y 200 - 1000 μ l.

- Papel de filtro Whatman N° 44.
- Picetas.
- Termómetro de 20 a 100 °C.
- Tips de 10 – 200 µl (amarillos) y 100 – 1000 µl (azules).
- Tubos eppendorf de 1500 µl.
- Tubos Falcón.

1.3. MATERIAL DE VIDRIO

- Bagueta
- Cubreobjetos.
- Fiola de 50 mL, 100 mL, 250 mL.
- Frasco de Vidrio Autoclave de 250 mL.
- Láminas portaobjetos.
- Pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 mL.
- Placa Petri de Vidrio de 100 x 15 mm.
- Probeta de 50 mL, 100 mL, 250 mL.
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

1.4. MATERIAL BIOLÓGICO

- Plantas de rocoto (*Capsicum pubescens*)
- Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

1.5. REACTIVOS QUÍMICOS

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (Merck)
- 8-Hidroxiquinolina. (Merck)
- Ácido Casamino. (Sigma)
- Ácido Succínico. (Sigma)
- Ácido Sulfúrico. (Sigma)

- Alcohol Acetona. (Biogen)
- Alcohol de 95°. (Merck)
- Azul de lactofenol. (Biogen)
- Catalasa. (Merck)
- Cloroformo. (Sigma)
- Cristal violeta. (Biogen)
- Dextrosa. (Merck)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. (Merck)
- $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. (Merck)
- Glucosa. (Merck)
- HCl 10mM, 1M y 5M. (Merck)
- HDTMA (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio). (Merck)
- Hipoclorito de sodio. (Clorox)
- K_2HPO_4 . (Merck)
- KH_2PO_4 . (Merck)
- Lugol. (Biogen)
- Metanol de 90°. (Merck)
- MgSO_4 . (Merck)
- NaCl. (Merck)
- NaOH 1M Y 5M. (Merck)
- NH_4Cl . (Merck)
- PIPES (piperazina- N, N- bis (2 – etanosulfónico)). (Sigma)
- Reactivo CAS (Cromo azurol S). (Sigma)
- Reactivo de KOVACS. (Biogen)
- Sacarosa. (Merck)
- Safranina. (Biogen)
- Sulfato de Amonio. (Sigma)
- Tiras Reactivas de Oxidasa. (Merck)
- Triton x – 100. (Sigma)

1.6. MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

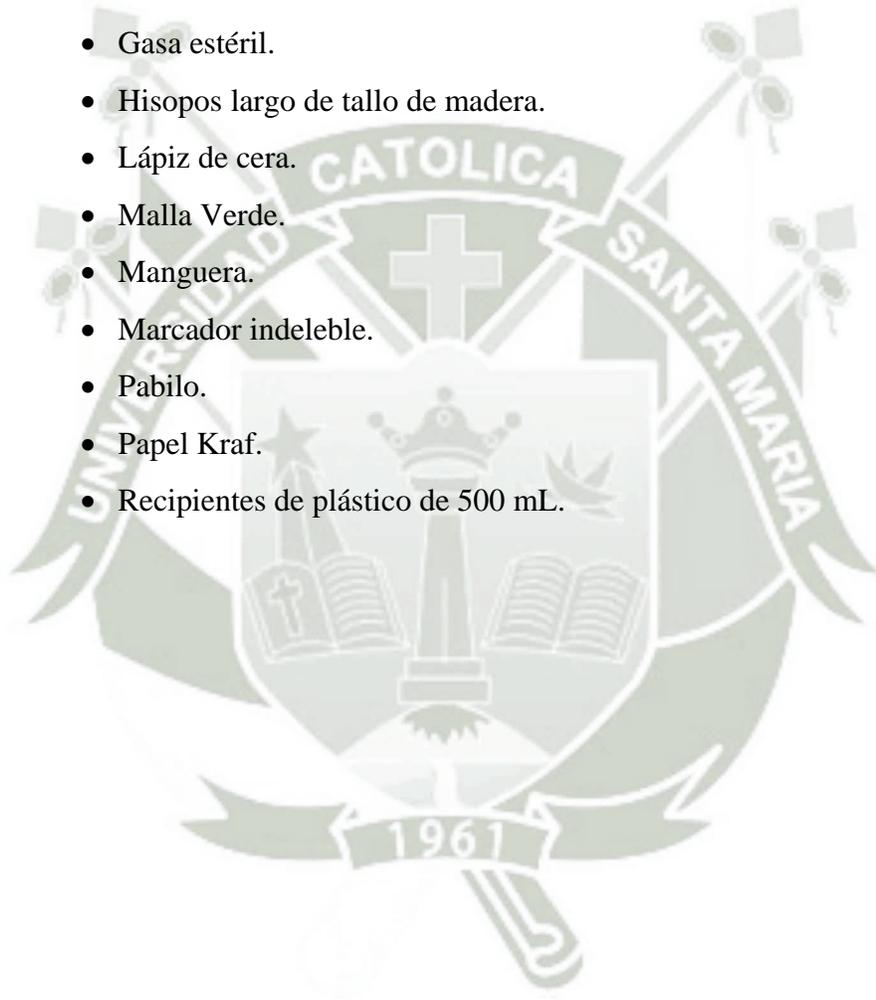
- Agar – Agar. (Merck)
- Medio Cetrimide. (Merck)
- Medio Citrato de Simmons (CS). (Bacto – Difco)
- Medio Lisina Hierro Agar (LIA). (Bacto – Difco)
- Medio Movilidad, Indol, Ácido Sulfhídrico (SIM). (Bacto – Difco)
- Medio Papa Dextrosa Agar (PDA). (Dibico)
- Medio Triple Azúcar Hierro (TSI). (Bacto – Difco)
- Medio Urea. (Bacto – Difco)

1.7. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Autoclave. (Numak – LDZM-80KCS)
- Balanza Analítica. (Crystal – 200CAL)
- Baño María. (Mettler – 6WNB10)
- Cámara de Flujo Laminar. (Telstar – AH-100)
- Cámara UV. (Ingesc – A-UV100)
- Centrífuga. (Hettich – ROTOFIX32A)
- Desecador (Deltalab – AB19232)
- Espectrofotómetro. (Thermo Scientific – GENESYS10SUV-VIS)
- Espectrómetro. (Thermo Scientific – Nicolet-iS5)
- Estufa. (Numak – DH6-9031A)
- Evaporador Rotatorio al Vacío (Hychem – RE300)
- HPLC. (Thermo Scientific – Ultimate3000)
- Incubadora. (Numak – ICN-150A)
- pH metro. (Schott – LAB850)
- Shaker. (LabNet – SL-S12-2)

1.8. OTROS MATERIALES

- Agrofilm.
- Algodón estéril.
- Bolsa ziploc 20 x 20 cm.
- Bolsas negras de polietileno 17 x 13 cm
- Columnas Nucleosil C18 de 250 x 4 mm (Sigma)
- Fosforo.
- Gasa estéril.
- Hisopos largo de tallo de madera.
- Lápiz de cera.
- Malla Verde.
- Manguera.
- Marcador indeleble.
- Pabilo.
- Papel Kraf.
- Recipientes de plástico de 500 mL.



2. MÉTODOS

2.1. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA Y BIOQUÍMICA DE *Pseudomonas fluorescens*.

Se aislaron las raíces de *Capsicum pubescens* (rocoto), las cuales se llevaron a una solución al 1% de Triton X – 100, por 60 minutos sobre el shaker a 120 rpm. ⁽⁶⁰⁾

A continuación, se realizó la siembra por agotamiento en Medio Cetrimide bajo condiciones asépticas y se llevó a incubadora por un lapso de 24 horas a 37 °C.

Finalmente se realizó la caracterización macroscópica, para lo cual se utilizó la campana de luz UV. También se caracterizó microscópicamente y bioquímicamente mediante la aplicación de la Tinción de Gram y pruebas enzimáticas como oxidasa, catalasa, y de Identificación Bioquímica en tubo como TSI, LIA, CS, UREA y SIM ^{(30) (33)}

2.2. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA DE *Fusarium oxysporum*.

A partir de plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate), se aislaron trozos de tallos identificados con marchitamiento vascular, los cuales se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 2.5% durante 3 minutos; y se enjuagaron con agua destilada, y finalmente se secaron con papel toalla. ⁽⁵⁹⁾

A continuación, se colocó un pequeño trozo de la muestra estéril en una placa con medio PDA baja condiciones asépticas y se llevó a incubar a 25 °C durante 7 días.

Finalmente, se realizó la caracterización macroscópica donde se observó el crecimiento en el medio de cultivo PDA; y microscópica mediante examen directo con azul de lactofenol, y se observó en el microscopio a 40x. ⁽⁵⁷⁾

2.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA LA PRODUCCIÓN DEL SIDERÓFORO A PARTIR DE *Pseudomona fluorescens*.

Se preparó 100 mL del medio succinato deficiente en hierro (ANEXO 1) y con ayuda de una asa de Kohl se realizó la siembra de la *Pseudomona fluorescens* anteriormente aislada; la cual se dejó en la incubadora por 24 horas a 29°C. Luego se realizó un recuento en cámara de Neubauer, y se obtuvo la concentración del inóculo. ⁽²⁾

2.4. OBTENCIÓN, DETECCIÓN Y ESTIMACIÓN DEL SIDERÓFORO.

Para la obtención del sideróforo se preparó 250 mL del medio SM deficiente de hierro ajustado a pH 7; al cual se inoculó el 1% (v/v) del inóculo obtenido; se incubó a 29°C durante 24 horas en un shaker a 120 rpm. Luego, se llevó a la centrifuga a 10000 rpm durante 15 minutos; se extrajo el sobrenadante, el cual fue sometido a la detección y estimación del sideróforo. ⁽⁸⁾

Para la detección cualitativa, con una asa de Kohl se tomó una alícuota del sobrenadante y se sembró en medio CAS por agotamiento, bajo condiciones asépticas. Se incubó a 29 °C por 24 horas. ⁽³⁷⁾

Para la estimación cuantitativa del sideróforo obtenido, se colocó en un tubo de ensayo 0.5 mL del reactivo de CAS y 0.5 mL del sobrenadante obtenido; se mezcló homogéneamente y se llevó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 630 nm; para lo cual se realizó un blanco el cual se agregó a un tubo de ensayo 0.5 mL del reactivo CAS ⁽³⁷⁾; y se anotó ambas absorbancias, luego se realizó el cálculo para determinar la cantidad del sideróforo obtenido. (Ecuación 1)

$$\% \text{Unidades de Sideroforo} = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorba de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo para determinar las unidades de sideróforo obtenidas.

2.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL CULTIVO.

2.5.1. Optimización del pH del medio: Se prepararon 3 tubos de ensayo con 2.5 mL de medio SM deficiente en hierro, los cuales se ajustaron a pH de 5, 7 y 9 respectivamente. Cada uno de los tubos se inocularon con *Pseudomona fluorescens* aislada, luego se llevó al shaker por 24 horas a 120 rpm. Finalmente se realizó la estimación de la cantidad de sideróforo. ^{(36) (25)}

2.5.2. Suplementación de la fuente de carbono: Se dispuso de tubos de ensayo a los cuales se agregaron 2.5 mL del medio SM deficiente en hierro, y se suplementaron cada uno con 0,01 g de las diversas fuentes de carbono (glucosa, lactosa y sacarosa). Se inocularon con la *Pseudomona fluorescens*, luego se llevó al shaker por 24 horas a 120 rpm. Finalmente se realizó la estimación de la cantidad de sideróforo. ⁽³⁶⁾

2.5.3. Influencia de la concentración de hierro: Se colocó en tubos de ensayos 2.5mL del medio SM deficiente en hierro, los cuales se suplemento 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Seguidamente se inoculó con *Pseudomona fluorescens* y se llevó al shaker a 120 rpm durante 24 horas. Finalmente se realizó la estimación de la cantidad de sideróforo. Además se realizó un recuento en cámara de Neubauer para determinar la concentración de *Pseudomona fluorescens* que se desarrolló a cada concentración. ⁽⁸⁾
⁽³⁶⁾

2.6. OBTENCIÓN OPTIMIZADA DEL SIDERÓFORO A PARTIR DE

Pseudomona fluorescens

Para la obtención del sideróforo en condiciones asépticas, se armó un sistema de reacción a partir de un recipiente de vidrio resistente al calor, el cual cuenta con un volumen de 250 mL; y tiene en la parte superior

(HEADPLATE) dos puertos: inoculación y toma de muestra. Cada uno de los puertos contaba con un candado para mantener las condiciones asépticas del sistema. El sistema de reacción se puede apreciar en la Figura 16.

Se preparó 250 mL del medio SM optimizado y se inoculó un 1% (v/v) del inóculo obtenido inicialmente. Se llevó el sistema de reacción al shaker a 120 rpm durante 48 horas, tomando muestras cada 6 horas. ⁽²⁾

Con las muestras obtenidas se estimó el porcentaje de unidades de sideróforo obtenido, además se realizó un recuento con la ayuda de una cámara de Neubauer. Se evaluó el tiempo en el que se obtuvo el mayor porcentaje de sideróforo. ⁽¹⁾



Figura 16. Sistema de Reacción para la obtención optimizada del sideróforo a partir de *Pseudomonas fluorescens*.

2.7. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SIDERÓFORO OBTENIDO A PARTIR DE *Pseudomonas fluorescens*.

Se obtuvo una muestra de 15 mL y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos. Luego, se separó el sobrenadante y se ajustó el pH a 3 con H₂SO₄ y una solución de Sulfato de amonio al 50%. La fase acuosa se concentró en un evaporador rotatorio.

Se neutralizó el concentrado, y se llevó a filtración al vacío, para lo cual se utilizó papel filtro Whatman N° 44, se agregó al concentrado metanol caliente. Finalmente se dejó en el desecador durante 24 horas. ⁽⁶⁾

2.8. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL SIDERÓFORO OBTENIDO A PARTIR DE *Pseudomonas fluorescens*.

Se reconstituyó 0.5 gr de la muestra cristalizada con 2 mL de agua desionizada estéril, seguidamente se ajustó el pH a 5.3 ⁽¹⁴⁾ Se tomó 1 mL de la muestra reconstituida y se realizó un análisis espectral a una longitud de onda de 300 nm a 700 nm para determinar la máxima absorbancia. A continuación, se llevó al HPLC, donde se trabajó con columnas Nucleosil C18 de 250 x 4 mm, un sistema Waters 2190, y a una longitud de onda que se obtuvo en el análisis espectral. Para la fase móvil se utilizó una elución por gradientes con 50 mM de ácido acético con metanol (3 al 30%) durante 50 minutos a un caudal de 0.7 mL /min. ⁽⁴⁰⁾

2.9. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICÓTICA *IN VITRO* DEL SIDERÓFORO OBTENIDO POR *Pseudomonas fluorescens*.

Se realizó soluciones a concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20,30, 40, 45, 55, 65 ppm, a partir de los cristales obtenidos reconstituidos en de agua desionizada estéril, y con ayuda de un Baño María a 30°C. ⁽⁴⁰⁾

Luego, en una placa con medio PDA se sembró la cepa de *Fusarium oxysporum* mediante el método de punción. A continuación, se realizó

pocillos de 5 mm de ancho cerca del lugar donde se hizo la punción y se colocara 250 µl del sideróforo reconstituido. Se dejó a 25°C durante 7 días.

