

# ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS EN CEPAS AISLADAS DESDE SUELO AGRÍCOLA PARA SU APLICACIÓN COMO BIOINSUMO

Acceptance date: 02/05/2024

### **Viviana Edith Calvente**

Laboratorio de Microbiología Industrial,  
Facultad de Química, Bioquímica y  
Farmacia, Universidad Nacional de San  
Luis  
<https://orcid.org/0000-0003-1079-1531>

### **Julian Berca Espinosa**

Laboratorio de Microbiología Industrial,  
Facultad de Química, Bioquímica y  
Farmacia, Universidad Nacional de San  
Luis  
<http://orcid.org/0009-0003-4660-7158>

### **Yesica Sabrina Lambrese**

Facultad de Ingeniería y Ciencias  
Agropecuarias, Universidad Nacional de  
San Luis  
<https://orcid.org/0009-0004-7861-6398>

### **Leonardo Gastón Navarta**

Laboratorio de Microbiología Industrial,  
Facultad de Química, Bioquímica y  
Farmacia, Universidad Nacional de San  
Luis  
<https://orcid.org/0009-0007-7754-4603>

### **María Gabriela Sansone**

Laboratorio de Microbiología Industrial,  
Facultad de Química, Bioquímica y  
Farmacia, Universidad Nacional de San  
Luis  
<https://orcid.org/0009-0004-2776-6273>

**RESUMEN:** El hierro es un micronutriente esencial involucrado en muchos procesos bioquímicos en los microorganismos. Apesar de que el hierro es bastante abundante en la naturaleza, la insolubilidad del ión férrico (III) hace su adquisición dificultosa para ellos. Por esto muchos microorganismos han desarrollado mecanismos específicos para su adquisición, produciendo un agente quelante de bajo peso molecular, denominado “sideróforo”, que excreta al medio, el cual tiene gran afinidad por el hierro. La raíz de la planta también secreta sideróforos para mantener el nivel de hierro para sus actividades metabólicas y fisiológicas en suelos degradados y estresados por hierro, pero muchas veces no es suficiente. Según estudios recientes, el uso de sideróforos como biofertilizantes ha demostrado ser efectivo en la mejora del crecimiento de las plantas y en la absorción de nutrientes. Además los sideróforos se han utilizado en biocontrol de hongos fitopatógenos. La utilización del sideróforo, ácido *rhodotorúlico*, producido por levaduras rosadas y del sideróforo *enteroquelina* producido por la bacteria *Kosakonia radicincitans* redujeron el crecimiento de hongos patógenos. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar a partir de

microorganismos aislados de suelos agrícolas, aquellos con capacidad de producir sideróforos de tipo hidroxamato y/o catecolato, para luego aplicarlos en el desarrollo de un biofertilizante. Los resultados mostraron que de las 94 cepas ensayadas, 38 produjeron hidroxamatos y 20 catecolatos; destacándose 12 cepas que produjeron ambos tipos de sideróforos. Por lo tanto 46 cepas presentaron producción de uno o ambos sideróforos, es decir más del 43 % del total fueron positivas para producción de estos quelantes de hierro en las condiciones del ensayo. Los microorganismos estudiados podrían mediante su producción de sideróforos, no solo aportar hierro a la planta, mejorando su crecimiento, sino también actuar como agentes de control biológico; lo cual los hace excelentes candidatos para el desarrollo de un bioinsumo.

**PALABRAS-CLAVE:** sideróforo, catecolato, hidroxamato, microorganismos, bioinsumo

## STUDY OF THE SIDEROPHORES PRODUCTION CAPACITY IN ISOLATED STRAINS FROM AGRICULTURAL SOIL FOR APPLICATION AS BIOINPUTS

**ABSTRACT:** Iron is an essential micronutrient involved in many biochemical processes in microorganisms. Although it is quite abundant in nature, it is mostly found as the ferric ion (III), which is not soluble for plants and microorganisms, making it a nutrient that is hard to absorb. Due to this fact, many microorganisms have developed a specific mechanism for its acquisition, by producing a low molecular weight chelating agent, called “siderophore”, which they excrete into the environment and has a high affinity for iron. The plant’s root also secretes siderophores to maintain the iron levels for its metabolic and physiological activities in degraded and low-iron soils. Still, many times this is not enough to reach the optimum level. According to recent studies, the use of siderophores as biofertilizers has proven to be effective in improving plant growth and nutrient absorption. Additionally, siderophores have been used for biological control against phytopathogenic fungi. It has been shown that the use of the siderophore, rhodotorulic acid, produced by pink yeasts, and the siderophore enterochelin, produced by the bacteria *Kosakonia radicincitans*, reduced the growth of some pathogenic fungi. In the present work, the goal was set to select from microorganisms isolated from agricultural soils, those with the capacity to produce siderophores of the hydroxamate and/or catecholate type, and then apply them in the development of a biofertilizer. The results showed that of the 94 strains tested, 38 produced hydroxamates and 20 catecholates; highlighting 12 strains that produced both types of siderophores. Therefore, 46 strains showed the production of one or both siderophores, that is, more than 43% of the total were positive for the production of these iron-chelating compounds under the test conditions. Thus, these microorganisms, through their production of siderophores, can not only provide iron to the plant, improving its growth, but also act as biological control agents; which makes them excellent candidates for the development of a bioinput.

