

**PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER* SPP. AISLADAS DE SUELOS
DE CULTIVOS HORTÍCOLAS DEL ALTIPLANO CUNDIBOYACENSE**



Diego Mauricio Salazar Sánchez

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.

2017

**PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER* SPP.
AISLADAS DE SUELOS DE CULTIVOS HORTÍCOLAS DEL ALTIPLANO
CUNDIBOYACENSE**



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Colombia

DIEGO MAURICIO SALAZAR SÁNCHEZ

Dra. Concepción Puerta
Decana Facultad de Ciencias

Dra. Marcela Franco Correa
Directora Carrera de Microbiología
Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA
INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
2017

**PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER* SP. AISLADAS DE SUELOS
DE CULTIVOS HORTÍCOLAS DEL ALTIPLANO CUNDIBOYACENSE**

Diego Mauricio Salazar Sánchez

José Salvador Montaña, PhD
Director

María Ximena Rodríguez, PhD
Evaluador

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
2017

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia a Dios, por darme la posibilidad de culminar satisfactoriamente mi trabajo de grado y darme la licencia para ejecutar todas las actividades propuestas en el presente trabajo. De igual forma quiero agradecer a mis padres y familiares por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de la carrera y de mi vida, especialmente a mi Abuelo Gustavo Salazar que, a pesar de su ausencia física, siempre ha estado conmigo.

Mi tercer agradecimiento es dedicado a mi tutor José Salvador Montaña, por su amabilidad, su don de gente, su colaboración, por sus consejos y sobre todo por el conocimiento aportado para realizar el presente proyecto. Además, agradecer a la Profesora María Ximena Rodríguez, por proveer apoyo al proyecto por medio de la disponibilidad de material.

Por último, agradezco a mis compañeros de semillero de investigación, por acompañarme durante todo el proceso de realización de este trabajo, por su ayuda y gran esfuerzo para culminarlo.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	11
2.1. Formulación del problema	11
2.2. Justificación	11
3. Marco teórico	12
3.1. Hierro y su importancia en el suelo	12
3.2. Condiciones fisicoquímicas del suelo que afectan la disponibilidad del hierro	13
3.3. Síntomas de deficiencia por Hierro en las Plantas	14
3.4. Alternativas químicas reducir la deficiencia de hierro	15
3.5. Biofertilizantes	15
3.6. Microorganismos capaces de producir sideróforos	16
3.7. Producción de sideróforos por <i>Azotobacter</i> sp.	17
3.8. Sideróforos	17
3.9. Biosíntesis de los sideróforos	18
3.10. Regulación génica de los sideróforos	18
3.11. Mecanismo de transporte del complejo sideróforo-Fe	19
3.12. Aplicación de los sideróforos	19
3.12.1. Sideróforos promotores de crecimiento en plantas	19
3.12.2. Sideróforos con potencial en biocontrol.....	20
3.12.3. Aplicación clínica	¡Error! Marcador no definido.
3.13. Métodos para la detección y cuantificación de Sideróforos	20
3.13.1 Métodos de detección cuantitativa	21
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo General	23
4.2. Objetivos Específicos	23
5. METODOLOGÍA	23

5.1. Elaboración del Banco de trabajo	23
5.2. Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos en Medio selectivo y diferencial CAS	23
5.3. Evaluación cualitativa en CAS a diferentes temperaturas	24
5.4. Cuantificación de sideróforos de tipo catecolato mediante el test de Arnow 24	
5.5. Determinación cualitativa de hidroxamatos mediante Test de Sales de Tetrazolio	25
5.6. Cuantificación de sideróforos de tipo hidroxamato mediante el Test de Atkin	25
5.7. Detección de Sideróforos por Cromatografía de Capa Fina	25
5.7.1. Estandarización de la técnica.....	25
5.7.2. Extracción y detección de Sideróforos usando Cromatografía de Capa Fina (TLC)	26
5.8. Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS	26
6.1. Evaluación del banco de trabajo	26
6.2. Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos en Medio selectivo y diferencial CAS	28
6.3. Cuantificación de sideróforos de tipo catecolatos (Test de Arnow)	30
6.4. Cuantificación de sideróforos de tipo hidroxamatos (Test de Atkin)	30
6.4.1 Evaluación cualitativa de sideróforos de tipo hidroxamato (Test de Sales de Tetrazolio).....	32
6.5. Detección de Sideróforos por Cromatografía de Capa Fina	33
6.5.1. Estandarización del proceso	33
6.5.2. Extracción y detección de Sideróforos usando Cromatografía de Capa Fina (TLC)	34
7. DISCUSIÓN	36
7.1. Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos en Medio selectivo y diferencial CAS	37

7.2. Evaluación cuantativa de sideróforos de tipo catecolatos mediante el Test de Arnow	39
7.3. Evaluación cualitativa y cuantitativa de sideróforos de tipo Hidroxamatos mediante el test de Sales de Tetrazolio y test de Atkin	42
7.4. Cromatografía en capa delgada.	43
8. CONCLUSIONES	45
9. RECOMENDACIONES	45
10. BIBLIOGRAFÍA.....	46

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del octahedón (Kurth et al., 2016).....	18
Figura 2. Regulación transcripcional de los genes involucrados con la síntesis de sideróforos (Sah & Singh, 2015).	19
Figura 3. Ecuación que explica la reacción entre el sideróforo y el complejo formado por el colorante (Schwyn & Neilands, 1987)	21
Figura 4. Actividad de solubilización de hierro en medio selectivo y diferencial CAS a 28°C y 5 días de incubación. El halo de color amarillo alrededor de la colonia indica la producción de sideróforos. 1. C5T 2. C3CA. 3. C2BR. 4. C4BR.	28
Figura 5. Actividad de solubilización de hierro de las cepas C3CA, C2BR, C4E, C5CO, C1Z, C4BR, C2Z, C5E, C5T y ATCC a temperaturas de 25°C, 35°C y 45°C, en prueba semi-cuantitativa (difusión en placa). Halos de solubilización en mm.	29
Figura 6. Producción de sideróforos de tipo catecolatos de las cepas descritas en el recuadro de la figura reportadas en (µg/ml) respecto al tiempo.	31
Figura 7. Producción de sideróforos de tipo hidroxamato de las cepas descritas en el recuadro de la figura reportadas en (ug/ml) respecto al tiempo.	31

RESUMEN

El hierro es un microelemento de gran importancia para el desarrollo de funciones celulares en los organismos como la síntesis de ADN, y la respiración. Este elemento se encuentra en abundancia en la rizósfera en forma de óxidos e hidróxidos de hierro, que no están disponibles para plantas y microorganismos. La poca disponibilidad de hierro para las plantas puede ocasionar desde una clorosis férrica, hasta pérdida de la turgencia de los tejidos y la muerte. Se han identificado microorganismos que producen compuestos con habilidad para secuestrar el hierro férrico Fe^{+3} no disponible, a formas reducidas, Fe^{+2} disponibles para las plantas. Los géneros de microorganismos más estudiados por la producción de sideróforos y considerados como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp. entre otros. Trabajos realizados por la Unidad de Investigaciones Agropecuarias UNIDIA de la Universidad Javeriana, con aislamientos de *Azotobacter* spp. obtenidos de suelos de cultivos hortícolas colombianos, han demostrado el potencial de este género bacteriano para producir metabolitos promotores de crecimiento vegetal. Es por esta razón que, en este trabajo, se propuso determinar la producción de sideróforos por cepas de *Azotobacter* sp. aisladas de suelos de cultivos hortícolas del altiplano Cundiboyacense. Para tal fin, inicialmente fueron reactivadas 24 cepas de *Azotobacter* spp., a las cuales se les evaluó de forma cualitativa la producción de sideróforos. Del primer *screening* fue posible seleccionar 9 cepas con capacidad de producir sideróforos, con base en la formación de halos de solubilización en medio CAS. En un ensayo posterior, se evaluó el efecto de la temperatura en la producción de sideróforos, encontrando que temperatura óptima corresponde a 25°C. Con el fin de determinar y cuantificar el tipo de sideróforo producido por las 9 cepas seleccionadas, se utilizó el test de Arnow, para sideróforos de tipo catecolato, sales de tetrazolio y test de Atkin para sideróforos de tipo hidroxamato. Las cepas C4E, C5CO, C1Z, C2Z y C5T produjeron las mayores concentraciones de catecolatos entre las 60 y 72h de cultivo, con valores de 11,48 $\mu\text{g/ml}$, 15,70 $\mu\text{g/ml}$, 20,72 $\mu\text{g/ml}$, 25,06 $\mu\text{g/ml}$ y 22,25 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que las cepas C4E y C5CO produjeron hidroxamatos en mayor cantidad, con valores de 45,75 $\mu\text{g/ml}$ y 87,21 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Finalmente, a través de cromatografía de capa fina (TLC) empleando placas de sílica gel, se confirmó la producción de sideróforos de tipo catecolato por las 9 cepas seleccionadas. Los resultados derivados de este trabajo permiten concluir que las cepas C4E, C5CO, C1Z, C2Z y C5T son promisorias para ser evaluadas en especies vegetales apropiadas, bajo condiciones de invernadero y campo con miras a proponer su uso como biofertilizante.

1. INTRODUCCIÓN

El hierro es un elemento esencial para los organismos y el segundo metal más abundante, seguido del Aluminio en la corteza terrestre (Raval & Desai, 2015). A pesar de esto, las condiciones ambientales del planeta como: la concentración de oxígeno en la atmósfera, la temperatura, el pH y potencial redox del suelo así como las reacciones antagónicas y sustancias tóxicas (Moore, 1972), han afectado la disponibilidad del hierro, precipitándolo en forma de compuestos silícicos y no silícicos libres, estos compuestos representan hasta el 50% de la masa del suelo (Sandoval et al., 2004; Muthuselvan & Balagurunathan, 2013).

Aunque la concentración de los iones férrico y ferroso en la solución de suelo en condiciones aeróbicas es mayor a 10^{-7} M, la concentración máxima de hierro requerida por las plantas a pH neutro no es mayor a 10^{-17} M (Saha et al., 2016). La forma soluble del hierro absorbida por las plantas corresponde a iones férricos cuya concentración en la solución del suelo es < 0.1 y 25 mg L^{-1} (Sandoval et al, 2004). De otra parte, los microorganismos aeróbicos necesitan para su crecimiento óptimo y para llevar a cabo funciones fisiológicas básicas como: la reducción del oxígeno para la síntesis de ATP formación de grupos hemo y otros propósitos esenciales, iones férricos en una concentración aproximada de 10^{-6} mol/L (Abramowski et al., 2014; Saha et al., 2016).

Se conocen microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que tienen la capacidad de producir moléculas de bajo peso molecular denominadas sideróforos, que son capaces de secuestrar (quelar) el hierro férrico que no se encuentra soluble en el suelo, con una elevada afinidad, facilitando el transporte en las plantas. (Baars et al., 2015). Microorganismos como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp. y *Azotobacter* sp. han sido reportados como productores de sideróforos en condiciones de deficiencia de hierro. Los sideróforos producidos por *Azotobacter* sp. están relacionados con diversas actividades biológicas, como cofactores de la enzima nitrogenasa (Fekete et al., 1989), como inductor de respuesta de resistencia sistémica inducida (Rubio, 2003), con mecanismos de virulencia para controlar fitopatógenos (Chaiharn et al., 2009) y con la reducción del estrés oxidativo (Peralta et al., 2016).

El presente estudio busca identificar sideróforos producidos por cepas nativas de *Azotobacter* sp empleando técnicas, con el fin de proponer su posible uso como biofertilizante.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

2.1. Formulación del problema

El Hierro es el cuarto metal de mayor abundancia en los suelos, pero a pesar de encontrarse en grandes cantidades, en condiciones fisiológicas se encuentra en forma trivalente (Fe^{3+}), formando precipitados de silicatos de ferromagnesio, hidróxidos u óxidos de hierro; compuestos que, por su carácter hidrofóbico, no están disponibles para los microorganismos y plantas (Rubio, 2013; Santacruz et al., 2012; Fekete et al., 1988; Page, 1987; Hoyer & Page, 1988). La baja solubilidad del Hierro genera problemas nutricionales en las plantas, provocando desde una clorosis férrica en hojas jóvenes hasta defoliación completa. Esta deficiencia puede incrementarse dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del suelo, como la textura arcillosa, elevados contenidos de materia orgánica, alta aireación y pH alcalino, también el carácter antagónico y la formación de complejos con nutrientes como el Fósforo, Molibdeno, Cobre, Níquel, Cobalto, Manganeseo y altas concentraciones de carbonato de calcio (Íncesu et al., 2015; Aguado et al., 2012; Ahmed & Holmström, 2014). Los cultivos en los que se presenta con mayor frecuencia está deficiencia son la gulupa, tomate, espinaca, maracuyá, caña, cacao, maíz y frijol entre otros, los cuales son cultivos de importancia económica en Colombia (Mójica, 1984).

2.2. Justificación

Para resolver el problema de deficiencia de hierro en estos cultivos, generalmente se aplican abonos basados en quelatos de hierro como el EDTA, DTPA Y EDDHA o abonos de síntesis química como el bicarbonato de calcio, el sulfato ferroso y sulfato de amonio (Álvarez et al., 2004) que son compuestos que contribuyen a la estabilidad de los iones ferroso. Estos abonos ofrecen a los agricultores una mayor productividad y rendimiento en los cultivos, al aumentar la solubilidad del hierro. Sin embargo, esta alternativa es de alto costo y se recomienda aplicar solo a cultivos de alto valor rentable. Por esta razón, en los últimos años se han implementado estrategias basada en el uso de biofertilizantes, para minimizar el impacto originado por los fertilizantes de síntesis química.

Los biofertilizantes son preparaciones de células vivas o latentes, las cuales cumplen con funciones específicas en la rizósfera como la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de reguladores de crecimiento vegetal, antibióticos y la generación de agentes quelantes de hierro, que contribuyen al mejoramiento nutricional y fisiológico de la planta (Bermúdez, 2016; Escobar et al., 2011; Wani et al., 2013). Los microorganismos

que llevan a cabo estas funciones en la rizósfera son conocidos como PGPR (Plant Growth Promoter Rhizobacteria). Varias especies de bacterias han sido estudiadas por su actividad PGPR entre las que se encuentran *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp. y *Azotobacter* sp. Desde los años 80 se ha documentado que *Azotobacter* sp. está involucrado en la mayoría de las actividades de promoción de crecimiento vegetal, siendo la producción de sideróforos una de las más importantes.

Con base en lo descrito anteriormente, este estudio tiene como objetivo determinar la producción de sideróforos por cepas nativas de *Azotobacter* sp. con el fin de proponer su posible uso como biofertilizante.

3. Marco teórico

3.1. Hierro y su importancia en el suelo

El hierro es el elemento con mayor abundancia en la corteza terrestre siendo el metal de transición de mayor uso en los seres vivos y más frecuentes en las rocas y en los suelos agrícolas. Es causante del color rojizo del suelo, permitiendo la diferenciación visual de los horizontes del perfil, dependiendo de los compuestos de hierro que se encuentren. Los estados o depósitos de hierro precipitado más abundantes en la litósfera son: óxidos e hidróxidos de hierro y silicatos de ferromagnesio. Estos minerales, permiten la formación de cristales muy pequeños que se pueden agregar, dispersar a través del suelo o revestir a otros minerales tales como oxihidróxido férrico amorfo ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), maghemita (Fe_2O_3), lepidocrocita (FeOOH) hematita (Fe_2O_3), goethita (FeOOH), con características hidrofóbicas para suplir las necesidades fisiológicas de las plantas (Aguado et al., 2012; Kappler, 2005; Acevedo et al., 2004; Shelobolina et al., 2004). La necesidad de satisfacer nutricionalmente la planta con hierro se debe a que este metal está relacionado con diversas funciones del metabolismo celular, siendo cofactor de diversas enzimas (Wandersman, et al., 2004), además está involucrado en procesos biológicos esenciales, como: transporte de oxígeno, síntesis de ADN, fijación de nitrógeno, respiración y fotosíntesis.