(61)

2.10. UTILIZACIÓN DEL SIDERÓFORO COMO INHIBIDOR DEL *Fusarium oxysporum* EN CULTIVOS DE *Solanum lycopersicum* (TOMATE) INFECTADAS.

Al evaluar la actividad antimicótica del sideróforo, se realizó un pequeño biohuerto donde se obtuvo las condiciones controladas de los cultivos de *Solanum lycopersicum* (Tomate), para lo cual se utilizó agrofilm para controlar la temperatura entre 16°C a 24 °C; se preparó un sustrato a base de aserrín y composta de estiércol ovino, el riego se realizó por goteo y aspersión sobre hojas y tallos. (62)

Se evaluó diariamente durante 30 días la conformación y evolución del área foliar y la altura de tallos en plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate).⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los sideróforos son pequeñas moléculas orgánicas producidas por microorganismos o plantas bajo condiciones de limitación de hierro que mejoran la captación de este elemento. En el medio ambiente, la forma férrica de hierro es insoluble e inaccesible a pH fisiológico. Bajo esta condición, los microorganismos sintetizan sideróforos que tienen alta afinidad por el hierro férrico. Estos complejos hierro-sideróforo son transportados entonces al citosol. En el citosol, el hierro férrico se reduce en hierro ferroso y se hace accesible al microorganismo. En los últimos tiempos, los sideróforos han llamado la atención debido a sus posibles funciones en diferentes campos. Los sideróforos tienen aplicación en la ecología microbiana para potenciar el crecimiento de varios microorganismos incultivables y pueden alterar las comunidades microbianas. En el campo de la agricultura, diferentes tipos de sideróforos promueven el crecimiento de varias especies vegetales y aumentan su rendimiento aumentando la absorción de hierro por las plantas. Los sideróforos actúan como un potencial agente de control biológico.⁽¹⁶⁾

3.1. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA Y BIOQUÍMICA DE *Pseudomona fluorescens*.

Pseudomona fluorescens se aisló a partir de las raíces de *Capsicum pubescens* (Rocoto), tal como Preston menciona, que en raíces de plantas de la familia *Solanaceae* se encuentra mayor cantidad de microorganismos estimuladores del crecimiento vegetal (MECV), entre ellos la *Pseudomona fluorescens*. Para la extracción de los MECV de las raíces indica también Preston que es preferible utilizar un surfactante no iónico, para preservar la conformación de los microorganismos; por tal motivo se aplicó el Triton X – 100 en disolución.⁽⁶⁰⁾

La siembra se realizó por agotamiento en medio Cetrimide, se dejó incubando a 29°C durante un periodo de 24 horas.

Tortora, Funke y Case indican que el crecimiento del género *Pseudomona* se puede dar en medio King A o también el medio Cetrimide, ambos específicos y selectivos; siendo la única diferencia que la cetrimida que contiene el último medio nombrado, actúa como agente inhibidor, liberando el nitrógeno y el fósforo de la flora acompañante. Es por tal motivo que se prefirió trabajar con el medio Cetrimide en vez del medio King A.⁽³⁰⁾

En la Figura 17 se aprecia las características macroscópicas obteniendo como resultado colonias blanquecinas aplanadas de aproximadamente 1 mm de diámetro, de consistencia mucosa, forma circular y borde liso. Las características macroscópicas encontradas son muy similares a las descritas por Koneman, donde indica que la *Pseudomona fluorescens* tiene un crecimiento en placa de colonias mucoides, blanquecinas, teniendo formas circulares, lisas y aplanadas además que se puede evidenciar la presencia de la fluoresceína, si es llevada bajo cámara UV.⁽³²⁾

En la cámara de UV de rango corto se visualizó la pigmentación fluorescente de las colonias, lo cual es característico de la *Pseudomona fluorescens*, además que el medio de cultivo microbiológico utilizado inhibe el crecimiento de otros microorganismos Gram Negativos, y favorece la síntesis del pigmento.

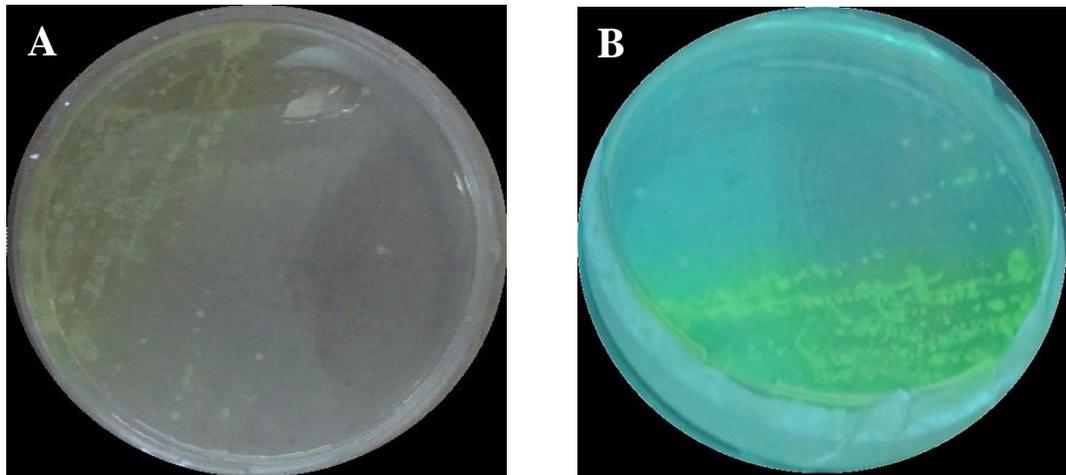


Figura 17. *Pseudomonas* aislada a partir de la rizosfera de *Capsicum pubescens*: A) Medio Cetrimide sin luz UV. B) Medio Cetrimide bajo luz UV de rango corto.

Además MacFaddin menciona que la presencia de la fluorescencia en la *Pseudomonas fluorescens* se da en parte por la composición del medio que contiene Cloruro de magnesio y Sulfato de potasio lo cual promueve dicha fluorescencia. ⁽³²⁾
⁽³³⁾

Como un segundo paso, se hizo la caracterización microscópica, para lo cual se realizó una tinción de Gram y se visualizó en un microscopio óptico a un objetivo de 100X, dando como resultados bacilos teñidos de color rosado, lo cual nos indica que son Gram Negativos.

Murray explica que el género *Pseudomonas* es un bacilo gramnegativo recto o ligeramente curvo, tal como se aprecia en la Figura 18. ⁽³¹⁾

Tortora, Funke y Case indican que los Gram Negativos presentan esa coloración rosácea debido a que las bacterias Gram Negativas presentan una pared celular constituida por petidoglicano y dos membranas lipídicas tanto interna como externa que al agregar la solución decolorante alcohol – acetona disuelve los lípidos que se encuentran en ambas membranas, dejando poros, por donde se pierde el colorante Cristal Violeta. ⁽³⁰⁾

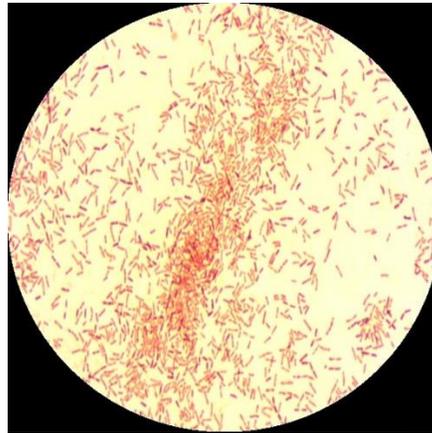


Figura 18. Caracterización Microscópica mediante la aplicación de la Tinción de Gram a 100x.

En la Figura 18 se aprecian bacilos Gram Negativos observados en Microscopio óptico con objetivo de 100X con aceite de inmersión, lo cual se ajusta a lo descrito por Tortora, Funke y Case.

Finalmente la caracterización bioquímica se realizó mediante la utilización de una pruebas de identificación bioquímica, la cual consta de los siguientes medios: TSI, LIA, CS, UREA y SIM; siendo los resultados los que se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 3. Resultados del Medio TSI (Triple Azúcar Hierro)

TSI - K/K	
Fermenta Lactosa	Negativo
Fermenta Glucosa	Negativo
Dióxido de Carbono	Negativo
Ácido Sulfhídrico	Negativo



Figura 19. Caracterización Bioquímica en Medio TSI.

Como podemos observar en la Tabla 3 como en la Figura 19, los resultados son característicos del género *Pseudomona*, e idénticos a los expuestos por Torrico, donde resalta que no hay cambio o viraje del indicador rojo de fenol debido a que no fermenta las fuentes de carbono para utilizarlas como energía; si no que lo hacen mediante el mecanismo de oxidación. ⁽²⁹⁾

Además Koneman indica que el mecanismos de oxidación estipulado por Torrico es un proceso aerobio y las bacterias que oxidan los hidratos de carbono por lo común son aerobias obligadas. El proceso de oxidación no es degradado y fraccionado en dos triosas. Si la fuente de carbono fuera la glucosa, es oxidado hasta generar dos moléculas de ácido pirúvico. En contraste con el metabolismo fermentativo, la oxidación no requiere una fosforilación inicial de un hidrato de carbono antes de la degradación, además que produce menor acidez que la fermentación. ^{(32) (29)}

Tabla 4. Resultados del Medio LIA (Lisina Hierro Agar)

LIA - K/K	
Lisina	Positivo
Descarboxilación	Positivo
Desaminación	Negativo
Ácido Sulfúrico	Negativo



Figura 20. Caracterización Bioquímica en Medio LIA.

Como podemos observar en la Tabla 4 como en la Figura 20, los resultados son característicos del género *Pseudomona*, y muy parecidos a los expuestos por Torrico y MacFaddin, los cuales indican que algunas subespecies de la *Pseudomona fluorescens* pueden activar las enzimas para desaminar o descarboxilar la lisina.

La descarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio, lo cual produce el viraje del indicador al color violeta. La desaminación la lisina, produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual, con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio. ⁽²⁹⁾ ⁽³³⁾

Tabla 5. Resultados del Medio CS (Citrato de Simmons)

Citrato de Simmons	
Crecimiento	Positivo
Utiliza Citrato de Sodio	Positivo



Figura 21. Caracterización Bioquímica en Medio CS.

En la Tabla 5 como en la Figura 21, se aprecia que la cepa microbiana a investigar tiene la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su metabolismo y su crecimiento.

MacFaddin menciona que es positivo si hay crecimiento con un intenso color azul en el pico de flauta; mientras que será negativo si hay ausencia de crecimiento y no hay viraje en el indicador. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono y sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa (Citrataasa), mediante el ciclo del ácido tricarboxílico. ⁽³²⁾

El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos haciendo que el medio entonces vira a una coloración azul. ⁽³³⁾

Tabla 6. Resultados del Medio Urea

Urea	
Crecimiento	Positivo
Enzima ureasa	Positivo



Figura 22. Caracterización Bioquímica en Medio Urea.

En la Tabla 6 como en la Figura 22, se puede observar que el microorganismo en estudio tiene la capacidad de hidrolizar la urea por la presencia de la enzima ureasa. MacFaddin menciona que algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la utilización de la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el indicador del amarillo al rojo. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea. ⁽³³⁾

Tabla 7. Resultados del Medio SIM (Ácido Sulfhídrico, Indol, Movilidad)

SIM	
Ácido Sulfhídrico	Negativo
Indol	Negativo
Movilidad	Positiva



Figura 23. Caracterización Bioquímica en Medio SIM.

El medio SIM permite la caracterización bioquímica de la cepa microbiana en estudio, a través de tres parámetros que se observan tanto en la Tabla 7 como en la Figura 23, los cuales son característicos del género *Pseudomona*.

Koneman y MacFaddin explican que el triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y especialmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para generar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovacs para generar un compuesto de color rojo.

Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, debido a la baja concentración de agar en el medio (0.3 -0.5 %); mientras que aquellas cepas productoras de ácido sulfhídrico se distinguen por la generación de un precipitado negro a partir del tiosulfato. ^{(32) (33)}

Como hemos podido observar hasta el momento, todos los resultados se ajustan al género *Pseudomona*, se cree que pueda ser una *Pseudomona fluorescens* por el pigmento fluorescente que emitió en el medio Cetrimide, y que es característico de esta cepa.

También se realizó pruebas enzimáticas de catalasa y oxidasa, las cuales se muestran en la Figura 24 y 25.



Figura 24. Prueba rápida de Catalasa.

La Figura 24 muestra la presencia de burbujas al hacer contacto con el microorganismo estudiado, esto evidencia la presencia de la enzima catalasa en este microorganismo.

Las flavoproteínas reducidas se unen con el oxígeno y las oxidasas en la cadena respiratoria para formar dos compuestos tóxicos: el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido.

Tortora y MacFaddin indican que la enzima catalasa se encuentra presente en todo el género *Pseudomona*.⁽³⁰⁾ ⁽³³⁾ MacFaddin indica además que la *Pseudomona fluorescens* presenta una ferrocitocromo c peroxidasa, la cual es una catalasa considerada como hemoproteína que contiene el grupo hemo y pueden utilizar una amplia variedad de dadores de electrones para reducir el peróxido de hidrogeno.⁽³³⁾



Figura 25. Prueba rápida en Tira de Oxidasa

La Figura 25 evidencia la coloración morada de la tira de oxidasa la cual es positiva debido a la presencia de una enzima oxidasa intracelular; dicha reacción se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular.

Murray y MacFaddin, la prueba oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intercelular. Esta reacción de la oxidasa se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia de electrones.⁽³³⁾ Además Murray estipula que esta es una característica resaltante del género *Pseudomona*.⁽³³⁾ ⁽³¹⁾

3.2. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA DE *Fusarium oxysporum*.

El aislamiento se realizó a partir de la rizósfera y segmentos de los tallos plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate) que fueron diagnosticadas con *Fusarium oxysporum*.

Amini menciona que se diagnostica que la planta *Solanum lycopersicum* (Tomate) padece de marchitamiento vascular cuando al principio las hojas pierden turgencia y presentan clorosis; los tallos y raíces no muestran daño inicial, pero luego se afectan severamente con la formación de cavidades, presentándose una pudrición seca en la base y en las raíces. En una etapa más avanzada, los tallos al ser cortados transversalmente, presentan en las vías vasculares una coloración amarillenta o marrón con la muerte y deshilachamiento de los tejidos, sin afectarse la médula, lo cual puede ser distinguible de otras enfermedades. De esta forma se logró identificar los segmentos con marchitamiento vascular. ⁽⁵⁹⁾

El segmento sembrado en medio de cultivo PDA, tuvo un rápido crecimiento ya que al cuarto día de incubación a temperatura ambiente ya había micelio. Las principales características macroscópicas que se observaron fue la formación de micelio esparcido de color blanco, que se esparce desde el punto de siembra extendiéndose en forma radial hacia los extremos de la placa como se puede observar en la Figura 26.



Figura 26. *Fusarium oxysporum* aislado en Medio PDA a partir de plantas de *Solanum lycopersicum* infectadas.

