

ARTÍCULO RESEÑA

## *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno?

Sandra Pérez Álvarez<sup>I</sup>, Orlando Coto Arbelo<sup>II</sup>, Mayra Echemendía Pérez<sup>III</sup>,  
Graciela Ávila Quezada<sup>IV</sup>

<sup>I</sup>Productora Agrícola «El Encanto», Guillermo Nelson y Cuauhtémoc, Sin número altos, Dpto. 3, Colonia Centro, Guasave, Sinaloa, C.P. 81000. Correo electrónico: [innovacion@grupoagrostar.com](mailto:innovacion@grupoagrostar.com). <sup>II</sup>Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT), 7<sup>ma</sup> e/ 30 y 32, No. 3005, Apartado Postal 11 300, Miramar, Playa, La Habana, Cuba.

<sup>III</sup>Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, Carretera Tapaste, km 22 ½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. <sup>IV</sup>Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología, Chihuahua, CP. 31000, México.

**RESUMEN:** El objetivo de esta revisión es presentar algunos aspectos de interés sobre la bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula, su función como agente de control biológico y su reciente acción como patógeno de los cultivos. Su empleo como control biológico para biorremediación, y recientemente su capacidad para infectar tejido vegetal, la han hecho objeto de múltiples estudios en todo el mundo. En la actualidad, la identificación de especies del género *Pseudomonas* se realiza a través de métodos moleculares, entre los que se encuentran la comparación de secuencias del 16S ARNr o hibridación ARNr-ADN; no obstante, hasta el momento se considera que el gen *rpoB* es el más adecuado para estos fines a nivel de especies y subespecies. Esta bacteria se clasifica dentro del grupo de Bacterias Promotoras del Crecimiento, debido a que controlan patógenos en las plantas, ya sea produciendo sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta, o como las Bacterias Biocontroladoras Promotoras del Crecimiento Vegetal (Biocontrol-PGPB), que tienen efectos beneficiosos sobre los cultivos (contribuye a la fijación biológica del nitrógeno, síntesis de fitohormonas, promoción del crecimiento de las raíces), se asocian con especies de plantas y se encuentran en diversos ecosistemas. A principios del siglo XXI esta bacteria comenzó a informarse como patógena en diferentes cultivos y países.

**Palabras clave:** *Pseudomonas*, control biológico, organismos patógenos.

---

### *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen?

**ABSTRACT:** The aim of this review was to summarize some aspects of interest of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* Migula, its function as a biological control agent and its recent action as a crop pathogen. Its use as a biological control agent, for bioremediation, and its recently known capacity of infecting plant tissues, have made them an object of several studies around the world. Identification of *Pseudomonas species* is currently performed by using molecular methods such as the comparison of 16S rRNA sequences or the rRNA-DNA hybridization although, until now, the *rpoB* gene is considered the most suitable for the identification and phylogenetic discrimination at a species and subspecies level. This bacterium is classified within the Plant Growth Promoting Bacteria for its capacity for controlling plant pathogens by either producing inhibitory substances or increasing the natural resistance of the plant, or as the Biocontrol Plant Growth Promoting Bacteria (Biocontrol-PGPB), which have beneficial effects on crops by contributing to nitrogen fixation, phytohormone synthesis, and root growth promotion; they associate with plants species and can be found in different ecosystem. At the beginning of the 21th century, this bacterium started to be reported as pathogenic in different crops and countries.

**Key words:** *Pseudomonas*, biological control, pathogenic organisms.

---

## INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* está compuesto por más de 100 especies, las cuales fueron divididas por análisis de secuencias multilocus (MLSA-multilocus sequence analysis) en nueve grupos mayoritarios: *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Pseudomonas syringae* Van Hall, *Pseudomonas lutea* Peix, *Pseudomonas putida* Trevisan, *Pseudomonas anguilliseptica* Mlakabayashi y Egusa, *Pseudomonas straminea* Iizuka y Komagata, *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter, *Pseudomonas oleovorans* Lee y Chandlery, *Pseudomonas stutzeri* Lehmann and Neumann (1).

Las bacterias del género *Pseudomonas* presentan gran capacidad para utilizar diversidad de nutrientes, razón por la que se explica su ubicuidad. Su actividad enzimática las convierte en un grupo de microorganismos importante, debido a que son responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en diversos ecosistemas (2).

La efectividad de cepas de *Pseudomonas* con actividad antagonista, frente a fitopatógenos que afectan a cultivos de importancia económica, fue informada con anterioridad por otros autores (3, 4). Este género bacteriano constituye un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos a través de los cuales ejerce un efectivo control biológico, incluyendo el antagonismo directo y la inducción de resistencia en la planta (5). Sin embargo, *Pseudomonas* no tiene la capacidad de producir esporas de resistencia, lo que limita su formulación para uso comercial.