**KEYWORDS:** siderophore, catecholate, hydroxamate, microorganisms, bioinput

## INTRODUCCIÓN

El hierro es un micronutriente esencial involucrado en muchos procesos bioquímicos en los microorganismos. La existencia de dos estados de oxidación le da al hierro su capacidad para actuar como transportador de electrones. De esta manera el hierro está presente en los citocromos y en transportadores de electrones, siendo esencial para el

crecimiento y la supervivencia de muchas especies microbianas. A pesar de que el hierro es bastante abundante en la naturaleza, la insolubilidad del ión férrico (III) hace su adquisición dificultosa para los microorganismos. Debido a esta baja disponibilidad de hierro, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos específicos para su adquisición. El mecanismo es esencialmente el siguiente: el microorganismo produce un agente quelante de bajo peso molecular, denominado “sideróforo”, que excreta al medio, el cual tiene gran afinidad por el hierro. Este fenómeno también se puede reproducir en medios de cultivo de laboratorio, particularmente cuando el medio posee bajo contenido de hierro. La función de los sideróforos es solubilizar tanto hierro como esté disponible en el ambiente externo y transportarlo al interior de la célula. Cuanto menor es el hierro disponible, mayor es la cantidad de sideróforo producido. Los sideróforos se producen como ligandos libres (en la forma desferri) y luego complejados con el hierro disponible en el medio para dar el ferro-complejo. Este complejo es luego utilizado en la captación de hierro por la célula. Dado que los sideróforos aumentan la disponibilidad de hierro para un microorganismo, ellos pueden funcionar como factores de virulencia ayudando al microorganismo patógeno a crecer en la célula huésped. La especificidad del complejo férrico-sideróforo a veces previene que el hierro sea complejado y utilizado por otros microorganismos diferentes a la célula productora dando así a este organismo productor una ventaja en la competición con otros microorganismos (MESSENGER and RATLEDGE, 1985). Los sideróforos son moléculas especiales, muchos contienen aminoácidos modificados y se ha visto una gran variación en la estructura de los sideróforos desde una especie microbiana a otra. En general se clasifican en tres grupos estructurales: catecolatos o fenolatos, mayoritariamente producidos por las bacterias; hidroxamatos que los producen principalmente hongos y bacterias; y sideróforos mezcla, los cuales presentan grupos hidroxamato, catecolato y carboxilato en una misma estructura (TIMOFEEVA *et al.*, 2022). La mayoría de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos producen al menos un sideróforo, cuando crecen en condiciones de carencia del mencionado metal (NEILAND, 1995). Desde los años 80 se demostró la presencia de sideróforos en suelo y también en ambientes acuáticos (POWELL *et al.*, 1980). Los sideróforos ejercen un efecto positivo sobre las plantas, en un estudio la Crisobactina producido por *Erwinia chrysanthemi* activó la vía de señalización mediada por el ácido salicílico induciendo la expresión del gen PR1 en *Arabidopsis* (DELLAGI *et al.*, 2009). La raíz de la planta también secreta sideróforos para mantener el nivel de hierro para su actividades metabólicas y fisiológicas en suelos degradados y estresados por hierro, pero muchas veces esto no es suficiente para llegar al nivel perfecto (HERLIHY *et al.*, 2020). La deficiencia de hierro es un fenómeno observado en suelos desérticos ricos en  $\text{CaCO}_3$  a pH alto y se demostró deficiencia de hierro debido a una menor solubilidad del hierro en niveles altos de pH. Por otro lado el riego por inundación y aumento de la concentración de nitratos y fosfatos (uso exógeno de fertilizantes sintéticos) en el suelo reduce la solubilidad del hierro, altera la translocación del hierro e induce su deficiencia en la planta (SINGH *et al.*, 2022). En agricultura, los sideróforos tienen aplicaciones en la promoción del crecimiento de las plantas, se observó que el uso de microorganismos productores de sideróforos,

