

PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE SIDERÓFOROS A PARTIR DE LA CEPA DE *Pseudomonas fluorescens* J-143

Annia Hernández, Ana I. Fernández, J. Pérez, Sandra Miranda, Caridad Fons, Ana N. Hernández y J. L. Santander

ABSTRACT. This study develops a methodology on the production, purification and diagnosis of siderophores by serological methods. Those siderophores came from *Pseudomonas fluorescens* J-143 strain pertaining to the National Biofertilization Strain Bank. King B medium was employed for metabolite production, besides conducting a small-scale study of the influence of different temperatures (28, 30 and 37°C) by 140 rpm stir for a growth period of 18 hours, with the purpose of evaluating optical density at 405 and 650 nm and the characteristic color appearance to this type of siderophore. Once the most appropriate temperature is selected, stationary culture was carried out for 120 hours, determining the same parameters. Purification was performed through ion-exchange chromatography in CM-Sephadex G-50, using pyridine-acetate 50 mM pH 5.0 as elution and equilibrium buffer. Results proved this strain yields a lonely siderophore (pyoverdín), when growing in a King B medium for 14 hours and 140 rpm at 37°C, showing growth as a nonassociate secondary metabolite. Double immunodiffusion and Dot-immunobanding techniques were efficient for this metabolite diagnosis, the latter being remarkable for its higher sensibility.

RESUMEN. Se desarrolló una metodología que incluye la producción, purificación y el diagnóstico por métodos serológicos, de sideróforos a partir de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-143, perteneciente al Cepario Nacional de Biofertilización. Para la producción de este metabolito se empleó el medio King B y se estudió en zaranda, la influencia a diferentes temperatura (28, 30 y 37°C) con una agitación de 140 rpm y en un período de crecimiento de 18 horas, para evaluar la densidad óptica a 405 y 650 nm, así como la aparición del color característico para este tipo de sideróforo. Una vez seleccionada la mejor temperatura, se llevó a cabo el cultivo estacionario durante 120 horas, determinándose los mismos parámetros. La purificación se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex G-50, utilizándose como buffer de equilibrio y elución piridina-acetato 50 mM pH 5.0. Los resultados demostraron que esta cepa produce un solo tipo de sideróforo (pyoverdín), cuando es crecida en medio King B durante 14 horas y 140 rpm a 37°C, manifestándose como un metabolito secundario no asociado al crecimiento. Las técnicas de inmunodifusión doble y Dot-oro resultaron eficientes para el diagnóstico de este metabolito, destacándose esta última por su mayor sensibilidad.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, siderophores, double immunodiffusion, Dot-immunobanding, production

Palabras clave: *Pseudomonas fluorescens*, sideróforos, inmunodifusión doble, Dot-oro, producción

INTRODUCCIÓN

El uso de pesticidas químicos para el control de enfermedades de los cultivos es un método costoso, además de provocar desbalance ecológico. La utilización de antagonistas microbianos para el control de fitopatógenos se ha catalogado como un importante complemento en el manejo integrado de las enfermedades de las plantas (Frías, 1997). Las bacterias que pertenecen al grupo de las *Pseudomonas fluorescens*

tales como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* han sido las más estudiadas, debido a su capacidad de colonizar un amplio rango de cultivos y ser antagonistas de varios patógenos que se encuentran asociados a las raíces de las plantas.

La inoculación de semillas con cepas efectivas de *Pseudomonas fluorescens* trae como resultado una reducción considerable de las enfermedades de las raíces y un incremento del rendimiento de las cosechas. Entre los mecanismos involucrados en el biocontrol, se destacan la producción de sideróforos, antibiosis e inducción de resistencia en la planta (Neish y Rainey, 1997).