*P. fluorescens* es una de las especies más estudiadas, pues produce metabolitos como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas (6). Se informó su efectividad en el control de hongos patógenos como *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx & H. Olivier var. *tritici* (7), *Aspergillus* sp. (6), *Pyricularia oryzae* Cav. (8), entre otros.

Por otro lado, existen numerosos investigadores que informan a esta bacteria como patógeno en cultivos de importancia económica, como son: endivia (*Cichorium endivia* L.) en Argentina (9), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Arabia Saudita (10), brócoli (*Brassica oleracea* L.) en China (11).

El objetivo de este trabajo es realizar un análisis de los resultados de investigación previos sobre la bacteria *P. fluorescens*, su uso como control biológico y su reciente aparición como patógeno en algunos países del mundo.

## Generalidades de *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* son bacterias baciliformes, aerobias, poseen varios flagelos polares. Son conocidas por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas que viven en contacto con ellas (12). Según la clasificación taxonómica (12) se ubican en:

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especie: *Pseudomonas fluorescens* Migula

Los resultados de estos estudios desencadenaron cambios en la nomenclatura del género durante la última década. Por ejemplo, en un inicio el género fue asignado basándose en la morfología y metabolismo de la bacteria, y en la octava edición de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (13) se listaron alrededor de 29 especies bien caracterizadas, junto con otras 235 especies menos estudiadas. En los diez años siguientes, este número se redujo a sólo 112 especies formalmente reconocidas (13).

El género *Pseudomonas* es reconocido como un complejo grupo de especies descritas, las cuales fueron reclasificadas en nuevos géneros. A pesar del reconocimiento de la heterogeneidad filogenética en las especies clasificadas, se inició una reevaluación de las características fenotípicas, las actividades metabólicas, genéticas y ecológicas, con el fin de esclarecer las complejas relaciones filogenéticas intragénicas (12). Estos estudios son importantes porque, mediante filogenia, se podrán despejar las dudas sobre la relación de las especies que son utilizadas como agentes de control biológico y las especies patógenas (12).

Estas bacterias son bacilos Gram-negativo, rectos o ligeramente curvados y saprofitas. Se pueden encontrar en ecosistemas acuáticos y en el suelo (12). No forman esporas y el rango de temperatura más favorable para su desarrollo es de 25 a 30°C, aunque puede crecer desde 5 a 42°C. Requiere un pH neutro y no crece en condiciones ácidas (pH ≤ 4,5). Sus flagelos polares hacen posible su movimiento activo en líquido. Su pigmento fluorescente (fluoresceína) la hace reaccionar frente a la luz ultravioleta, aunque algunas veces no fluoresce cuando el cultivo es reciente o después de varios cultivos de laboratorio.

Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, interactuando de forma asociativa con la planta (12).

*P. fluorescens* tiene una gran capacidad para solubilizar fósforo. La bacteria puede realizar esta actividad a través de dos vías: la primera es la producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, glucónico) que actúan sobre el pH del suelo, favoreciendo la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato al suelo. La otra vía es a través de las fosfatasa, estas son enzimas hidrolasas (Monoesterasas y diesterasas fosfóricas) que actúan sobre las uniones ésteres, liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica. Ambas vías generan una mayor cantidad de fosfato, disponible para ser absorbido por las raíces de las plantas (14).

Otro aspecto destacable en *P. fluorescens* es la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento. Las principales sustancias de este tipo son hormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas). Además, también producen aminoácidos y promotores específicos del crecimiento vegetal. La producción de estas sustancias es posible siempre que sea adecuada la concentración de organismos en el sistema radicular y que en el suelo haya suficiente cantidad de materia orgánica (12).

### **Aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens* de hábitat naturales**

Esta bacteria fue aislada a partir de hongos de la rizosfera de plantas como arroz (*Oryza sativa* L.) (15), berenjena (*Solanum melongena* L.), ají (*Capsicum annuum* L.) (16). También se ha aislado de suelos de zonas industriales para utilizarlas en biorremediación de suelos cultivados (17,18) y de agua (19).

Sajbena *et al.* (20) lograron secuenciamientos parciales del gen *rpoB*, el cual es importante ya que codifica para la región altamente conservada del gen de mantenimiento ARN-Polimerasa subunidad  $\beta$  utilizado para la identificación de bacterias. Los autores encontraron una alta correlación entre la secreción de proteasas y lipasas y el efecto necrótico de esta bacteria; se identificó la presencia de *P. fluorescens*, la cual causa serios daños durante la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* Champ. Jura. Vosges. La secuencia parcial de este gen se encuentra disponible en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information-Centro Nacional de Información de Biotecnología) (34), bajo los números de acceso GQ351518 - 22, GQ351529 - 39, GQ351544 - 48, por citar algunos. Todas estas especies son patógenas del hongo.