pueden mejorar la vida de las plantas en suelos estresados por baja concentración de hierro (SAHA *et al.*, 2016). Según estudios recientes, el uso de sideróforos como biofertilizantes ha demostrado ser efectivo en la mejora del crecimiento de las plantas y en la absorción de nutrientes (AL-ANI *et al.*, 2021). La bacteria *Pseudomonas putida* secreta sideróforos tipo hidroxamatos, que juegan un rol en la promoción de crecimiento y en la regulación de mecanismos de defensa de plantas (ASHAJYOTH *et al.*, 2023). Además los sideróforos se han utilizado en el control biológico de hongos fitopatógenos. La utilización del sideróforo, ácido *rhodotorúlico*, producido por levaduras rosadas y del sideróforo *enteroquelina* producido por la bacteria *Kosakonia radicincitans* redujeron el crecimiento de hongos patógenos (CALVENTE *et al.*, 2001a; CALVENTE *et al.*, 2001b; LAMBRESE *et al.*, 2018).

Por todo lo expuesto es que en el presente trabajo se planteó el objetivo de seleccionar a partir de microorganismos aislados de suelos agrícolas, aquellos con capacidad de producir sideróforos de tipo hidroxamato y/o catecolato, para luego aplicarlos en el desarrollo de un biofertilizante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos utilizados

Los microorganismos ensayados fueron aislados de muestras de suelo provenientes de 10 fincas con cultivo de vid, de la provincia de Mendoza (Argentina). Los aislamientos se realizaron mediante el método de diluciones sucesivas, en tres medios de cultivo seleccionados con la finalidad de detectar y poder aislar microorganismos con potencial capacidad de promoción de crecimiento de plantas, los cuales fueron: medio base con extracto de suelo, medio Sabouraud para hongos y levaduras y medio para identificar microorganismos solubilizadores de fosfato. Se trabajó con muestras de suelo extraídas en dos temporadas de cultivo (2021/2022 y 2022/2023); y a su vez en cada temporada en dos etapas del ciclo fenológico de la vid (brotación y envero). Finalmente de las más de 150 cepas de interés que se aislaron, se logró probar para producción de sideróforos 94 de ellas, entre bacterias y levaduras.

### Observaciones macro y microscópicas

Además de realizar las determinaciones de producción de distintos tipos de sideróforos, se realizaron observaciones macro y microscópicas de cada una de las cepas. Las observaciones macroscópicas consistieron en una caracterización de las colonias según: color, brillo, textura, bordes de las colonias, etc. Las observaciones microscópicas se realizaron mediante preparados en fresco y consistieron en observar: forma, tamaño, movimiento, si se encontraban encadenados o agregados entre sí o cualquier otra característica de importancia.

## Cultivo y producción de sideróforos

A partir de estas cepas ya aisladas, se repicaron cada una en un medio de bajo contenido en hierro, Vitamin Free (VF) conteniendo: Glucosa 10 g,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  3.5 g, Asparagina 1.5 g, Histidina 0.010 g, Metionina 0.020 g, Triptofano 0.020 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 0.5 g, Agar-agar 20 g, Agua destilada 1000 ml, pH 7. Este medio se lo formuló tanto de manera sólida (con agar-agar) como para medio líquido (sin agar). Todos los microorganismos fueron repicados dos veces en medio sólido VF, con el fin de lograr una estimulación de la producción de sideróforos a partir de la falta del hierro. Aquellos microorganismos que sobrevivieron a los dos repiques, se los cultivó en el medio VF líquido y se los llevó a agitación a 120 rpm en cuarto estufa a  $25 \pm 1$  °C, por 120 horas. Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 10 mL de cada una de las muestras y se las centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos.

## Determinación de sideróforos

Luego de la centrifugación, se utilizó el sobrenadante para determinar hidroxamatos y/o catecolatos mediante ensayos colorimétricos: método de Arnow para catecolatos y la prueba de perclorato férrico para hidroxamatos. Método de Arnow: consistió en el agregado secuencial de 1 mL del sobrenadante, luego 1 mL de HCl 0.5 N, 1 mL del reactivo de Arnow y por último 1 mL de NaOH 1N. Esta prueba se considera positiva en el caso de que, luego del agregado del último reactivo la muestra vire del amarillo al color rojo. La determinación se realizó a 510 nm en espectrofotómetro. Método del Perclorato Férrico: consistió en el agregado de 0.5 mL de sobrenadante junto con 2.5 mL de perclorato férrico 0.5 M en ácido perclórico. La prueba se consideró positiva si la muestra presentó viraje hacia los tonos naranjas o rojos por formación del quelato. En este caso se midió a 480 nm en espectrofotómetro. (PAYNE, 1994)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las observaciones macro y microscópicas evidenciaron una amplia mayoría de bacterias y en menor proporción levaduras. Los mismos se presentan en las **Tabla 1**, **Tabla 2**, **Tabla 3** y **Tabla 4**, junto con los resultados de las pruebas de Arnow y Perclorato férrico. Los resultados de las determinaciones de sideróforos se expresaron en forma semicuantitativa ya que como se explicó anteriormente los mismos presentan un amplio rango de estructuras, las cuales no se conocían al momento de realizar este trabajo, lo que impidió contar con el patrón adecuado para cuantificar cada determinación. Por tanto, los resultados de las reacciones colorimétricas se indican en la tabla según su densidad óptica (DO) como: (-) sin producción, de 0 a 0,030; (+/-) dudoso o variable de 0,031 a 0,100; (+) positivo débil, de 0,101 a 0,200; (++) positivo moderado de 0,201 a 0,500 y (+++) positivo alto, desde 0,501 o más.

