



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“Influencia de la rizobacterias ferriredutoras en la
disponibilidad de hierro en plantas de frijol (*Phaseolus
vulgaris* L. var. Flor de Mayo bajo)”**

Tesis

**Que para obtener el grado de Maestría en
Ciencias en Biología Experimental**

Presenta

Biol. Erasto Hernández Calderón

**Asesor
D.C Eduardo Valencia Cantero**

**Co-asesor
D.C Ernesto García Pineda**

Morelia, Michoacán Febrero de 2006

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 El hierro en el suelo	3
2.2. La captación del hierro por las plantas	5
2.2.3 Estrategas I	5
2.2.4. Estrategas II	10
2.3. La clorosis férrica en las plantas	13
2.4 La rizosfera	17
2.4.1 Efecto de los microorganismos sobre la captación de Fe	19
2.5. Reducción microbiana del hierro	21
2.5.1. El ciclo del hierro	21
2.5.2. Reducción asimilatoria de hierro	23
2.5.3. Reducción desasimilatoria de hierro	24
2.5.3.1 Reductores de Fe (III) fermentadores	25
2.6. Los microorganismos ferrireductores utilizados en el presente estudio	28
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
3.1 HIPÓTESIS	31
3.2 OBJETIVO GENERAL	31
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1 Material biológico	33
5.2 Medios de cultivo	33
5.3 Identificación de los aislados	36

5.4. Reducción del hierro en el suelo	39
5.5 Experimentos en suelo	41
5.6 Experimentos en medio nutritivo	45
5.7 Análisis estadístico	47
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
6.1 Identificación de los aislados	48
6.2 Reducción de hierro por cepas UMCV en suelo alcalino	54
6.3 Interacción planta-cepas UMCV en suelo alcalino estéril	57
6.3.1 Colonización	57
6.3.2 Biomasa	59
6.3.3 Reducción en la raíz y contenido de clorofila	61
6.3.4 Contenido de hierro	63
6.3.5 Correlación de las variables	67
6.4 Experimentos “ <i>in vitro</i> ”	69
6.4.1 Cinética de concentración de Fe (II) “ <i>in vivo</i> ”	70
6.4.2 Concentración de Fe en los tejidos.	74
6.5 Interacción frijol-UMCV1	79
6.6 El efecto promotor del desarrollo	86
7. CONCLUSIÓN	88
8. LITERATURA CITADA	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Frigura 1. La solubilidad del hierro en relación al pH	4
Figura 2. Representación esquemática de la adquisición de hierro en raíces.	6
Figura 3. Síntesis de fitosideróforos	10
Figura 4. Función del Fe en la biosíntesis de clorofila	14
Figura 5. Dependencia del pH en la actividad in vivo de la ferrico quelato reductasa de hojas de remolacha	16
Figura 6. Tasas de captación de Fe por soya y avena	20
Figura 7. La función de las ferricoquelatoreductasas en el ciclo del hierro	23
Figura 8. Modelo para la oxidación de un complejo de materia orgánica con Fe (III) sirviendo como el único aceptor de electrones	27
Figura 9. Reducción de citrato Fe (III) por aislados ferrireductores	28
Figura 10. Reducción del citrato ferrico por organismos rizosfericos	29
Figura 11. Análisis elemental del suelo de el Lometon municipio	34
Figura 12. Curvas patrón.	40
Figura 13. Curva patrón de Fe (II) visual	46
Figura 14. Árbol filogenético inferido a partir de secuencias de 16S rRNA para las cepas UMCV1 y UMCV2	50
Figura 15. Árbol filogenético de las cepas UMCV3 y UMCV4	53
Figura 16. Reducción de Fe (III) presente en el suelo por diferentes cepas UMCV	56
Figura 17. Cinética de colonización de las raíces de frijol por cepas UMCV	58
Figura 18. Reducción de Fe (III)-Citrato por cepas rizosfericas UMCV	62
Figura 19. Contenido de clorofila total en hojas jóvenes de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> v. Flor de Mayo Bajio)	63
Figura 20. Contenido de hierro total en plantas tratadas con cepas ferrireductoras UMCV	65
Figura 21. Visualización de la reducción.	70
Figura 22. Cinética de concentración de Fe (II).	73
Figura 23 Capacidad de amortiguamiento del suelo del Lometón y el medio mineral	77
Figura 24. Cambios en la arquitectura de la raíz de plantas de frijol inoculadas con	