En Cuba, se realizaron aislamientos de cepas de *Pseudomonas* asociadas al cultivo del arroz (*O. sativa*) con actividad antagonica y autóctonas, con potencialidades para el control biológico frente a *Curvularia pallescens* Boeijn y *Curvularia trifolii* Boeijn, dos hongos que afectan a este cultivo. Los resultados demostraron que los 17 aislamientos tuvieron efecto antagónico ante los aislamientos fúngicos probados, se mostraron porcentajes de inhibición desde 49% hasta 83%. Del total de aislamientos, solo tres pertenecieron a *P. fluorescens*, según pruebas fisiológico - bioquímicas desarrolladas mediante el micrométodo API20NE (21).

También se realizaron aislamientos de esta bacteria a partir de raíces y tallos de arveja (*Pisum sativum* L.). Se tuvo en cuenta, como primer criterio de selección, su acción antagonica frente a *Fusarium oxysporum* Schltdl, y se seleccionaron tres cepas eficientes (PPC, PPO y PPL). Su aplicación, en condiciones de invernadero, demostró que PPC se destaca por el control del 90,31% del patógeno (22).

En cuanto a la identificación del género *Pseudomonas*, las investigaciones iniciales se basaron en el análisis de la composición de ácidos grasos, con énfasis en la capa de lipopolisacáridos correspondiente (LPS). Esta capa es responsable de una importante fracción discriminadora de hidroxi-ácidos grasos. En los años 70, la principal investigación en el contenido de ácidos grasos de los miembros del género *Pseudomonas sensu lato* fue llevada a cabo en los laboratorios de Moss (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, USA) (23). Estos investigadores encontraron que los análisis repetidos de patrones de Esteres matílicos de ácidos grasos (FAME) dieron patrones similares, por lo que fueron usados rápidamente para diferenciar especies de *Pseudomonas* y grupos de especies.

Uno de los principales estudios sobre los ácidos 3-hidroxi fue informado por Oyaizu y Komagata (24). A inicios de los 90', las primeras interpretaciones de los sistemas de evaluación comercial, para la identificación bacteriana basada en FAME, Sherlock MIS (MIDI Inc. Newark, DE, USA), se llevaron a cabo también con especies del género *Pseudomonas* (25). El grupo de Stead se enfocó en las especies de *Pseudomonas* fitopatógenas, se analizaron 38 de las 86 especies de *Pseudomonas* válidamente descritas. Seis grupos de cepas fueron discriminadas sobre la base de tres tipos de ácidos grasos, hidroxi principalmente (también corehidroxi ácidos grasos: 2-hidroxi, 3-hidroxi e iso-ramificado 3-hidroxi), a pesar de que ellos tuvieron menos del 10% del área total de picos. Diferencias cuantitativas en ácidos grasos no hidroxi permitieron diferenciar entre taxas dentro de estos grupos y se

encontraron pocas diferencias cualitativas entre los perfiles de taxas incluidas en el mismo subgrupo. Incluso, únicos perfiles se encontraron para taxas infraespecíficas (subespecies, biovares, patovares) (25).

Stead *et al.* (25) también encontraron buenas correlaciones entre los agrupamientos realizados con los datos de los análisis de ácidos grasos, y los basados en los resultados de hibridación DNA-DNA y DNA-ARNr. Los ácidos grasos predominantes en el género *Pseudomonas* son C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub> y derivados (26), aunque otros autores consideran que son predominantes los ácidos grasos hidroxi, C<sub>10:0</sub> 3-hidroxi, C<sub>12:0</sub> 3-hidroxi y C<sub>12:0</sub> 2-hidroxi, (27).

### Estudios de taxonomía molecular del género *Pseudomonas*

El gen ARNr 16S es actualmente la sección del genoma más utilizada para fines taxonómicos.

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontes. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en la taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (28).

En la actualidad, la identificación de *Pseudomonas* se realiza con métodos moleculares, como la comparación de secuencias del 16S ARNr o hibridación ARNr-ADN. De Vos *et al.* (29) propusieron que el género *Pseudomonas* se limite a las especies relacionadas con *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* en el grupo I de homología ARNr-ADN. A las especies que pertenecen a este grupo se les conoce como «las verdaderas *Pseudomonas*» o las «*Pseudomonadales* fluorescentes», debido a los pigmentos fluorescentes que producen ambas especies.

En el año 2000, Yumamoto *et al.* (30) realizaron un estudio filogenético de este género con el objetivo de establecer un sistema de clasificación más fiable. Para ello usaron secuencias nucleotídicas combinadas de los genes que codifican para la subunidad B ADN girasa (*gyrB*) y el gen del factor  $\delta^{70}$  (*rpoD*). Ambas proteínas son ubicuas en las bacterias y esenciales en el crecimiento celular. El experimento fue validado con la identificación de 31 especies descritas de *Pseudomonas* (un total de 125 aislamientos).