CEPAS	Observación MACROSCÓPICA	Observación MICROSCÓPICA	SIDERÓFOROS	
			CATECOLATOS	HIDROXAMATOS
ChM2a	Colonia naranja cremosa con brillo	Levaduras con inclusiones	(-)	(-)
ChM2b	Colonia naranja cremosa con brillo.	Levaduras con inclusiones	(-)	(-)
ChM4	Colonia amarillenta de aspecto seco.	Bacilos pequeños.	(-)	(+)
ChM17b	Colonia beige cremosa con brillo.	Levadura sin inclusiones	(-)	(-)
ChM17a	Colonia beige cremosa con brillo	Levadura sin inclusiones	(-)	(-)
ChM20b	Colonias muy pequeñas blancas.	Bacilos chicos a medianos.	(-)	(+/-)
ChM21a	Colonias aisladas y blancas	Bacilos chicos a medianos.	(-)	(-)
ChM22a	Colonia blanco azulado, opaca.	Bacilo pequeño.	(-)	(-)
ChM23b	Colonia naranja rugosa sin relieve.	Bacilos chicos a medianos móviles.	(-)	(+)
ChM27b	Colonia beige claro, opaca.	Diplococos y coco bacilos.	(-)	(-)
ChM28c	Colonia azul verdosa poco de brillo.	Bacilos largos y grandes.	(-)	(+/-)
ChM30b	Colonia blanco tiza, textura cremosa.	Bacilos medianos a grandes.	(-)	(++)
ChM34a	Colonias blancas.	Bacilos chicos con movilidad	(-)	(-)
ChM34b	Colonia, color crema, brillo y textura.	Bacilos muy finos y largos.	(-)	(-)
ChM37b	Colonia seca, color amarillo naranja.	Bacilos muy pequeños.	(+/-)	(-)

(-) Negativo, (+/-) Dudoso, (+) Positivo débil, (++) Positivo medio, (+++) Positivo alto

Tabla 1 : características de los microorganismos aislados en período de brotación temporada 2021/2022 y su producción de sideróforos.

CEPAS	Observación MACROSCÓPICA	Observación MICROSCÓPICA	SIDERÓFOROS	
			CATECOLATOS	HIDROXAMATOS
ChM41	Colonia blanca y cremosa.	Bacilo mediano sin movimiento.	(+)	(+/-)
ChM44	Colonias cremosas, color naranja.	Bacilos, movimiento browniano.	(-)	(++)
ChM52c	Colonia color crema claro, opaca.	Bacilos medianos, esporulado.	(-)	(-)
ChM54a	Colonia naranja opaco, duras.	Bacilo mediano	(-)	(-)
ChM58a	Colonia amarilla, con textura, opaca y dura.	Filamentos largos y finos con ramificaciones.	(-)	(+/-)
ChM58b	Colonia naranja claro, pocas colonias.	Bacilos medianos con movimiento.	(-)	(++)
ChM62a	Colonia crema, brillante y cremosa.	Bacilos chicos amedianos, agrupados.	(+)	(-)
ChM63a	Blanca cremosa y con halo	Bacilo mediano sin movilidad	(-)	(++)
ChM63d	Colonia opaca, blanca / amarillenta.	Bacilos con una especie de ramificación.	(-)	(-)
ChM64a	Colonia poco cremosa, color crema.	Bacilo chico con movimiento.	(-)	(-)
ChM64c	Colonia blanco / crema con poco brillo.	Bacilo largo, movimiento browniano.	(-)	(-)
ChM64d	Colonia naranja a rosa.	Bacterias, cadena de cocos.	(++)	(+/-)
ChM64f	Colonia seca, amarillo translúcido.	Bacteria, cocos en cadena.	(-)	(-)
ChM65c	Colonia blanca cremosa y brillante.	Bacilos grandes y alargados.	(-)	(-)
ChM65e	Colonia rosa claro, cremosa y brillante.	Cocos en cadena, chicos.	(-)	(-)
ChM72a	Colonias rosa-naranja.	Levaduras ovals, brotes polares.	(-)	(+)
ChM72b	Colonias rosadas	Levaduras ovals, brotes polares e inclusiones.	(-)	(-)
ChM73	Colonia amarilla a beige, cremosa.	Bacilos chicos.	(-)	(+/-)
ChM74a	Colonia beige a marrón, con textura.	Bacilos chicos.	(-)	(-)
ChM74b	Colonia color crema.	Levadura redondeada, brotes polares.	(-)	(+/-)
ChM76b	Colonia color beige/ amarillento.	Bacilos medianos.	(+)	(-)