La hipótesis de los sideróforos plantea que estos suprimen la enfermedad mediante el acomplejamiento del Fe^{3+} , convirtiendo este elemento en un factor limitante para el crecimiento de patógenos en la rizosfera (Chen et al., 1995). *P. fluorescens* produce fundamen-

Annia Hernández, Investigadora, Ana N. Hernández, Investigador Agregado y J. L. Santander, Reserva Científica del departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Ana I. Fernández, Investigador Auxiliar y Sandra Miranda, Lic. Bioquímica de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana; Dr. J. Pérez, Investigador Auxiliar, Instituto de Oceanología (CITMA); Caridad Fons, Investigador Auxiliar, Instituto de Sanidad Vegetal (MINAGRI).

talmente sideróforos del tipo pyoverdina (Dowling y O'Galan, 1994); sin embargo, la información acerca de su producción, purificación y diagnóstico aún es pobre, por lo que se ha convertido en un tema de gran actualidad.

El desarrollo de una metodología para la producción, purificación de sideróforos y de métodos serológicos para el diagnóstico de estos metabolitos, constituye el objetivo de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Curvas de crecimiento para la producción de sideróforos. Se empleó la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-143, procedente del Cepario Nacional de Biofertilización, como cultivo de referencia.

Esta cepa fue crecida en plano inclinado en tubos que contenían medio agar nutriente; luego, se inocularon al 1% erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de medio King B (King, Ward y Raney, 1954). El preinóculo poseía una concentración celular de 10^8 UFC.mL⁻¹.

Se estudiaron a escala de zaranda diferentes condiciones de temperatura (28, 30 y 37°C), con una agitación de 140 rpm y un periodo de crecimiento de 18 horas. Cada dos horas se determinó la densidad óptica (DO) a 405 y 650 nm, y aparición de color. Luego, con la mejor temperatura se llevó a cabo el cultivo estacionario, durante 120 horas, determinándose cada 12 horas los mismos parámetros.

Producción de sideróforos. Siguiendo las condiciones estandarizadas a través de las curvas de crecimiento, la cepa de referencia se cultivó a partir de un preinóculo crecido durante 12 horas a 37°C y 140 rpm y se inocularon al 1% erlenmeyers de 3000 mL con 1000 mL de medio de cultivo. Luego se incubaron durante 14 horas a 37°C.

Extracción. Se realizó en forma de ferri-sideróforo, según Meyer y Abdallah (1978), añadiendo al cultivo microbiano FeCl₃ 1M a razón de 4 mL.L⁻¹, para aumentar su estabilidad. Posteriormente, el cultivo fue agitado y centrifugado a 10 000 rpm durante 20 minutos. El caldo se pasó por filtros bacteriológicos de 0.2 µm y se concentró mediante liofilización. Después se diluyó en 1 mL de agua desionizada y se saturó con NaCl para precipitar proteínas contaminantes. Se centrifugó para eliminar precipitados.

La extracción del sobrenadante se realizó con la mezcla cloroformo: fenol (1:1, vol:peso). La fase orgánica (cloroformo) se mezcló con tres volúmenes de éter dietílico y se extrajo con agua desionizada (20 mL) hasta lograr la desaparición total del color de la fase orgánica. El extracto acuoso obtenido se lavó tres veces con éter dietílico para eliminar fenol. Luego se concentró mediante evaporación en rotoevaporador a 55°C. Finalmente la muestra se diluyó en 1 mL de agua desionizada.

Cuantificación. El extracto de sideróforo crudo se leyó en un Spekol 11 a 400 nm contra agua desionizada. La concentración se determinó aplicando el coeficiente de extinción molar (2000 LM⁻¹.cm⁻¹), según Buyer, Kratzke y Sikora (1993).

Purificación. Con el sideróforo crudo obtenido (7 mL), se realizó una cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex G-50. Para esto se utilizó una columna de vidrio C (Pharmacia Fine Chemicals, 16 x 700 mm) y como matriz CM-Sephadex G-50 previamente equilibrado con *buffer* piridina-acetato 50 mM pH 5.0.