Algunos investigadores sugieren que el estudio del género *Pseudomonas* marcó la entrada a una nueva manera de percibir y trabajar la taxonomía bacteriana; un ejemplo de ello fue el establecimiento de las bases para utilizar la molécula de ARNr como marcador

molecular, ya que se mantenían patrones de similitud entre especies relacionadas (31).

Debido a la amplia variedad de especies dentro del género y a la conjunción de estudios multifacéticos del mismo, se adoptaron métodos para la identificación de procariontes más allá de los límites de un solo grupo. Es importante destacar que, aunque la quimio taxonomía o los métodos inmunológicos fueron estrategias para la identificación de procariontes, en la actualidad se conoce que estas herramientas no son suficientes para la identificación precisa de un microorganismo. Actualmente, la secuenciación del gen 16S ARNr ha confirmado los grupos básicos definidos por Palleroni (27).

Una de las proteínas de la membrana externa más abundantes de *Pseudomonas sensu stricto* es OprF. El gran polimorfismo de esta proteína se encuentra relacionado con el nicho ecológico. Además de tener una función como poro- proteína estructural de membrana y adherencia radical- esta proteína pleiotrópica muestra un gran polimorfismo que se corresponde con dos tipos de OprF, denominadas OprF tipo 1 y OprF tipo 2. Aunque la proporción del gen *oprF* tipo 2 entre muestras de rizosfera fue muy variable, con diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) en comparación con la proporción del gen *oprF* tipo 2 del suelo adyacente a la planta, donde la gran mayoría de los *oprF* (>95%) corresponde al tipo 1. Los resultados obtenidos en este estudio (33) resaltan la función potencial del gen *oprF* para definir ecotipos en *P. fluorescens* especies, y tal vez para mejorar la resolución de la taxonomía de *Pseudomonas*.

Hasta el momento, se considera que el gen *rpoB* es el más adecuado para la identificación y discriminación filogenética a nivel de especies y subespecies, si se tiene en cuenta el análisis de la secuencia situada entre las posiciones 2300-3300 (34).

### Mecanismos de acción de *Pseudomonas fluorescens* como estimuladora del crecimiento en plantas

Existe gran cantidad de bibliografía que describe el uso potencial de bacterias asociadas a las plantas como agentes estimulantes del desarrollo y la sanidad de las mismas (34).

En 1998, Bashan y Holguin (35) propusieron dos nuevos términos para el uso científico general de las PGPB; estos fueron: Bacterias biocontroladoras promotoras del crecimiento vegetal como biocontrol en plantas (Biocontrol-PGPB) y Bacterias estimuladoras del crecimiento en plantas (PGPB).

Los autores proponen que el término Rizobacterias estimuladoras del crecimiento en plantas, propuesto por Kloepper (36), se actualice con los nuevos conocimientos dentro de este campo. Según los investigadores, este término describe mejor la naturaleza de muchas bacterias beneficiosas y es ampliamente aceptado por los miembros de la comunidad científica. Debido a que muchas bacterias beneficiosas no son bacterias rizosféricas, proponen sustituir la palabra rizobacteria por bacteria, creando el término modificado Bacterias biocontroladoras promotoras del crecimiento vegetal (biocontrol-PGPB-Plant Growth Promoting Bacteria). Este vocablo se empleará para describir bacterias que controlan patógenos en las plantas (ya sea produciendo sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta), la palabra «Biocontrol» se combinará para formar el nuevo término Biocontrol PGPB. El término PGPB se aplicará cuando la bacteria favorece a la planta a través de su propio metabolismo (solubilización de fosfatos, producción de hormonas, fijación de nitrógeno), favoreciendo lo que beneficia el metabolismo de la planta (aumenta la toma de agua y minerales, mejora el desarrollo de las raíces, aumenta la actividad enzimática de las plantas). Estas palabras pueden utilizarse sin tener en cuenta el género o la especie de la bacteria. Sin embargo, en algunos casos, diferentes razas de la misma especie podrían ser biocontrol PGPB o PGPB (35).

Según una revisión realizada por Glick (37), algunas de estas PGPB pueden penetrar también al interior de las raíces y establecerse como una población endófitica.

La propagación de la colonización endófitica de los órganos y tejidos de las plantas hospedantes reflejan la capacidad de la bacteria de adaptarse selectivamente a estos nichos ecológicos específicos (38). Consecuentemente, una asociación íntima entre la bacteria y la planta hospedante puede establecerse sin dañar a la planta. Aunque es generalmente aceptado que muchas comunidades endófiticas de bacterias son producto del proceso de colonización en la zona de las raíces, ellas pueden también originarse de otras fuentes además de la rizosfera, por ejemplo, la filosfera, la antosfera, o la espermosfera (38).