Las concentraciones de los iones férricos y ferrosos en la solución de suelo en condiciones aeróbicas son mayores a 10^{-7} M, pero las concentraciones máximas de hierro requeridas por las plantas a pH neutro no es mayor a 10^{-17} M (Saha et al., 2016); además, el hierro intercambiable oscila entre 1 y 1000 mg kg⁻¹ y el soluble entre < 0.1 y 25 mg L⁻¹ (Sandoval et al, 2004; Neilands, 1995). Según Acevedo y colaboradores en 2004, los compuestos de

hierro no salicólicos (óxidos e hidróxidos de hierro en distintos grados de cristalización y amorfos, hierro de intercambio y soluble en agua), componen hasta el 50% de la masa del suelo.

El hierro en los microorganismos aeróbicos necesitan concentraciones 10^{-6} M (Saha et al., 2016) para el crecimiento óptimo, además para llevar a cabo funciones fisiológicas como la reducción del oxígeno para la síntesis de ATP, la reducción de los precursores ribosos del ATP (Pentosas- P), la formación de grupos hemo y para otros propósitos esenciales (McMorran et al, 2001; Neilands, 1995; Abramowski et al., 2014).

3.2. Condiciones fisicoquímicas del suelo que afectan la disponibilidad del hierro

Las condiciones fisicoquímicas del suelo son claves para la solubilización del hierro y su disponibilidad para las plantas. El pH, es tal vez la característica química que tiene mayor influencia en la precipitación del hierro. Se encuentra documentado que en suelos con valores de pH entre 7.4 y 8.5, la concentración de hierro decrece y aumenta la deficiencia de este elemento en las plantas. El hierro se encuentra de forma divalente (Fe^{2+}), el cual durante el proceso de meteorización y bajo condiciones aeróbicas se precipita como óxidos e hidróxidos de Fe^{3+} altamente insolubles, por tanto la solubilidad de los óxidos e hidróxidos de Fe^{3+} desciende 1000 veces por cada unidad de pH (Aguado et al., 2012). De otra parte, la condición de solubilidad del hierro depende de la concentración de oxígeno. En condiciones de anaerobiosis u oxígeno reducido aumenta la disponibilidad de hierro. En el caso contrario, el aumento en la concentración de oxígeno en el suelo disminuye la solubilidad del hierro, el cual es radicalmente modificada por la oxidación, debido a que la en presencia de oxígeno y valores de pH superiores a 3.5, el Fe^{+2} se oxida a Fe^{3+} que precipita como $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ de muy baja solubilidad.

La solubilidad del hierro se puede ver favorecida por la presencia de materia orgánica, debido al incremento en las poblaciones microbianas que pueden consumir oxígeno en condiciones de anegamiento o descomponer la materia orgánica para liberar el hierro de los compuestos orgánicos. Una elevada concentración de materia orgánica o de partículas de arcilla. puede precipitar el hierro, debido a que el hierro en estado divalente se une con los materiales cargados negativamente, aumentando su adsorción y reduciendo su disponibilidad (Acevedo et al., 2004). En suelos arenosos con pH bajo, el ion divalente Fe^{2+} es lavado por las lluvias y el riego, lixiviándose y disminuyendo la concentración en la

rizósfera y superficie de las raíces de las plantas (Mengel et al., 2001). Según Cuenca, 2012, las bajas temperaturas reducen el crecimiento y desarrollo radicular, afectando la absorción de hierro. En un rango de temperatura entre 10 y 17°C se reduce la cantidad de hierro absorbido en dos o tres veces, por tanto la temperatura propicia para la absorción del Hierro está entre 30 y 37°C (Brindley et al., 1992). Los procesos REDOX intervienen en la solubilización de hierro, siendo procesos dependientes de sistema Eh-pH, del medio y del estado de oxidación de estos compuestos. En valores de pH 5, el potencial rédox favorece las formas ferrosas, mientras que a pH de 8 se genera un medio estable para favorecer la formas hierro férrico. Por estas razones, en suelos con pH alcalino, el problema de deficiencia de hierro se acentúa en las plantas generando principalmente síntomas a nivel foliar (Acevedo et al., 2004).

3.3. Síntomas de deficiencia por Hierro en las Plantas

Teniendo en cuenta la variedad de procesos fisiológicos en los cuales participa el hierro como: transporte de electrones, síntesis de clorofila para la fotosíntesis y respiración entre otros, la deficiencia de este elemento en las plantas, pueden generar graves inconvenientes. En la mayoría de cultivos los síntomas por deficiencia de hierro se manifiestan en hojas, cuya coloración ha perdido el verde natural, y sus tonos se han tornado a amarillo pálido, a excepción de las nervaduras que permanecen verde oscuras, manifestando la baja movilidad del hierro y su baja distribución (Giongo et al., 2010; Oliver et al., 2013). Este hecho, es debido a una disminución de la concentración de pigmentos fotosintéticos, fundamentalmente de clorofilas (Álvarez et al., 2004). La carencia de hierro afecta la formación de nuevos brotes, debido a que el tamaño de estos se reduce y son progresivamente menos vigorosos, sus entrenudos más cortos y sus hojas más pequeñas. La clorosis aguda, produce necrosis y provoca una defoliación prematura de los brotes y de los retoños que conlleva la muerte progresiva de los mismos, comenzando por su zona apical (Betoni et al., 1992). Ejemplos de la deficiencia aguda de hierro, ha sido documentada en cultivos de naranja, mandarina y aguacate, los cuales suelen ser de menor tamaño, con la piel suave, falta de color, pérdida de peso, pérdida de contenidos sólidos solubles del zumo (Razeto & Palacios, 2005; Incesu et al., 2015). Por tal razón se han implementado medidas para contrarrestar estas deficiencias, tanto con la inoculación de abonos o el aprovechamiento de metabolitos producidos por algunos organismos (Escobar et al., 2011).

3.4. Alternativas químicas reducir la deficiencia de hierro

Se han reportado alternativas químicas para contrarrestar la deficiencia de hierro en varios cultivos agrícolas. La metodología comúnmente utilizada para neutralizar la clorosis férrica consiste en la aplicación de enmiendas compuestas de quelatos férricos. La mayoría de fertilizantes a base de quelatos de hierro sintéticos tienen como principio activo compuestos basados en las moléculas Fe-EDDHA (etilendiamino-di-o-hidroxifenilacetato ferrato (III)), Fe-EDDHMA (etilendiamino-di-(o-hidroxi-p-metilfenilacetato ferrato(III)) y Ditihiadona que son las más eficaces en condiciones alcalinas, ya que es máxima su estabilidad en valores de pH entre 7 y 9 (Norvell, 1991). En un estudio realizado en plantas de arroz, Mojica en 1984 utilizó iones divalentes tamponado con HEDTA o DTPA con Ferrozina con el objetivo de amortiguar otros micronutrientes como Zn y Mn. Los resultados demostraron que las soluciones nutritivas tamponadas con DTPA no son adecuadas, pero la técnica de solución nutritiva tamponada con FZ / HEDTA puede usarse para evaluar la eficiencia del zinc. No obstante, los precios de los fertilizantes químicos no son asequibles y restringe su aplicación sólo para cultivos de gran impacto económico. Según Martínez 2012, España es el país europeo con mayor consumo de estos fertilizantes, con aproximadamente 3.000 toneladas por año y un costo de 26 millones de euros. Por otra parte, Mojica en 1984 reportó el uso de extractantes con ácidos fuertes, los cuales se utilizan para liberar una cantidad excesiva de micronutrientes o cationes como Zinc, Cobre, Manganeso y hierro de la fase sólida del suelo. Entre las soluciones extractoras ácidas más utilizadas están el Oxalato de amonio (pH 3,3), H_3PO_4 0,1 N, para extraer Mn^{+2} y para extraer los cuatro micronutrientes se utilizan acetato de amonio a pH 4,8 y HCl con una concentración de 0,1 N. El autor aclara que estas soluciones son adecuadas para suelos ácidos y no para suelos calcáreos o neutros. Para incrementar las fracciones solubles de Fe^{+2} también se puede atribuir la presencia de moléculas orgánicas que exhiben diversas capacidades para quelar el hierro (Lindsay, 1991), entre las que se encuentran los sideróforos.

3.5. Biofertilizantes

Los biofertilizantes también conocidos como bioinoculantes son preparaciones orgánicas que contienen microorganismos beneficiosos para la producción agrícola en términos nutricionales, particularmente en el mejoramiento de relación N:P:K (Wani et al., 2013). Se estima que el suelo alberga entre 10^4 y 10^9 UFC/g de suelo (Fuentes et al., 2017). Estos microorganismos que habitan en el suelo interactúan con las raíces de las plantas, estableciendo un ambiente propicio para llevar a cabo las actividades metabólicas. Los

biofertilizantes son una alternativa frente a los fertilizantes químicos pues utilizan los microorganismos nativos de suelos, con el propósito de incrementar la fertilidad y beneficio a las plantas. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), representan una amplia diversidad que incluye géneros de microorganismos como *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp. entre otros, los cuales tienen como base de la actividad promotora, la fijación del nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de hormonas (Auxinas, Citoquininas y Giberelinas), producción de agentes quelantes y antibióticos, y de esta manera mejorar la relación C:N (Escobar et al., 2011; Rueda et al., 2016; Wani et al., 2013). Estudios realizados por Wani y colaboradores en el año 2013, indican que el género *Azotobacter* sp. tiene la capacidad de fijar 10 mg de nitrógeno g⁻¹ en condiciones de laboratorio, añadiendo además que los biofertilizantes con base a este género son más baratos y ecológicos. *Azotobacter chroococcum* tiene gran significancia en la nutrición de las plantas y la contribución a la fertilidad de los suelos (Rivera et al., 2014) y además tiene un potencial biofertilizante que puede ser utilizado como alternativa a los fertilizantes nitrogenados usados convencionalmente (Obando et al., 2013). De otra parte, Rueda y colaboradores en el año 2016, afirman que las PGPR estimulan el crecimiento y el rendimiento de frutales como, manzanos, cerezos y duraznos y en el mismo estudio, reportan que el consorcio conformado por cepas de *Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp. tuvo una incidencia positiva en cultivos de fresas, debido a que se observó un incremento en el crecimiento de la planta, contenido de clorofila, peso fresco y seco de la raíz (Rueda et al., 2016). Cabe resaltar que aún no existe en el mercado un biofertilizante a base microorganismos productores de sideróforos.

3.6. Microorganismos capaces de producir sideróforos

Se ha reportado la actividad productora de sideróforos de tipo enterobactina y aerobactina en bacterias gram negativas como *E. coli* (Andrade et al., 2000) y corinebactina en *Corynebacterium glutamicum* (Bluhm et al., 2002). En *Pseudomonas* spp. se ha estudiado la producción de potentes agentes quelantes llamados pioverdina, dihidropioverdina (sideróforos fluorescentes) y pseudobactin y ferrobactin (sideróforos tipo hidroxamato) (Bultreys et al., 2001; McMorran, Shantha et al., 2001). *Mycobacterium* sp. y *Nocardia* sp., por su parte, producen dos tipos de sideróforos; unos de tipo intracelular (al parecer anclados a la membrana plasmática) y otros de tipo extracelular o exoquelinas que permiten la captación del hierro desde las distintas fuentes del hospedero (Aguado et al., 2012). En el caso de *Burkholderia cepacia*, los estudios realizados por caballero y colaboradores en

2007 evidencian la producción de sideróforos de tipo hidroxamato el alta concentración (Caballero et al., 2007).

3.7. Producción de sideróforos por *Azotobacter* sp.

Azotobacter vinelandii bajo condiciones de estrés y condiciones limitantes de hierro produce tres tipos de catecolato: Azotoquelina, Amiloquelina y Protoquelina (Huyer & Page, 1988). Estos sideróforos son excelentes quelantes a pH neutro. Además, diversos autores demuestran que la producción de sideróforos en *Azotobacter* sp. puede varias de acuerdo a la especie. Por ejemplo *Azotobacter vinelandii* produce principalmente sideróforos de tipo catecolato y fluorescentes (Ahmed et al., 2015; Baars et al., 2015; Fekete, 1983; Rubio et al., 2013), entre los que se reporta azotobactina D, el cual es un cromo-péptido compuesto por compuesto por glicina, ácido aspártico, dos grupos de serinas, tres homoserinas, y citrulina y azotobactina δ (Knosp et al., 1984; Baars et al., 2015). *A. chroococum*, produce sideróforos de tipo hidroxamato (Fekete et al., 1989; Rubio et al., 2013).

3.8. Sideróforos

Los sideróforos se describen como ligandos específicos a iones férricos de bajo peso molecular, capaces de influir sobre procesos geoquímicos que se llevan a cabo en la rizósfera. Su biosíntesis está regulada por el hierro y tiene como función la de suministrar el hierro a la célula permitiendo que, en condiciones de déficit de hierro, los microorganismos sintetizen moléculas que secuestren el hierro (en estado de ion ferroso), permitiendo su solubilización y transporte dentro de la célula por medio de un sistema de transporte de alta afinidad (Hofte, 1993; Baars et al., 2015; Tindale et al., 2003; Page, 1987). Zhang y colaboradores en 2015, definen los sideróforos como moléculas quelantes que cambian la valencia del hierro en el medio extracelular por afinidad de ligando naturales. En bacterias Gram negativas, este sistema de quelación está mediado por moléculas receptoras unidas en la membrana para obtener el hierro soluble (ion ferroso). En el caso de *A. vinelandii*, Zhang también afirma que los sideróforos se pueden unir a otros metales como el molibdeno y vanadio, necesarios para la actividad de la nitrogenasa.

De acuerdo con Hofte en 1993, la clasificación de los sideróforos se basa en la presencia y tipo de grupo quelante (ácidos hidroxámicos, fenoles, ácidos carboxílicos e hidroxilos). De forma general, las bacterias producen una mayor diversidad de moléculas quelantes, entre las que se encuentran: catecolatos, hidroxamatos y carboxilatos.

3.9. Biosíntesis de los sideróforos

La producción de sideróforos requiere de la síntesis de grupos ligando adecuados y la incorporación de un complejo molecular donde se acople el ion férrico. Para ello, la configuración electrónica o sitio de unión de los sideróforos es el octahedro, en donde cada uno de los cinco orbitales (3d) está ocupado por un electrón (figura 1). El enlace biosintético de los grupos ligando y un grupo espaciador (grupos alifáticos que aseguran la densidad electrónica en cada lado de la molécula) involucra la formación de enlaces amida o éster.

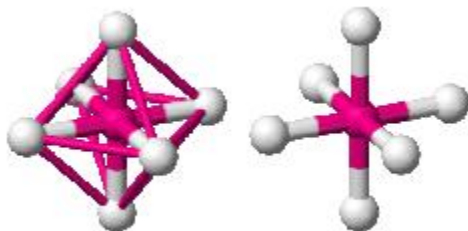


Figura 1. Estructura molecular del octahedro (Kurth et al., 2016).

El precursor más comúnmente usado en la biosíntesis de sideróforos de tipo catecol es 2,3-dihidroxibenzoatos (DHBA), molécula derivada del ácido corísmico a través de la vía del shikimato. La enzima isocorismato sintasa, cataliza una doble isomerización del grupo 4-hidroxilo y el producto de esta reacción sufre una escisión hidrolítica del enolpiruvilo, antes de que la enzima alcohol deshidrogenasa convierta el intermediario ciclohexadienona en el catecol más estable (Kurth et al., 2016).