Rattink evidencia que el género *Fusarium* se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido, tal cual se vio en el presente trabajo. Además informa que tiene un micelio aéreo, abundante y algodonoso y que con los días se vuelve violeta claro; el cual puede evidenciarse en la Figura 26. ⁽⁵³⁾

Por otro lado Casas, muestra que algunas subespecies del *Fusarium oxysporum* presentan un micelio de color púrpura oscuro, como el que genera enfermedad en el *Dianthus caryophyllus* (Clavel), mientras el que está presente en variaciones de *Solanum lycopersicum* (Tomate) presenta un micelio blanquecino. ⁽⁵⁴⁾

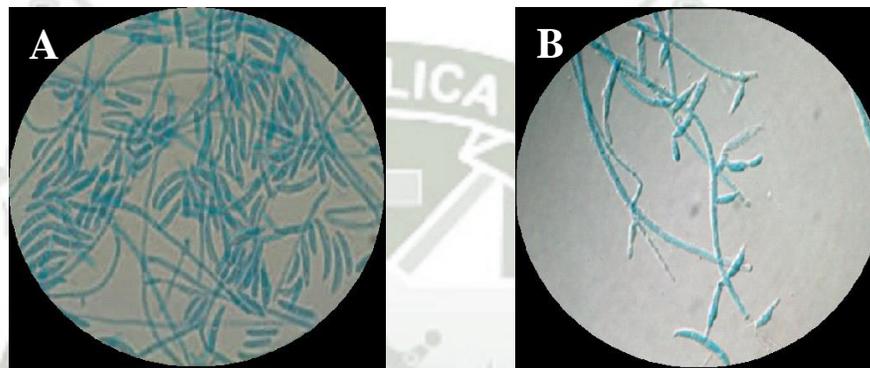


Figura 27. Características Microscópicas con Tinción de Azul de Lactofenol a 40X.

Casas menciona que mediante la observación microscópica podemos evidenciar microconidias de forma elipsoidal a cilíndricas, rectas o curvas, se forman sobre fialides o conidióforos; las macroconidias (que son las que se pueden visualizar en la Figura 27 tanto en A) que hay macroconidias ligeramente curvas. Mientras que en la imagen B) se aprecia con mayor claridad los septos visibles de extremos redondos.) son esporas fusiformes moderadamente curvas. También hay la presencia de clamidioesporas formada por la condensación de los contenidos de las hifas y macroconidios, las cuales sobreviven a condiciones desfavorables. ⁽⁵⁴⁾

3.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA LA PRODUCCIÓN DEL SIDERÓFORO A PARTIR DE *Pseudomona fluorescens*.

El inóculo obtenido se encontraba en fase exponencial de crecimiento, con una concentración de 8.5×10^8 Número de Microorganismos/mL, ya en este punto, el inóculo poseía la pigmentación fluorescente bajo luz UV; lo cual indico que había la presencia del sideróforo.

3.4. OBTENCIÓN, DETECCIÓN Y ESTIMACIÓN DEL SIDERÓFORO.

A las 24 horas se observó la turbidez del medio, y este sirvió tanto para la detección en placa como para su estimación.



Figura 28. Medio CAS sembrado con *Pseudomona fluorescens* obtenida mediante el Medio de Ácido Succinico deficiente en hierro.

Se evidencia en la Figura 28 que efectivamente hay la presencia de sideróforos por el cambio de coloración del medio.

Louden indica que el viraje del coloración se da debido a que el complejo CAS / HDTMA se compacta firmemente con hierro férrico para producir un color azul y cuando hay la presencia de un sideróforo (como en este caso), elimina el hierro del complejo y esto hace el viraje de coloración a naranja. ⁽³⁷⁾

Al ver que había la presencia del sideróforo se realizó la estimación respectiva, dando como resultado un 84.3% de unidades de sideróforo.

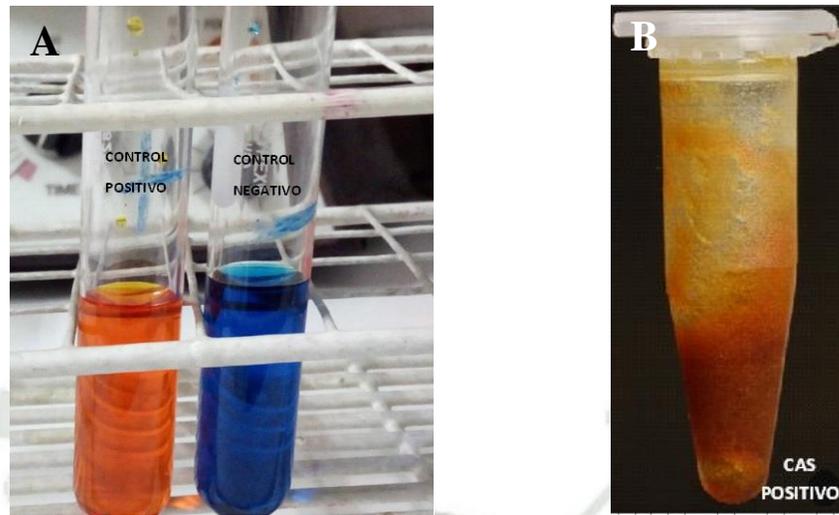


Figura 29. Estimación mediante la aplicación del Reactivo Cromo Azurol S (CAS).

En la figura 29 se muestra en A) Controladores del Reactivo CAS. B) Eppendorf donde ocurrió la reacción de estimación para determinar el porcentaje de unidades de sideróforo obtenido en 24 horas.

Tank señala que al transcurrir 24 horas se estimó una cantidad del 82% de unidades de sideróforo a partir de la cepa *Pseudomona fluorescens*.⁽³⁶⁾ Además, Sayyed y Badguajar indican que a partir de *Pseudomona fluorescens* obtuvieron un 86% de unidades de sideróforo, mientras que de *Pseudomona putida* llegaron a obtener un 83% de unidades de sideróforo. Lo cual indica que el resultado obtenido se encuentra dentro de los valores normales.⁽⁸⁾

3.5.OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL CULTIVO.

Para maximizar la obtención del sideróforo se evaluaron diversos parámetros generando como resultado final que el pH óptimo es 7, y que la utilización como mejor fuente de carbono es la glucosa, además que hay una mejor producción del sideróforo cuando no hay hierro en el medio. A continuación se verán los resultados detalladamente.

3.5.1. Optimización del pH del medio:

El pH muchas veces juega un papel muy importante al momento de obtener un metabolito secundario; es por ello que es una variable muy importante para este trabajo.

Tabla 8. Porcentaje de Unidades de sideróforo obtenidas a diversos pH.

pH	Absorbancia a 630 nm	Porcentaje de unidades de sideróforo obtenido
5	0.614	61.4
7	0.796	79.6
9	0.549	54.9

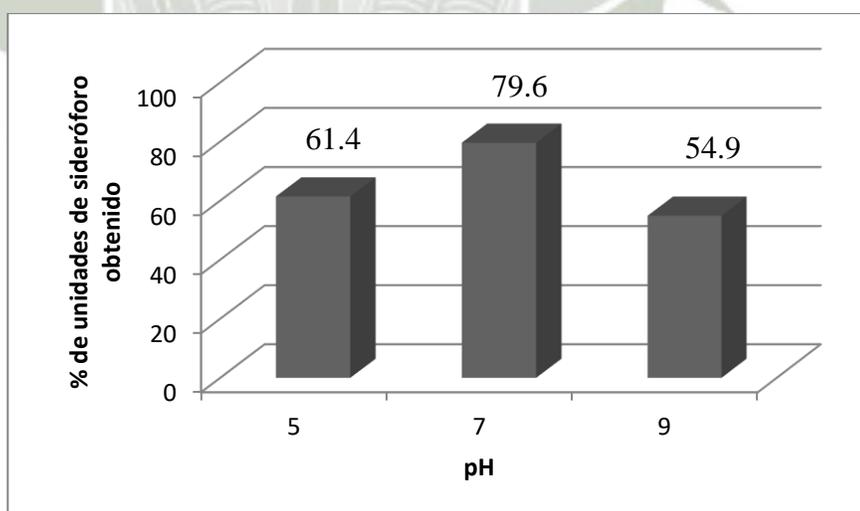


Figura 30. Evaluación de la acción del pH sobre la obtención de unidades de sideróforo obtenidas

Como se puede apreciar tanto en la Tabla 8 como en la Figura 30 se pudo obtener casi un 80% de unidades de sideróforo a pH neutro ó 7. Mientras que a un pH alcalino logramos obtener casi el 50% de subunidades de sideróforo. Tank y Rajendra exponen que a pH cercanos a la neutralidad hasta un pH 7.5 se logra obtener un porcentaje de unidades de sideróforo superior al 70%. Mientras que a pH ácido o alcalino la obtención queda disminuida entre el 50 – 60% de unidades formadoras de colonias. ⁽³⁶⁾

Bhattacharya menciona que el pH influye directamente en la obtención de unidades de sideróforo. Un pH cercano a la neutralidad es un parámetro que hay q ajustar y mantener para obtener más del 50% de unidades de sideróforo. ⁽²⁵⁾

3.5.2. Suplementación de la fuente de carbono:

Otro parámetro importante es la fuente de carbono que el microorganismo utiliza para su metabolización. Así como se explicó anteriormente la *Pseudomona fluorescens* utiliza el mecanismo de oxidación para convertirla o metabolizarla en energía necesaria para diversos procesos.

Tabla 9. Porcentaje de Unidades de sideróforo obtenidas dependiendo de las diversas fuentes de carbono.

Fuente de Carbono	Absorbancia a 630 nm	Porcentaje de unidades de sideróforo obtenido
Glucosa	0.536	53.6
Lactosa	0.459	45.9
Sacarosa	0.443	44.3

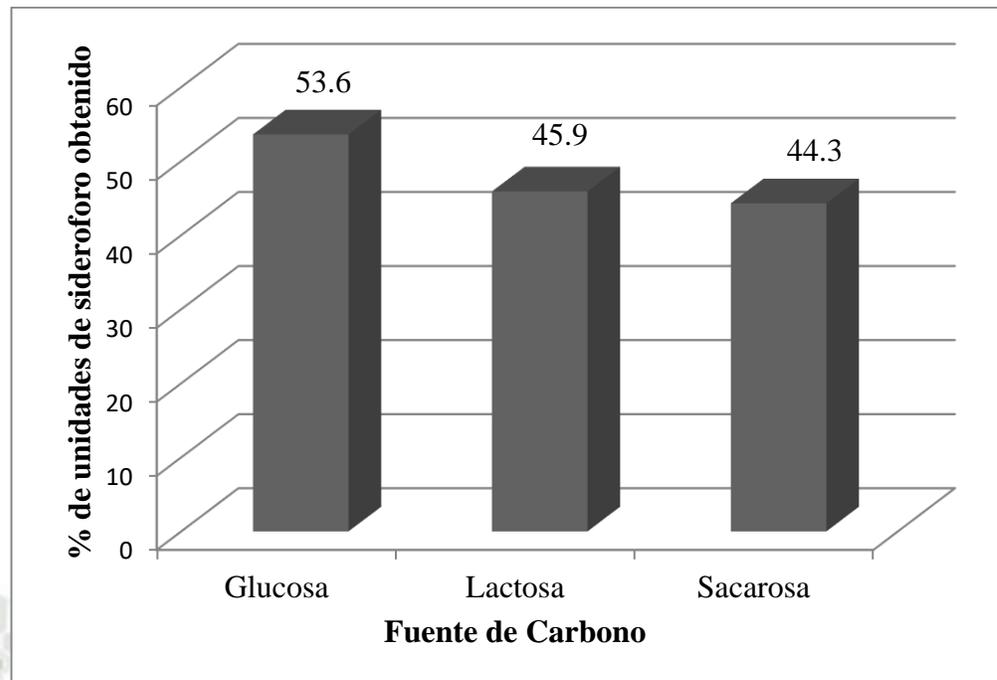


Figura 31. Evaluación de las diversas fuentes e carbono sobre el porcentaje de unidades de sideróforo obtenido.

Vemos en tanto en la Tabla 9 como en la Figura 31, que la mejor fuente de carbono que oxida la *Pseudomona fluorescenes* para la producción del sideróforo fue la glucosa, obteniendo casi un 54% de unidades de sideróforo. Sin embargo, entre lactosa y sacarosa no hay una gran diferencia.

Tank y Rajendra concluyen que la *Pseudomona fluorescens* utiliza mejor la glucosa como fuente de carbono, pero que no es netamente significativa en la obtención del sideróforo. ⁽³⁶⁾

3.5.3. Influencia de la Concentración de Hierro:

Este parámetro fue el más importante en la evaluación, debido a que se quería saber a qué concentración de hierro el sideróforo queda inhibido o bloqueada su síntesis. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 10. Porcentaje de Unidades de sideróforo obtenidas dependiendo de las diversas concentraciones de FeCl₃.

Cloruro de Hierro (III) en μM	Absorbancia a 630 nm	Porcentaje de unidades de sideróforo obtenido	Concentración de <i>Pseudomona fluorescens</i> en N° de Microorganismos/mL
0	0.829	82.9	8.4×10^8
5	0.625	62.5	9.5×10^8
10	0.537	53.7	1.0×10^9
15	0.421	42.1	1.0×10^9
20	0.283	28.3	1.1×10^9
25	0.126	12.6	1.1×10^9
30	0.035	3.5	1.1×10^9

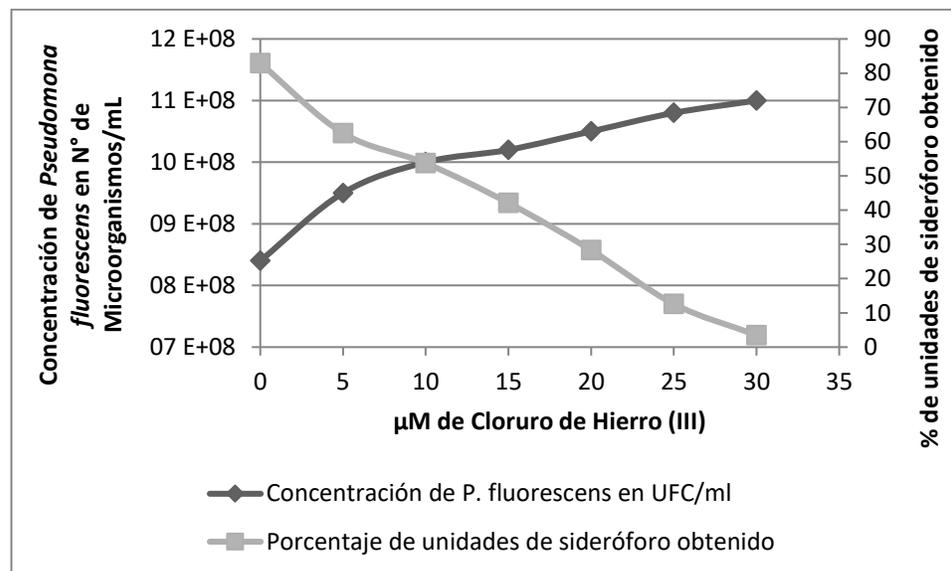


Figura 32. Influencia de las diversas Concentraciones de Cloruro de Hierro sobre el porcentaje de unidades de sideróforo obtenidas y el crecimiento microbiano de la *Pseudomonas fluorescens*.