Las PGPB pueden promover, de forma directa, el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos de acción. Los efectos directos se evidencian en ausencia de otros microorganismos, e incluyen la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) (39) y la síntesis de fitohormonas (40). Los mecanismos indirectos se ponen de manifiesto cuando ocurre la interacción

del microorganismo de interés con un fitopatógeno, provocando la disminución de los efectos dañinos de este último sobre la planta. Los mecanismos de control biológico más ampliamente reconocidos son: la competencia por un nicho ecológico o sustrato, la producción de inhibidores aleloquímicos y la inducción de resistencia sistémica en las plantas hospedantes ante un amplio espectro de patógenos y/o estrés abióticos (41).

Muchos suelos agrícolas pierden una cantidad suficiente de uno o más de estos compuestos, por lo que el desarrollo de la planta no es óptimo. Para mitigar este problema y obtener una alta producción, los agricultores se convirtieron en dependientes de fuentes químicas de nitrógeno y fósforo, y estos, además de ser costosos, dañan el medio ambiente. Sería muy ventajoso si un significado biológico eficiente de proveer nitrógeno y fósforo a las plantas, pudiera utilizarse para sustituir, al menos, una porción los químicos nitrogenados y fosforados que actualmente se utilizan (38).

Algunos de los mecanismos directos que están asociados con *P. fluorescens* como PGPB son (24):

- **Secuestro del hierro:** Este elemento no es asimilado ni por bacterias ni por plantas, debido a que el ion férrico  $Fe^{3+}$  es la forma predominante en la naturaleza, por lo que la cantidad de hierro disponible para ser asimilado por organismos vivos es extremadamente baja. Para sobrevivir con esta limitada cantidad de hierro, algunas bacterias sintetizan sideróforos de baja masa molecular (~400–1500 Da), moléculas con una elevada afinidad por el  $Fe^{3+}$ , así como receptores de membrana capaces de unirse a complejos de Fe-sideróforos, facilitando de esta forma la toma de hierro. Actualmente se conocen casi 500 sideróforos.

Los beneficios directos de las bacterias con sideróforos en el desarrollo de las plantas se demostraron en diferentes tipos de experimentos. Por ejemplo, se realizaron estudios utilizando sideróforos-férricos marcados radiactivamente, como fuente de hierro, donde se mostró que las plantas son capaces de tomar el hierro marcado. Las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) que crecían bajo condiciones limitadas de hierro, mostraron leves síntomas cloróticos. Posteriormente, cuando fueron inoculadas con la raza de *Pseudomonas* productora de sideróforos GRP3, aumentaron los niveles de clorofila, comparadas con plantas no inoculadas. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* L. asimilaron un complejo de Fe sintetizado por *P. fluorescens*, induciendo un incremento de Fe en el interior de la planta y mejorando el desarrollo de la misma.

- **Citoquininas y giberelinas:** Algunos estudios demuestran que, en particular las PGPB, pueden producir tanto giberelinas como citoquininas. Las citoquininas se han detectado en medios de células libres de *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus polymyxa*. El estímulo en el desarrollo de las plantas por algunas citoquininas o giberelinas producidas por PGPB, ha sido documentado (26), pero aún se desconocen muchos aspectos sobre la función de las bacterias sintetizadoras de hormonas y la forma de producción de estas por las bacterias. Algunos fitopatógenos pueden también sintetizar citoquininas. Sin embargo, se ha encontrado que las PGPB producen bajos niveles de citoquininas comparadas con los fitopatógenos, por lo que el efecto de las PGPB en el desarrollo de las plantas es estimulante, mientras que es inhibitorio el efecto de las citoquininas producidas por patógenos (37).

*Pseudomonas* [*P. putida*, *P. spp.*, (42)] se consideran también bacterias diazotróficas, las que como inoculantes microbianos constituyen una gran alternativa en el uso de fertilizantes nitrogenados. Estas bacterias tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico, donde se encuentra como nitrógeno elemental de forma ilimitada, y hacerlo disponible para los cultivos. Los fijadores de nitrógeno pueden interactuar de forma simbiótica con la planta, como en el caso de rizobio-leguminosa, o comportarse como diazótrofos asociativos.

Las investigaciones relacionadas con los mecanismos de promoción, en el desarrollo de las plantas por las PGPB, proveen de una gran comprensión sobre las múltiples facetas en la supresión de enfermedades por estos agentes biocontroladores. La mayoría de los estudios se relaciona con rizobacterias de vida libre, especialmente *Pseudomonas* y *Bacillus*; sin embargo, mucho queda por aprender de las bacterias endófitas no simbióticas que tienen una asociación única y aparentemente un efecto más pronunciado en el aumento del desarrollo de las plantas (43).

#### ***Pseudomonas fluorescens* como agente de control biológico**

El método más común para controlar las enfermedades en los cultivos es el uso de compuestos químicos; sin embargo, se ha comprobado que estos tienen consecuencias negativas en el ambiente y en la salud humana (44). Por lo tanto, se han buscado nuevas alternativas para manejar las enfermedades en los cultivos. Así, el uso de microorganismos con capacidades

para restringir el crecimiento de fitopatógenos se ha convertido en una opción viable.