Los sideróforos de tipo hidroxamatos, son sintetizados por la vía acilación de la ornitina o lisina por precursores formiato y acetato mesaconato en una reacción catalizada por monooxigenasas el grupo quelante del sideróforo es sintetizado mediante la hidroxilación del aspartato por acción de la enzima dioxigenasas o por la incorporación del ácido cítrico da la estructura (Kurth et al., 2016; Neilands, 1995; Raines et al., 2015).

3.10. Regulación génica de los sideróforos

Una proteína denominada Fur ha sido identificada en el proceso de regulación transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis, exportación e importación de sideróforos. El producto del gen *Fur* actúa como un represor clásico que requiere Fe^{2+} como activador. Cuando la concentración de hierro es alta, Fur forma un complejo con Fe^{2+} , en la región promotora, evitando la transcripción de estos genes. Bajo condiciones de deficiencia

de hierro, el ion ferroso (Fe^{2+}) es removido por la proteína Fur y los genes dependientes de Fur, son transcritos (Figura 2) (Sah & Singh, 2015).

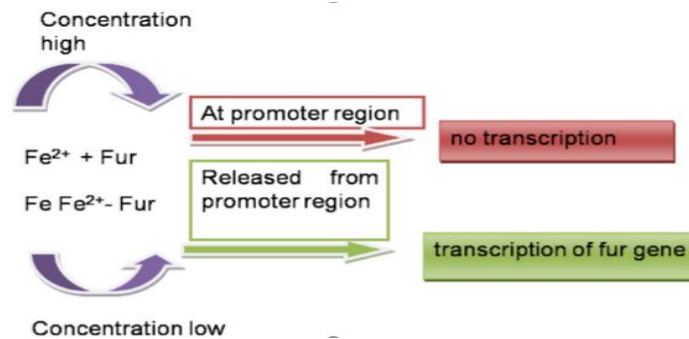


Figura 2. Regulación transcripcional de los genes involucrados con la síntesis de sideróforos (Sah & Singh, 2015).

3.11. Mecanismo de transporte del complejo sideróforo-Fe

El mecanismo de acción de los sideróforos en bacterias Gram negativas, se da gracias a que su membrana tiene la capacidad de permitir la difusión pasiva de pequeñas moléculas a través de proteínas integrales o porinas. Aquellas moléculas como la transferrina, lactoferrina, hemoglobina y los complejos Fe^{3+} -sideróforo, que exceden el tamaño del poro, necesitan receptores específicos externos de membrana para que se lleve a cabo la internalización al espacio periplásmico. Debido a que las bacterias Gram negativas carecen de un gradiente de iones o de ATP, necesitan de proteínas TonB, ExbB y Exb ligados a receptores, llamados proteínas de unión periplásmica (PBP) y un transportador membranal interno del tipo ABC (ATP-binding cassette proteins o proteínas de unión al casete de ATP) (Aguado et al., 2012; Menon et al., 2017).

3.12. Aplicación de los sideróforos

3.12.1. Sideróforos promotores de crecimiento en plantas

La literatura reporta que algunas especies de *Pseudomonas* sp. pueden mejorar el crecimiento de las plantas y el control de patógenos del suelo mediante la producción de sideróforos de tipo pseudobactina y pioverdina y la fijación biológica de nitrógeno, aumentando la actividad del complejo enzimático de la nitrogenasa, que es dependiente de la concentración de hierro, tal como ocurre en *Rhizobium* spp. (Neilands, 1995). En un estudio realizado por Maslha y colaboradores en 2000, donde se cultivaron plantas en condiciones estériles y no estériles en un suelo de marga, se observó que las plantas

cultivadas en condiciones no estériles crecieron adecuadamente, exhibiendo mayores concentraciones de hierro en las raíces en contraste con las plantas crecidas bajo condiciones axénicas. A través de este experimento, se logró evidenciar que la producción de sideróforos microbianos se suprimió totalmente cuando las plantas se cultivaron en condiciones axénicas (Masalha et al., 2000). En un estudio realizado con *Trichoderma asperellum* se encontró que los sideróforos producidos por el hongo, mejoraron el crecimiento del pepino (Saha et al., 2016). Finalmente, la aplicación de bioinoculantes sideroporógenos microbianos en semillas de cacahuete han evidenciado una mejora en la clorosis de hierro, una mejora en el crecimiento general y la salud de las plantas tras el tratamiento. (Sah & Singh, 2015).

3.12.2. Sideróforos con potencial en biocontrol.

Los sideróforos juegan un papel importante en los mecanismos de control biológico, debido a que tienen la capacidad de unirse al hierro, reduciendo la concentración de hierro biodisponible para los patógenos en las plantas. Según reporta Saha y colaboradores en 2016, Los sideróforos fluorescentes de tipo pioverdina producidos por *Pseudomonas* sp. están implicados en el control de la marchitez de la papa causada por *Fusarium oxysporum*. y en el control de *Gaeumannomyces graminis* que está asociado con una deficiencia de crecimiento de trigo y cebada. Por otra parte, Raines y colaboradores en el año 2015, reportan que, como parte de mecanismo de defensa, los microorganismos que producen sideróforos limitan la concentración de hierro en el hospedero, mediante la síntesis de proteínas de almacenamiento y transporte del hierro, como la ferritina y la transferrina, mecanismos que inhiben el crecimiento de organismos que compiten por el hierro.

3.13. Métodos para la detección y cuantificación de Sideróforos

El método más empleado para determinar de forma cualitativa los sideróforos fue propuesto por Neilands y Schwyn en 1987. Este método está basado en la competencia de hierro entre el complejo de hierro del indicador del tinte Chromo Azurol S (CAS) y el sideróforo producido por los microorganismos. El hierro es removido del CAS por el sideróforo, el cual tiene una alta afinidad aparente por el ion férrico. El resultado positivo produce un cambio de coloración del reactivo CAS, de una coloración azul a naranja que no depende de la estructura del sideróforo (Ames et al., 1989; Andrews et al., 2016; Lynne et al., 2011; Manninen et al., 1994; Milagres et al., 1999; Neilands, 1984; Payne, 1994; Schwyn & Neilands, 1987). La siguiente ecuación explica la reacción de reducción.

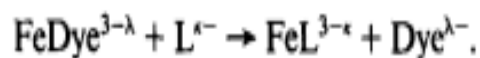


Figura 3. Ecuación que explica la reacción entre el sideróforo y el complejo formado por el colorante (Schwyn & Neilands, 1987)

3.13.1 Métodos de detección cuantitativa

3.13.1.1 Test de perclorato férrico

Mediante este ensayo se pueden detectar hidroxamatos u otros sideróforos capaces de formar complejos de hierro estables a pH bajo con perclorato férrico en ácido perclórico: los catecoles generalmente no reaccionan en este ensayo ya que el hierro se disocia de estos compuestos a pH bajo (Payne, 1994).

3.13.1.2 Test de Csáky

El ensayo Csáky también se usa para detectar hidroxamatos. Es más sensible que el ensayo de perclorato férrico, pero es más cualitativo que cuantitativo. El ensayo detecta la presencia de hidroxamatos secundarios y depende de la oxidación a nitrito y la formación de un complejo coloreado a través del acoplamiento de diazonio (Payne, 1994).

3.13.1.3 Test de Arnow

En este ensayo, la reacción se evidencia debido a que el grupo funcional de estos sideróforos (3,4- dihidroxifenilalanina) genera un color amarillo al entrar en contacto con el ácido clorhídrico, que se torna rojo con el exceso de hidróxido de sodio. Por otro lado, el reactivo molibdato/nitrito previene la descomposición rápida del ácido, otorgándole mayor estabilidad a la reacción e incrementando en un 15% la reacción colorimétrica, permitiendo la identificación de la molécula. Posteriormente la molécula se cuantifica por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 515 nm. (Arnow, 1937).

3.13.1.4 Test de Atkin

Esta prueba se emplea en la actualidad para la identificación colorimétrica y la posterior cuantificación de los sideróforos de hidroxamato. Una reacción se considera positiva cuando se presenta una coloración rojiza, producto de la reacción entre el perclorato de hierro y los ácidos hidroxámicos. La molécula se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 480 nm. Este ensayo no permite diferenciar el complejo sideróforo-ión

férrico (Atkin et al., 1970).

3.13.1.5 Test de sales de tetrazolio

Este test está basado en la capacidad de los ácidos hidroxámicos para reducir las sales de tetrazolio por medio de hidrólisis del grupo hidroxamato usando un compuesto alcalino fuerte como el NaOH (Raval & Desai, 2015)

3.13.1.6 Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de ionización por electrospray (HR-LC-MS) es un método que combina el poder de la separación de materiales de gran peso y mediano peso molecular del HPLC y la capacidad de detección selectiva y confirmación de la identidad molecular del espectrómetro de masas, permitiendo la separación y la ionización del analito mediante un chorro de gas que son generados por un electrospray disolviendo el producto de la cromatografía en gotas cargadas o ionizadas que previamente pueden ser identificadas en un espectrómetro de masas. Baars y colaboradores en el año 2015 utilizaron esta técnica para la cuantificación de sideróforos en cepas de *Azotobacter vinelandii*, encontrado que la mayoría de sideróforos producidos son de tipo catecolato de los subgrupos. Aminoquelinas, protoquelinas y azotobactina D.

3.13.1.6 Cromatografía de capa fina (TLC)

Técnica analítica rápida y sencilla, utilizada para determinar el grado de pureza de un compuesto e identificar compuestos según su polaridad. Está constituida por un compuesto adsorbente (fase estacionaria) como sílica Gel, la alúmina (Al_2O_3) y la poliamida, y un eluyente (fase móvil). La fase estacionaria más utilizada es la sílica gel, debido a que es un compuesto polar utilizado para separar sustancias polares como alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos (Wang & Yuan, 2006).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

-Determinar la producción de sideróforos por cepas de *Azotobacter* spp. aisladas de suelos de cultivos hortícolas del altiplano Cundiboyacense.

4.2. Objetivos Específicos

-Seleccionar las cepas de *Azotobacter* sp. con mayor producción de sideróforos.

-Determinar la temperatura óptima de producción de sideróforos de las cepas seleccionadas.

-Identificar y cuantificar los diferentes tipos de sideróforos producidos por las cepas de *Azotobacter* sp. seleccionadas.

5. METODOLOGÍA

5.1. Elaboración del Banco de trabajo

En este trabajo se emplearon 24 cepas de *Azotobacter* sp aisladas de cultivos hortícolas del Altiplano Cundiboyacense por Jiménez en 2007 (Anexo1), conservadas en glicerol al 30% a -70°C. Las cepas fueron reactivadas en caldo BHI durante toda la noche a 150 rpm y 28°C en un agitador de órbita circular Thermo Fisher Scientific. Posteriormente se adicionó 1,5 mL de glicerol hasta una concentración final del 30% y se conservaron a -20°C para los ensayos posteriores.

5.2. Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos en Medio selectivo y diferencial CAS.

Con el fin de evaluar la producción de sideróforos por el método de difusión en agar, las cepas se reactivaron en agar nutritivo (Anexo 2) a 28°C durante 24 horas y en caldo Burk´s (Kraepiel & Morel, 2009)(Anexo 2) a 28°C durante 60 horas a 120 rpm. Como control positivo se utilizó la cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518 y como control absoluto del ensayo se empleó medio de cultivo. La concentración del inóculo se determinó mediante la absorbancia a 540 nm, ajustando una densidad óptica de 0,2 equivalente a una

concentración inicial de 10^8 células/ml.

La preparación del medio CAS se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lynne y & Louden en 2011). Para tal fin, se prepararon tres soluciones. La solución I contiene Cromo azurol sulfonato (CAS); $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y HDTMA (Hexa-Decil Trimetil Bromuro de Amonio). La solución II corresponde a una solución de sales que contiene KH_2PO_4 ; NH_4Cl y NaCl con pH 6,8 ajustado con NaOH 5N y la solución III contiene glucosa 1M (Anexo 2). Para preparar 1L de medio CAS se mezcló: 100 ml de solución II, 16 ml de solución III, 100 ml de la solución I y 15 g de agar agar. El volumen final fue ajustado con agua destilada esterilizada. El medio fue esterilizado a 15 lb de presión, 121°C durante 15 minutos y servido en cajas de petrí. Una vez solidificado el medio, fueron colocados 3 pitillos por caja. Para realizar la prueba de difusión en agar, se inocularon 20 μL de cada cepa por triplicado y las cajas fueron incubadas a 28°C durante 72 h. Como control absoluto del ensayo se empleó el medio CAS sin inóculo y como control positivo se utilizó la cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518. La producción de sideróforos se evidenció mediante observación de un halo amarillo, naranja o violeta alrededor de la colonia bacteriana. Se seleccionaron las cepas que presentaron un halo de solubilización mayor a 5 mm, (Pontes et al.,2015).

5.3. Evaluación cualitativa en CAS a diferentes temperaturas

Para evidenciar la incidencia de la temperatura en la producción de sideróforos en 9 cepas seleccionadas, se siguió el procedimiento descrito en 4.2. Las temperaturas de incubación utilizadas fueron 25°C , 35°C y 45°C (Kumar et al., 2016). Como en el caso anterior, la producción de sideróforos se evidenció mediante observación de halo de solubilización.

5.4. Cuantificación de sideróforos de tipo catecolato mediante el test de Arnow

Para cuantificar los sideróforos de tipo catecolato, se siguió el protocolo propuesto por Arnow en 1937. Para esto, 9 ml de caldo Burk's (Anexo 2) fueron inoculados con 1ml de cultivo iniciador de cada cepa, empleando las condiciones de incubación descritas en 4.2. Posteriormente se tomó 1ml de cultivo cada 6 horas entre las horas 48 y 72 (Storey & Chakraborty, 2005) y a cada muestra se adicionó 0,1 ml de ácido clorhídrico (5N), 0,5 ml del reactivo molibdato de sodio/nitrito de sodio y 0,1 ml de NaOH (10N). El registro de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 515 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV. Como blanco se empleó la solución que contiene todos los reactivos del test. (Haydon et al., 1973).

5.5. Determinación cualitativa de hidroxamatos mediante Test de Sales de Tetrazolio

Para la determinación de sideróforos de tipo hidroxamato, se siguió el protocolo propuesto por Raval y colaboradores en 2015. Para esto, 9 ml de caldo Burk's (Anexo 2) fueron inoculados con 1ml de cultivo iniciador de cada cepa. Las condiciones de incubación corresponden a las descritas en 4.2. Posteriormente se tomó 0,1 ml de cultivo cada 6 horas entre las horas 48 y 72 al cual se adicionó 1 mg de cloruro de trifeniltriazolio y 1 o 2 gotas de NaOH (2N). La formación de un complejo de color rojo, indica la presencia de sideróforos de tipo hidroxamato.

5.6. Cuantificación de sideróforos de tipo hidroxamato mediante el Test de Atkin

Para cuantificar los sideróforos de tipo hidroxamato, se siguió el protocolo propuesto por Atkin y colaboradores en 1979. Para esto, 9 ml de caldo Burk's (Anexo 2) fueron inoculados con 1ml de cultivo iniciador de cada cepa. Las condiciones de incubación corresponden a las descritas en 4.2. Cada 6 horas, desde la hora 48 hasta la 72, se tomó 1 ml de cultivo al cual se agregó 1 ml de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (0,005M) en HClO_4 (0,14M). El registro de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 480 nm (Atkin et al., 1979) en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV. Como blanco la solución que contiene todos los reactivos del test.