En la Tabla 10 como en la Figura 32 se puede observar que a mayor concentración de Cloruro de Hierro (III) el crecimiento microbiano se mantiene dentro de lo normal; pero la obtención del sideróforo disminuye drásticamente; esto puede deberse a que la *Pseudomonas fluorescens* utiliza el hierro en su crecimiento, pero a su vez inhibe la excreción del sideróforo.

Tank y Rajendra exponen que concentraciones entre cero a 1.5 μM de Cloruro de Hierro (III) hay mayor obtención del sideróforo a partir de *Pseudomonas putida*, sin quedar inhibido el crecimiento microbiano. ⁽³⁶⁾ Sin embargo, Sayyed y Badguajar indican en su investigación que trabajar con una concentración de 1 μM de Cloruro de Hierro (III) mejora la obtención del sideróforo a partir de *Pseudomonas fluorescens*.

Como se tomó concentraciones que se incrementan de cinco en cinco se observó que al no haber cloruro de hierro (III) se obtiene un buen porcentaje de unidades de sideróforo. ⁽⁸⁾

3.6. OBTENCIÓN OPTIMIZADA DEL SIDERÓFORO A PARTIR DE *Pseudomona fluorescens*

Luego de obtener los parámetros optimizados, se suplemento y mejoro el medio de ácido succínico para obtener la mayor cantidad de sideróforos.

Tabla 11. Cinética de Crecimiento de la *Pseudomona fluorescens* y la obtención del sideróforo.

Incubación (h)	Absorbancia a 630 nm	Porcentaje de unidades de sideróforo obtenido	Concentración de <i>Pseudomona fluorescens</i> en N° de Microorganismos/mL
6	0.05	5	6.5×10^3
12	0.241	24.1	7.1×10^4
18	0.557	55.7	3.8×10^6
24	0.841	84.1	1.7×10^8
30	0.836	83.6	8.2×10^8
36	0.811	81.1	1.0×10^9
42	0.572	57.2	9.8×10^8
48	0.491	49.1	4.6×10^8

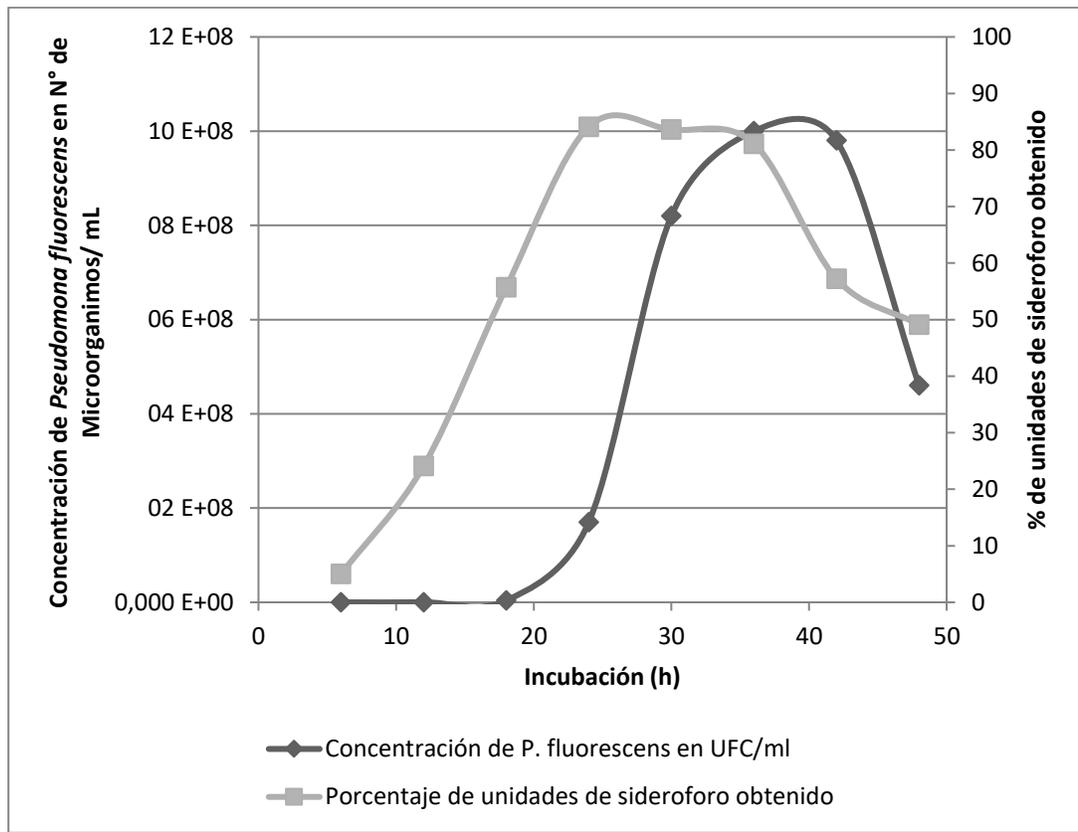


Figura 33. Evaluación de la Cinética de Crecimiento vs el Porcentaje de Unidades de sideróforo obtenido.

En la Tabla 11 como en la Figura 32, se puede observar claramente que el porcentaje más alto de unidades de sideróforo obtenidas se da a las 24 horas, manteniendo una cantidad por encima del 80% hasta la hora 36; mientras que la cinética de crecimiento de la *Pseudomonas fluorescens* nos muestra que la fase exponencial se encuentra entre las 30 y 42 horas.

También se aprecia que al ajustar todos los parámetros se puede obtener tanto la curva de crecimiento de la *Pseudomonas fluorescens* sin ser inhibida por la producción del sideróforo; debido a que no hay competencia por los sustratos que ambas requieren.

Brown concluye que a las 24 horas se llega a obtener un 84% de unidades de sideróforo, siendo a esta hora la máxima producción del sideróforo. ⁽¹⁾

3.7. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SIDERÓFORO OBTENIDO A PARTIR DE *Pseudomona fluorescens*.

Se obtuvieron los cristales de sideróforo de manera exitosa como se muestra en la siguiente figura.



Figura 34. Cristales de sideróforo obtenido a partir del Medio de Ácido Succínico deficiente en hierro

Como se aprecia en la Figura 34 el pigmento es de color amarillo y al llevarlo a la luz UV fluorescen los cristales. Es por ello que junto con las otras características mostradas se determinó que se logró aislar el sideróforo; el cual se encuentra en gran proporción en *Pseudomona fluorescens*. Se obtuvo un 4.4% p/v de sideróforo. Valencia indica que la solución de Sulfato de amonio al 50% y el ajuste de pH 3, es utilizada para desproteinizar la muestra, mientras que el metanol caliente en filtración sirve para eliminar las impurezas que puedan quedar en la muestra. Tanto la evaporación como la filtración, son operaciones que ayudan a la formación de cristales amarillos que fluorescieron bajo la luz UV. ⁽⁶⁾

3.8. DETECCIÓN DE SIDERÓFORO OBTENIDO A PARTIR DE *Pseudomona fluorescens*.

El sideróforo se encuentra aproximadamente a una longitud de onda alrededor de los 400 nm. Entonces al realizar el análisis espectral se evaluó la presencia o ausencia del sideróforo o si se aisló otro compuesto. Además la longitud de onda

encontrada fue aplicada en el análisis por HPLC. Los resultados los veremos a continuación:

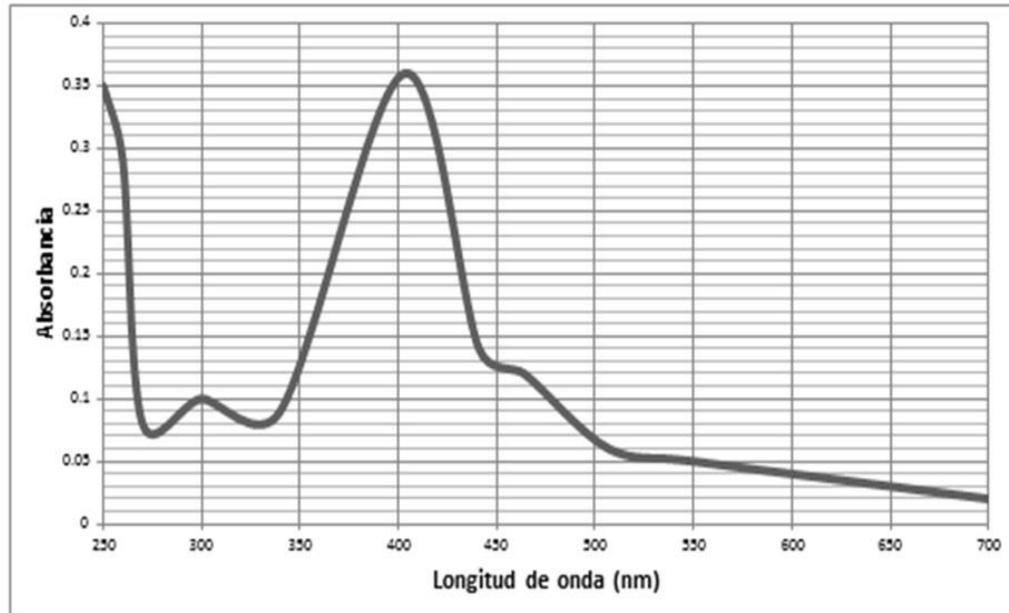


Figura 35. Análisis Espectral del sideróforo aislado en Medio de Ácido Succínico.

Como se aprecia en la Figura 35 el pico más alto se encuentra a 403 nm aproximadamente teniendo una absorbancia de 0.36.

Storey menciona que la pioverdina, se encuentra entre los 380 nm – 440 nm; teniendo esto en cuenta vemos que el resultado obtenido se encuentra dentro del rango esperado. ⁽¹⁴⁾

En cuanto a los resultados de HPLC se evaluó los RT (Tiempos de Retención); lo cual, permitió la diferenciación del sideróforo entre las diferentes cadenas peptídicas producidas por diferentes especies de *Pseudomona*.

En la Figura 35 se puede observar los picos dominantes obtenidos por el sideróforo a partir de *Pseudomona fluorescens*.

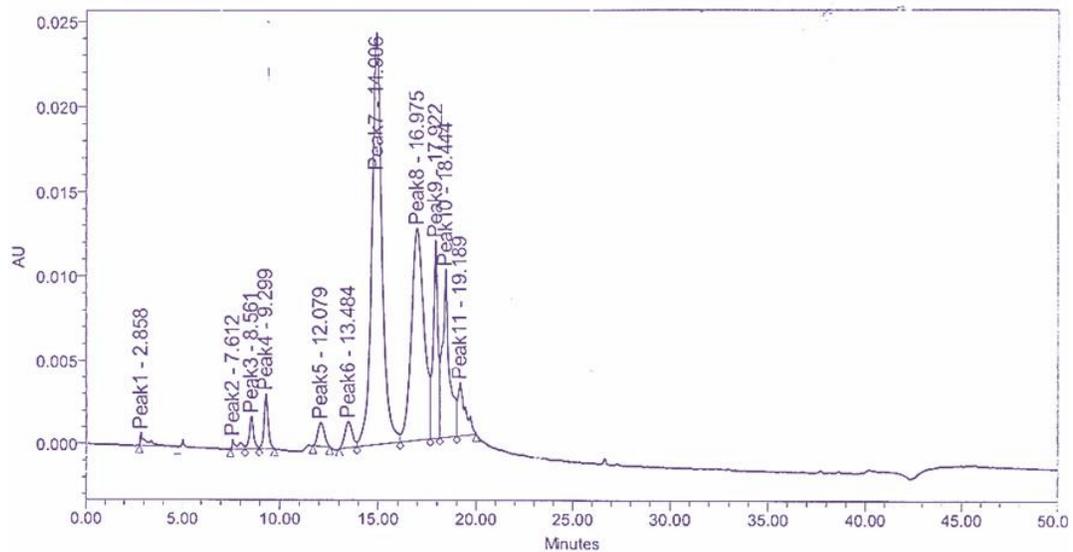


Figura 36. Cromatograma del sideróforo producido por la *Pseudomonas fluorescens*.

Como se puede ver en la Figura 36, se obtuvo tres picos dominantes y bien definidos a 14.91 min; 16.98 min y 18.44 min a 403 nm, los cuales son característicos de los sideróforos.

Según Bultreys, Gheysen y Wathélet indican que las especies de *Pseudomonas* que poseen la pioverdina tienen picos dominantes que van entre 14.894 minutos hasta 18.783 minutos.⁽⁴⁰⁾

Las condiciones trabajadas son similares a las expuestas por Bultreys, Gheysen y Wathélet, a diferencia del tiempo de corrida de la muestra; debido a que Battacharya menciona que 45 minutos es un tiempo promedio que muestras de este tipo debe permanecer en el HPLC. Por tal motivo, el tiempo de corrida se prolongó hasta los 50 minutos.

Hasta este punto se vio que efectivamente el pigmento fluorescente aislado a partir de *Pseudomonas fluorescens* es un sideróforo.

3.9. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA IN VITRO DEL SIDERÓFORO OBTENIDO POR *Pseudomona fluorescens*.

Este punto a evaluar fue muy importante debido a que se comprobó la inhibición del crecimiento del *Fusarium oxysporum* por la actividad del sideróforo. Esta aseveración se observa en la Figura 37 y la Tabla 12, donde se muestra la concentración del sideróforo con la respectiva medición de los halos generados.

Tabla 12. Actividad Antimicóticas del sideróforo.

Concentración del Sideróforo (ppm)	Medida del Halo de Inhibición (mm)
0	0
5	0
10	11
15	15
20	20
30	24
40	31
45	34
55	39
65	42

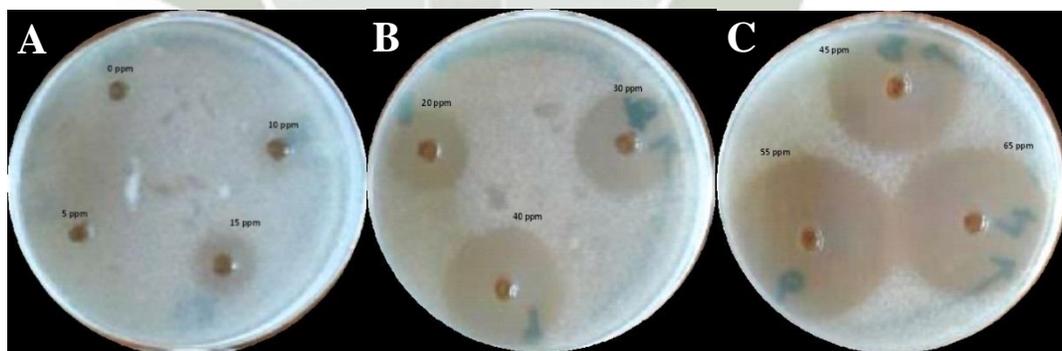


Figura 37. Actividad antimicótica del sideróforo sobre el *Fusarium oxysporum*.

Tanto en la Tabla 12 como en la Figura 37, se observa claramente que una concentración de 65 ppm del sideróforo puede inhibir el crecimiento del *Fusarium oxysporum*.

Akkopru y Demir indica en su investigación que hasta una concentración de 70 ppm se vio una inhibición de la pioverdina generando un halo de 45 mm. En su metodología Akkopru y Demir prepararon el medio PDA solubilizando el sideróforo en el medio después de ser esterilizado. ⁽⁶¹⁾

3.10. UTILIZACIÓN DEL SIDERÓFORO COMO INHIBIDOR DEL *Fusarium oxysporum* EN CULTIVOS DE *Solanum lycopersicum* (TOMATE) INFECTADAS.