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos frente a otros microorganismos, y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de fitopatógenos (45); entre estos se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Fusarium*, *Gliocladium* y *Trichoderma* (45).

En la naturaleza existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en muchos casos no se desarrolle la enfermedad (45).

Las bacterias *Pseudomonas* del grupo fluorescente se consideran una opción prometedora en el control biológico de fitopatógenos. Este grupo bacteriano es un importante colonizador de la rizosfera de plantas. Actualmente existen diversas cepas de *P. fluorescens* que han sido registradas, y algunas de ellas patentadas (46) para su uso en los cultivos agrícolas como agentes de control biológico. Por ejemplo, la cepa ZUM80 suprime significativamente el crecimiento del patógeno de frijol *Colletotrichum lindemuthianum* Briosi & Cavaray, y de los patógenos de aguacate *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y *Phytophthora cinnamomi* Rands (46).

El género *Pseudomonas* produce compuestos extracelulares conocidos como biosurfactantes, debido a la capacidad que tienen de crecer en presencia de hidrocarburos, lo cual estimula la producción de estas moléculas. Investigaciones realizadas por Tran *et al.* (47), demostraron que los biosurfactantes producidos por especies de *Pseudomonas* tienen actividad lítica sobre zoosporas de los géneros *Phytophthora* y *Pythium*.

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta o en las heridas. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica para seleccionarlos.

#### ***Pseudomonas fluorescens* como patógeno**

Algunas especies de *Pseudomonas* son patógenos importantes de animales, insectos y plantas (48).

*Pseudomonas* como patógenos oportunistas, se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes naturales y pueden encontrarse en la rizosfera de las plantas. Bajo condiciones medioambientales específicas (elevada humedad relativa, cambios de temperatu-

ra, elevada fertilización nitrogenada), *P. fluorescens* puede causar considerables daños en la agricultura (10).

En Argentina, se observó una enfermedad bacteriana postcosecha en endivias (*Cichorium endivia* L.). Las plantas afectadas mostraron oscurecimiento y podredumbre blanda de las hojas interiores, así como una necrosis marginal. Las pruebas bioquímicas y fisiológicas permitieron identificar al patógeno como *P. fluorescens* bv. III, *P. fluorescens* bv. V, y *Pseudomonas cichorii*. La identificación de los aislamientos bacterianos se realizó a través de los RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism o Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción). Estos resultados generaron el primer informe de estas dos bacterias afectando endivias en Argentina (9).

Del año 2002 al 2004, en el Departamento de Protección de Plantas en Riyadh (Abha, Arabia Saudita) se analizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con síntomas de lesiones en los tallos, necrosis y raíces adventicias. La bacteria que se aisló del tallo de las plantas infectadas, se identificó como *P. fluorescens* (biotipo I). Esta identificación fue confirmada mediante análisis biológicos (fuente de carbono a 37°C) y constituyó la primera publicación de la etiología de la necrosis de la médula en tomate en Arabia Saudita (10).

En Ningbo (Provincia de Zhejiang, República Popular China), durante los periodos cálidos y húmedos en el verano de los años 2005 a 2008, se observaron síntomas de pudrición en frutos de brócoli (*Brassica oleracea* L. var *italica* Planch). Los síntomas característicos eran lesiones húmedas, desarrolladas en las yemas, que se transforman en una pudrición blanda marrón-negro. Secciones longitudinales de las inflorescencias sintomáticas mostraron decoloración parda y pudrición de los tejidos internos. La producción de brócoli mermó debido a la enfermedad, la cual presentó una incidencia del 65 al 81%. Se caracterizaron cinco aislamientos representativos con el Sistema de identificación Biolog® G2, versión 4.2 (Biolog Inc., Hayward, CA) y por cromatografía de gas de los ácidos grasos ésteres de metilo (FAME) utilizando el Sistema de Identificación Microbiológico (MIDI Inc., Newark, DE). Los cinco aislamientos fueron identificados como *P. fluorescens*. Además, se seleccionó la cepa PFB-01 a la cual se le amplificó y secuenció el gen ARNr 16S. Por este método, se corroboró la identidad del patógeno y su secuencia se depositó en el GenBank, bajo el número de acceso GQ352649 (11).

En este mismo país, en la provincia de Jiangsu, se observó una enfermedad no identificada en campos comerciales de ajo (*Allium sativum* L.). Los síntomas iniciaron con lesiones húmedas desarrolladas en la base de las hojas. Posteriormente, se presentaron en el tallo y en los tejidos internos, seguidos de un amarillamiento y necrosis a lo largo de los bordes de las hojas. El organismo causal aislado de plantas enfermas se identificó como *P. fluorescens*, basado en pruebas bioquímicas y fisiológicas, lo cual fue confirmado por la composición celular de ácidos grasos y el análisis de la secuencia del ARNr 16S. Este constituyó el primer informe de la enfermedad bacteriana en ajo, causada por *P. fluorescens* en la República Popular China (11).