5.7. Detección de Sideróforos por Cromatografía de Capa Fina (TLC)

5.7.1. Estandarización de la técnica

Para la estandarización de la TLC se utilizaron placas de Sílica Gel de 4x8 cm. Se emplearon patrones de Desferoxamina (hidroxamato) a una concentración de 10mg/ml y Catecol a una concentración de 2%. Se evaluaron tres fases móviles con diferente polaridad, con el objetivo de determinar la polaridad de los sideróforos con respecto a la fase móvil y poder separarlos. La fase móvil con mayor polaridad corresponde a una mezcla de butanol: ácido acético: agua (3,5:0,5:1) (Xie et al., 2006). Considerando que con esta fase no se obtuvo un buen resultado, se evaluó una fase menos polar compuesta por Butanol: Tolueno: Ácido acético (2:2:1). En este caso el resultado no fue el esperado por lo que se utilizó finalmente una fase móvil que contiene una mezcla de hexano: acetato de etilo (6:4). Las placas fueron reveladas con: 1) solución empleada en el test de Arnow (1%), 2) Cloruro férrico (1%) (Storey & Chakraborty, 2005); 3) Perclorato férrico (1%), 4) Sales de Tetrazolio (1%) y 5) CAS (1%) (Wang, & Yuan, 2006).

5.7.2. Extracción y detección de Sideróforos usando Cromatografía de Capa Fina (TLC).

Para determinar los Sideróforos mediante Cromatografía de Capa Fina, inicialmente se realizaron inóculos de cada una de las cepas en 10 ml de caldo Burk's y con las condiciones mencionadas en 4.2. Con el fin de extraer los sideróforos, el cultivo celular se centrifugó a 7000 rpm por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado y el pH fue ajustado a 1,5 con HCl 0,5M. Los sideróforos fueron extraídos tres veces con 1 volumen de acetato de etilo. Las fases acuosa y orgánica fueron separadas por agitación fuerte (vórtex) durante 3 minutos, y el Acetato de etilo fue evaporado en un rotavapor a 40°C y 240 psi (Xie et al., 2006). Una vez obtenida la solución concentrada de sideróforos, se resuspendió con 1 ml de acetato de etilo y se sembraron sobre placas de Sílica Gel de 10x20, dejando secar las muestras por 2 minutos. Posteriormente las placas se colocaron en una cámara cromatográfica con 50 ml de la fase móvil compuesta por Hexano: Acetato de etilo (35:15) por 45 minutos hasta alcanzar la parte superior de la placa. Las placas se dejaron secar por 15 minutos y fueron reveladas con FeCl_3 0,1 M en HCl 0,1N para detección de sideróforos de tipo Catecolatos e Hidroxamatos, y solución de Arnow para la detección de sideróforos de tipo Catecol. Finalmente se calculó el R_f mediante la fórmula reportada por Memon y colaboradores en el año 2005 (Anexo 4).

5.8. Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias en la producción de sideróforos en las tres temperaturas y la producción de catecolatos e hidroxamatos (test de Arnow y Atkins), se utilizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Post Hoc de Tukey. El valor de confianza se ajustó al 95%.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación del banco de trabajo

Las 24 cepas de *Azotobacter* sp. se reactivaron en agar nutritivo por 72 h a 28°C, obteniendo colonias de color crema, pequeñas, medianas, brillantes y con pigmentaciones amarillas o verde claro. Las características macroscópicas se presentan en la tabla 1. La verificación de la pureza se realizó en 7 cepas seleccionadas al azar (CT, C2E, C5T, C4CA, C5CO, C4E y C1BR) observando las características microscópicas típicas de especies de

Azotobacter sp como, Bacilos Gram negativos con forma convexa, agregadas en cadenas y presencia de quistes. (Martínez & Montaña, 2009) (tabla 2).

Tabla 1. Caracterización macroscópica de las 24 cepas de *Azotobacter* sp.

Cepas	Morfología de la colonia	Pigmentación
C2E	Color crema, medianas e irregulares.	Sin pigmentación
C4BR	Color crema brillantes, pequeñas e irregulares.	Amarilla
CT	Color crema, brillantes y pequeñas	Sin pigmentación
C4CA	Color crema, brillantes y medianas.	Sin pigmentación
C5CO	Color crema, brillantes y medianas.	Sin pigmentación
C2Z	Color crema, brillantes y medianas.	Verde-Amarillo
C1E	Color crema, pequeñas y brillantes.	Verde-Amarillo
C2BR	Translúcidas, brillantes y pequeñas.	Sin pigmentación
C5T	Color crema, mediana, brillantes e irregulares.	Sin pigmentación
C1CO	Color crema, medianas, brillantes e irregulares.	Sin pigmentación
C5BR	Color crema, brillantes y medianas.	Sin pigmentación
C1BR	Color crema, brillantes, medianas e irregulares.	Sin pigmentación
C3CA	Color crema, medianas, brillantes e irregulares.	Amarilla
C3BR	Color crema, medianas, brillantes e irregulares.	Sin pigmentación
C3T	Color crema, pequeñas, brillantes e irregulares	Amarilla
C3E	Color crema, mediana, brillantes e irregulares.	Sin pigmentación
C5CA	Color crema, mediana, brillantes e irregulares.	Sin pigmentación
C5E	Color crema, mediana, brillantes e irregulares.	Amarilla
C2T	Colonias crema, medianas y brillantes.	Amarilla
C1T	Color crema, mediana y brillantes.	Amarilla
C4E	Color crema, mediana, brillantes e irregulares.	Sin pigmentación
C1Z	Color crema, mediana y brillantes.	Verde-Amarillo
C1CA	Color crema, mediana, brillantes e irregulares.	Sin pigmentación
C4CO	Color crema, mediana, brillantes e irregulares.	Sin pigmentación

Tabla 2. Caracterización morfológica de las cepas CT, C2E, C5T, C4CA, C5CO, C4E y C1BR a las 72 horas en medio nutritivo.

Cepas	Morfología celular
C1BR	Bacilos Gram negativos convexos con formación de cadenas.
CT	Bacilos Gram negativos convexos con formación de cadenas y quistes.
C2E	Bacilos Gram negativos convexos con formación de cadenas y quistes.
C5T	Bacilos Gram negativos convexos con formación de cadenas.
C4CA	Bacilos Gram negativos convexos con formación de cadenas y quistes.
C5CO	Bacilos Gram negativos convexos con formación de cadenas y quistes.
C4E	Bacilos Gram negativos convexos con formación de cadenas.

6.2. Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos en Medio selectivo y diferencial CAS.

Después del primer *screening* de las 24 cepas en medio CAS (Anexo 3), se seleccionaron 9 cepas (Anexo 3) por presentar un halo de solubilización de color amarillo mayor a 5 mm (Figura 4). Como control positivo del ensayo se empleó la cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518 y como control negativo absoluto, el medio de cultivo.

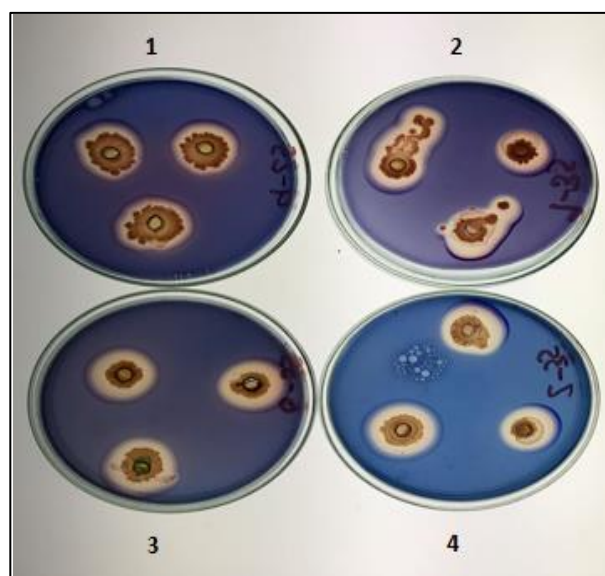


Figura 4. Actividad de solubilización de hierro en medio selectivo y diferencial CAS a 28°C y 5 días de incubación. El halo de color amarillo alrededor de la colonia indica la producción de sideróforos. 1. C5T 2. C3CA. 3. C2BR. 4. C4BR.

Con el fin de determinar la temperatura en la que se produce mayor actividad de solubilización se evaluaron tres temperaturas 25°C, 35°C y 45°C. Los resultados obtenidos permitieron determinar que la mayor producción de sideróforos se presenta a 25°C en 7 de las 9 cepas (C3CA, C2BR, C4E, C1Z, C4BR, C5E y C5T) con un promedio de tamaño de halo de 5,56 mm. Cabe resaltar que la cepa C4BR presentó un tamaño de halo de 8 mm. La prueba de Dunnett arrojó un valor $p > 1,0$ lo que significa que no hay diferencias significativas entre el control y las 7 cepas. A medida que la temperatura aumenta, se evidenció una disminución en el tamaño del halo en todas las cepas. A 35°C el promedio de tamaño de halo fue de 4,07 mm, siendo la cepa C4BR la que presentó el mayor tamaño (5 mm). Sin embargo, en esta cepa se observó una disminución del halo de solubilización en un 37,5% respecto al valor obtenido a 25°C. Con respecto a las cepas C3CA, C5E, C5T y C1Z se observó una disminución del halo de solubilización de 6,6%, 23,6%, 6,6% y 47% respectivamente. Por otro lado, las cepas C5CO y C2Z no presentaron variación en el tamaño del halo de solubilización entre 25°C y 35°C con valores de 3,67 mm y 4,33 mm respectivamente. Para las cepas C3CA y C5T se presentaron diferencias significativas en cuanto al tamaño del halo, respecto al control $P= 0,036$. Finalmente, 45 °C se observó que el 55,6 % de las cepas no presentaron halos de solubilización. El promedio de tamaño de los halos de solubilización obtenido en este caso fue de 0,81 mm. En síntesis, las cepas que produjeron sideróforos a las tres temperaturas fueron C3CA y C5T (Figura 5).

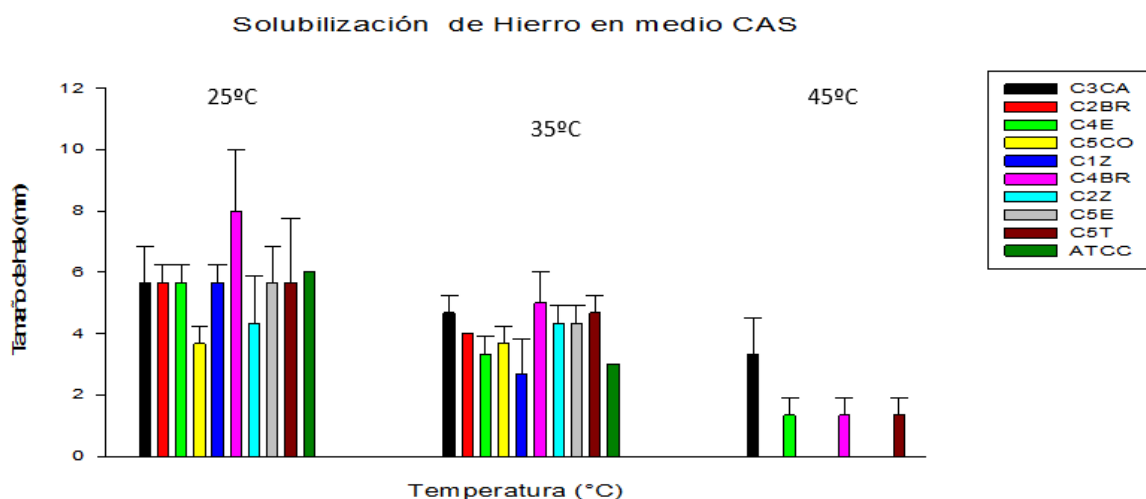


Figura 5. Actividad de solubilización de hierro de las cepas C3CA, C2BR, C4E, C5CO, C1Z, C4BR, C2Z, C5E, C5T y ATCC a temperaturas de 25°C, 35°C y 45°C, en prueba semi-cuantitativa (difusión en placa). Halos de solubilización en mm.

6.3. Cuantificación de sideróforos de tipo catecolatos (Test de Arnow)

El objetivo de este ensayo fue determinar la concentración de sideróforos de tipo catecolatos en función del tiempo en las 9 cepas seleccionadas. La evaluación se llevó a las 48, 54, 60, 66 y 72 horas de cultivo. Con base en los resultados obtenidos, se puede evidenciar que no hay un comportamiento homogéneo respecto a la producción de catecolatos (Figura 6). Las cepas C1Z, C2Z y C5T por ejemplo, alcanzaron una mayor producción de catecolatos a las 72h de cultivo con valores de 20,3 µg/ml, 25,06 µg/ml y 22,25 µg/ml respectivamente, mientras que las cepas C3CA, C2BR, C4E, C5CO, C4BR y C5E presentaron la mayor producción de catecolatos a las 60h de cultivo con valores de 5,31 µg/ml, 8,9 µg/ml, 11,5 µg/ml, 15,70 µg/ml, 5,73 µg/ml y 4,5 µg/ml respectivamente.

Al relacionar la producción de catecolatos con la cinética de crecimiento de las cepas nativas de *Azotobacter* C3CA, C2BR, C4E, C5CO, C4BR y C5E, se observó que los valores más altos del metabolito se producen entre las 60 y 72h cuando la mayoría de las cepas se encuentran en fase exponencial de crecimiento. El análisis ANOVA mostró diferencias significativas $P=0,000$ entre los tiempos de muestreo, mientras que la prueba de Tukey mostró que no hay diferencia significativa $P \geq 0,092$ a la hora 60 entre las cepas C1Z, C2Z y C5T con respecto a las cepas C5E, C2BR, C4BR, y C3CA. Por último, a la hora 72 el valor de significancia fue $P = 1,0$. (Anexo 5).

6.4. Cuantificación de sideróforos de tipo hidroxamatos (Test de Atkin)

El objetivo de este ensayo fue determinar la concentración de sideróforos de tipo hidroxamatos en función del tiempo en las 9 cepas evaluadas empleando el método propuesto por Atkin y colaboradores en 1970. Observando los resultados se puede afirmar, como en el caso anterior, que no hay un comportamiento homogéneo en cuanto a la producción de hidroxamatos en los 5 tiempos evaluados (Figura 7). Para las cepas C4E y C5CO se observó un incremento en la producción de hidroxamatos en función del tiempo de cultivo, obteniéndose la mayor producción a la hora 66 con concentraciones de 45,8 µg/ml y 87,2 µg/ml respectivamente.