La columna se eluyó con el mismo *buffer* a una velocidad de 15 mL.h⁻¹ y las fracciones colectadas (3 mL) se leyeron en espectrofotómetro a 280 nm (proteínas) y a 405 nm (compuestos fluorescentes). Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente.

Finalmente, al producto obtenido se le realizó una cromatografía en placa fina, utilizando sílica gel G y la mezcla etanol: agua (70:30) como sistema de solventes, con el objetivo de comprobar el grado de pureza. Las manchas se observaron mediante la iluminación con luz ultravioleta a 366 nm.

Pruebas serológicas aplicadas al diagnóstico de sideróforos. Al sideróforo obtenido se le aplicaron las técnicas inmunodifusión doble (IDD) y Dot-oro. La IDD se realizó según Ouchterlony y Nilsson (1978). En el pocillo central se colocó el antisuero anti-*P. fluorescens* (Hernández, 1998) y en la periferie las variantes antigénicas. Fueron utilizadas como antígenos:

- 1- células tratadas con lisozima
- 2- células tratadas con lisozima y centrifugadas (extracto celular)
- 3- células tratadas con lisozima y centrifugadas (sobrenadante)
- 4- sideróforos crudos
- 5- sideróforo purificado.

Para la técnica Dot-oro se siguió la metodología descrita por Duran (1988), que se realizó sobre tiras de 0.5 x 3 cm de membrana de nitrocelulosa. Se punteó 50 µL del sideróforo puro y diluido (1/10; 1/100; 1/1000), partiendo de un extracto madre que poseía 10 mg del sideróforo producido por la cepa de referencia; como control se utilizó el sideróforo obtenido sin enfrentar al antisuero homólogo y el antisuero sin enfrentar al antígeno. Se realizaron los otros pasos de la metodología. Se empleó el antisuero anti-*P. fluorescens* obtenido por Hernández, Fernández y Hernández (1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de sideróforos. Por medio de las mediciones de la absorbancia a 650 nm, se pudo comprobar que para las tres temperaturas estudiadas, el crecimiento bacteriano se comporta de modo similar, aunque resulta evidente que el mayor crecimiento celular se obtiene a 37°C, donde la velocidad específica de crecimiento (%) fue de 0.08 (Figura 1).

Se puede observar la aparición del pigmento fluorescente alrededor de las 14 horas a 37°C para el cultivo agitado. Sin embargo, a 28 y 30°C no se observó en ningún momento la aparición del pigmento durante el periodo de tiempo evaluado. Estos resultados son corroborados cuando se mide la DO a 405 nm (Figura 2),

longitud de onda a la cual el cromóforo fluorescente que forma parte del sideróforo, presenta su máxima absorción (Buyer, Wright y Leong, 1986).