ChM76c	Colonia rosa clarito a crema.	Bacilos chicos móviles	(-)	(-)
ChM78a	Colonia casi transparente y gelatinosa.	Bacilos medianos, agrupados.	(+)	(-)
ChM78c	Colonia cremosa	Bacilos medianos no móviles	(++)	(+/-)
ChM79	Colonia rosa claro, poco crecimiento.	Levaduras ovas, múltiples brotes.	(-)	(-)
ChM80	Colonia casi transparente.	Bacilos medianos sin movilidad.	(+)	(-)

(-) Negativo, (+/-) Dudoso, (+) Positivo débil, (++) Positivo medio, (+++) Positivo alto

Tabla 2: características de los microorganismos aislados en período de enero, temporada 2021/2022 y su producción de sideróforos.

CEPAS	Observación MACROSCÓPICA	Observación MICROSCÓPICA	SIDERÓFOROS	
			CATECOLATOS	HIDROXAMATOS
ChM85	Colonia crema seca.	Bacteria filamentosas	(-)	(-)
ChM86	Colonia blanco-crema, cremosa con brillo	Bacilos chicos y algunos agrupados.	(-)	(-)
ChM87	Colonia beige-crema, cremosa y brillante.	Bacilo chico (cocobacilo), agrupados.	(++)	(+/-)
ChM89	Colonia naranja intenso, con brillo.	Bacilo muy pequeño.	(-)	(++)
ChM90a	Colonia naranja, produce un pigmento.	Bacilo chico.	(+/-)	(+/-)
ChM90b	Colonia beige/crema. Crecimiento definido.	Bacilo chico, con movimiento browniano.	(+/-)	(++)
ChM90c	Colonia crema/beige, cremosa, dispersa.	Bacilo pequeño y redondeado.	(+++)	(+/-)
ChM95b	Colonia blanco amarillento, brillante.	Bacilos chicos, agrupados en pares.	(-)	(+)
ChM96e	Colonia amarilla, crecimiento definido.	Cocobacilos medianos/pequeños.	(-)	(+)
ChM96f	Colonia beige oscuro, con brillo.	Bacilos medianos con movimiento.	(-)	(+/-)
ChM96g	Colonia beige, con brillo.	Bacilo pequeño, agrupados en cadenas.	(-)	(+/-)
ChM97b	Colonia amarillo-mostaza, cremosa, brillo.	Cocobacilos, sin movimiento.	(-)	(+)
ChM97c	Colonia blanca, con brillo.	Bacilos chicos/medianos. Agrupados.	(-)	(-)
ChM97d	Colonia beige viscosa, con brillo.	Bacilos medianos con movimiento.	(-)	(-)



ChM97e	Colonia verde musgo, cremosa, brillante.	Bacilos chicos, en cadenas de a dos o más.	(-)	(+/-)
ChM99	Colonia verde oscuro, crecimiento definido.	Bacilos medianos, agregados en pares.	(-)	(+)
ChM99a	Colonia amarillo fuerte, brillante.	Bacilos pequeños muy agregados.	(-)	(-)
ChM99d	Colonia amarillo/beige, cremosa.	Bacilos medianos a grandes, largos.	(-)	(+/-)
ChM100a	Colonia blanca, centro amarillo, cremosa.	Bacilos chicos, agregado de a 2 o más.	(-)	(-)

(-) Negativo, (+/-) Dudoso, (+) Positivo débil, (++) Positivo medio, (+++) Positivo alto

Tabla 3: características de los microorganismos aislados en período de brotación temporada 2022/2023 y su producción de sideróforos.