Producción de Sideróforos de tipo Catecolato

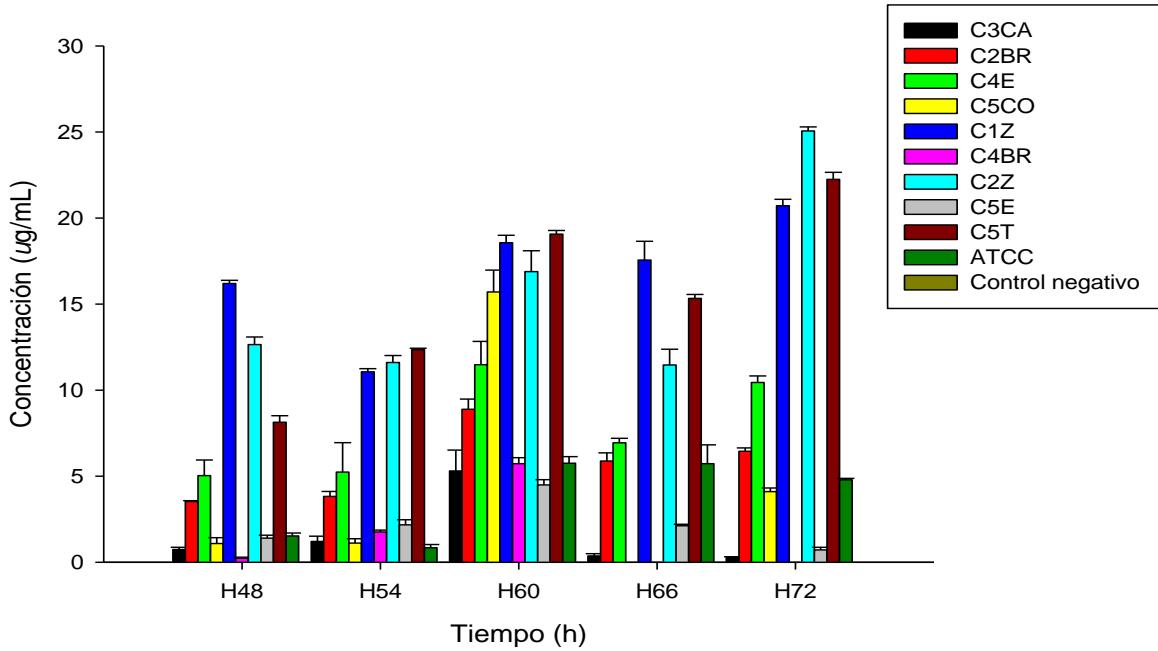


Figura 6. Producción de sideróforos de tipo catecolatos de las cepas descritas en el recuadro de la figura reportadas en (µg/ml) respecto al tiempo.

Producción de Sideróforos de tipo Hidroxamato

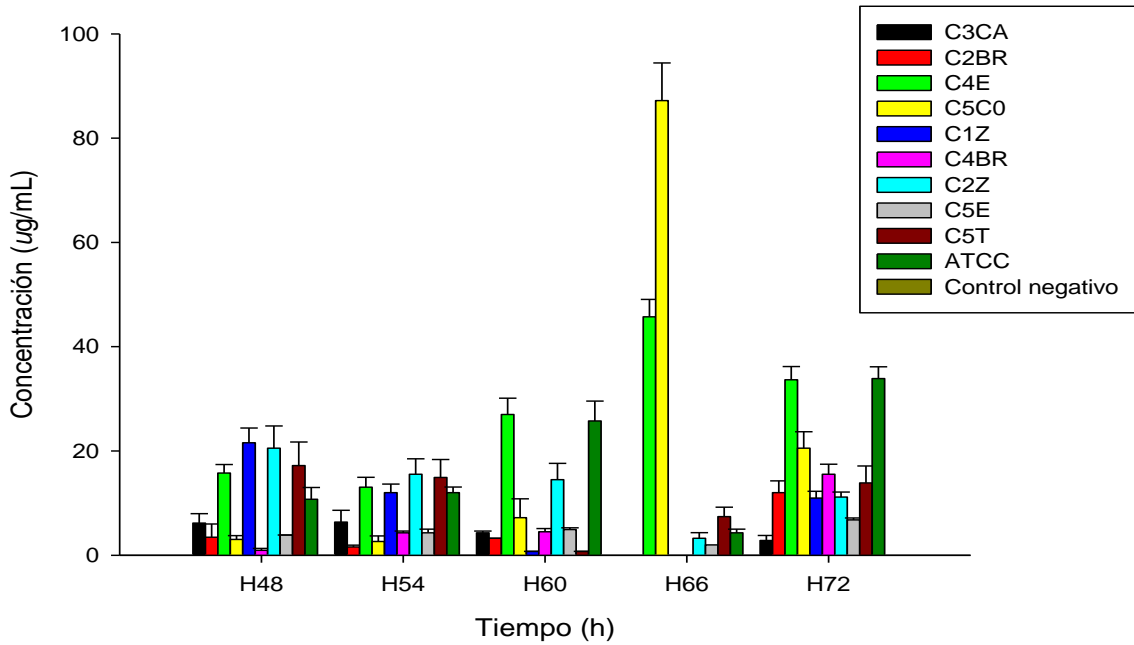


Figura 7. Producción de sideróforos de tipo hidroxamato de las cepas descritas en el recuadro de la figura reportadas en (µg/ml) respecto al tiempo.

Por otro lado, las cepas C2BR y C4BR presentaron la mayor producción de hidroxamatos a la 72h de cultivo, con concentraciones de 12µg/ml y 15,4µg/ml respectivamente. El análisis ANOVA mostró diferencias significativas $P=0,000$ entre los tiempos de muestreo, y se observó a la hora 66 una diferencia significativa $P=0,000$ entre la producción de hidroxamatos entre la cepa C4E y cepa C5CO.

6.4.1 Evaluación cualitativa de sideróforos de tipo hidroxamato (Test de Sales de Tetrazolio)

Esta prueba se basa en la capacidad de los ácidos hidroxámicos para reducir las sales de tetrazolio por medio de hidrólisis del grupo hidroxamato usando un compuesto alcalino fuerte. Esta prueba cualitativa confirma la presencia de sideróforos con ácidos hidroxámicos, mediante la formación de una coloración rojiza. La evaluación se realizó en los mismos tiempos que en los ensayos anteriores, tomando como control positivo la cepa ATCC y como control negativo absoluto sales de tetrazolio, NaOH (2N) y medio Burk's. Los resultados obtenidos muestran la presencia de sideróforos en el 70% de las cepas (Tabla 3).

Tabla 3. Presencia de hidroxamatos en función del tiempo en 9 cepas de *Azotobacter* seleccionadas

Cepa/Hora	Hora 48	Hora 54	Hora 60	Hora 66	Hora 72
C3CA	xxx	xxx	xx	xxx	xxxx
C2BR	xx	x	⊖	⊖	⊖
C4E	xxx	xx	xx	xxx	xxx
C5CO	x	⊖	x	x	xx
C1Z	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
C4BR	x	x	x	x	x
C2Z	xx	xxx	xxx	xxx	xxx
C5E	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
C5T	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
ATCC	xxx	xxx	xx	xxx	xxx
Control	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Negativo					

XXX: Coloración rojo intenso **XX:** Coloración rojo neutro **X:** Coloración rojo pálido **⊖:** No hubo coloración

6.5. Detección de Sideróforos por Cromatografía de Capa Fina

6.5.1. Estandarización de la técnica

Con el fin de determinar el tipo de sideróforo producido por las 9 cepas de *Azotobacter* sp. seleccionadas mediante cromatografía de capa fina, inicialmente se realizaron algunos ensayos para determinar la fase móvil y los reveladores apropiados para la determinación de los sideróforos de tipo hidroxamatos y catecolatos. Con la fase móvil Butanol: Ácido acético: dH₂O (3,5:0,5:1) y con el revelador cloruro férrico, se determinó que los compuestos presentaban una alta polaridad con base en el R_f obtenido, que en este caso fue mayor para los catecolatos que para los hidroxamatos (figura 8). Con respecto al revelador, se encontró que la solución de FeCl₃ 0,1 M en HCl 0,1N y la solución empleada en el test de Arnow, tenían una mayor sensibilidad para detectar ácidos hidroxámicos. Para los patrones Desferoxamina y catecol, revelados con FeCl₃ 0,1 M en HCl 0,1N y Perclorato férrico (1%), se obtuvo un color marrón y verde-grisáceo respectivamente. Por otro lado, se obtuvo un color amarillo para el patrón de catecol al ser revelado con Sales de Tetrazolio (1%) y solución de Arnow (Figuras 8C y 8D). El patrón de Hidroxamato no reveló con la solución de sales de Arnow debido a que es una solución específica para sideróforos de tipo catecolato.

Las placas cromatográficas sometidas a una fase móvil compuestas con Butanol: Tolueno: Ácido acético (2:2:1) y con el patrón de ácidos carboxílicos, revelado con solución de Arnow, permitió evidenciar que los compuestos no fueron separados debido a su baja polaridad (Figura 9A).

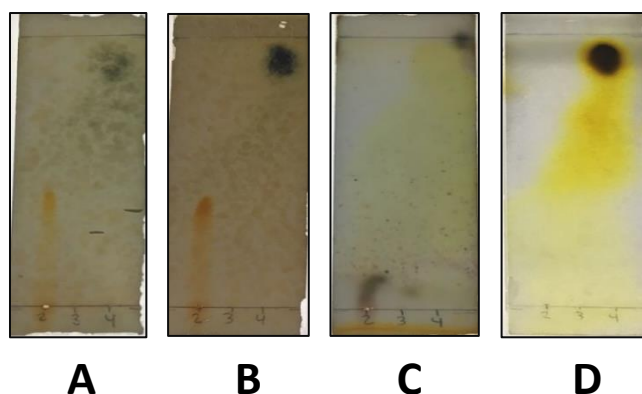


Figura 8. Cromatografía de capa fina en placa de Sílica Gel con los patrones Desferoxamina y Catecol con una fase móvil compuesta de Butanol: Ácido acético: dH₂O **A.** Placa revelada con FeCl₃ 0,1 M en HCl 0,1N **B.** Placa revelada con perclorato férrico (1%) **C.** Placa revelada con sales de tetrazolio (1%) **D.** Placa revelada con solución de Arnow.

Por último, se evidenció que la fase móvil compuesta por Hexano: Acetato de etilo (35:15) fue la que presentó mejor separación de los ácidos carboxílicos. Debido a su baja polaridad, permitió que los compuestos se movilaran según lo esperado. En este caso, se realizó el revelado con solución de Arnow, por lo que se observa un patrón claro para el catecol (figura 9B). Además, la solución de Arnow presentó mayor sensibilidad para detectar fenoles, por lo que se escogió como revelador para la determinación de los sideróforos.

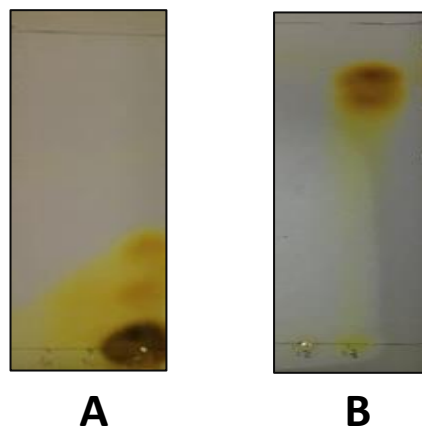


Figura 9. Cromatografía de capa fina en placa de Sílica Gel con el patrón de Catecol A. fase móvil compuesta por Butanol: Tolueno: Ácido acético (2:2:1) revelada con solución de Arnow y B fase móvil compuesta por Hexano: Acetato de etilo (35:15) revelada con solución de Arnow

6.5.2. Extracción y detección de Sideróforos usando (TLC)

Se determinó que la fase móvil compuesta por Hexano: Acetato de etilo presentaba mejor movilización y separación de los compuestos, y que la solución de Arnow presentó la mayor sensibilidad. Por tanto, se corrió la cromatografía en placa sílica G, obteniendo resultados positivos los cuales se pueden evidenciar en la figura 10. El resultado evidencia que todas las 9 cepas evaluadas producían sideróforos de tipo catecolatos, debido a que al momento de revelar la solución de Arnow presentó una coloración amarilla en la parte superior de la placa cromatográfica, teniendo una movilización similar al patrón utilizado para catecoles.

Por otro lado, se realizó una réplica en la que se puede observar que hay 4 tipos de catecolatos producidos por las cepas 8, 7, 5 y 4, debido a que presentaron una mayor polaridad con los solventes, por lo cual se presentaron en la parte superior al punto de siembra. Estos resultados se pueden evidenciar en la figura 11.

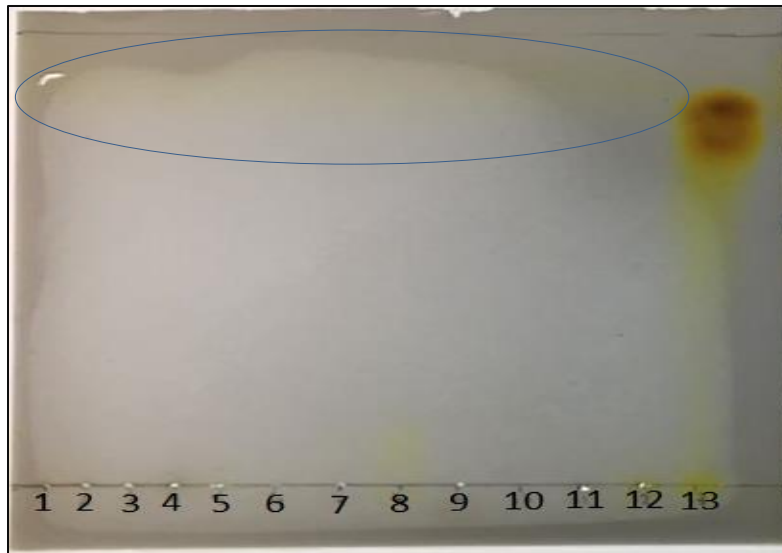


Figura 10. Cromatografía de capa fina en placa de Sílica Gel, con el patrón de Catecol y con una fase móvil compuesta por Hexano: Acetato de etilo revelada con solución de Arnow. Se observa la presencia de sideróforos de tipo Catecolatos en las 9 cepas evaluadas, mediante la producción de una mancha amarilla en la parte superior de la placa. 12) patrón desferal. 13) patrón catecol

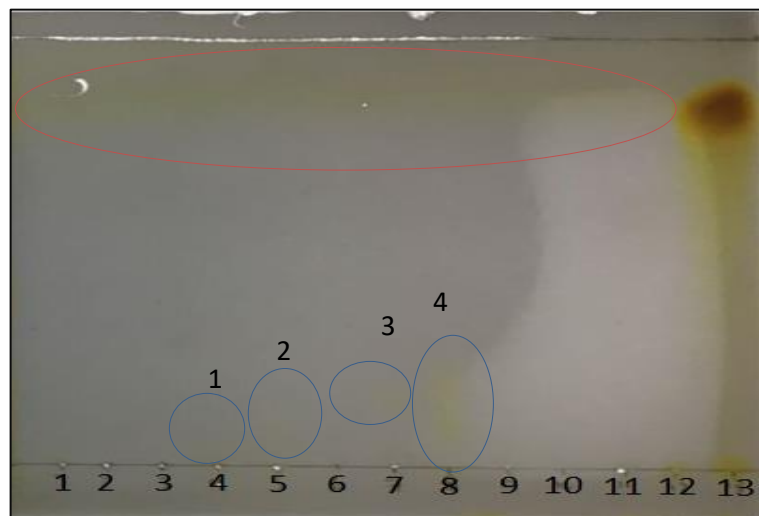


Figura 11. Cromatografía de capa fina en placa de Sílica Gel, con el patrón de Catecol y con una fase móvil compuesta por Hexano: Acetato de etilo revelada con solución de Arnow. Se observa la presencia de sideróforos de tipo Catecolatos en las 9 cepas evaluadas, mediante la producción de una mancha amarilla en la parte superior de la placa. 1) Catecol producido por la cepa 4. 2) Catecol producido por la cepa 5. 3) Catecol producido por la cepa 7. 4) Catecol producido por la cepa 8.

Posteriormente se calculó los R_f de los corridos de todas las cepas (círculo rojo), el control de catecol, y los corridos que se evidencian en la figura 11 de las cepas 4, 5, 7 y 8 (Tabla 4)

Tabla 4. Identificación de sideróforos de tipo catecolatos.