Todas estas publicaciones muestran la patogenicidad de una bacteria que ha sido mayoritariamente conocida como agente de control biológico o promotora del crecimiento en las plantas. Aunque la mayoría de los autores aún no depositan sus secuencias de referencia en alguna base de datos, como el NCBI en Estados Unidos, The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), y el DNA Data Bank of Japan (DDBJ), se infiere que se trata de la misma especie.

## CONCLUSIONES

La utilización de bacterias endofíticas, como control biológico de diversos patógenos, tiene una gran relevancia en la agricultura actual por la creciente necesidad de disminuir el uso de plaguicidas en los sistemas de producción agrícola.

*P. fluorescens* como PGPR son muy utilizadas en diversos cultivos, pues colonizan las raíces de los mismos, promueven el crecimiento y previenen el establecimiento de patógenos. También favorecen la capacidad de absorción de agua y nutrientes, lo que permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas.

Recientemente, se ha encontrado a esta bacteria como patogénica de diversas plantas, por lo que debe continuar el estudio del genoma de estos tres tipos de bacterias (patógenas, agentes de control biológico y PGPR).

## REFERENCIAS

1. Lalucat MJ, Garcia-Valdes E. DNA sequence-based analysis of the Mulet *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol.* 2010; 12(6):1513-1530.

2. Nava-Pérez E, García-Gutiérrez C, Camacho-Báez JR, Vázquez-Montoya EL. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*. 2012; 8(3): 17-29.
3. Hofte M, Altier N. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*. 2010; 161: 464-471.
4. Hernández-Rodríguez A, Ruíz-Beltrán Y, Acebo-Guerrero Y, Miguélez-Sierra Y, Heydrich-Pérez M. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 2014; 29(1): 11-19.
5. Lee KJ, Oh BT, Seralathan KK. ed. Maheshwari, D.K. Advances in Plant Growth Promoting Rhizobacteria for biological control of plant diseases. In *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*: Springer Berlin Heidelberg. 2013;1-13.
6. Showkat S, Murtaza I, Laila O, Ali A. Biological Control of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. by *Pseudomonas fluorescens* Isolated From Wheat Rhizosphere Soil of Kashmir. *J Pharm Biol Sci*. 2012; 1(4): 24-32
7. Marchi M, et al. Genomic analysis of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp with evidence of T3SS and T6SS gene expression on plant roots. *Environ Microbiol Report*. 2013; 5(3): 393-403.
8. Nour E, El-Ghiet ENA. Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* as Biological Control Agent against *Aeromonas hydrophila* Infection in *Oreochromis niloticus*. *World J Fish Marine Sci*. 2011; 3 (6): 564-569.
9. Alippi AM, López AC, Rollan MC, Ronco L, Aguilar OM. Fluorescent *Pseudomonas* species causing post-harvest decay of endives in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2002; 34(4):193-198.
10. Molan Y, Ibrahim Y. First report of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia. *Plant Disease*. 2007; 91(1):110.
11. Li B, Wang GL, Wu ZY, Qiu W, Tang QM, Xie L. First Report of Bacterial Head Rot of Broccoli Caused by *Pseudomonas fluorescens* in China. *Plant Disease*. 2009; 93(11): 1219.
12. Madigan M, Martinko J. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th ed. Prentice Hall; 2005.
13. Bergey HD, Krieg NR. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1st Ed., Vol 1, The Willians and Wikins Co., Baltimore., 1989;104-110.
14. Cornelis P. *Pseudomonas: Genomics and molecular biology*. 1st eE. Caister Academic Press; 2008.
15. Meera T, Balabaskar P. Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* from rice fields. *International Journal of Food, Agric Vet Sci*, 2012; 2 (1): 113-120.
16. Ramyasmruthi S, Pallavi O, Pallavi S, Tilak K, Srividya S. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. *Asian J. Plant Sci. Res.*, 2012, 2 (1):16-24.
17. Cruz-Quiroz R, Chávez C, Hernández M, Rodríguez R, Hernández D, Aguilar CN. Antagonist capacity of newly isolated strains of *Pseudomonas fluorescens* against three important phytopathogenic bacteria. *Am J Agric Biol Sci*. 2011; 6 (2): 267-272.
18. Arumugam K, Ramalingam P, Appu M. Isolation of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* organism from soil and their treatment against rice pathogens. *J. Microbiol. Biotech. Res*. 2013; 3 (6):77-81.
19. Wong V, Levi K, Baddal B, Turton J, Boswell TC. Spread of *Pseudomonas fluorescens* due to contaminated drinking water in a bone marrow transplant Unit. *J. Clin. Microbiol*. 2011; 49(6): 2093-2096.
20. Sajbena E, Manczinger L, Nagyb A, Kredicsa L, Vagvolgyi C. Characterization of *Pseudomonas* isolated from decaying sporocarps of oyster mushroom. *Microbiol Res*. 2011; 166: 255-267.
21. Hernández-Rodríguez A, León-Plasencia D, Rives-Rodríguez N, Díaz-de la Osa A, Almaguer-Chávez