Tabla 13. Condiciones iniciales que se encuentran las plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate).

INICIAL	Marchitamiento Vascular	Área Foliar (cm ²)	Altura de Tallos (cm)
Control Positivo	1 Estadio Tardío (CO/MA)	41.85	15.6
	2 Estadio Intermedio (C/MI)	49.78	18.3
	3 Estadio Inicial (CC/ SM)	67.49	20.1
Control Negativo	1 Negativo (SC/SM)	90.81	26.3
	2 Negativo (SC/ SM)	74.49	23.9
	3 Negativo (SC/ SM)	102.46	28.5
65 ppm del Sideróforo	1 Estadio Tardío (CO/MA)	32.99	14.9
	2 Estadio Intermedio (C/MI)	48.85	17.2
	3 Estadio Inicial (CC/ SM)	67.49	19.4

Clasificación y características de las plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate) trabajadas: **Estadio Inicial:** Sistema vascular presenta manchas de coloración

café claro (CC) y no hay presencia de micelio (SM). **Estadio Intermedio:** Sistema vascular presenta manchas de coloración café y presencia intermedia de micelio (MI). **Estadio Tardío:** Sistema vascular presenta manchas de coloración café oscuras (CO) y hay presencia abundante de micelio (MA).

Se indica que es Negativo cuando no hay presencia de manchas de coloración café claro (SC) y no hay presencia de micelio (SM).

Tabla 14. Condiciones finales que se encuentran las plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate).

DESPUÉS DE 30 DÍAS	Marchitamiento Vascular	Área Foliar (cm ²)	Altura de Tallos (cm)	Observación
Control Positivo	1 Estadio Tardío (CO/MA)	40.45	15.3	Clorosis y perdida de turgencia del tallo
	2 Estadio Intermedio (C/MI)	46.98	18.1	
	3 Estadio Inicial (CC/ SM)	65.16	19.9	
Control Negativo	1 Negativo (SC/SM)	92.67	26.4	Sin novedad, el crecimiento fue dentro de lo normal
	2 Negativo (SC/ SM)	77.29	24	
	3 Negativo (SC/ SM)	103.86	28.8	
65 ppm del Sideróforo	1 Estadio Tardío (CO/MA)	32.06	14.4	Mejoro la turgencia del tallo
	2 Estadio Intermedio (CC/SM)	51.18	17.4	
	3 Estadio Inicial (CC/ SM)	68.43	19.6	

Clasificación y características de las plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate) trabajadas: **Estadio Inicial:** Sistema vascular presenta manchas de coloración

café claro (CC) y no hay presencia de micelio (SM). **Estadio Intermedio:** Sistema vascular presenta manchas de coloración café y presencia intermedia de micelio (MI). **Estadio Tardío:** Sistema vascular presenta manchas de coloración café oscuras (CO) y hay presencia abundante de micelio (MA).
Se indica que es Negativo cuando no hay presencia de manchas de coloración café claro (SC) y no hay presencia de micelio (SM).

En las Tabla 13 y 14, se apreció la mejora que ocurre en las plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate) en estados iniciales como intermedios tratadas con 65 ppm del sideróforo, donde se evidencia la mejora del área foliar y tanto la altura como la turgencia de los tallos. En cuanto a la planta de *Solanum lycopersicum* (Tomate) con marchitamiento vascular avanzado, no se vio variación, al contrario, fue decayendo.



Figura 38. Sistema Vascular de plantas de *Solanum lycopersicum* (Tomate) a diversos estadios infectadas con *Fusarium oxysporum*.

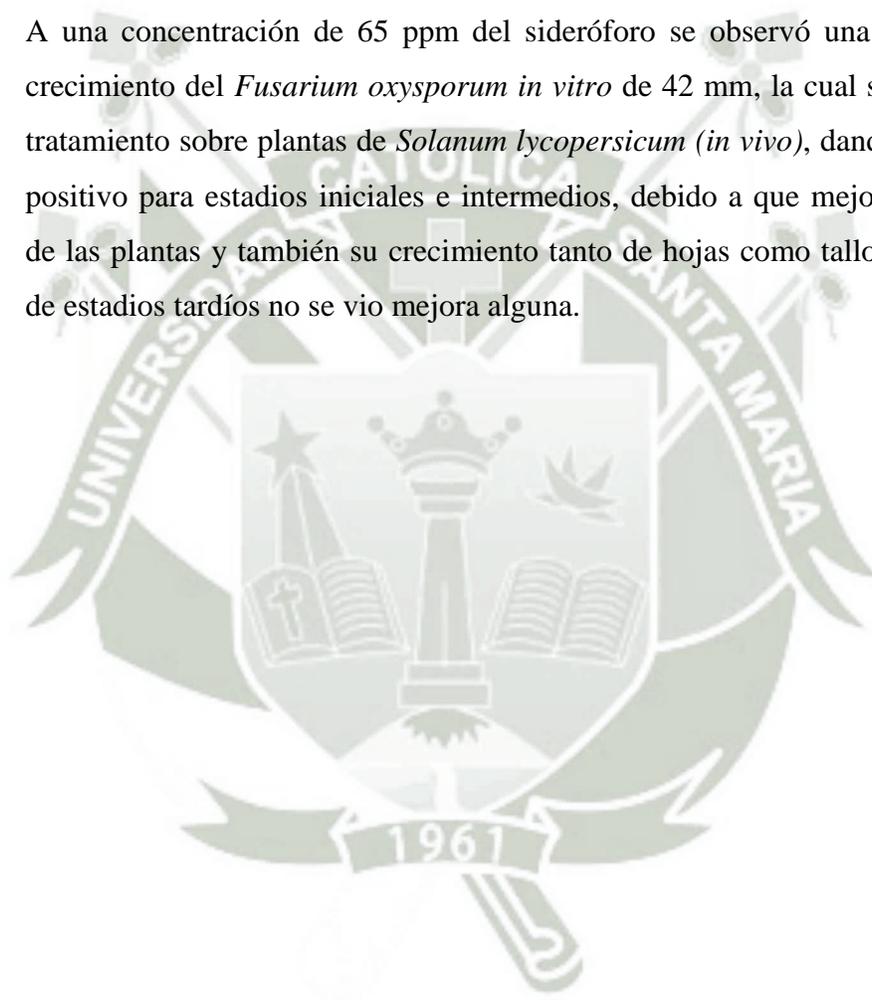
En la Figura 38 A) Estadio Inicial, B) Estadio Intermedio, C) Estadio Tardío.

Kotan, Sahin y Cafer concluye en su investigación realizada en plantas de *Solanum tuberosum* (papa) que tenían marchitamiento vascular por acción del *Fusarium oxysporum*, que la pioverdina solo podía actuar en plantas diagnosticadas en fase inicial, mientras que plantas en estado tardío, el sideróforo no podría revertir dicho proceso; lo cual también fue evidenciado en este trabajo. ⁽⁶²⁾

CONCLUSIONES

1. Se logró aislar colonias blanquecinas, de consistencia mucóide y de forma circular en el medio Cetrimide, que mediante pruebas de identificación bioquímica, enzimática y la utilización de flujogramas se caracterizó e identificó la *Pseudomona fluorescens* para la obtención del sideróforo. micelio aéreo abundante y algodonoso que al transcurrir los días se tornaba de un color violeta claro; que mediante examen directo con azul de lactofenol y la utilización de flujogramas se caracterizó e identificó el hongo *Fusarium oxysporum*, utilizado para evaluar si el sideróforo tiene propiedades antimicóticas contra este patógeno.
2. El medio de ácido succínico deficiente en hierro sirvió de forma excelente para la obtención del sideróforo. En cuanto a la siembra realizada en el medio Cromo Azurol S (CAS) mostró la presencia de sideróforo debido al viraje de color azul a un color anaranjado obteniéndose un 84.3% de unidades de sideróforo luego de 24 horas de incubación en dicho medio.
3. La optimización del pH del medio de ácido succínico deficiente de hierro, dio como resultado que el medio debía ser ajustado a pH 7 además que la *Pseudomona fluorescens* utiliza mediante mecanismo de oxidación la glucosa como fuente de carbono y que la ausencia de una fuente de hierro mejora la cantidad de unidades de sideróforo a obtener.

4. La extracción con solventes químicos y la purificación por filtración con solvente caliente dieron como resultado cristales de color amarillo fluorescente, obteniendo finalmente un 4.4% (p/v) del sideróforo.
5. La determinación de la presencia del sideróforo dio a una longitud de onda de 403 nm, medida utilizada en el HPLC donde se identificaron tres tiempos de retención puntuales (14.91 min, 16.98 min y 18.44 min), los cuales son característicos del sideróforo.
6. A una concentración de 65 ppm del sideróforo se observó una inhibición del crecimiento del *Fusarium oxysporum in vitro* de 42 mm, la cual se utilizó como tratamiento sobre plantas de *Solanum lycopersicum (in vivo)*, dando un resultado positivo para estadios iniciales e intermedios, debido a que mejoró la turgencia de las plantas y también su crecimiento tanto de hojas como tallos. Para el caso de estadios tardíos no se vio mejora alguna.



RECOMENDACIONES

1. Se sugiere investigar sobre otros posibles fitopatógenos que el sideroforo podría inhibir, tales como *Leveillula taurica* que causa Oidiosis, *Botryotinia fuckeliana* que genera Podredumbre gris, *Sclerotinia sclerotiorum* causa Podredumbre blanca y la *Alternaria solani* que causa la Alternariosis; todas ellas en plantaciones de *Solanum lycopersicum* (Tomate).
2. Investigar sobre las otras aplicaciones que puedan tener el sideroforo en el ámbito ambiental con la biorremediación de contaminantes ambiente ya que son extremadamente eficaces para solubilizar y aumentar la movilidad de una amplia gama de metales como el cadmio, cobre, níquel, plomo y zinc. Otras aplicaciones importantes también son como biosensores ópticos para determinar la biodisponibilidad de hierro en aguas oceánicas y/o suelos. En el área acuífera también tiene una gran aplicación como controlador de enfermedades de los peces limitando el hierro, el cual es necesario en la virulencia y las interacciones bacterianas.
3. Caracterizar químicamente el sideróforo mediante la utilización de espectrometría de masa ó resonancia magnética nuclear.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Brown A, Luke K.** "Siderophore production and utilization by milk spoilage *Pseudomona* species". Journal of Dairy Science. 2010 Agosto; 93(4).
2. **Hernnard C, Bachir M, Kystik P, Mohamed A.** "*Pseudomonas* siderophores. A mild and selective halogenation procedure of chromophonic moiety of pyoverdins". Tetrahedron Letters. 1997 Abril; 38(1).
3. **Rajkuman K, Noriharu A, Majeti N, Freitas H.** "Potential of siderophore - producing bacteria from improving heavy metals phyloextraction". Trend in Biotechnology. 2010 Marzo; 28(3).
4. **Raines D, Sanderson T, Wilde E, Duhme A.** "Siderophores". Elsevier. 2015 Mayo; 28(5).
5. **Takeshi N, Takuro O, Osamu A.** "Efficacy of bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants". Journal of Bioscience and Bioengineering. 2013 Junio; 115(6).
6. **Valencia E, Villegas J, Sánchez J, Peña J, Farías R.** "Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomona fluorescens* Zum80 incapaces de producir sideróforos". Terra Latinoamericana. 2005 Enero; 23(1).
7. **Ahmed E, Holmstrom J.** "Siderophores in enviromental research: roles and applications". Microbial Biotechnology. 2014 Marzo; 7(3).

8. **Sayyed R, Badguajar M, Sonawne H, Mhaske M, Chincholkar S.** "Production of microbial iron chelators (siderophores) by *fluorescent Pseudomonds*". Indian Journal of Biotechnology. 2005 Enero; 4(1).
9. **Kannahi M, Senbagan N.** "Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphaera soil and its antibacterial activity". Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014 Abril; 6(4).
10. **Amini J, Feuzi D.** "The effects of Fungicides on *Fusarium oxysporum f sp. lycopersici* associated with Fusarium wilt of Tomato". Journal of Plant Protection Research. 2010 Febrero; 50(2).
11. **Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan M, Kumar R.** "Extracellular biosynthesus of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*". Elseiver. 2003 Julio; 28(4).
12. **Sajeed S, Vidhale N.** "Bacterial siderophore and their application". International Journal of Current Microbiology and Applied Science. 2013 Diciembre; 2(12).
13. **Schrett M, Bignell E, Kragl C, Joechl C, Rogers T, Arst H, et al.** "Siderophores biosynthesis but not reductive Iron assimilation is essential for *Aspergillus niger* virulence. Journal Exp. Medical. 2013 Setiembre; 20(7).
14. **Storey E.** "Isolation, purification and chemical characterization of the Dihydroxamate type siderophore, produced by Rizobium leguminosarum IARI 917". East Teneesse State University. 2005 Noviembre; 23(6).

15. **Xionmei Y, Chengxiang D, Li X, Guangfang Z.** "The siderophore producing bacterium *Bacillus subtilis* CAS 15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper". *European Journal of Soil Biology*. 2011 Febrero; 47(1).
16. **Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma B, Bhattacharjee S, Tribedi P.** "Microbial siderophore and their potential applications: A review". *Environment Science Pollut*. 2016 Mayo; 23(5).
17. **Kim D, Misaqui I.** "Siderophore production by *fluorescent Pseudomonads* is sensitive to change in atmospheric O₂, and CO₂, concentrations". *Soil Biol. Biochem*. 1992 Julio; 24(8).
18. **Narillos E.** "Estudio de sideróforo procedentes de Bacterias Patógenas de peces de acuicultura. Preparación de intermedios sintéticos claves en la síntesis de sideróforo Acinetobactina y análogos estructurales". Universidad Da Coruña. 2014 Octubre; 34(1).
19. **Essén S, Johnsson A, Bylund D, Pedersen K, Lunstrom U.** "Siderophore production by *Pseudomonas stutzeri* under aerobic and anaerobic conditions". *Applied Environment Microbiology*. 2007 Setiembre; 73(18).
20. **No Added Chemicals.** "Storage and Transport of Iron in Living Things". *Chemistry Journal*. 2015 Mayo; 20(5).
21. **Holden V, Bachman M.** "Diverging roles of bacterial siderophores during infection". *Metallomics*. 2015 Junio; 7(6).

22. **Esmaeel Q, Pupin M, Kieu N, Chataigné G, Béchet M, Deravel J, et al.** "Burkholderia genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis". *Microbiology*. 2016 Junio; 5(3).
23. **Salusso A, Raimunda D.** "Defining the Roles of the Cation Diffusion Facilitators in homeostasis and establishment of their participation in Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*". *Front Cell Infect Microbiology*. 2017 Marzo; 20(7).
24. **Aguado G, Moreno B, Jiménez B, García E, Preciado R.** "Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas". *Scielo*. 2012 Marzo; 35(1).
25. **Bhattacharya A.** "Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomona fluorescens* and its comparison to iron (III) chelation". *Biotechnology Science*. 2010 Mayo; 93(4).
26. **Meyer J.** "Pyoverdines: pigments siderophores and potential taxonomic markers of *fluorescent Pseudomonas* species". *Springer*. 2000 Abril; 174(3).
27. **Helguero E.** "Bacilos Gram Negativos no fermentadores: *Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Burkholderia*". *Scielo*. 2010 Mayo; 19(4).
28. **Scales B, Dickson R, Huffnagle G.** "Microbiology, Genomics and Clinical Significance of *Pseudomona fluorescen*, Species Complex, on unappreciated colonizer of Humans Clinical". *Microbiological Reviews*. 2014 Mayo; 27(4).