cepas UMCV	78
Figura 25. Cinética de concentración de Fe (II)	80
Figura 26. Contenido de hierro total y clorofila en plantas tratadas con la cepa ferrirreductora UMCV1	81
Figura 27. Biomasa de plantas de frijol	82
Figura 28. Cambios en el crecimiento vegetal de plantas de frijol inoculadas con la cepa UMCV1	83
Figura 29. Visualización de la reducción y desarrollo vegetal de plantas control sin inocular y tratadas con la cepa UMCV	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes involucrados en las respuestas de captación de hierro en la raíz	12
Tabla 2. Efecto de la población microbiana sobre la captación y removilización de Fe en Maíz y avena	19
Tabla 3. Tasas de captación y removilización de ⁵⁵ Fe en plantas de maíz Fe-suficiente (+Fe) y Fe-deficiente (-Fe)	21
Tabla 4. Antibiograma para las cepas UMCV	44
Tabla 5. Distribución de las variables cuantificadas en suelo estéril	47
Tabla 6. Acciones del GENE BANK para las secuencias UMCV	48
Tabla 7. Alineamientos más significativos obtenidos por análisis BLAST	49
Tabla 8. Biomasa de frijol tratadas con cepas UMCV	60
Tabla 9. Correlación múltiple de las variables analizadas	68
Tabla 10. Contenido de Fe en plantas tratadas con cepas UMCV crecidas en medio mineral	75

1. INTRODUCCIÓN

La deficiencia de hierro aflige a más de tres mil millones de personas en todo el mundo, en especial en los países en vías de desarrollo y las plantas son la principal fuente de hierro en la mayoría de las dietas (Robinson *et al.* 1999). El cuerpo humano requiere hierro para la síntesis de proteínas que transportan oxígeno (hemoglobina y mioglobina) y para la formación de enzimas tipo hemo y otras enzimas que contienen hierro que son particularmente importantes para la producción de energía, respuesta inmune y función de la tiroides (Frossard *et al.* 2000).

El hierro es el elemento más abundante en el planeta; ocupa el cuarto lugar como constituyente de las rocas de la corteza terrestre (Guerinot y Yi 1994). El contenido promedio de hierro en los suelos varía entre 2% y 6% (Clark 1991); no obstante, la proporción de hierro soluble es extremadamente baja, debido a la cual la deficiencia de hierro es la más extendida de las deficiencias minerales de las plantas por micronutrientes y es considerada como una de las más difíciles de corregir (Bates 1982). La participación del hierro en diversas fases anabólicas de la biosíntesis de clorofila y en el mantenimiento del sistema captador de energía luminosa, hacen de la clorosis y de la disminución de la capacidad fotosintética los síntomas más evidentes de la deficiencia de Fe en las plantas (Hernández *et al.* 1996).

La baja solubilidad del hierro en suelos con pH neutros y alcalinos y la oxidación de este elemento en condiciones aeróbicas (Mengel 1994, Conolly *et al.* 2003) limita la disponibilidad de este elemento y ha sido una presión selectiva que ha permitido a las plantas evolucionar dos distintos mecanismos de captación de hierro conocidos como estrategias I y II. De manera general las plantas con estrategia II utilizan la quelación de Fe(III) por medio de la liberación de fitosideróforos (Römheld 1987, Curie *et al.* 2001). Las especies de plantas que muestran estrategia de tipo I, reducen Fe(III) a Fe(II) antes de captarlo, además de una liberación al medio de protones por medio de una H⁺-ATPasa (Römheld 1987).

Las rizobacterias ferriredutoras en interacción con el frijol

En México se calcula que entre un 50% a 60% del territorio posee características potenciales para que los cultivos manifiesten clorosis por deficiencia de hierro (Lee *et al.* 1999). En las áreas agrícolas del norte del país se han detectado disminuciones de rendimiento de hasta un 80 % en cultivos de soya, sorgo, maíz, cacahuate, nogal y papa, llegando en algunos casos al extremo de tener que abandonar extensas áreas productivas por esta causa y/o sembrar cultivos tolerantes como chile, alfalfa, etc. (Lee y Lerma, 1991). El frijol es un cultivo importante para México, se trata de una leguminosa que forma parte de la dieta básica de los mexicanos y de muchos latinoamericanos (Hernández *et al.* 1996). Debido a que las semillas de frijol contienen son una fuente importante de proteínas y minerales en especial de hierro se necesitan elevadas cantidades de este elemento en el momento del desarrollo de la semilla (Moraghan *et al.* 2002).