CEPAS	Observación MACROSCÓPICA	Observación MICROSCÓPICA	SIDERÓFOROS	
			CATECOLATOS	HIDROXAMATOS
ChM104	Colonia blanca , filamentosa	Bacilo pequeño, formando cadenas.	(-)	(-)
ChM105	Colonia blanca, brillante.	Levaduras con brotes en los polos.	(-)	(-)
ChM105a	Colonia beige, brillante.	Levaduras ovaladas.	(-)	(+/-)
ChM105e	Colonias beige a blancas, secas.	Bacilos muy chicos, agregados.	(+/-)	(-)
ChM106a	Color beige. Opaca y cremosa.	Levaduras redondas en germinación.	(+/-)	(-)
ChM107a	Colonias amarillo fuerte, secas.	Cocobacilo pequeño, agregados.	(+++)	(+)
ChM107b	Colonias blanco rosadas, gelatinosa.	Bacilos grandes unidos de a dos.	(-)	(-)
ChM107c	Colonias amarillo-naranja, viscosas.	Bacilos grandes y largos, en cadena.	(-)	(-)
ChM107d	Color beige, brillante y cremosa.	Bacilo pequeño, algunos agregados.	(-)	(+)
ChM108a	Colonia beige claro, cremosa.	Bacilos chicos, agregados de a dos.	(-)	(-)
ChM108b	Colonia beige, viscosa, brillante.	Bacilo pequeño, agregados entre si.	(-)	(-)
ChM109b	Colonia amarilla. Brillante y cremosa.	Bacilo chico sin movimiento	(-)	(-)
ChM110a	Colonia blanca, brillante, cremosa.	Bacilos chicos agregados, filamentosos.	(-)	(-)
ChM110b	Colonia amarilla, aspecto seco.	Bacilos muy pequeños.	(++)	(+/-)

ChM111d	Colonia beige, cremosa y brillante.	Bacilo pequeño, algunos agregados.	(-)	(-)
ChM111y	Colonia amarilla bordes irregulares.	Bacilo mediano, algunos agregados.	(-)	(+/-)
ChM111z	Colonia beige cremosa	Bacilo chico a mediano, agregados.	(-)	(-)
ChM112b	Colonia blanco/beige, brillo, cremosa.	Bacilos muy chicos, algunos agregados.	(+/-)	(-)
ChM113f	Colonia blanco/beige, brillo, cremosa.	Bacilos chicos, agregados de a 2.	(-)	(-)
ChM114a	Color rojo, aspecto seco, brillante.	Bacilo mediano algunos agregados.	(-)	(-)
ChM114c	Color blanco, cremosa y brillante.	Bacilos pequeños sin movimiento.	(+)	(+/-)
ChM114d	Colonia amarillo, translúcida.	Bacilos alargados agregados.	(++)	(+/-)
ChM114e	Colonia blanca cremosa.	Bacilos medianos.	(-)	(-)
ChM115	Colonia beige claro, cremosa.	Bacilos chicos y alargados, esporulado.	(-)	(-)
ChM116e	Colonia amarilla	Bacilo pequeño, agregados entre sí.	(-)	(-)
ChM117b	Colonia casi transparente	Bacilo pequeño, movilidad, agregados.	(-)	(-)
ChM118a	Colonia amarillo, seco, con brillo.	Bacilos pequeños, agregados.	(-)	(-)
ChM118e	Colonia cremosa, amarillo borde blanco.	Bacilo mediano y alargado, agregados.	(-)	(-)
ChM119	Colonia beige, brillante y cremosa.	Bacilo chico, algunos agregados.	(-)	(-)
ChM119b	Colonia beige cremosa	Bacilo mediano.	(-)	(-)
ChM119c	Colonia rosada oscura	Bacilo grande, esporulado.	(-)	(+)
ChM119e	Colonia beige claro	Bacilo pequeño, agregados entre si.	(-)	(+/-)
ChM120	Colonia beige cremosa	Bacilo mediano, agregados entre si.	(-)	(-)
ChM120y	Colonia rosado claro.	Bacilo grande, esporulado.	(+++)	(++)

(-) Negativo, (+/-) Dudoso, (+) Positivo débil, (++) Positivo medio, (+++) Positivo alto

Tabla 4: características de los microorganismos aislados en período de enero, temporada 2022/2023 y su producción de sideróforos.

Como se observa en los resultados de las 94 cepas ensayadas, 38 produjeron hidroxamatos y 20 catecolatos; destacándose 12 cepas que produjeron ambos tipos de sideróforos. Por lo tanto 46 cepas presentaron producción de uno o ambos sideróforos, es decir más del 43 % del total fueron positivas para producción de sideróforos en las condiciones del ensayo. En la **Figura 1** se muestran las reacciones colorimétricas

correspondientes al ensayo de Arnow y el del Perclorato férrico en un grupo de pruebas realizadas. Observándose en el caso del ensayo de Arnow la prueba positiva de color rojo violáceo y los negativos de color amarillo ya que no se ha producido el viraje final que indica la presencia del catecolato. En el caso de los ensayos de Perclorato férrico se observan con diferentes intensidades de color rojo las pruebas positivas e incoloras las negativas.