Cepa	Valor de Rf
Patrón de catecol	0,80
Círculo Rojo	0,81
Banda 1	0,088
Banda 2	0,1
Banda 3	0,2
Banda 4	0,26

7. DISCUSIÓN

Los sideróforos son moléculas quelantes de bajo peso molecular, sintetizados por microorganismos que compiten por el ion férrico en complejos de hidróxido férricos. Estas moléculas están asociadas con la promoción de crecimiento vegetal, actividad de bio-control y remoción de contaminantes. Los microorganismos productores de sideróforos, hacen parte del grupo de PGPRs, los cuales son indispensables para las plantas, debido a que estimulan su crecimiento a través de la proliferación de pelos radicales y el incremento en la absorción de nutrientes (Wani et al., 2013). En este trabajo se evaluó la producción de sideróforos a partir de cepas nativas de *Azotobacter* sp. aisladas de cultivos hortícolas del Altiplano-Cundiboyacense.

Azotobacter spp ha sido descrito como bacilo gram negativos convexo y con formación de quistes (Huyer & Page, 1988; Rubio, 2003; Rueda et al., 2016), que crece fácilmente en medios enriquecidos con manitol o sacarosa, donde forma colonias cremosas, medianas o pequeñas e irregulares y en algunos casos con formación de pigmentos. Las cepas evaluadas en este trabajo presentaron las características típicas de *Azotobacter* motivo por el cual se puede afirmar que se encuentran libres de contaminación (Borda et al., 2009). Adicionalmente, en un estudio realizado por Jiménez y colaboradores en 2007, relacionado con análisis de restricción del gen ARNr 16S, se pudo determinar que 8 cepas corresponden a *Azotobacter* sp, 3 cepas fueron identificadas como *Azotobacter chroococcum*, 6 cepas identificadas como *Azotobacter nigricans*, 1 cepa identificada como *Azotobacter paspali* y 7 cepas identificadas como *Azotobacter vinelandii*.

7.1. Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos en medio selectivo y diferencial CAS.

La selección de las cepas con alta actividad de solubilización de hierro se realizó de acuerdo con Díaz, 2009 quien afirma, que las cepas con tamaño de halo mayor a 5 mm son cepas con alta actividad de solubilización. En este trabajo 9 de las 24 cepas fueron seleccionadas con base en este criterio (C3CA, C2BR, C4E, C5CO, C1Z, C4BR, C2Z, C5E y C5T) que incluyen: *Azotobacter chroococcum*, *A. nigricans*, *A. paspali* y *Azotobacter* sp. En un estudio realizado por Caballero y Martínez en 2007 donde se evaluó la actividad de solubilización de hierro en 9 cepas *Burkholderia* sp. se encontró, que los tamaños de halo oscilaron entre 5 y 22 mm, siendo la cepa TAtl-371 la que presentó mayor actividad con un tamaño de halo de 22mm. Estos resultados sugieren que el criterio de selección empleado en este trabajo tiene validez.

Por otro lado, la coloración naranja clara demuestra la formación de un complejo entre cromóforo-ión férrico confirmando la producción de sideróforos (Neilands et al., 1987) (Figura 3). Diversos estudios han demostrado la capacidad de bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp. *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Rhizobium* sp y *Azotobacter Chroococcum* y Bacterias Gram positivas *Bacillus* sp, *Microbacterium* sp. para producir sideróforos (Ronald & Andrzej, 2006; Goris & Merlevede, 1983; Singh, & Upadhyay, 2015; Haarmann, & Louden, 2011; Manninen & Mattila-Sandholm, 1994; Rivera, & Fernández, 2007; Raval & Desai, 2015; Scagliola et al., 2016) siguiendo la metodología descrita en este estudio. Para el caso de Basidiomycetes y Ascomycetes, el color generado por la formación del complejo cromóforo-ión férrico es púrpura o rojo púrpura. La diferencia de color, producto de la reacción de CAS, podría estar relacionada con las diferencias en las estructuras presentes en los tipos de sideróforos secretados (Milagres et al., 1999).

Se encuentra documentado que factores como la concentración, el tipo de sideróforo y el pH están relacionados con el color y la intensidad generado en el medio CAS. Por ejemplo, cuando hay alta concentración de sideróforos de tipo hidroxamato y catecol, se producen complejos de Fe (III) altamente coloreados. Además, se reporta que a pH neutro (pH del agar azul CAS), los complejos de monohidroxamato y trihidroxamato presentes en los sideróforos de tipo hidroxamatos, producen color naranja rojizo y naranja, respectivamente,

mientras que los complejos de catecol son de color rojo púrpura (Neilands, 1984; Payne, 1994) (Figura 3). En otro estudio realizado por Hider y colaboradores en 1984, basado en el tipo de sideróforo, se encontró que la tasa de reacción CAS-hierro difería ampliamente, dependiendo de la estructura del ligando del sideróforo, de tal forma que al usar enterobactina y vibriobactina, por ejemplo, el color cambió de azul a naranja en minutos, mientras que empleando rizobactina y aerobactina, que son sideróforos de tipo hidroxamato, el cambio de coloración se observó en cuestión de horas. Por último, al emplear hidroxamatos puros como el ácido *rhodotorulico* y la deferriferrioxamina B, el cambio de coloración se observó después de varios días (Hider, 1984; Schwyn & Neilands, 1987).

De acuerdo con lo anterior y con base en los resultados obtenidos en el primer ensayo, las cepas seleccionadas posiblemente producen sideróforos de tipo hidroxamato y catecolato. Es importante tener en cuenta que el ensayo universal CAS, es una prueba cualitativa.

De otra parte, la fuente de carbono también es un factor que influye en la secreción de sideróforos en el medio CAS. Neilands y colaboradores en 1984, reportan que utilizar glucosa como fuente de carbono es poco conveniente, debido a que la glucosa, aunque generalmente es el sustrato mayormente asimilable, no es óptima para la producción de sideróforos. En microorganismos entéricos como *Aerobacter aerogenes*, el crecimiento en medios con glucosa, produce rendimientos muy bajos de aerobactina, un sideróforo de tipo hidroxamato (Neilands, 1984). Este autor recomienda utilizar como fuente de carbono succinato, debido a que el succinato solo se puede metabolizar a través de una vía metabólica aeróbica que requiere enzimas que contienen hierro. Otra ventaja que reporta el autor con respecto al uso de succinato o citrato, es que estos pueden agregarse al medio de cultivo antes de la esterilización (Neilands, 1984). En este trabajo la utilización de glucosa en el medio CAS pudo haber afectado la producción de sideróforos por las cepas evaluadas.

La evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de solubilización de hierro, a 25°C, 35°C y 45°C mostró que un aumento en la temperatura produce una reducción en la actividad de solubilización para 5 de las cepas. Solo para la cepa C3CA la actividad de solubilización se mantiene a las tres temperaturas (figura 4). El trabajo realizado por Storey y Chakraborty en 2005 con *Rhizobium leguminosarum*, mostró una mayor actividad de

solubilización de hierro a una temperatura de 30°C y buen crecimiento; Sin embargo, los investigadores observaron que a medida que aumenta la temperatura, la producción de sideróforos se reduce. En este trabajo, también se demostró que, aunque el crecimiento óptimo de *Rhizobium* se presenta a una temperatura de 37°C a 24°C, la producción de sideróforos se duplica.

Sayyed en 2016, realizó un diseño factorial (plackett-burmann) evaluando variables de pH, temperatura, fuente de carbono y fuente de nitrógeno sobre la producción de sideróforos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. En este diseño se pudo determinar que los factores que más influyen en la producción de sideróforos son el pH y la temperatura. Ellos observaron que a pH 7,08 y una temperatura de 28°C, se alcanzó un valor de unidades de sideróforos (US) de 70%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, que establecen que estos dos factores son los que más repercuten en la secreción de sideróforos (Pattan et al., 2017; Sharma., 2016). Los valores promedio obtenidos en este estudio (US 75,54%) (valores no mostrados), coinciden con lo reportado por estos autores. En este trabajo se determinó, que las cepas seleccionadas tienen una mayor producción de sideróforos a temperaturas entre 25°C y 28°C.

A diferencia de lo reportado anteriormente en un estudio realizado por Kumar y colaboradores en el año 2017, empleando cepas de *Bacillus* sp y *Enterobacter* sp se encontró que la producción de sideróforos se mantuvo en temperaturas entre 25°C y 45°C, alcanzando unidades de sideróforos hasta de 90%. Esto hace pensar que la producción de sideróforos se ve influenciada por el ambiente del cual son aislados los microorganismos y las condiciones de cultivo. Con respecto al metabolismo de *Azotobacter* sp. diversos estudios reportan que este género de bacterias presenta una mayor actividad de solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y producción de AIA a una temperatura de 27°C, por lo que estas actividades se pueden relacionar con la actividad de solubilización de hierro (Martínez-Salgado, & Montaña-Lara, 2009; Rubio, 2003).

7.2. Evaluación cuantativa de sideróforos de tipo catecolatos mediante el Test de Arnow

Para la detección y cuantificación de fenolatos, 3,4-Dihidroxifenilalanina, y Epinefrina se realizó el test de Arnow, que es un test colorimétrico, que se fundamenta en la reacción del grupo funcional de estos sideróforos (3,4- dihidroxifenilalanina), el cual genera un color

amarillo al entrar en contacto con el ácido clorhídrico, y posteriormente se torna a un color rojo con el exceso de hidróxido de sodio (Arnow, 1937). Posterior a la evaluación cualitativa mediante el ensayo universal CAS, se realizó la evaluación de sideróforos de tipo catecolato en las nueve cepas evaluadas con el objetivo de determinar la concentración de catecol producida por cada una de ellas en función del tiempo, y de esta manera estimar si la producción de catecolatos está relacionado con el crecimiento de las cepas.

En nuestro estudio, se pudo evidenciar que la mayor producción de catecol se presentó entre las 60 y 72 horas de cultivo. En un estudio realizado por Zhang y colaboradores en 2015, donde se caracterizó el metaboloma de *Azotobacter vinelandii*. en condiciones de deficiencia de hierro, se determinó que la presencia de sideróforos de tipo vibrioferrina, y catecolatos, como *Aminoachelin* y *Azotoachelin*, están relacionados con la fase de crecimiento del microorganismo. Otros trabajos demuestran que los sideróforos de tipo catecolatos e hidroxamatos empiezan a producirse al final de la fase exponencial de crecimiento, por lo que es considerado un metabolito secundario (Chunhaleuchanon, & Lumyong, 2009).

Estudios recientes reportan el uso del test de Arnow para cuantificar la producción de sideróforos de tipo catecolato en cepas de *Rhizobium* sp. (Storey et al., 2005). En el caso de *Rhizobium leguminosarum* los autores reportan que la producción de sideróforos se inicia entre 8 y 9 horas después de la inoculación y alcanza su pico máximo entre las 23 y 24 horas, cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria.

Neilands en 1995 reportó que la producción de sideróforos está más influenciada por la deficiencia de hierro en el medio que por el crecimiento del microorganismo. De forma similar en un estudio realizado en 1995 por Raaska y Mattila en 1995, donde se evaluó el efecto de la concentración del hierro con respecto a la producción de sideróforos en cepas de *Staphylococcus* sp, se encontró que a concentraciones de hierro de 50 μM , la producción de sideróforos disminuía, por el contrario, cuando hay una concentración de hierro de 2 μM la producción de sideróforos alcanzaba concentraciones altas en las cepas evaluadas de *Staphylococcus* sp. Este mismo estudio reporta que los sideróforos se pueden unir al manganeso, al cobre y al cobalto y las altas concentraciones de estos elementos pueden interferir con la producción de sideróforos y la adquisición de hierro (Raaska & Mattila-Sandholm, 1995). Con base en esto podemos sugerir que la actividad de solubilización de hierro por las cepas evaluadas en este trabajo, no está influenciada por el crecimiento del

microorganismo si no por la disponibilidad de hierro. Esto se hace evidente en las cepas C1Z, C2Z y C5T que tuvieron los picos máximos de producción de sideróforos a las 72 horas de cultivo.

Las cepas C2Z, C1Z, C5T y C5CO, presentaron mayor producción de sideróforos, Cabe recordar que, en trabajo previo, estas cepas fueron identificadas como *Azotobacter* sp, *Azotobacter paspali*, *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter nigricans* respectivamente. Un estudio realizado por Cllinson y Page en 1987, ya había reportado la producción de sideróforos de tipo catecolatos en condiciones de deficiencia y presencia de hierro en *Azotobacter paspali*. El compuesto fenólico fluorescente que produce *Azotobacter paspali* fue identificado como 3,4-DHBA, el cual es un precursor metabólico para la síntesis de diversos sideróforos de tipo catecolatos (Urpí, 2004; Collinson & Page, 1987; Fekete et al., 1989). Por otro lado, la cepa C5T identificada como *Azotobacter chroococcum*, presentó producción de sideróforos de tipo catecolatos, alcanzando concentraciones de 22,52 µg/ml. Estudios previos, han reportado que *Azotobacter chroococcum* tiene la capacidad de producir sideróforos solo de tipo hidroxamato (Fekete et al., 1989; HÖFTE, 1993; Page, 1987).

De acuerdo con Rubio y colaboradores en 2003 *Azotobacter nigricans*, no está reportado como productor de sideróforos. Otros estudios sin embargo sugieren que esta especie posee actividad de fijación de nitrógeno, la cual está relacionada con la producción de sideróforos, debido a que el hierro es un elemento fundamental para la actividad de la enzima nitrogenasa (Duhme, 2003; Kraepiel & Morel, 2009; Wilde & Duhme, 2015). Por último, en nuestro trabajo, la cepa ATCC 12518 identificada como *Azotobacter vinelandii*, presentó producción de sideróforos de tipo catecolatos. Se ha reportado en literatura que cepas de *Azotobacter vinelandii* tiene la capacidad de producir sideróforos g *N,N'*-bis-(2,3-dihydroxybenzoyl)-*L*-lisina de tipo azotoquelina, un péptido fluorescente de color amarillo y verde de tipo azotobactina, aminoquelina, azotoquelina y protoquelina los cuales conforman la familia de sideróforos de tipo catecolatos (Morel, & Seyedsayamdost, 2015; a Fekete, 1983; Huyer & Page, 1988; Knosp & Page, 1984; Page & Dale, 1986).

La baja producción de catecolatos puede estar relacionada con la regulación transcripcional ejercida por LuxAB, involucrados en la regulación de la síntesis del gen Isocorismato sintasa (csbC), que sintetiza sideróforos de tipo catecolatos cuando la concentración de

hierro alcanzan valores de 10 μ M (Tindale & Page, 2000). Por tanto, la producción de catecolatos en *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter paspali* se confirma con el presente estudio, mientras que la baja producción de catecolatos en *Azotobacter nigricans*, se describe por primera vez en este trabajo.

7.3. Evaluación cualitativa y cuantitativa de sideróforos de tipo Hidroxamatos mediante el test de Sales de Tetrazolio y test de Atkin

El test de sales de tetrazolio está basado en la capacidad de los ácidos hidroxámicos para reducir la sal de tetrazolio por hidrólisis del grupo hidroxamato en presencia de un compuesto alcalino (Raval & Desai, 2015). Los resultados demostraron que el 66% de las cepas evaluadas presentaron una coloración rojiza intensa en las 5 horas evaluadas, siendo las cepas C2Z, C5E y C5T las que presentaron mayor intensidad en el color.