29. **Torrice E.** "Características de los Bacilos Gram Negativos". Terra Latinoamerica. 2009 Marzo; 24(2).
30. **Tortora G, Funke B, Case C.** "Introducción a la Microbiología". Novena Edición ed. España: Panamericana; 2007.
31. **Murray P.** "Microbiología". Sexta edición ed. Barcelona: Panamericana; 2009.
32. **Koneman E, Allen S.** "Diagnostico Microbiológico". Sexta Edición ed. Barcelona: Panamericana; 2008.
33. **MacFaddin J.** "Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias de importancia clínica". Tercera Edición ed. Madrid: Panamericana; 2003.
34. **Liu G, Giometti S, Tollasken S, Wu L, Zhou J.** "Knock out of S01377 gene, which encodes the member of a conserved hypothetical bacterial protein family C062268, results in alteration of iron metabolism, increased spontaneous mutation and hydrogen peroxide sensitivity". BMC Genomics. 2006 Agosto; 79(7).
35. **Manninem M.** "Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores". Journal of Microbiology Methods. 1994 Abril; 19(1).
36. **Tank N, Rajendra N, Patel B, Saraf M.** "Evaluation and biochemical characterization of a distinctive pyoverdine from a *Pseudomona* isolated from chickpea Rhizosphere". Brazilian Journal of Microbiology. 2012 Noviembre; 10(5).

37. **Louden B, Haarmann D, Lynne A.** "Use of Blue Agar CAS Assay for siderophore detection". *Journal of Microbiology & Biology Education*. 2011 Julio; 12(1).
38. **Duval B, Huangate B.** "The long road to nitrogen fixation". *Nature Geoscience*. 2008 Octubre; 14(2).
39. **Castaños E.** "Ciencia Química - Instrumentación en HPLC". Online. 2015; citado el 2017 Febrero 16. Disponible en: www.lidiaconlaquimica.wordpress.com.
40. **Bultreys A, Gheysen I, Wathélet B, Maraite H.** "High performance liquid chromatography analyses of pyoverdine siderophores differentiate among phytopathogenic *fluorescent Pseudomonas* species". *Applied Environmental Microbiology*. 2003 Mayo; 69(2).
41. **Hantke K, Nicholson G, Rabseh W, Winkelmann G.** "Salmochelins siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strain, are recognized by the outer membrane receptor iron". *Proc. Natl Acad. Science*. 2003 Octubre; 10(7).
42. **Alvarez C, Diaz G, Hollman L, Ruggieri M.** "Cromatografía de Intercambio Iónico. *Terra Lationamericana*. 2009 Abril; 13(1).
43. **Fuhrmann J.** "Purification of siderophores from cultures of fluorescent *Pseudomonas* by ion - exchange chromatography". *Soil Bid. Biochem*. 1991 Setiembre; 23(12).
44. **Piotr M, Piotr R, Alicja K, Gotfryd K.** "Separation of siderophores by capillary electrophoresis". Elsevier. 1999 Mayo; 55(4).

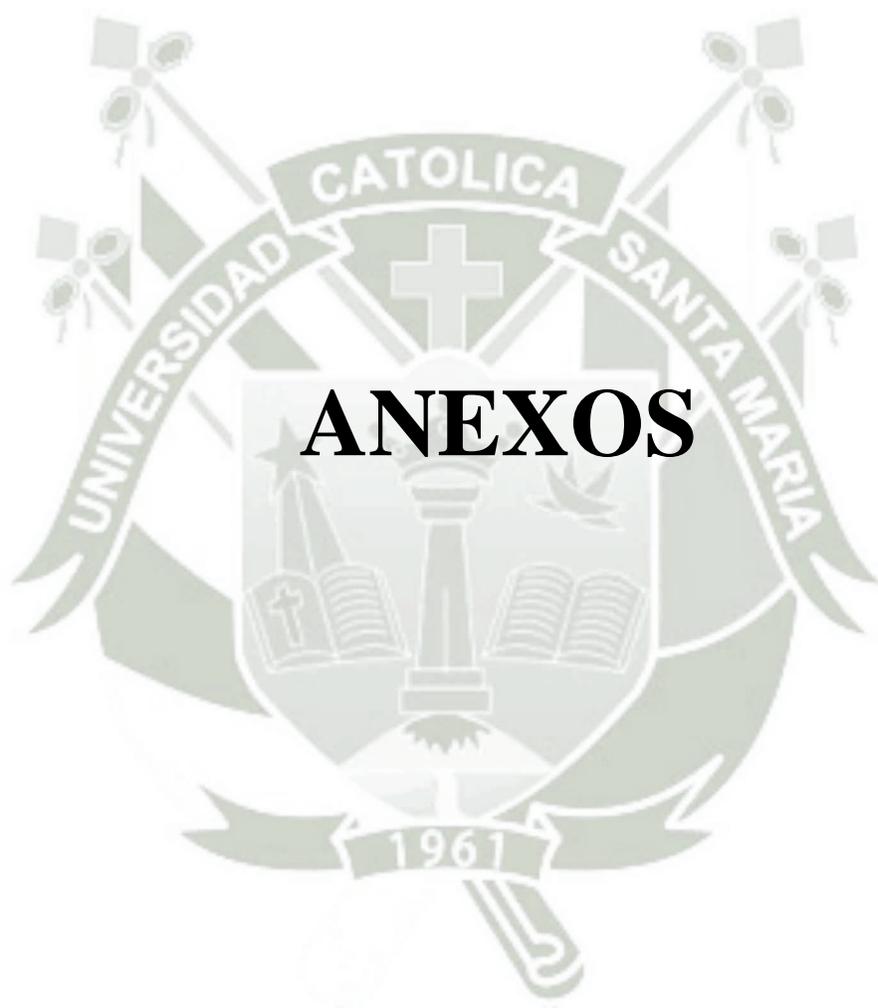
45. **Osatinsky R.** "¿Qué es una electroforesis capilar?" *Biología y Patología Clínica*. 2007 Julio; 71(2).
46. **Schalk I, Gaetan L, Brillet M, Brillet K.** "Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of siderophore - Iron Outer Membrane Transporters". Elsevier. 2012 Octubre; 69(1).
47. **Skoog A, Holler J, Nieman T.** "Principios de Análisis Instrumental". quinta edición ed. Martin MdC, editor. Chicago: McGraw - Hill; 2000.
48. **Dorais M, Ehret D, Papadopoules A.** "Tomato (*Solanum lycopersicum*) heath components: from the seed to the consumer". Springer. 2008 Marzo; 7(3).
49. **Fernandez E, Guerrero J, Rueda E, Acosta M.** "Patógenos y Sintomas asociados a la marchitez del Tomate (*Solanum lycopersicum*) en Texcoco México". *Journal of phytopatology*. 2011 Marzo; 29(1).
50. **Kimura S, Sinha N.** "Tomato (*Solanum lycopersicum*) a model fruit bearing crop". *CSH Protoc*. 2008 Junio; 10(1).
51. **Agromaticas.** Cultivo de Tomate. Online. 2012 citado el 2017 Febrero 22. Disponible en: www.agromatica.es/cultivo_de_tomates/.
52. **Agroinformación.** El cultivo del Tomate. Online. 2009 citado el 2017 Marzo 28. Disponible en: www.infoagro.com/hortalizas/tomate3.htm.

53. **Rattink H.** "Marchitez por Fusarium en clavel". Scielo. 2000 Junio; 17(2).
54. **Casas E, Rosero H.** "Reconocimiento e identificación de *Phialophora cinerescens* y *Fusarium oxysporum* en un cultivo de clavel en la Sabana de Bogota". Universidad Nacional de Bogota. 1991 Marzo; 21(1).
55. **Brown L, Wolf J, Prados R, Bustamante A.** "Through the wall: extracelular vesides in Gram positive bacteria, mycobacteria y fungi". Nature Reviews. 2015 Marzo; 13(1).
56. **Gonzales I, Arias Y, Peteira B.** "Aspectos Generales de la Interacción *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* - Tomato". Scielo. 2012 Agosto; 27(3).
57. **Salazar L, Diamont D, Aponte G.** "Identificación del Agente causal de la marchitez de *Stevia rebaudiana bertonii* en muestras provenientes del estado Aragua, Venezuela". Bioagro. 2015 Mayo; 27(1).
58. **Araujo E.** "Enfermedad del Tomate - Ciclo Biológico". Online. 2015 citado el 2017 Febrero 14. Disponible en: www.enfermedadesdeltomate1.blogspot.pe/2015/01/marchitez-por-fusarium-fusarium.html?m=1.
59. **Amini J, Feuzi D.** "The effects of Fungicides on *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of Tomato". Journal of Plant Protection Research. 2010 Julio; 50(2).
60. **Preston G.** "Plant perceptions of plant growth - promoting *Pseudomonas*". The Royal Society Publishing. 2004 Abril;

359(1446).

61. **Akkopru A, Denir S.** "Control of *Fusarium* wilt in Tomato caused by *Fusarium oxisporum* f sp *licopersici* by AMF intraradices and some *Rhizobacteriums*". Journal of Phytopathology. 2005 Noviembre; 153(9).
62. **Kotan R, Sahin F, Cafer E.** "Biological control of Potato dry rot causet by *Fusarium* species using PGPR strain". Science Direct. 2009 Junio; 50(2).





ANEXOS

ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICOS

1. MEDIO CETRIMIDE

Fundamento

El Agar Cetrimide es un medio para el aislamiento e identificación selectiva del género *Pseudomona*. La composición del agar produce la inhibición selectiva de microorganismos distintos al género, debido a la presencia de la cetrimida; la cual es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, liberando el nitrógeno y el fosfato de las células de casi toda la flora acompañante.

La fórmula de este medio promueve la formación de pigmentos (pioverdina, piocianina & piomelamina) por la presencia de cloruro de magnesio y el sulfato de potasio en la composición del medio.

Composición

Agar Cetrimide	
Composición	Cantidades (g/L)
Peptona de Gelatina	20
Cloruro de magnesio	1.4
Sulfato de potasio	10
Agar	13.6
Cetrimide	0.3
pH final 7.2 ± 0.2	

Instrucciones

Suspender 45.3 gramos del polvo por litro de agua destilada. Agregar 10 mL de glicerina. Dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

2. MEDIO PAPA DEXTROSA (PDA)

Fundamento

El Agar PDA está compuesto por infusión de Papa Deshidratada y Dextrosa que fomenta el crecimiento exuberante de los hongos y levaduras, mientras que el desarrollo bacteriano es inhibido con el agregado de ácido tartárico luego de la esterilización hasta alcanzar un pH de 3.5 ± 0.2

Composición

Agar PDA	
Composición	Cantidades (g/L)
Infusión de papa	4
Dextrosa	20
Agar	15
pH final 5.6 ± 0.2	

Instrucciones

Disolver 39 de polvo en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar hasta ebullición con agitación continua. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Si se desea ajustar el pH a 3.5 agregar aproximadamente 14 mL de una solución de 'ácido tartárico al 10%, cuando el agar se encuentre entre $45 - 50^{\circ}\text{C}$.

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro ligeramente opalescente.

3. MEDIO MODIFICADO DE ÁCIDO SUCCÍNICO DEFICIENTE EN HIERRO

Fundamento

El medio modificado de ácido succínico deficiente en hierro favorece la síntesis del pigmento fluorescente de la *Pseudomona fluorescens*, mediante la utilización del carbono orgánico del ácido succínico y la fuente de energía de los compuestos inorgánicos.

Composición

Medio MS deficiente e hierro	
Composición	Cantidades (g/L)
Fosfato dipotásico	6
Fosfato de potasio monobásico	3
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de amonio	1
Ácido Succínico	4
pH final 7.0 ± 0.2	

Instrucciones

En un matraz colocar las cantidades indicadas anteriormente, y enrasar con agua destilada hasta un volumen final de un litro. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Ajustar el pH hasta un valor final de 7 con ayuda de Hidróxido de Sodio al 20%.

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro

4. MEDIO CROMO AZUROL S (CAS)

Fundamento

Este medio es utilizado para detectar los diferentes fenotipos de sideróforos que existen. Schwyn y Neiland desarrollaron este medio para dicha detección, mediante la utilización de cromo azurol S (CAS) y Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) como indicadores. El CAS / HDTMA se compacta firmemente con hierro férrico para producir un color azul. Cuando un quelador de hierro fuerte como un sideróforo elimina el hierro del complejo de colorantes, el color cambia de azul a naranja. ^{(36) (37)}

Procedimiento

Para la preparación de este medio se realizara en tres pasos:

A. Colorante Azul:

- a. Solución I: Disolver 0.06 g de CAS en 50 mL de agua bidestilada.
- b. Solución II: Disolver 0.0027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de HCL 10 mM.
- c. Solución III: Disolver 0.073 g de HDTMA en 40 mL de agua bidestilada.
- d. Mezclar la Solución I con 9mL de la Solución II. Luego, mezclar con la Solución III; quedando de color azul esta solución final. Finalmente llevar al autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

B. Soluciones Stock:

- a. MM9 – Solución Stock Mínima de Sales: Disolver 15 g de KH_2PO_4 , 25 g de NaCl y 50 g de NH_4Cl en 500 mL de agua bidestilada.
- b. Solución Stock de Glucosa al 20%: Disolver 20 g de glucosa en 100 mL de agua bidestilada.
- c. Solución Stock de Hidróxido de Sodio: Disolver 25 g de NaOH en 150 mL de agua bidestilada. El pH debe de estar alrededor de 12.
- d. Solución Stock de Ácido Casamino (da al medio los aminoácidos esenciales para el crecimiento de los microorganismos): Disolver 3 g de ácido Casamino en 27 mL de agua bidestilada. Extraer con una mezcla al 3% de 8-

hydroxiquinolina (agente quelante) en cloroformo para remover cualquier traza de hierro. Finalmente esterilizar mediante la utilización de un filtro

C. Preparación final del medio CAS:

- a. Añadir 100 mL de la solución MM9 a un matraz con 750 mL de agua bidestilada. A continuación, disolver 32.24 g piperazina – N, N' – bis (2- ácido etanosulfónico) PIPES (buffer ó tampón biológico). Este compuesto no disuelve a pH 5, pero si lo hace a pH 6; por lo tanto añadir suavemente el PIPES luego de subir el pH a 6. El pH final luego de agregar el PIPES tiene que ser máximo hasta 6.8; no se debe exceder si no se tornara la solución de un color verde.
- b. Añadir 15 g de Agar Agar.
- c. Autoclavar a 121°C por 15 minutos y dejar enfriar hasta 50°C.
- d. Añadir 30 mL de la solución de ácido casamino estéril y 10 mL de la solución esteril de glucosa al 20%.
- e. Finalmente añadir suavemente y pegado a las paredes 100 mL de la solución del colorante azul, agitar suavemente para que todo quede mezclado.
- f. Colocar en placas Petri, esperar que enfrie y llevar al frigidier.