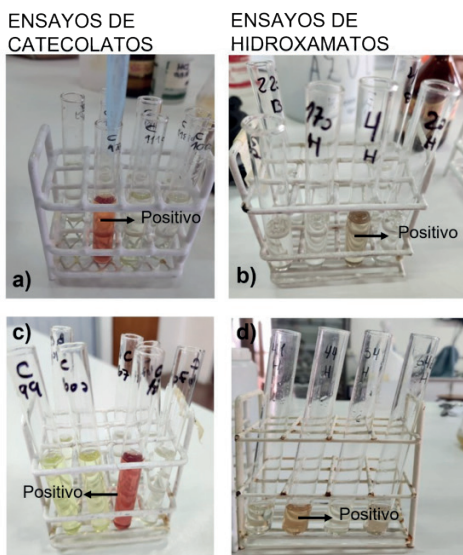


Figura 1: Prueba de Arnow para determinación de catecolatos (a y c) y Prueba del perclorato férrico para determinación de hidroxamatos (b y d)

En la **Figura 2** se representan los porcentajes de pruebas que dieron negativo, dudoso, positivo débil, moderado o alto para catecolatos y lo mismo para hidroxamatos.

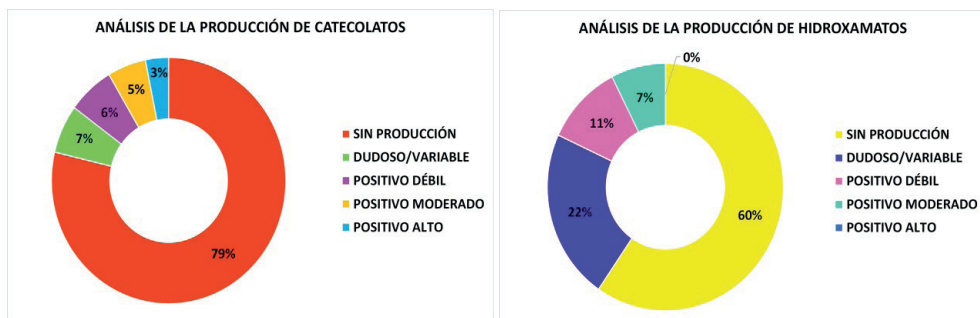


Figura 2: Porcentajes de pruebas que dieron producciones negativas, dudosas, débil, moderadas o altas para catecolatos (A) y para hidroxamatos (B)

Si bien la proporción de cepas productoras fueron mayoritariamente medias y bajas, se debe tener en cuenta que esta es una selección preliminar de microorganismos productores de sideróforos y no se ha intentado aún producirlos en medios de cultivo específicos para catecolatos o hidroxamatos, ni tampoco optimizar dicha producción, por ejemplo manipulando condiciones del cultivo como cambio de fuentes de C y N, pH, temperatura de crecimiento, agitación, etc. (CALVENTE *et al.*, 2001b). No obstante, estos resultados son prometedores ya que nos indican que los microorganismos de estos suelos presentan la capacidad de producir sideróforos lo que puede ayudar a las plantas en su crecimiento como fue demostrado por numerosos autores.

## CONCLUSIONES

Si tenemos en cuenta que la población mundial está en constante crecimiento y la superficie de tierra cultivable va disminuyendo o baja sus rendimientos debido a malos manejos, existe una fuerte necesidad de introducir nuevas tecnologías agrícolas. Es posible garantizar una alta demanda de alimentos de alto valor nutricional en los siguientes años; para satisfacerla se deberán utilizar soluciones agronómicas de bajo impacto para aumentar la resistencia de las plantas a los efectos adversos y condiciones de suelos deteriorados (TIMOFEEVA *et al.*, 2022). En mayo de 2020, la Unión Europea anunció el programa Farm to Fork estrategia (F2F), destinado a reducir la dependencia de pesticidas, antimicrobianos y el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química, es por esto que durante los últimos años, la investigación se ha centrado en nuevas tecnologías agroecológicas, enfoques dirigidos a la gestión de la agrobiodiversidad (CASTIGLIONE *et al.*, 2021). Los bioestimulantes vegetales son productos de próxima generación que probablemente sean eficaces para la sostenibilidad agrícola. Estos bioestimulantes vegetales pueden combinar fertilizantes químicos con microorganismos y, por lo tanto, se clasifican como bioestimulantes vegetales microbianos. Actualmente, hay numerosos estudios dirigidos a seleccionar microorganismos con actividad de crecimiento específica para mejorar la asimilación de nutrientes en el caso de su baja disponibilidad, así como en la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento de plantas, aislados de regiones afectadas por la salinización y la desertificación (CASTIGLIONE *et al.*, 2021). Como ya se mencionó anteriormente los microorganismos productores de sideróforos, pueden producir numerosos compuestos quelantes del hierro, que pueden mejorar la vida de las plantas en suelos estresados por hierro. Estos microorganismos productores de sideróforos, tienen actividades de biofertilizantes y biocontrol de la planta (SINGH *et al.*, 2022). En el caso del presente trabajo muchos de los microorganismos que presentaron producciones medias y altas de sideróforos también mostraron alguna otra característica de promoción de crecimiento de plantas (solubilización de P, fijación de nitrógeno atmosférico y/o producción de fitohormonas). Por sus características de aportar nutrientes y/o