- M, Acebo-Guerrero Y. Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas fluorescentes* con actividad antagónica ante *Curvularia* spp. Rev. Protección Veg. 2010; 25(3):181-189.
22. Guerra G, Betancourth CA, Salazar CE. Antagonismo de *Pseudomonas fluorescens* Migula frente a *Fusarium oxysporum* sp. *pisi* Schtdl en arveja *Pisum sativum* L. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica 2011;14(2):33-42.
23. Moss CW. Gas-liquid chromatography as an analytical tool in microbiology. J Chromatogr. 1981; 203:337-347.
24. Oyaizu H, Komagata K. Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. J. Gen. Appl. Microbiol. 1983; 29:17-40.
25. Stead DE, Sellwood JE, Wilson J, Viney I. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant-pathogenic bacteria. J Bacteriol. 1992; 72:315-321.
26. Kang SM, Joo GJ, Hamayun M. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. Biotech Letters. 2009; 31(2): 277-281.
27. Palleroni, N.J. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237<sup>AL</sup>. p. 322-379. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria, Springer, New York, USA. 2005;1108.
28. Case RJ, Boucher Y, Dallhöf I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S. Use of the 16SrRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73:278-288.
29. De Vos P, et al.. Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxy-ribonucleic acid: Ribosomal ribonucleic acid hybridizations. Int J Syst Bacteriol. 1989; 9:35-49.
30. Yumamoto S, Kasai H, Arnold D, Jackson RW, Vivian A, Harayama S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of 49 *gyrB* and *rpoD* genes. Microbiol. 2000; 146:2385-2394.
31. Castro GM. Estudio inicial de *Pseudomonas* fitopatógenas aisladas de daños en plantas de estropajo, pino y tomate de cultivos Veracruzanos. Tesis Trabajo de Experiencia Recepcional. Xalapa, Veracruz, México, 2012; 22-23.
32. Palleroni NJ. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies of the genus *Pseudomonas*: a personal view. Microbiol. 2003; 149:1-7.
33. Bodilis J, Hedde M, Orange N, Barry S. OprF polymorphism as a marker of ecological niche in *Pseudomonas*. Environ Microbiol. 2006; 8(9), 1544-1551.
34. Esitken A, Hilal E, Ercisli YS, Donmez MF, Turan M, Gunes A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. Sci Hort. 2010; 124: 62-66.
35. Bashan Y, Holguin G. Proposal for the division of Plant Growth Promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. Soil Biol Biochem. 1998; 30(89): 1225-1228.
36. Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature. 1980. 286: 885-886.
37. Glick BR. Review Article: Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica. 2012:1-15
38. Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. J of King Saud University - Sci. 2013: 1-20.
39. Urquiaga S, Jantalia CP, Alves BJR, Boddey RM. Importancia de la FBN en el secuestro de carbono en el suelo y en la sustentabilidad agrícola. En: Monzón de Asconegui, M., I.E. García de Salamone, S. Miyazaki (Eds.). Biología del suelo.

- Transformación de la materia orgánica. Usos y biodiversidad de los organismos edáficos. Editorial FAUBA, Buenos Aires. 2004; 1-6.
40. Caballero-Mellado J. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. Rev Latinoam Microbiol. 2006; 48 (2): 154-161.
41. Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiol. Biochem. 2004; 42:565-572.
42. Rives-Rodríguez N, Baldani V, Hernández-Rodríguez A. Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista Cubana del Arroz. 2012; 14(2):19-25.
43. Postma J, Montanari M, van den Boogert PH. Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. Eur. J. Soil Biol. 2003; 39:157-163.
44. Kah M, Brown CD. Adsorption of ionizable pesticides in soils. Rev. Environ Contam. Toxicol. 2006;188:149-217.
45. Fernández-Larrea O. Microorganismos antagonistas para el control Fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 2001;62:96-100.
46. Araya CM. Coevolución de interacciones hospedante patógeno en frijol común. Fitopatol. Bras. 2003;28:221-228.
47. Tran H, Ficke A, Asimwe T, Hofte M, Raijmakers J. Role of the Cyclic Lipopeptide Massetolide in Biological Control of *Phytophthora infestans* and in Colonization of Tomato Plants by *Pseudomonas fluorescens*. New Phytologist. 2007; 731-742.
48. Sarris PF, Scoulica EV. *Pseudomonas entomophila* and *Pseudomonas mendocina*: Potential models for studying the bacterial type VI secretion system. Infect Genet Evol. 2011;11:1352-1360.

Recibido: 9-10-2014.

Aceptado: 6-2-2015.