Las plantas toman la mayoría de los nutrientes de la rizosfera donde interactúan los microorganismos con los fotosintatos exudados por la raíz. Esta interacción tiene un efecto directo o indirecto sobre la adquisición de nutrientes requerido para el crecimiento vegetal (Dakora y Phillips 2002). El papel atribuido a los microorganismos en la captación de Fe por las plantas se basa en el hecho de que estos producen sideróforos que quelan Fe y el complejo Fe-sideróforo puede ser captado por las plantas. Sin embargo en la rizosfera habitan una gran cantidad de microorganismos que reducen hierro, se podría esperar que este proceso pueda tener un efecto sobre la captación de este elemento por parte de las plantas debido al hecho que el hierro reducido es más soluble y que además en las plantas con estrategia I la reducción de Fe(III) es un paso necesario y obligado antes de la captación de este elemento por parte de las raíces (Römheld 1987).

2. ANTECEDENTES.

2.1 El hierro en el suelo

El hierro ocupa cerca del 5% del peso de la corteza terrestre y se encuentra invariablemente presente en todos los suelos. La mayor parte del hierro del suelo se encuentra en capas de numerosos minerales. Los minerales primarios en los cuales el hierro está presente incluyen los silicatos ferromagnesianos como al olivita, augita, hornobleda y biotita, por humedecer esos óxidos de hierro se forman la geotita, hematina y el ferrihidrato. La solubilidad de esos óxidos de Fe(III) es extremadamente baja. La geotita es el mineral con Fe más abundante en los suelos (Mengel y Kirkby 2001)

La concentración del Fe soluble en los suelos es extremadamente baja en comparación con la concentración total de Fe. Las formas inorgánicas solubles incluyen el Fe(OH)_2 , Fe(OH) y el Fe^{2+} . En suelos bien aireados, el Fe^{2+} contribuye poco a el total de Fe orgánico soluble. La solubilidad del hierro está grandemente controlada por la solubilidad del Fe(III) óxidos de la siguiente manera (Lindsay y Schwab1982):



El equilibrio es por mucho a favor de Fe(OH)_3 la precipitación es altamente dependiente del pH y la actividad del Fe^{3+} cae cuando se incrementa el pH. A altos niveles de pH la actividad del Fe^{3+} en solución disminuye 1000 veces por cada unidad de pH que aumente (Ver figura 1). En el rango de pH de 7-9 Fe(OH)_2^+ , Fe(OH)_4^- , y el Fe(OH)_3 se forman. El nivel de solubilidad alcanza un mínimo en el rango de pH de 7.4- 8.5. Los suelos ácidos tienen relativamente más altas cantidades de Fe soluble que los suelos calcáreos donde los niveles son extremadamente bajos (Lindsay y Schwab1982)

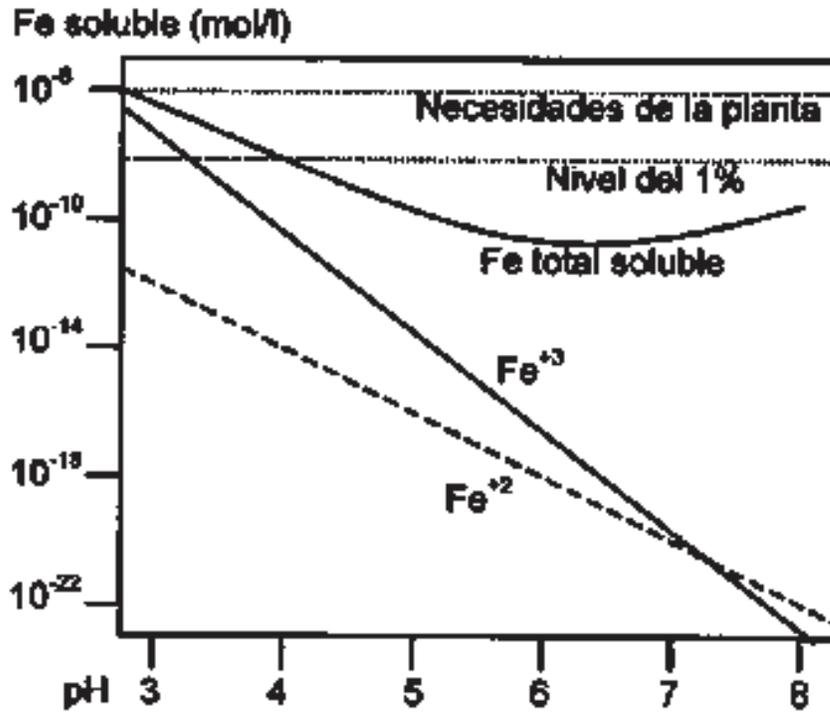


Figura 1. La solubilidad del hierro en un suelo bien aireado en relación al pH. Las líneas punteadas indican el 100% y el 1% de los requerimientos de hierro por las plantas (Lindsay 1974).