Identificación



Fig 1. Ejemplo del medio CAS sembrado con 4 cepas microbianas diferentes: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*.⁽³⁷⁾

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE COLORANTES

1. TINCIÓN GRAM

Fundamento

Esta tinción se basa en la diferencia de las paredes celulares de las bacterias Gram Positivas de las Gram Negativas.

La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram Negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol / acetona. La capa de peptidoglicano que posee es muy delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta / yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiendo la coloración azul – violácea. Pero por el contrario, las Gram Positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor porción de peptidoglicano, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta / yodo, y manteniendo la coloración azul violácea.

Preparación de Reactivos

REACTIVOS	CANTIDADES
CRISTAL VIOLETA	
Cristal violeta	2 g
Etanol 95%	20 mL
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80 mL
LUGOL	
Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g

Agua destilada	300 mL
ALCOHOL – ACETONA	
Alcohol etílico 95%	500 mL
Acetona	300 mL
SAFRANINA	
Safranina	0.25 g
Alcohol etílico 95%	10 mL
Agua Destilada	100 mL

Para el Cristal Violeta: Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo. Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice. Mezclar las dos soluciones y filtrar.

Para el Lugol: Combinar el yodo y el yoduro de potasio con la ayuda de un mortero. Lavar el contenido de este con pequeñas alícuotas de agua destilada. Agregar agua destilada hasta 300 mL. Agitar fuertemente. Almacenar en una botella oscura y con tapón.

Para el alcohol – acetona: mezclar los ingredientes respectivos de cada combinación para su uso.

Para la safranina: Disolver el colorante en el alcohol. Agregar agua destilada. Filtrar y almacenar en un frasco de vidrio con tapón.

Procedimiento

Realizar los frotis bacterianos a colorear. Agregar cristal violeta hasta cubrir el frotis durante 1 minuto. Lavar con agua el exceso de colorante. Cubrir con lugol por 1 minuto. Lavar con agua el exceso de lugol. Agregar el alcohol – acetona aproximadamente por 30 segundos. Nuevamente lavar para eliminar el exceso de disolvente. Teñir con safranina por 30 segundos. Lavar con agua el exceso del colorante, esperar que seque y llevar a examinar al microscopio.

Interpretación

Después de la coloración, las bacterias Gram Negativas son rojas – rosadas; mientras que las bacterias Gram Positivas permaneces azules – violetas.



2. TINCIÓN DE AZUL DE LACTOFENOL

Fundamento

La tinción de azul de lactofenol es un método para examen directo o para teñir hongos de un medio de cultivo.

El fenol destruye la flora acompañante y organismos; el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul de lactofenol tiñe la quitina de las paredes fúngicas.

Preparación del Reactivo

REACTIVOS	CANTIDADES
Cristales de Fenol	20 g
Ácido láctico	20 mL
Agua destilada	20 mL
Glicerina	20 mL
Azul de algodón	0.05 g

Disolver el fenol en el agua. Agregar el ácido y la glicerina. Calentar a 70°C. Adicionar el colorante. Finalmente guarda en un frasco de vidrio.

Procedimiento

Colocar con ayuda de un aza de khole en punta una pequeña porción del hongo. Añadir una gota de azul de lactofenol y colocar encima un cubre objeto. Observar al microscopio con objetivo de 10X y 40X.

Interpretación

Las estructuras de los hongos se observan al microscopio de color celeste.

3. REACTIVO CROMO AZUROL S (CAS)

Fundamento

El CAS / HDTMA se compacta firmemente con hierro férrico para producir un color azul. Cuando un quelador de hierro fuerte como un sideróforo elimina el hierro del complejo de colorantes, el color cambia de azul a naranja.

Preparación del reactivo

Solución I: Disolver 0.06 g de CAS en 50 mL de agua bidestilada.

Solución II: Disolver 0.0027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de HCL 10 mM.

Solución III: Disolver 0.073 g de HDTMA en 40 mL de agua bidestilada.

Mezclar la Solución I con 9mL de la Solución II. Luego, mezclar con la Solución III; quedando de color azul esta solución final. Finalmente llevar al autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

Interpretación

Si hay viraje de color a anaranjado se dice que hay presencia de sideróforo.

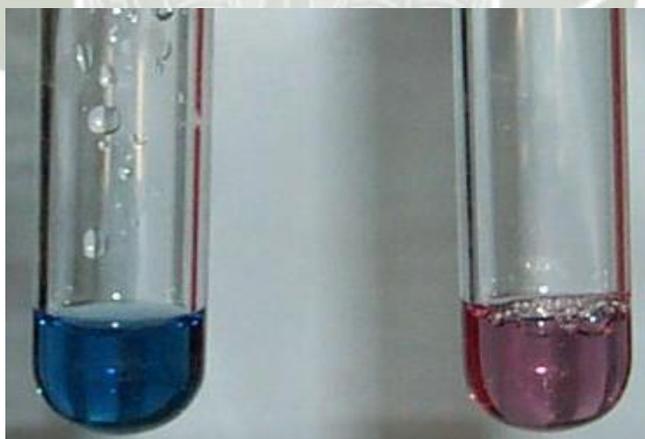


Fig 2. Reactivo CAS: Coloración azul (Negativo) Coloración Anaranjada (Positivo).⁽³⁸⁾

ANEXO 3

MEDIOS MICROBIOLÓGICOS PARA IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

5. TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI)

Fundamento

En este medio microbiológico de identificación bioquímica; el extracto de carne y la pluripeptona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. ⁽²⁹⁾

En cuanto a la fuente de carbono tenemos a la lactosa, sacarosa y glucosa los cuales pueden ser fermentables.

El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico; además el sulfato de hierro y amonio son la fuente de iones Fe^{+3} los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro dando una coloración negra en el medio.

El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. ^{(29) (32)}

Debido a la fermentación de azúcares se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.



Fig 3. Esquema de reacción en el medio Triple Azúcar Hierro (TSI) ⁽³³⁾

Composición

Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)	
Composición	Cantidades (g/l)
Extracto de carne	3
Pluripeptona	20
Cloruro de Sodio	5
Lactosa	10
Sacarosa	10
Glucosa	1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo de fenol	0.025
Agar	13
pH final 7.3 ± 0.2	

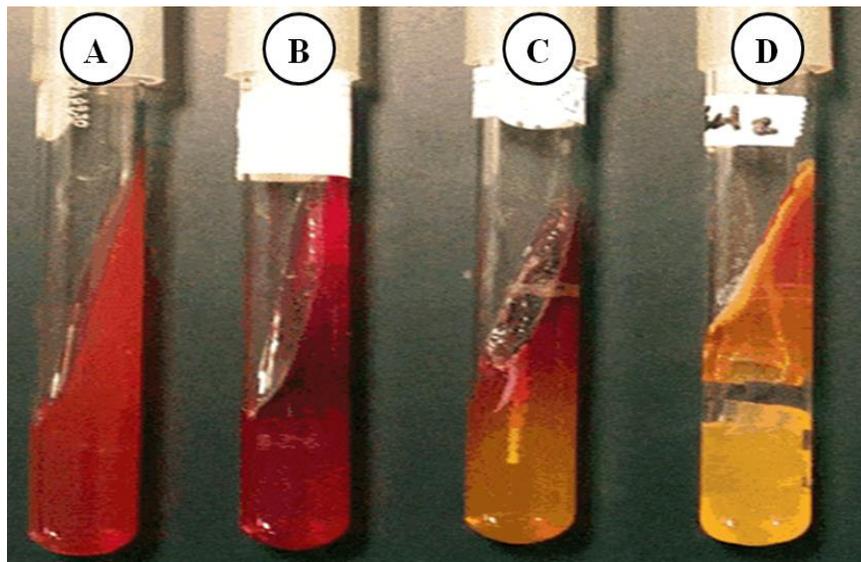
Instrucciones

Suspender 62.5 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.

Características del medio

Medio preparado: rojo

Identificación



A) Control	B) K/K	C) K/A	D) A/A
Lactosa	-	-	+
Glucosa	-	+	+
Ácido Sulhídrico	-	-	+
Producción de gas	-	-	+
Ejemplo de Microorganismo	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i>

Fig 4. Características Bioquímicas obtenidas del medio Triple Azúcar Hierro. ⁽³²⁾

6. LISINA HIERRO AGAR (LIA)

Fundamento

La peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa ó desaminasa. El citrato de hierro, citrato de amonio y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8. La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro. ^{(29) (33)}

Por descarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio, lo cual produce el viraje del indicador al color violeta. La descarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesaria que la glucosa sea previamente fermentada. Los microorganismos que no producen lisina descarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas, y el fondo amarillo. ⁽³³⁾

Las cepas de los géneros *Proteus*, *Providencia* y algunas cepas de *Morganella*, desaminan la lisina, esto produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual, con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio.



Fig 5. Esquema de reacción en el medio Lisina Hierro Agar (LIA) ⁽³³⁾

Composición

Lisina Hierro Agar (LIA)

Composición	Cantidades (g/l)
Peptona de gelatina	5
Extracto de levadura	3
Glucosa	1
Lisina	10
Citrato de hierro y amonio	0.5
Tiosulfato de sodio	0.04
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	15.0
pH final 6.7 ± 0.2	

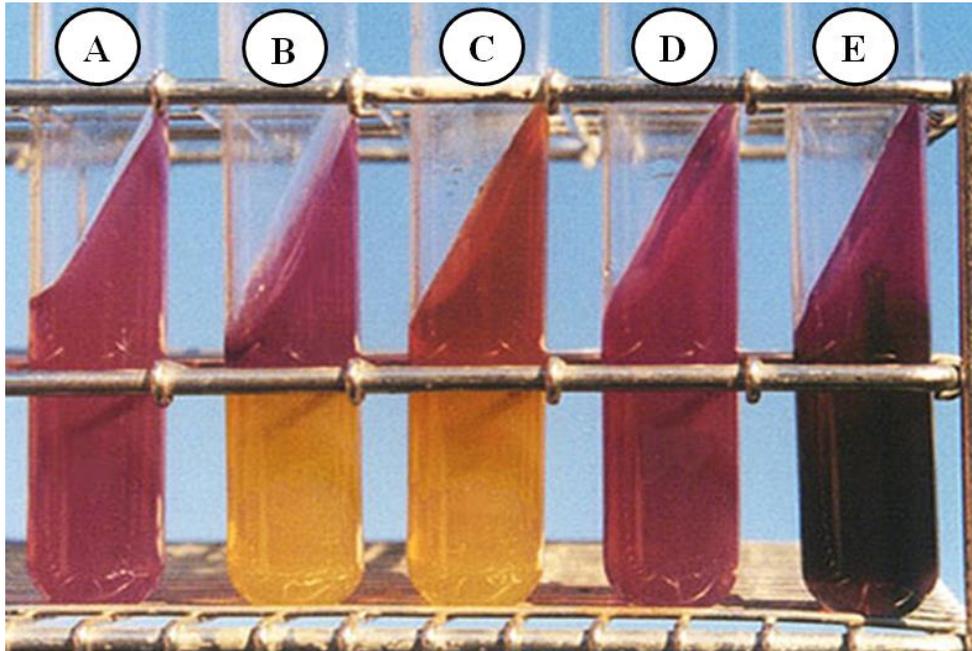
Instrucciones

Suspender 35 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar cuidadosamente, agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en pico de flauta dejando un fondo vertical apto para la punción.

Características del medio

Medio preparado: color violeta.

Identificación



A) Control	B) K/A	C) R/A	D) K/K	E) K/K
Lisina	-	-	+	+
Descarboxilación	-	-	+	+
Desaminación	-	+	-	-
Ácido Sulfhídrico	-	-	-	+
Ejemplo de Microorganismo	<i>Citrobacter</i>	<i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Morganella</i>	<i>E. coli</i> <i>Enterobacter</i>	<i>Salmonella</i> <i>Edwardsiella</i>

Fig 6. Características Bioquímicas obtenidas del medio Lisina Hierro Agar (LIA).⁽³²⁾

7. CITRATO DE SIMMONS (CS)

Fundamento

El fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano.

Las sales de fosfato conforman un buffer, mientras que el magnesio es utilizado como cofactor enzimático. ⁽³²⁾ ⁽³³⁾

El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino.

El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono y sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad.

El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa (Citratasa), mediante el ciclo del ácido tricarbóxico. ⁽³²⁾

El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos haciendo que el medio entonces vira a una coloración azul.



Fig 7. Esquema de reacción en el medio Citrato de Simmons (CS). ⁽³³⁾

Composición

Agar Citrato de Simmons

Composición	Cantidades (g/l)
Citrato de Sodio	2
Cloruro de Sodio	5
Fosfato dipotásico	1
Fosfato monoamónico	1
Sulfato de magnesio	0.2
Azul de bromotimol	0.08
Agar	15
pH final 6.9 ± 0.2	

Instrucciones

Suspender 24,2 g del medio en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

Características del medio

Medio preparado: verde

Identificación

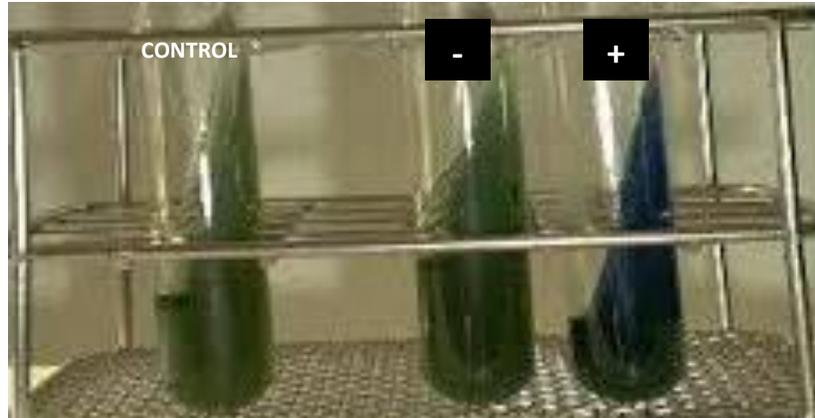
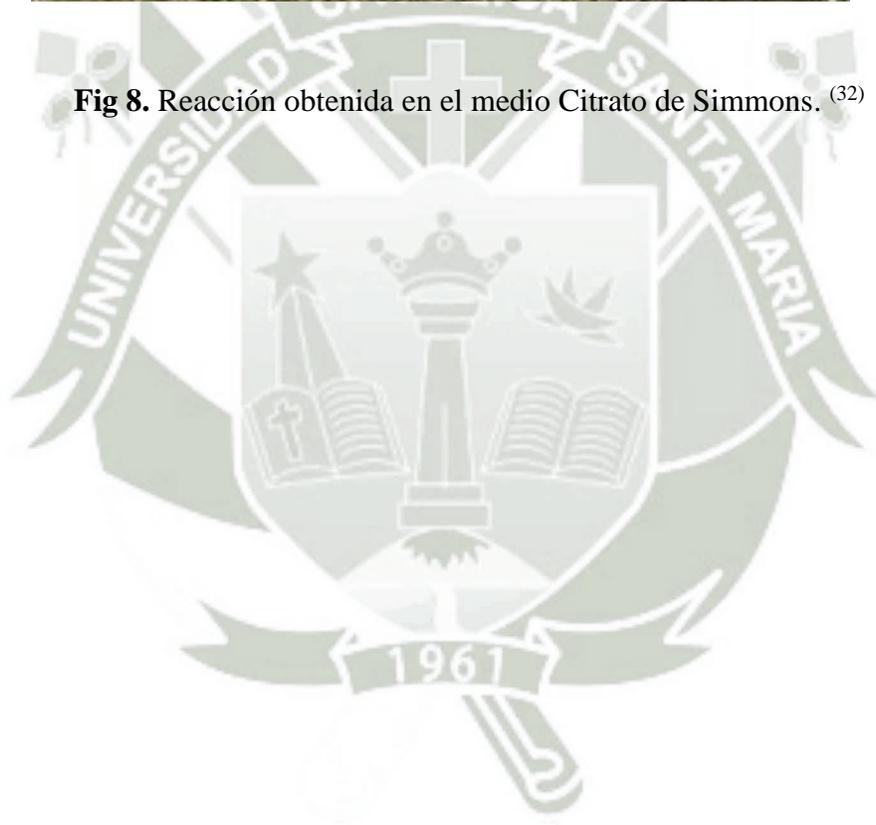


Fig 8. Reacción obtenida en el medio Citrato de Simmons. ⁽³²⁾



8. UREA

Fundamento

En el medio de cultivo, la tripteína y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH.

Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la utilización de la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el indicador del amarillo al rojo. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea, como especies de *Enterobacter* o *Klebsiella*.⁽³³⁾

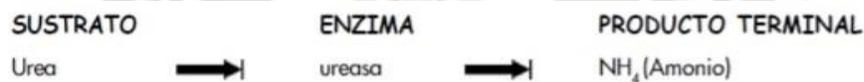


Fig 9. Esquema de reacción en el medio Urea.⁽³³⁾

Composición

Agar Urea

Composición	Cantidades (g/l)
Tripteína	1
Glucosa	1
Cloruro de sodio	5

Fosfato monopotásico	2
Rojo de fenol	0.012
Agar	15

pH final 6.8 ± 0.2

Instrucciones

Suspender 24 g de medio en 950 ml de agua destilada. Dejar reposar 2 minutos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 50 ml de una solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración o cloroformo. Fraccionar en tubos de ensayo y solidificar en pico de flauta con fondo profundo.

Características del medio

Medio preparado: amarillo

Identificación

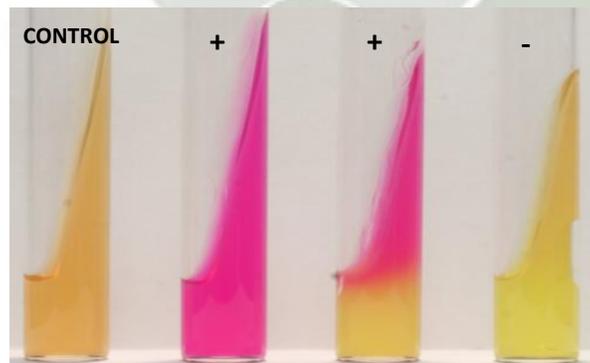


Fig 10. Reacción obtenida en el medio Urea. ⁽³²⁾

9. MOVILIDAD, PRODUCCIÓN DE INDOL Y ÁCIDO SULFHÍDRICO (SIM)

Fundamento

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y especialmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para generar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovacs para generar un compuesto de color rojo.

Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de ácido sulfhídrico se distinguen por la generación de un precipitado negro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2. ⁽³²⁾

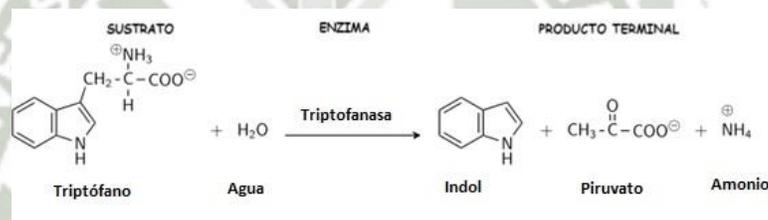


Fig 11. Esquema de producción de Indol. ⁽³³⁾

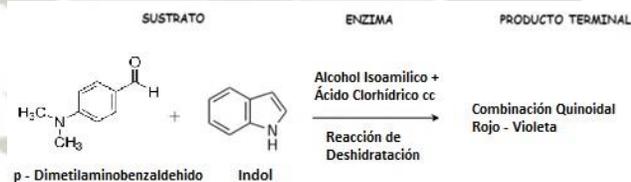


Fig 12. Esquema de Reacción del Indol con el Reactivo de Kovacs. ⁽³³⁾



Fig 13. Esquema de producción de Ácido Sulfhídrico. ⁽³³⁾

Composición

Movilidad – H₂S – Indol (SIM)

Composición	Cantidades (g/l)
Tripteína	20
Peptona	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5
pH final 7.3 ± 0.2	

Instrucciones

Suspender 30 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar hasta disolver; calentar agitando y hervir durante un minuto. Distribuir aproximadamente 4 ml en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Solidificar en posición vertical.

Características del medio

Medio preparado: ámbar

Identificación

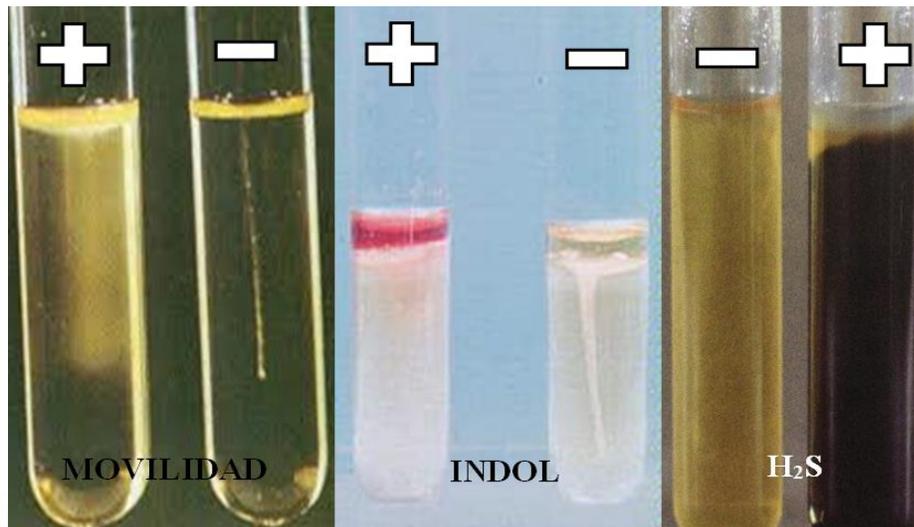
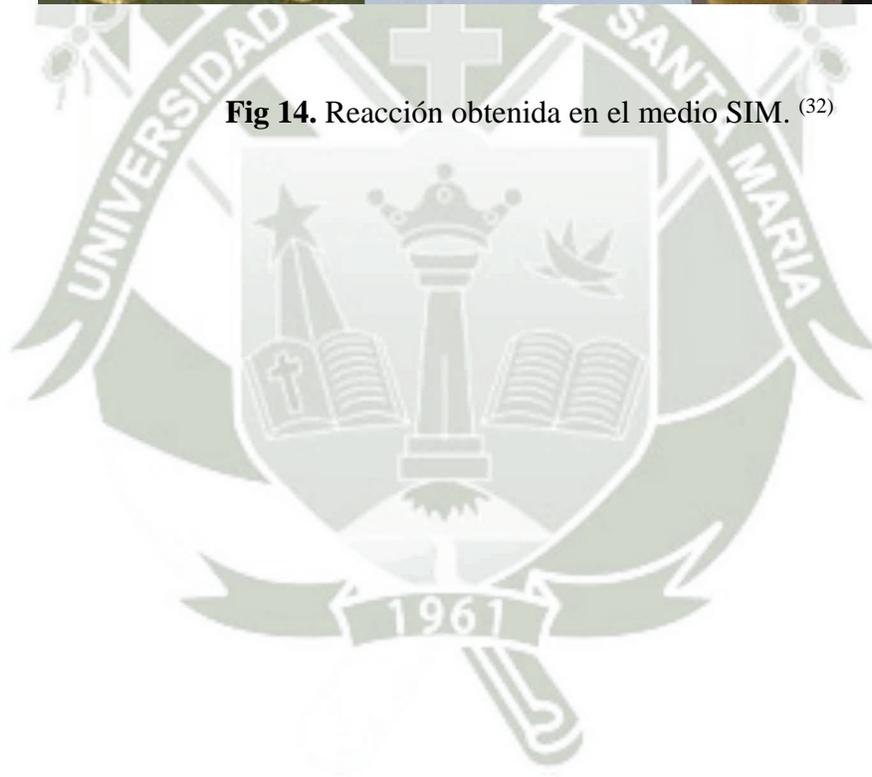


Fig 14. Reacción obtenida en el medio SIM. ⁽³²⁾



ANEXO 4

TABLAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE
Pseudomona fluorescens.⁽²⁹⁾ (33)

Prueba	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>
Reacción de Gram	-	-	-	-
Formación de Esporas	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+
Crecimiento a 4°C	+	-	-	NR
Crecimiento con 7% NaCl	+	-	-	+
Producción de pigmento fluorescente	+	+	+	-
Crecimiento en Agar MacConkey	+	+	-	-
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
Ureasa	V	-	-	-
Nitrato reductasa	+	+	+	+
Producción de Indol	-	-	-	-
Utilización de Citrato	+	+	+	+

*V: Variable *NR: No se dispone de resultados

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. fluorescens</i>
Morfología por Tinción Gram	-	-	-
O/F Glucosa	Ox	Ox	Ox
O/F Lactosa	K	A	K
O/F Maltosa	K	A	K
Lisina Descarboxilasa	-	-	V
Lisina Desaminasa	V	V	V
Producción de H ₂ S	-	NR	-
Producción de CO ₂	-	NR	-
Movilidad	+	+	+
Piocianina	+	-	-
Pioverdina	-	-	+
Desarrollo a 42°C	+	V	-
Oxidasa	+	+	+
Catalasa	+	+	+

*Ox: Oxidativo. *K: Alcalino. *A: Ácido. *V: Variable. *NR: No se dispone de resultados.

ANEXO 5

TABLA UTILIZADA EN LA IDENTIFICACIÓN MACROSCOPICA DE
Fusarium oxysporum.⁽⁵⁷⁾

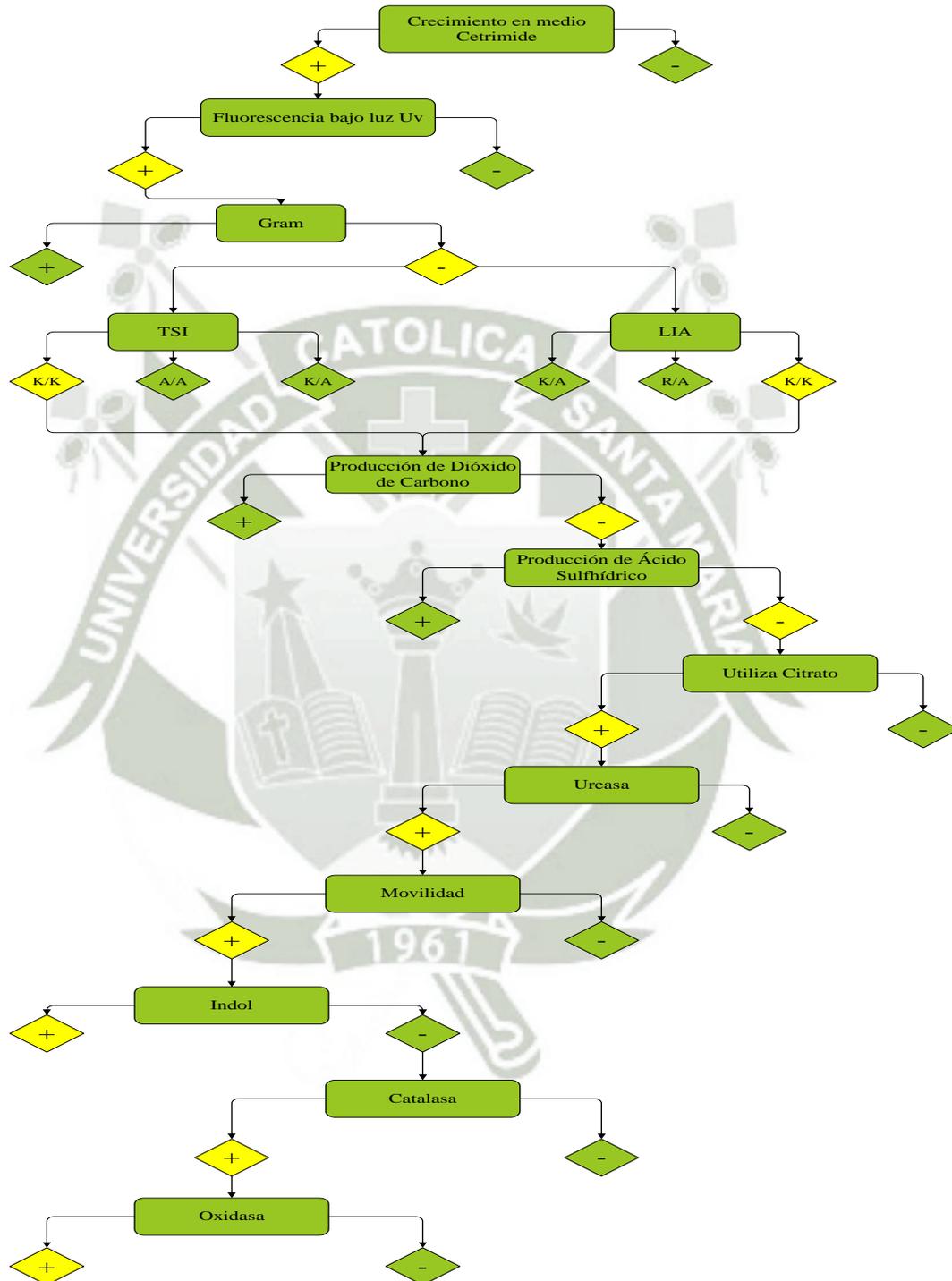
Parámetros	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
Color de la colonia en medio PDA	Amarillo claro, aspecto húmedo, rojo con micelio algodonoso y naranja, con exudado marrón claro	Violeta claro o púrpuro, todos con micelio algodonoso, sin exudados
Crecimiento en medio PDA	4 - 5 días	4 - 5 días
Tipo de Microconidia	8 - 16 x 2 - 4 μm	Ovaladas extendidas 5 - 12 x 2.2 - 3.5 μm
Tipo de Macroconidia	Abundantes, cilíndricas, superficie dorsal con 3 - 5 septos (35 - 55 x 4.5 - 6 μm)	Abundantes, forma curvada con 3 a 5 septos con pie celular distintivo. (27 - 55 x 3 - 5 μm)
Tipo de Clamidospora	Solas o apareadas	Abundantes, sola o en parejas
Tipo de Fialide	Largas y delgadas de aproximadamente 100 μm o mas	Monofilamentos robustos y cortos en ángulos rectos o verticales < 20 μm

*PDA: Agar Papa Dextrosa



ANEXO 6

FLUJOGRAMA DE IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomona fluorescens*. (*)



*Creación Propia.