Para la cuantificación y determinación de sideróforos de tipo Hidroxamato, se realizó el test de Atkin, el cual es un ensayo colorimétrico, que permite la detección de ácidos hidroxámicos di, tetra y sextadentados derivados con enlaces al ion férrico (Curtis & Neilands, 1968; Payne, 1994). Los resultados obtenidos demostraron que las 9 cepas evaluadas presentaron producción de sideróforos de tipo hidroxamatos, alcanzando las mayores concentraciones entre las horas 66 y 72, para las cepas C2BR, C4E, C5CO, C4BR y C5E. De acuerdo con Chaiharn y Lumyong en 2009), estas moléculas no están ligadas al crecimiento celular y su síntesis está ligada al tipo de compuesto férrico que se encuentre en el medio. Por otro lado, la cepa C5CO identificada como *Azotobacter nigricans* tuvo mayor producción de sideróforos de tipo hidroxamato, alcanzando una concentración de 87,2 μ g/ml. Este resultado es muy interesante considerando que la literatura no reporta hasta el momento actividad de solubilización de hierro mediante la producción de hidroxamatos en *A. nigricans*. De otra parte, la cepa C4E identificada como *Azotobacter* sp. presentó la producción más alta de hidroxamato a la hora 66. Aunque esta cepa no fue identificada al nivel de especie, es posible que se trate de *Azotobacter chroococcum* debido a su alta producción de hidroxamato. Las cepas C5E y C5T identificadas como *Azotobacter chroococcum* alcanzaron la mayor producción de sideróforosa las 72 horas de cultivo. Para esta especie también se ha reportado la producción de sideróforos de tipo hidroxamatos (Ehl et al., 2006; W J Page, 1987).

Page en 1987 evaluó la producción de sideróforos de *Azotobacter chroococcum* y encontró que en una concentración de citrato de hierro de $0,75\mu\text{M}$, se obtiene la mayor producción de ácidos hidroxámicos y que a una concentración mayor a $5\mu\text{M}$ la producción se ve reprimida. Posiblemente las concentraciones de sulfato de hierro en el medio Burk's afectaron la producción de sideróforos en 7 de las 9 cepas.

La cepa ATCC 12518 identificada por *Azotobacter vinelandii*, alcanzó a la hora 72 de cultivo la mayor actividad de producción de hidroxamatos. La literatura reporta que *A. vinelandii* además de producir sideróforos de tipo catecolato, produce sideróforos de tipo pioverdina, los cuales poseen un grupo hidroxamato al final de la cadena peptídica y un grupo hidroxamato adicional o un ácido hidroxicarboxílico grupo en el medio, que pudieron haber reaccionado con el perclorato férrico (Palanché & Gary, 2004). Según Payne en 1994, la reacción del ión férrico de los ácidos hidroxámicos puede llegar a revelar ciertos detalles de la estructura de los sideróforos. Un motivo por el cual no se evidenció una coloración rojiza es debido a que un trihidroxamato como el *Ferrichromo* permanece de color naranja incluso a pH 2, pero a un pH más bajo, el color se desvanece a través de un violeta oscuro y la solución se vuelve incolora (Payne, 1994). Por tanto, según los resultados obtenidos en el test de sales de tetrazolio y el test de Atkin, confirma que las cepas C5E y C5T tienen producción de sideróforos de tipo hidroxamato, característicos de la especie de *Azotobacter chroococcum*, mientras que las cepas C4E y C5CO, presentaron la mayor producción de sideróforos de tipo hidroxamatos.

7.4. Cromatografía en capa delgada.

La producción de sideróforos en las cepas evaluadas se confirmó mediante la cromatografía de capa fina, en donde se evidenció que todas las cepas evaluadas tienen la capacidad de producir sideróforos de tipo catecolato, debido a la formación de una mancha amarilla en la parte superior de la placa (Figura 10).

Los mejores resultados respecto a la fase estacionaria se obtuvieron empleando placas de sílica Gel. Xie y colaboradores en 2006, evaluaron dos fases estacionarias para la detección de sideróforos de tipo catecolato. La primera compuesta por sílica Gel y la segunda compuesta por Poliamida. Los resultados mostraron que las placas con sílica Gel, son adecuadas para detectar compuestos simples de tipo catecoles, tales como 2,3-DHBA y catecol, mientras que la placa de poliamida, que es un material más absorbente, es más

adecuada para el análisis de sideróforos complejos. Los autores además reportan que la diferencia entre la sílica y la poliamida, reside en la afinidad con los sideróforos de tipo catecol, siendo la poliamida el compuesto con mayor afinidad. La sílica Gel es utilizada comunmente para separar sustancias más polares como, alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos, permitiendo formar enlaces dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno con el compuesto a evaluar. Debido a que los sideróforos en su estructura contienen fenoles, ácidos carboxílicos y compuestos nitrogenados en este trabajo se decidió utilizar placas de sílica.

La fase móvil compuesta por hexano: acetato de etilo (35:15), permitió un alto orden de elución de los sideróforos. Se reporta que el orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente, por este motivo para obtener un R_f de 0,8 se utilizó un compuesto muy apolar como es el Hexano, con un compuesto con una polaridad mayor como el acetato de etilo, para bajar el orden de elución del sideróforo. Xie y colaboradores en 2006 reportaron un R_f para el control de sideróforos de tipo Catecol de 0,74 y para el compuesto 2,3-DHBA de 0,73. Estos resultados son similares a los obtenidos en el este trabajo, donde el valor de R_f para el patrón de catecol fue de 0,8 y el valor de R_f para los sideróforos producidos por las 9 cepas evaluadas fue de 0,82 (figura 10). De otra parte, en la figura 10 se observa la presencia de manchas amarillas para las cepas C4E, C5CO, C2Z y C5E que corresponden a otros tipos de sideróforos con valores de R_f de 0,088, 0,1, 0,2, 0,26 respectivamente que coinciden con los valores obtenidos por Jadhav y Desai en 1992, para catecolatos conjugados a aminoácidos como Lisina, Alanina, Glicina, Treonina con valores de R_f de 0,21, 0,36, 0,27, 0,33 respectivamente. Probablemente los catecolatos identificados por cromatografía de capa fina en este trabajo, estén conjugados con estos aminoácidos.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo sumado a la producción de ácido Indol Acético (AIA) y solubilización de fosfato evaluados previamente para estas cepas, podemos sugerir que las cepas C4E, C5CO, C1Z, C2Z y C5T, aisladas de cultivos de espinaca, coliflor, zanahoria y tomate, pueden ser empleadas en ensayos posteriores, con el fin de determinar su potencial uso como biofertilizante, con especial atención en las cepas C1Z y C5CO que presentan múltiples actividades.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó la actividad productora de sideróforos en ensayo Universal CAS, seleccionado las cepas C3CA, C2BR, C4E, C5CO, C1Z, C4BR, C2Z, C5E y C5T, por presentar un tamaño de halo superior a 5 mm.
- Se determinó que 25°C es la temperatura a la cual se presenta la mayor actividad de solubilización de hierro para la mayoría de las cepas evaluadas.
- Se evidenció que la mayor producción de sideróforos, determinada por los test de Arnow, Atkin y Sales de tetrazolio en las cepas seleccionadas, se registró entre las 60 y 72 horas de cultivo, al final de la fase exponencial de crecimiento.
- Nueve de las 24 cepas evaluadas tiene la capacidad de producir sideróforos de tipo catecolato
- Mediante Cromatografía de Capa Fina se confirmó la producción de sideróforos de tipo Catecolatos, obteniendo un Rf de 0,82.
- Se evidenció que las cepas C4E, C5CO, C1Z, C2Z y C5T son promisorias para ser utilizadas en un biofertilizante.

9. RECOMENDACIONES

- Se sugiere evaluar diferentes fuentes de carbono y pH en el medio agar azul CAS, con el objetivo de mejorar la producción de sideróforos de las cepas evaluadas.
- Se sugiere cuantificar de sideróforos de tipo catecolato e hidroxamato mediante los test de Arnow y Atkin entre las 72 y 120 horas, cuando los cultivos microbianos se encuentren en la fase estacionaria de la curva de crecimiento, con el fin de definir el pico máximo de producción de los compuestos.
- Se recomienda concentrar aún más el extracto de sideróforos con acetato de etilo y realizar más réplicas para la detección de sideróforos de tipo hidroxamatos, con el revelador cloruro férrico.
- Se recomienda purificar el extracto de sideróforos obtenido de las cepas promisorias, para una posterior cuantificación por Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Sandoval, O., Ortiz.Hernández, E., Cruz-Sánchez, M., Cruz-Chávez, E. (2004). El papel de óxidos de hierro en suelos. *Terra Lationoamericana*, 22 (4), 485–497. <https://doi.org/2395-8030>
- Aguado-Santacruz, G., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. (2012). Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 9–21. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Ahmed, E., Holmström, S. J. M., Kumar, V., Singh, S., Singh, J., Upadhyay, N., ... Pacheco Aguilar, J. R. (2015). Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(1), 276–284. <https://doi.org/10.1039/C4DT03559C>
- Álvarez-Fernández, A., García-Laviña, P., Fidalgo, C., Abadía, J., & Abadía, A. (2004). Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Plant and Soil*, 263(1–2), 5–15. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000047717.97167.d4>
- Ames Gottfred, N. P., Christie, B. R., & Jordan, D. C. (1989). Use of the Chrome Azurol S Agar Plate Technique To Differentiate Strains and Field Isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), 707–710.
- Andrade, A., Dall’Agnol, M., Newton, S., & Martinez, M. B. (2000). The iron uptake mechanisms of enteroinvasive *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(3), 200–205.
- Andrews, M. Y., Santelli, C. M., & Duckworth, O. W. (2016). Layer plate CAS assay for the quantitation of siderophore production and determination of exudation patterns for fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 121, 41–43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.12.012>
- Anna, M., Frederik, P. J., Ronald, L., & Andrzej, J. (2006). Identification of siderophores of *Pseudomonas stutzeri*.

- Arnow, B. Y. L. E. (1937). hydrochloric acid and enough distilled water to make a volume of 1 liter. Preserve under toluene. 531. *Compare A Journal Of Comparative Education*, 531–537. <https://doi.org/10.1126/science.86.2225.176>
- Atkin, C. L., & Neilands, J. B. (1968). Rhodotorulic Acid, a Diketopiperazine Dihydroxamic Acid with Growth-Factor Activity. I. Isolation and Characterization. *Biochemistry*, 7(10), 3734–3739. <https://doi.org/10.1021/bi00850a054>
- Atkin, C. L., Neilands, J. B., & Phaff, H. J. (1970). Rhodotorulic acid from species of [i]Leucosporidium[/i], [i]Rhodosporidium[/i], [i]Rhodotorula[/i], [i]Sporidiobolus[/i], and [i]Sporobolomyces[/i], and a new alanine-containing ferrichrome from [i]Cryptococcus melibiosum[/i]. *Journal of Bacteriology*, 103(3), 722–733.
- Baars, O., Zhang, X., Morel, F. M. M., & Seyedsayamdost, M. R. (2015). The Siderophore Metabolome of *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(October), AEM.03160-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.03160-15>
- Bermúdez, C. Q. (2016). *EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) Y FIJACIÓN LIBRE DE NITRÓGENO EN CEPAS NATIVAS DE Azotobacter sp. AISLADAS DE SUELOS DEL ALTIPLANO CUNDIBOYACENSE*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Bertoni, G. M., Pissaloux, A., Morard, P., & Sayag, D. R. (1992). Bicarbonate-pH relationship with iron chlorosis in white lupine. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10), 1509–1518. <https://doi.org/10.1080/01904169209364417>
- Bluhm, M. E., Kim, S. S., Dertz, E. A., & Raymond, K. N. (2002). Corynebactin and enterobactin: Related siderophores of opposite chirality. *Journal of the American Chemical Society*, 124(11), 2436–2437. <https://doi.org/10.1021/ja016651s>
- Borda-Molina, D., Pardo-García, J. M., Martínez-Salgado, M. M., & Montaña-Lara, J. S. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 71–78. <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-1.pdub>
- Brindley, P. K., Draper, S. L., Eldridge, J. I., Nathal, M. V., & Arnold, S. M. (1992). The effect of temperature on the the iron content of Banana Suckers. *Metallurgical Transactions A*, 23(9), 2527–2540. <https://doi.org/10.1007/BF02658056>
- Bultreys, A., Gheysen, I., & Maraite, H. (2001). Characterization of Fluorescent and Nonfluorescent Peptide Siderophores, 67(4), 1718–1727. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1718>

- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-De Los Santos, P., & Martínez-Aguilar, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5308–5319. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-07>
- Cecília, U. U. (2004). “ Análisis genómico y proteómico de los mecanismos de captación de hierro en Aeromonas mesófilas ,” 109–111.
- Chaiharn, M., Chunchaleuchanon, S., & Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1919–1928. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0090-7>
- Collinson, S. K., Doran, J. L., & Page, W. J. (1987). Production of 3,4-dihydroxybenzoic acid by Azomonas macrocytogenes and Azotobacter paspali. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(2), 169–175. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023227452&partnerID=tZOtx3y1>
- Duhme-kclair, A. K., & Kingdom, U. (2003). Catecholamide siderophores of Azotobacter vinelandii : a comparison of their iron and molybdenum binding properties, 96, 2003.
- Ehl, R. K. B., Arula, N. N., Asudeva, M. V, Ato, A. S., Hinano, T. S., & Saki, M. O. (2006). Mini Review Harnessing wheat genotype x Azotobacter strain interactions for sustainable wheat production in semi arid tropics, (January). <https://doi.org/10.3759/tropics.15.121>
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp . y su efecto en el desarrollo de Lycopersicon esculentum Mill . “ tomate ” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2, 39–49.
- Fekete, a. (1983). Siderophores vinelandii, 46(6), 1297–1300.
- Fekete, F. A., Lanzi, R. A., Beaulieu, J. B., Longcope, D. C., Sulya, A. W., Hayes, R. N., & Mabbott, G. A. (1989). Isolation and Preliminary Characterization of Hydroxamic Acids Formed by Nitrogen-Fixing Azotobacter chroococcum B-8. *Appl Environ Microbiol*, 55(2), 298–305. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347843>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–648.