Aunque abundante en la corteza terrestre el hierro es extremadamente insoluble en ambientes óxicos (oxigenados) y esta presente principalmente como oxihidratos de baja solubilidad. Se ha determinado que altos niveles de bicarbonato a menudo disminuyen la actividad de las especies de Fe por debajo de los requerimientos de las plantas (Schmidt 2003). El hierro es un elemento esencial y debe ser incorporado como cofactor dentro de hemo-proteínas, proteínas hierro-azufre y otras enzimas que contienen hierro, también es esencial para la síntesis de clorofila (Sparla 1997, Mori 1999). Tomando en cuenta los mecanismos de captación de hierro y las respuestas fisiológicas a la deficiencia de hierro, las plantas pueden ser clasificadas dentro de dos grupos: (a) Estrategas I, que incluyen especies dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas y (b) Estrategas II, que incluyen especies de Graminaceae (Römheld 1987, López-Millan *et al.* 2000) las características particulares de cada uno de los mecanismos de captación de hierro se describen a continuación.

2.2. La captación del hierro por las plantas

2.2.3 Estrategias I

La existencia en las raíces de plantas dicotiledones de la reducción de hierro de Fe(III) a Fe(II) como un paso obligatorio antes de la captación de hierro por las raíces fue demostrado primeramente por Chaney *et al.* (1972). Se ha acumulado evidencia en la actualidad que demuestra que la reducción del hierro ferrico a hierro ferroso por la ferrico quelato reductasa (FQ-R) es el paso limitante en la tasa de captación del hierro ((Moog y Brüggemann 1994, Grusak 2000, 1990, Conolly *et al.* 2003)

Todas las plantas (especies monocotiledóneas y dicotiledóneas) a excepción de las gramíneas utilizan esta estrategia para adquirir Fe y es similar al utilizado por *Saccharomices cerevesiae*. Consiste de una reducción inicial del Fe(III) en la parte externa de la membrana de la raíz llevada a cabo por una proteína: La Fe(FQ-R), seguida por el transporte de Fe(II) a través de la membrana celular de la epidermis de la raíz (figura 2). Tanto la actividad y expresión de la Fe(FQ-R) y las actividades de transporte de Fe(II) se encuentran aumentadas cuando existe una deficiencia de Fe en el suelo (Fox y Guerinot 1998). El aumento en la reducción del Fe(III) bajo condiciones de estrés por deficiencia de este elemento es la característica más típica de las plantas con estrategia I. La reducción neta de Fe(III) esta fuertemente limitada en pH altos debido a la inhibición de la FQ-R y la autooxidación del Fe(II). Como consecuencia, las plantas que presentan estrategia I a menudo muestran síntomas de clorosis férrica cuando crecen en suelos calcáreos (alcalinos), especialmente a altas concentraciones de HCO_3^- ya que tienen una fuerte capacidad de amortiguar el pH (Römheld 1987, Lee *et al.* 1998).