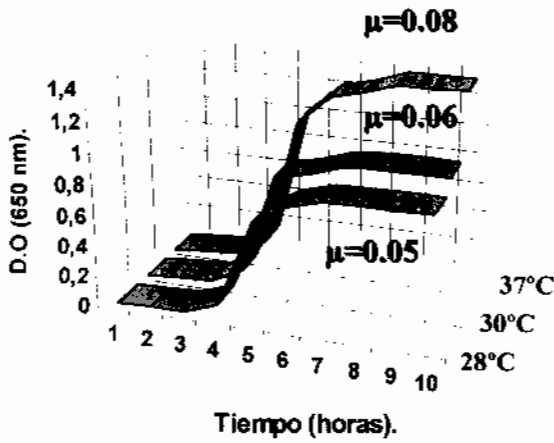


Figura 1. Crecimiento bacteriano en cultivo agitado

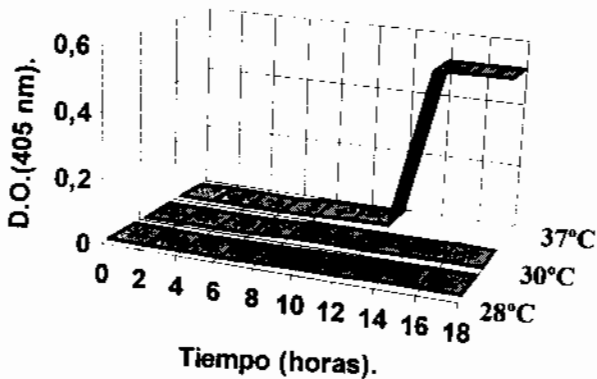
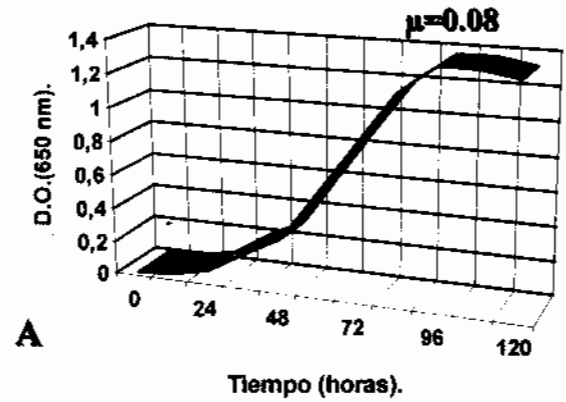


Figura 2. Producción de sideróforos en cultivo agitado

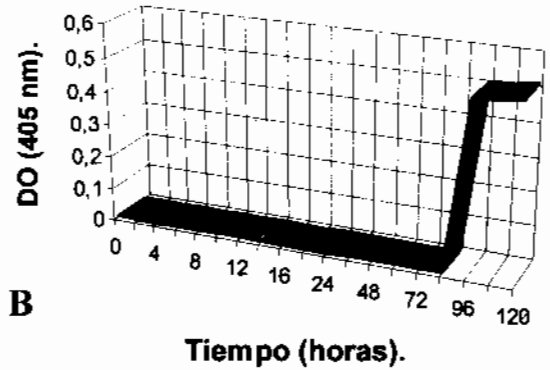
Una vez establecida la temperatura de 37°C como óptima para la producción de estos compuestos, se realizaron curvas de crecimiento en cultivo estático. En este caso también se observó la aparición del color verde amarillento característico, pero a las 96 horas de crecimiento (Figura 3).

En ambos tipos de cultivo a 37°C, el compuesto apareció durante la fase estacionaria de crecimiento, mostrándose como un metabolito secundario no asociado al crecimiento.

En los dos cultivos, la producción del pigmento fluorescente se comporta de forma similar, de modo que el cultivo estático no aumentó la productividad y, por otro lado, el tiempo requerido para la producción del pigmento es mayor y con ello el riesgo de contaminación aumenta.



A



B

Figura 3. Crecimiento bacteriano (A) y producción de sideróforos (B) en cultivo estático

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que la cepa *Pseudomonas fluorescens* J-143 produce las mayores concentraciones de sideróforos en medio King B en condiciones de agitación a 140 rpm. y con una temperatura de 37°C.

La producción de sideróforos por especie del género *Pseudomonas* y su utilización para el biocontrol de enfermedades de plantas, ha sido determinada por varios autores. Scher y Baker (1982) informaron una reducción de la marchitez por fusariosis de un 22, 40 y 61 % en los cultivos de lino, pepino y rábano, respectivamente, mediante la aplicación de *P. putida* en el suelo.

Por otra parte, algunos autores (Parke y Rand, 1991; Hebbar, Marstel y Heulin, 1994 y Fujimoto, Weller y Thomashow, 1995) señalaron un incremento de la germinación en un 33 y 22 %, por medio del tratamiento de semillas con *P. cepacia* y *P. fluorescens* para combatir enfermedades causadas por *Phytophthora ultimum* y *Aphanomyces*. En Cuba ha sido informado el efecto *in vitro* de *Pseudomonas* sp. sobre bacterias del género *Erwinia* en plátano y papa (Frías, 1997).