- Goris, J., & Merlevede, W. (1983). SIDEROPHORE PRODUCTION BY SALMONELLA TYPHI, *117*(2), 520–526.
- Hider, R. (1984). Siderophore mediated absorption of iron. *Siderophores from Microorganisms and Plants*, (lii), 25–87. <https://doi.org/10.1007/BFb0111310>
- HÖFTE, M. (1993). 1 – Classes of Microbial Siderophores. *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*. ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-079870-4.50006-5>
- Huyer, M., & Page, W. J. (1988). Zn Increases Siderophore Production in *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(11), 2625–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=204346&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- İncesu, M., Yeşiloğlu, T., Çimen, B., & Yılmaz, B. (2015). Influences of different iron levels on plant growth and photosynthesis of *W. Murcott* mandarin grafted on two rootstocks under high pH conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *39*(5), 838–844. <https://doi.org/10.3906/tar-1501-25>
- Jadhav, R. S., & Desai, A. J. (1992). Isolation and characterization of siderophore from cowpea *Rhizobium* (peanut isolate). *Current Microbiology*, *24*(3), 137–141. <https://doi.org/10.1007/BF01568978>
- Jiménez, D. J. (2007). *CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS COLOMBIANAS DE AZOTOBACTER SP. MEDIANTE EL ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL DNA RIBOSOMAL 16S*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Knosp, O., Tigerstrom, M., & Page, W. J. (1984). Siderophore-mediated uptake of iron in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, *159*(1), 341–347.
- Kraepiel, A. M. L., Bellenger, J. P., Wichard, T., & Morel, F. M. M. (2009). Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *BioMetals*, *22*(4), 573–581. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9222-7>
- Kumar, V., Singh, S., Singh, J., & Upadhyay, N. (2015). Potential of plant growth promoting traits by bacteria isolated from heavy metal contaminated soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *94*(6), 807–814. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1523-7>
- Kurth, C., Kage, H., & Nett, M. (2016). Siderophores as molecular tools in medical and environmental applications. *Org. Biomol. Chem.*, *14*(35), 8212–8227. <https://doi.org/10.1039/C6OB01400C>

- Lindsay, W. L. (1991). Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. *Plant and Soil*, Vol. 130, 27–34. Retrieved from https://www.jstor.org/stable/42937282?seq=1#page_scan_tab_contents
- Lynne, A. M., Haarmann, D., & Loudon, B. C. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), 51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- M, N. F. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal, 34(1), 17–31.
- Manninen, M., & Mattila-Sandholm, T. (1994). Methods for the detection of Pseudomonas siderophores. *Journal of Microbiological Methods*, 19(3), 223–234. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(94\)90073-6](https://doi.org/10.1016/0167-7012(94)90073-6)
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö., & Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5–6), 433–439. <https://doi.org/10.1007/s003740050021>
- McMorran, B. J., Shantha Kumara, H. M. C., Sullivan, K., & Lamont, I. L. (2001). Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*, 147(6), 1517–1524.
- Mengel, K., Kirkby, E. a., Kosegarten, H., & Appel, T. (2001). Principles of Plant Nutrition Edited by and, 5th, 849 pp. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2>
- Milagres, A. M. F., Machuca, A., & Napoleão, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00028-7)
- Moore, D. (1972). Mechanisms Of Micronutrient Uptake By Plants. In: Micro nutrients in Agriculture. In *Scientific society of America* (pp. 171–198).
- Muthuselvan, I., & Balagurunathan, R. (2013). Siderophore Production From Azotobacter Sp . and Its Application As Biocontrol Agent, 5(June), 23–35.
- Neilands, J. B. (1984). Methodology of Siderophores. *Siderophores from Microorganisms and Plants*, 58(III), 1–24. <https://doi.org/10.1007/BFb0111308>
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds *. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723–26726. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>

- Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2013). Respuesta Fisiológica a la Fertilización por Azotobacter chroococcum AC1 y Fertilización Nitrogenada de Síntesis Sobre el Maíz (*Zea mays* L.) en Invernadero. *BioTecnología*, 17(1), 1–23. Retrieved from <http://www.researchgate.net/publication/259822211>
- Oliver, A. Q., Alcántara, B. M., Primo-Millo, E., & Paredes, F. L. (2013). Abonados de los cítricos. Retrieved from <http://www.tecnicoagricola.es/abonado-de-los-citricos/>
- Page, W. J. (1987). Iron-Dependent Production of Hydroxamate by Sodium-Dependent Azotobacter chroococcum. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7), 1418–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=203886&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Page, W. J., & Dale, P. L. (1986). Stimulation of Agrobacterium tumefaciens Growth by Azotobacter vinelandii Ferrisiderophores Stimulation of Agrobacterium tumefaciens Growth by Azotobacter vinelandii Ferrisiderophores, 51(2), 451–454.
- Palanché, T., Blanc, S., Hennard, C., Abdallah, M. A., & Albrecht-Gary, A. M. (2004). Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Azotobactin, the Highly Fluorescent Siderophore of Azotobacter vinelandii. *Inorganic Chemistry*, 43(3), 1137–1152. <https://doi.org/10.1021/ic034862n>
- Pattan, J., Kajale, S., & Pattan, S. (2017). Isolation , Production and Optimization of Siderophores (Iron Chelators) from Pseudomonas fluorescence NCIM 5096 and Pseudomonas from Soil Rhizosphere and Marine Water. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(3), 919–928.
- Payne, S. (1994). Detection, Isolation and Characterization of Siderophores. *Methods in Enzymology*, 235(1), 329–344. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)
- Peralta, D. R., Adler, C., Corbalán, N. S., Paz García, E. C., Pomares, M. F., & Vincent, P. A. (2016). Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS ONE*, 11(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157799>
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
- Persmark, M., Expert, D., & Neilands, J. B. (1989). Isolation, characterization, and synthesis of chrysoabactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(6), 3187–3193.

- Pontes, A. P., Souza, R. De, Granada, C. E., Passaglia, L. M. P., & Alegre, P. (2015). Screening of plant growth promoting bacteria associated with barley plants (*Hordeum vulgare* L.) cultivated in South Brazil, *15*(2), 1–6.
- Prabhu, G. N., & Bindu, P. (2016). Optimization of process parameters for siderophore production under solid state fermentation using polystyrene beads as inert support. *Journal of Scientific and Industrial Research*, *75*(10), 621–625.
- Raaska, L., & Mattila-Sandholm, T. (1995). Effects of iron level on the antagonistic action of siderophores from non-pathogenic *Staphylococcus* spp. *Journal of Industrial Microbiology*, *15*(6), 480–485. <https://doi.org/10.1007/BF01570018>
- Raines, D. J., Sanderson, T. J., Wilde, E. J., & Duhme-Klair, A.-K. (2015). *Siderophores. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11040-6>
- Raval, A. A., & Desai, P. B. (2015). Screening and Characterization of Several siderophore Producing Bacteria as Plant Growth-Promoters and Biocontrolling agents. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, *6*, 4803–4811.
- Rubio, E. J. (2003). Caracterización molecular y funcional de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo., 101.
- Rubio, E. J., Montecchia, M. S., Tosi, M., Cassán, F. D., Peticari, A., & Correa, O. S. (2013). Genotypic Characterization of *Azotobacteria* Isolated from Argentinean Soils and Plant-Growth-Promoting Traits of Selected Strains with Prospects for Biofertilizer Production, *2013*.
- Rueda, D., Valencia, G., Soria, N., Rueda, B. B., Manjunatha, B., Kundapur, R. R., & Selvanayagam, M. (2016). Effect of *Azospirillum* spp. and *Azotobacter* spp. on the growth and yield of strawberry (*Fragaria vesca*) in hydroponic system under different nitrogen levels. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *6*(1), 048–054. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.600108>
- S., V. K., Menon, S., Agarwal, H., & Gopalakrishnan, D. (2017). Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores. *Resource-Efficient Technologies*, *0*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.04.004>
- Sah, S., & Singh, R. (2015). Siderophore: Structural And Functional Characterisation – A

- Comprehensive Review. *Agriculture (Polnohospodárstvo)*, 61(3), 97–114.
<https://doi.org/10.1515/agri-2015-0015>
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
- Sayed, S. S. S. S. J. W. R. Z. (2016). Statistical-based optimization and scale-up of siderophore production process on laboratory bioreactor. *3 Biotech*, 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0365-2>
- Scagliola, M., Pii, Y., Mimmo, T., Cesco, S., Ricciuti, P., & Crecchio, C. (2016). Characterization of plant growth promoting traits of bacterial isolates from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) and tomato (*Solanum lycopersicon* L.) grown under Fe sufficiency and deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.002>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.*, 160, 47–60.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sharma, T., Kumar, N., & Rai, N. (2016). Production and optimization of siderophore producing pseudomonas species isolated from Tarai region of Uttarakhand. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 7(1), 306–314.
- Shelobolina, E. S., Anderson, R. T., Vodyanitskii, Y. N., Sivtsov, A. V, Yuretich, R., & Lovley, D. R. (2004). Importance of clay size minerals for Fe(III) respiration in a petroleum-contaminated aquifer. *Geobiology*, 2, 67–76.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-4677.2004.00018.x>
- Storey, E. P., & Chakraborty, D. R. (2005). Isolation, Purification, and Chemical Characterization of the Dihydroxamate-type Siderophore, “Schizokinen,” Produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *Department of Health Sciences*, Master of, 108.
- Tindale, a E., Mehrotra, M., Ottem, D., & Page, W. J. (2000). Dual regulation of catecholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. *Microbiology (Reading, England)*, 146 (Pt 7(2000), 1617–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878126>
- Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B. M., Favrat, B., &

- Tissot, J. D. (2014). Physiology of iron metabolism. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 41(3), 213–221. <https://doi.org/10.1159/000362888>
- Wani, S., Chand, S., & Ali, T. (2013). Potential Use of *Azotobacter chroococcum* in Crop Production: An Overview. *Current Agriculture Research Journal*, 1(1), 35–38. <https://doi.org/10.12944/CARJ.1.1.04>
- Xie, X., Wang, J., & Yuan, H. (2006). High-resolution analysis of catechol-type siderophores using polyamide thin layer chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 390–393. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.022>

ANEXOS

Anexo 1. Cepas de estudio y cultivo agrícola del cual fueron aisladas

Microorganismo	Cultivo
ATCC 12518	BANCO ATCC
C1BR	Brocoli
C2BR	Brocoli
C3BR	Brocoli
C4BR	Brocoli
C5BR	Brocoli
C1CA	Calabacín
C3CA	Calabacín
C4CA	Calabacín
C5CA	Calabacín
C1CO	Coliflor
C4CO	Coliflor
C5CO	Coliflor
C1E	Espinaca
C2E	Espinaca
C3E	Espinaca
C4E	Espinaca
C5E	Espinaca
C1T	Tomate
C2T	Tomate
C3T	Tomate
C4T	Tomate
C5T	Tomate
C1Z	Zanahoria
C2Z	Zanahoria

Anexo 2. Composición de los medios de cultivo empleados en este trabajo

Agar nutritivo

Compuestos	Cantidad (g/L)
Pluripeptona	5,0
Extracto de Carne	3,0
Cloruro de Sodio	8,0
Agar	15,0

Agar Burk's

Compuestos	Cantidad (g/L)
Sulfato de Magnesio	0,200
Fosfato Dipotásico	0,800
Fosfato Monopotásico	0,200
Sulfato de Calcio	0,130
Cloruro Férrico	0,00145
Molibdato de Sodio	0,000253
Sacarosa	20,0

Medio CAS (Cromo azurol) para la detección de sideróforos

A) Solución CAS:

a. Solución I:

I. Disuelva 0.06 g de CAS (Fluka Chemicals) en 50 ml de ddH₂O.

b. Solución II:

I. Disuelva 0.0027 g de FeCl₃·6 H₂O en 10 ml de HCl 10 mM.

c. Solución III:

I. Disuelva 0.073 g de HDTMA en 40 ml de ddH₂O.

d. Mezclar la Solución 1 con 9 ml de Solución 2. Luego mezclar con la Solución

3. La solución debería ser ahora un color azul. Autoclave y almacenar en un plástico contenedor / botella.

B) Solución de Mezcla:

- a. Minimal Media 9 (MM9) Solución salina Stock:
 - I. Disuelva 15 g de KH_2PO_4 , 25 g de NaCl y 50 g NH_4Cl en 500 ml de ddH₂O.
 - b. 20% de glucosa Stock
 - I. Disuelva 20 g de glucosa en 100 ml de ddH₂O.
 - c. Disolver 25 g de NaOH en 150 ml de ddH₂O; el pH debería ser 12.
- C) Preparación de agar CAS
- a. Añadir 100 ml de solución de sal MM9 a 750 ml de ddH₂O.
 - b. Ajustar el pH a 6,8
 - c. Agregar 15g de agar-agar
 - d. Autoclave y enfríe a 50°C
 - e. Agregar 10 ml de solución de glucosa estéril al 20% en MM9
 - f. Lentamente agregar 100 ml de solución de tinte azul a lo largo la pared de vidrio con suficiente agitación para mezclar a fondo.
 - e. Verter en las placas

Anexo 3. Tamaño de halo (mm) de las 24 cepas evaluadas.

Microorganismo	Tamaño de halo (mm)
ATCC 12518	5
C1BR	3,5
C2BR	5
C3BR	3
C4BR	4,2
C5BR	2
C1CA	1
C3CA	4,4
C4CA	1
C5CA	3,8
C1CO	2
C4CO	3,8
C5CO	4,4
C1E	2,5
C2E	3,8
C3E	3,8

C4E	5
C5E	4,8
C1T	2,5
C2T	2,5
C3T	3,8
C5T	4,7
C1Z	5
C2Z	4,5

Cepas seleccionadas mediante el método universal Cas (Neilands et al.,1987)

CEPA	NÚMERAL
C3CA	1
C2BR	2
C4E	3
C5CO	4
C1Z	5
C4BR	6
C2Z	7
C5E	8
C5T	9

Anexo 4. Tamaño de halos obtenidos en medio CAS en las tres temperaturas evaluadas

Tamaño de halo obtenido en medio CAS a 25°C

Temperatura 25°C						
Cepa/ Tamaño (mm)	R1	R2	R3	Promedio	DESV EST	COEF VAR
1	7	5	5	5,67	1,15	20,38
2	6	6	5	5,67	0,58	10,19
3	6	5	6	5,67	0,58	10,19
4	4	3	4	3,67	0,58	15,75
5	6	6	5	5,67	0,58	10,19
6	10	8	6	8,00	2,00	25,00
7	6	4	3	4,33	1,53	35,25
8	7	5	5	5,67	1,15	20,38
9	4	5	8	5,67	2,08	36,74
ATCC	6	6	NC	6,00	0,00	0,00

Tamaño de halo obtenido en medio CAS a 35°C

Temperatura 35°C						
Cepa/ Tamaño (mm)	R1	R2	R3	Promedio	DESV EST	COEF VAR
1	5	4	5	4,67	0,58	12,37
2	4	4	4	4,00	0,00	0,00
3	4	3	3	3,33	0,58	17,32
4	4	3	4	3,67	0,58	15,75
5	4	2	2	2,67	1,15	43,30
6	5	6	4	5,00	1,00	20,00
7	4	4	5	4,33	0,58	13,32
8	4	4	5	4,33	0,58	13,32
9	4	5	5	4,67	0,58	12,37
ATCC	3	3	NC	3,00	0,00	0,00

Tamaño de halo obtenido en medio CAS a 45°C

Temperatura 45°C						
Cepa/ Tamaño (mm)	R1	R2	R3	Promedio	DESV EST	COEF VAR
1	4	4	2	3,33	1,15	34,6
2	0	0	0	0,00	0,00	0,0
3	2	1	1	1,33	0,58	43,3
4	0	0	0	0,00	0,00	0,0
5	0	0	0	0,00	0,00	0,0
6	1	1	2	1,33	0,58	43,3
7	0	0	0	0,00	0,00	0,0
8	0	0	0	0,00	0,00	0,0
9	1	1	2	1,33	0,58	43,3
ATCC	0	0	0	0,00	0,00	0,0

4) Fórmula reportada por Memon y colaboradores en el año 2005

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el sideróforo (Cm)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente o fase móvil (Cm)}}$$

Anexo 5. Resultados análisis estadístico (ANOVA)

		ANOVA				
Test de Arnow.		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
h48	Entre grupos	900,392	10	90,039	719,668	,000
	Dentro de grupos	2,752	22	,125		
	Total	903,144	32			
h54	Entre grupos	674,365	10	67,436	210,526	,000
	Dentro de grupos	7,047	22	,320		

	Total	681,412	32			
h60	Entre grupos	1281,447	10	128,145	193,478	,000
	Dentro de grupos	14,571	22	,662		
	Total	1296,018	32			
h66	Entre grupos	1218,055	10	121,805	371,708	,000
	Dentro de grupos	7,209	22	,328		
	Total	1225,264	32			
h77	Entre grupos	2778,694	10	277,869	4874,642	,000
	Dentro de grupos	1,254	22	,057		
	Total	2779,948	32			

ANOVA

Test de Atkin		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
h48	Entre grupos	1956,056	10	195,606	33,316	,000
	Dentro de grupos	129,167	22	5,871		
	Total	2085,223	32			
h54	Entre grupos	978,546	10	97,855	30,618	,000
	Dentro de grupos	70,313	22	3,196		
	Total	1048,859	32			
h60	Entre grupos	2831,813	10	283,181	65,364	,000
	Dentro de grupos	95,313	22	4,332		
	Total	2927,126	32			
h66	Entre grupos	23229,484	10	2322,948	375,944	,000
	Dentro de grupos	135,938	22	6,179		
	Total	23365,421	32			
h72	Entre grupos	3582,937	10	358,294	56,595	,000
	Dentro de grupos	139,278	22	6,331		
	Total	3722,215	32			