fitohormonas podrían favorecer el crecimiento de las plantas; además por su producción de sideróforos no solo pueden aportar hierro al vegetal, sino también actuar como agentes de control biológico; lo cual los hace excelentes candidatos para el desarrollo de un bioinsumo. Por lo tanto en estudios futuros se intentará estimular la producción de los sideróforos y probar estos compuestos como también sus organismos productores, en el control de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*. Desde este punto de vista se alcanzó el objetivo propuesto que era seleccionar microorganismos productores de sideróforos para desarrollar un posible bioinsumo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo y financiamiento de la Universidad Nacional de San Luis. PROICO 2–0520 “Desarrollo de bioinsumos destinados al sector agroalimentario”. También se agradece el apoyo y soporte técnico de la Sra. Flavia Silvina Guíñez.

## REFERENCIAS

- AGUADO-SANTACRUZ, G., MORENO-GÓMEZ, B., JIMÉNEZ-FRANCISCO, B., GARCÍA-MOYA, E.; PRECIADO-ORTIZ, R. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. **Revista Fitotecnia Mexicana**, 35 (1), 9-21. 2012.
- AL-ANI, L.; AGUILAR-MARCELINO, L.; BECERRA, A.; SALAZAR-VIDAL, V. Fe-Chelating Compounds Producing Fungal Communities and Their Applications. In **Recent Trends in Mycological Research, Fungal Biology**, YADAV, A. N(Ed.), Vol 1. Cap 6 . (p.135-158). Springer Nature Switzerland. 2021.
- ASHAJYOTHI, M.; VELMURUGAN, S.; KUNDU, A.; BALAMURUGAN, A.; CHOUHAN, V.; KUMAR, A. Hydroxamate siderophores secreted by plant endophytic *Pseudomonas putida* elicit defense against blast disease in rice incited by *Magnaporthe oryzae*. **Letters in Applied Microbiology**, 76, 1–10. 2023.
- CALVENTE, V.; ORELLANO, M.; SANSONE, G.; BENUZZI D, SANZ DE TOSETTI, MI. A simple agar plate assay for screening siderophore producer yeasts. **Journal of Microbiological Methods**, 47, 273-279. 2001a.
- CALVENTE, V.; ORELLANO, E.; SANSONE, G.; BENUZZI, D.; SANZ DE TOSETTI, MI. Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and its application to biocontrol of phytopathogenic moulds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 26, 226-229. 2001b.
- CASTIGLIONE, A.M.; MANNINO, G.; CONTARTESE, V.; BERTEA, C.M.; ERTANI, A. Microbial Biostimulants as Response to Modern Agriculture Needs: Composition, Role and Application of These Innovative Products. **Plants** 10, 1533, 1-23. 2021.
- LAMBRESE, Y.; GUIÑEZ, M.; CALVENTE, V.; SANSONE, G.; CERUTTI, S.; RABA, J., *et al.* Production of siderophores by the bacterium *Kosakonia radcincitans* and its application to control of phytopathogenic fungi. **Bioresource Technology Reports**, 3, 82–87. 2018.

MESSENGER, A and RATLEDGE C. Siderophores. In **Comprehensive Biotechnology. The principles, applications and regulations of biotechnology in industry agriculture and medicine.** MURRAY MOO-YOUNG ( Ed. in chief). 1° ed. Vol 3. Cap 13. (p.275-295) Pergamon Press, U.K. 1985.

NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, 270 (45), 26723-26726.1995.

PAYNE, S. Detection, isolation and characterization of siderophores. In: **Methods in Enzimology**, 235 (p.329-344). Academic Press, Inc. NY. 1994.

POWELL, P.; CLINE, G.; REID, C.; SZANISZLO, P. Occurrence of hydroxamate siderophores iron chelators in soils. **Nature**, 287, 833-834. 1980.

SAHA, M.; SARKAR, S.; SARKAR, B.; SHARMA, B., BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environ Sci Pollut Res**, 23, 3984–99. 2016.

SINGH, P.; CHAUHAN, P.; UPADHYAY, S.; SINGH, R.; DWIVEDI, P.; JING, WANG, J., *et al.* Mechanistic Insights and Potential Use of Siderophores Producing Microbes in Rhizosphere for Mitigation of Stress in Plants Grown in Degraded Land. **Frontiers Microbiology**, 13, 1-17. 2022.

TIMOFEEVA, A.; GALYAMOVA, M. SEDYKH, S. Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. **Plants**, 11,(3065),1-23. 2022.