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas se han obtenido resultados satisfactorios con la aplicación de *P. cepacia* al maíz, y si bien el efecto se asoció con la disminución del fertilizante nitrogenado, no ha sido

esclarecido el mecanismo de acción de estas bacterias (Hernández, 1996) y bien pudiera ser una consecuencia del que ejercen estas bacterias sobre microorganismos causantes de enfermedades. Los estudios sobre la posible aplicación de diferentes especies del género *Pseudomonas* se encuentra en la fase inicial de desarrollo; de aquí la importancia que tiene la obtención de cepas de PGPR eficientes en la producción de sideróforos (Miranda, 1998).

En la Figura 4 se presentan los resultados de la cromatografía de intercambio iónico realizada al sideróforo crudo (100 mg), mostrándose dos curvas; una realizada con los valores de DO medidos a 405 nm y la otra con los obtenidos a 280 nm. Entre las fracciones 10 y 18, se observan picos que coinciden a 280 y 405 nm, que denotan la presencia de una sustancia presumiblemente pura, pero que no se trata del sideróforo pues no presenta su coloración característica (fluorescencia). Más adelante, entre las fracciones 38 y 54, se puede observar otro pico predominante para 405 nm que coincide con uno a 280 nm. Este pico es mayor que el anterior y presenta la coloración característica del sideróforo.

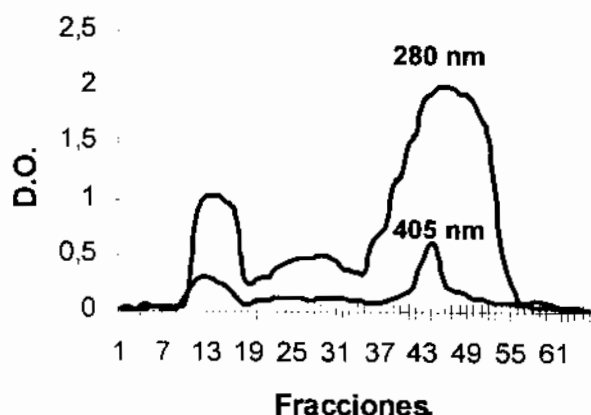


Figura 4. Cromatograma de la purificación del sideróforo

Al unir las fracciones del pico de interés y realizar una cromatografía en Sílica Gel G, se obtuvo una sola mancha fluorescente verde-carmelitosa, que indican que la sustancia puede encontrarse pura (Figura 5), aunque se deben realizar pruebas de mayor sensibilidad como criterio de pureza, entre ellas una cromatografía de alta resolución (HPLC) y focalización isoléctrica.

De acuerdo con la nomenclatura establecida por Buyer, Wright y Leong (1986), los sideróforos obtenidos en este trabajo a partir de la cepa de referencia deben ser pioverdines, ya que presentan la coloración descrita para este tipo de metabolito.

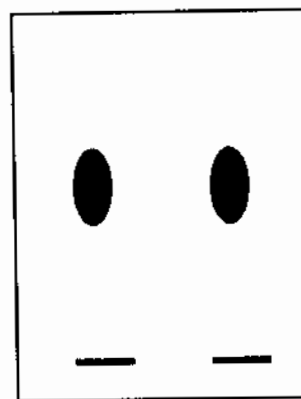


Figura 5. Esquema de la cromatografía en placa fina con sílica gel G

En los últimos años, se han planteado criterios divergentes acerca del papel que desempeñan estos sideróforos en el biocontrol. Hamdam, Weller y Tomashow (1991) encontraron que los mutantes deficientes en la producción de pioverdines controlan enfermedades en el trigo, de la misma manera que las cepas parentales, concluyendo que tienen poca o ninguna importancia en la supresión de la enfermedad.

Sin embargo, Rasska, Viikari y Mattioli-Sandholm (1993) y Dybas, Tarara y Criddle (1995) plantearon que los pioverdines pueden ser utilizados eficientemente en la agricultura contra microorganismos causantes de enfermedades en las plantas, pudiendo desempeñar el uso de estas sustancias purificadas un importante papel en el futuro.

En la Figura 6 se muestran las respuestas obtenidas al enfrentar el antisuero anti-*P. fluorescens* con las diferentes variantes de los antígenos, mediante IDD. Cuando las células lavadas de *Pseudomonas fluorescens* son tratadas con lisozima, y enfrentadas con el antisuero, se observan dos bandas de precipitación, al igual que cuando a las células se les aplica este tratamiento y se centrifuga, tomando el extracto celular. Al enfrentar el sobrenadante obtenido en el proceso de centrifugación con el antisuero, no aparecen bandas; esto indica que no hay reacciones positivas. El antisuero es capaz de reconocer a los antígenos formados por los sideróforos crudos y purificados, formándose en ambos casos una sola banda de precipitación, demostrándose que el determinante antigénico de estos metabolitos se encuentra al nivel de membrana. Esto coincide con planteamientos realizados por Heinrichs, Young y Poole (1991), quienes señalan que los receptores ferri-sideróforos relacionados con el pioverdín y piochelin se encuentran al nivel de membrana externa.

Al enfrentar los antígenos formados por el sideróforo purificado, con el antisuero anti-*P. fluorescens* mediante Dot-oro (Figura 7), técnica de mayor sensibilidad, se observó hasta la dilución 1:100 la formación del halo de coloración rosada, que denota la presencia del oro en las reacciones positivas. En los tratamientos controles no se observó la aparición de color. Esto indica la ausencia de reacciones cruzadas, resultando de ésta forma la técnica Dot-oro efectiva para la detección de sideróforos.

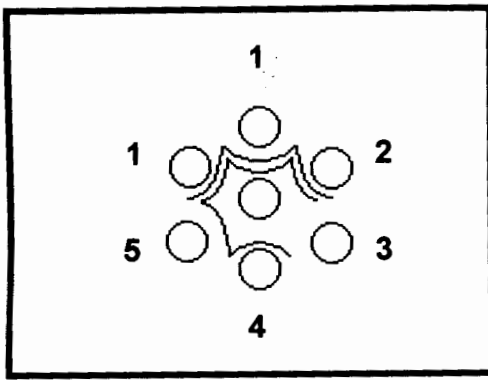


Figura 6. Prueba de inmunodifusión doble

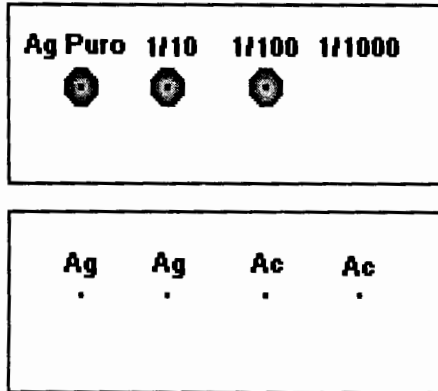


Figura 7. Representación esquemática de la técnica Dot-oro para sideróforos

Esta técnica detecta de forma rápida y sencilla la reacción antígeno-anticuerpo y no necesita de equipamiento especial, manteniendo una alta sensibilidad. Además, permite diagnosticar con un antisuero que no necesita de un título muy elevado, la presencia o no de un organismo determinado en un muestreo de laboratorio (Rojas, 1998).

Las técnicas serológicas también han sido empleadas por otros investigadores en el diagnóstico de sideróforos. Hernández (1998) empleó Dot-oro para el diagnóstico de cepas de *Pseudomonas*. Buyer, Kratzke y Sikora (1993) utilizaron el ELISA con estos fines.

Poder trabajar con estas técnicas en el diagnóstico de sideróforos, a partir del extracto crudo, sin tener que llegar a realizar su purificación, ofrece ventajas en cuanto a ahorro de tiempo y reactivos. Por estos métodos también se obtienen resultados más precisos.

REFERENCIAS

Buyer, J., J. M. Wright y J. Leong. Sstructure of Pseudobactin A214, a siderophore from a bean-deletereos *Pseudomonas*. *Biochemistry*. 25: 2492-5499, 1986.

Buyer, J., M. Kratzke y L. Sikora. A method for detection of Pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growth promoting *Pseudomonas* strain, in the barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 3:677-681, 1993.

Chen, C. /et al./ Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*. 5(1): 83-91, 1995.

Dowling, D. N. y F. OGalán. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biochnol.* 12: 133-141, 1994.

Duran, B. Les Western Blot. *Le Technoscope de Biofutur*. Avril (19). 17 p. 1988.

Dybas, M. J., G. M. Tarara y C. S. Criddle. Localization of the carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp strain KC. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2): 758-762, 1995.

Frias, A. S. Evaluación de diferentes factores que influyen en la producción de metabolitos a partir de *Pseudomonas fluorescens* para el control biológico de patógenos. / A.S. Frias.- Trabajo de Diploma UH (Bio), 1997.

Fujimoto, D. K. Role of secondary metabolites in root disease suppression. / D. K. Fujimoto.; D.M Weller; L.S. Thomashow. *En: Processes and Aplications*. Dabshim K. M and R. A Einhelling, (eds). Allelopathy : Organisms. Washington: American Chemical Society Washington, 1995. p.330-347.

Hamdam, H., D. W Weller y I. Tomashow. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *G. Graminis* var. *tritici* by *P. fluorescens* 2-79 and M4-Bor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991.

Hebbar, K. Burkholderia cepacia, a plant growth-promoting rhizobacteria associate of maize./En: K. Hebbar.; M. Martel and T. Heulin. *Proceedings of the Third International Workshop on PGPR*, 1994. p. 201-203.

Heinrichs, D. E., L. Young y K. Poole. Pyochelin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *Infect Immun.* 59: 3680-3684, 1991.

Hernández, Ana N. Selección de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz. /Ana N. Hernández (Mr en Ciencias Biológicas) ; UH (Bio), 1996. 61 p.

Hernández, Annia. Caracterización de cepas de *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. /Annia Hernández. (Mr en Ciencias Biológicas); UH (Bio), 1998. 62 p.

Hernández, Annia, Ana I. Fernández y Ana N. Hernández. Identificación de cepas de *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. *Cultivos Tropicales* 19(1):5-12, 1998.

King, E. O., M. K. Ward y D. E. Raney. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307, 1954.

Meyer, J. M. y M. A Abdallah. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J.Gen.Microbiol.* 107:319-328, 1978.

Miranda, S. Identificación y caracterización en cuanto a producción de sideróforos de cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. /S. Miranda.Trabajo de Diploma.UH (Bio), 1998. 56p.

Neish, B. y P. Rainey. Isolation and characterization of rhizosphere induced genes from *Pseudomonas fluorescens* using in vivo technology (IVET), incorporation GFP and inaz reporters. *Pseudomonas 97'. VI International Congress on Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, 1997.

Ouchterlony, O. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. /O. Ouchterlony, P. A. Nilsson.- *En: D. M. Weir, de Handbook of experimental immunology*. Oxford, Blackwell Scientific Publication. 1978. p. 655-706.

Parke, J. L. y R. E. Rand. Biological control of *Pythiumdamping off* and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant Dis.* 75: 987-992. 1991.

Rasska, L., L.Viikari y T. Mattioli-Sandholm. Detection of siderophores in growing cultures of *Pseudomonas* sp. *J. Indust. Microbiol.* 11: 181-186, 1993.

Rojas, M. Aislamiento e identificación de cepas de *Acetobacter diazotrophicus*. /M. Rojas.- *En: Fijación biológica del nitrógeno*. Cancún, 1998.

Scher, F. M. y R. Baker. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to fusarium with pathogens. *Phytopatology* 72:1567-1573, 1982.

Recibido: 12 de octubre de 1998

Aceptado: 23 de octubre de 1998