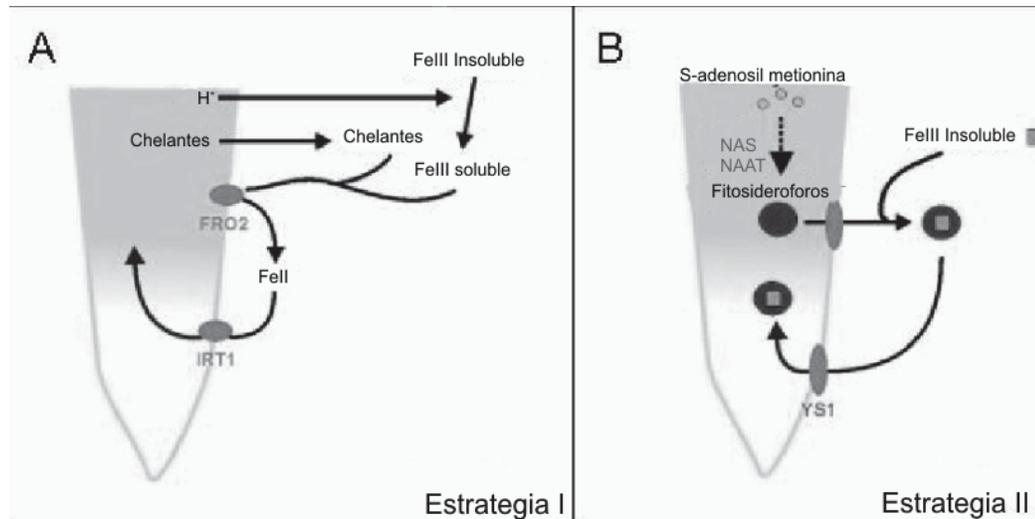


Figura 2. Representación esquemática de la adquisición de hierro en raíces o pelos radiculares bajo deficiencia de hierro. (A) Estrategia I de dicotiledóneas y monocotiledóneas con excepción de gramíneas. La deficiencia de hierro causa extrusión de protones (H^+), secreción de pequeñas moléculas orgánicas quelantes para solubilizar $Fe(III)$. El $Fe(III)$ es reducido por la FRO2 a $Fe(II)$ y posteriormente captado por el transportador IRT1 presente en la epidermis de la raíz. (B) Estrategia II de la familia Gramíneas. Los fitosideróforos son sintetizados vía la acción de la nicotianamina sintasa, nicotianamina aminotransferasa y algunas otras enzimas y son secretados en la rizosfera, después de quelar $Fe(III)$ el complejo fitosideróforo- $Fe(III)$ es captado dentro de la raíz vía el transportador YS1 (Bauer y Berczky 2003).

La reducción enzimática puede ser de quelatos de hierro ($FeCH$) de origen natural o sintético, así como de aceptores de electrones no fisiológicos con altos potenciales redox, como la ferricianida ($FeCN$). En esta actividad de reducción de hierro se transfieren electrones de dinucleótidos piridina a el apoplásto. Las plantas hierro eficientes se caracterizan por la capacidad para crecer en bajas concentraciones de hierro en el suelo (Moog y Brüggemann 1994).

Hay grandes diferencias entre plantas en cuanto a la concentración de Fe a la cual la deficiencia incrementa la tasa de reducción. Algunos organismos con estrategia II como el pasto *Hordeum vulgare* también muestran una actividad *in vivo* de reducción de $FeEDTA$,

sin embargo esta actividad no se induce por la deficiencia de Hierro. (Moog y Brüggemann 1994).

Las especies de plantas que muestran estrategia de tipo I, tienen al menos tres componentes adaptativos: 1) cuando tienen una deficiencia de hierro se induce o se incrementa un sistema de reducción de Fe(III) a Fe(II) en la raíz con una captación preferencial de Fe(II), 2) una extrusión de H⁺ que promueve tanto la solubilización de Fe(III) como el funcionamiento de la FQ-R, debido a que el pH óptimo para esta enzima es entre 5.5 y 6.5 y 3) en ciertos casos la liberación de sustancias reductoras o quelantes, principalmente compuestos fenólicos, por las raíces. La importancia relativa de los tres componentes parece diferir considerablemente entre especies de plantas y genotipos (Römheld 1987, Maschner y Römheld 1994, Curie y Briat 2003)

Basados en datos obtenidos sobre raíces intactas, Bienfait (1985) demostraron la existencia de dos tipos de sistemas redox unidos a la membrana plasmática llamados “Estándar” y “Turbo” (Moog y Brüggemann 1994). En su definición el sistema “Estándar” puede reducir aceptores de electrones externos con altos potenciales redox. Es constitutivo en todas las plantas y no reduce quelatos de hierro con bajos potenciales redox (ca.+100-+250 mV). La función biológica del sistema estándar puede ser diferente de la captación de hierro, como la modulación del potencial de membrana o la producción de especies reactivas de oxígeno (Moog y Brüggemann 1994, Susín *et al.* 1996).

El sistema “Turbo” es una FQ-R transmembranal, que es inducida por la deficiencia de hierro en la epidermis de raíces jóvenes de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas que no son gramíneas. Esta enzima reduce tanto ferricianida y quelatos de hierro extracelulares con electrones que se provenientes del NADPH citoplasmático. El incremento en 10 ordenes de magnitud en la reducción de los quelatos de hierro de raíces intactas de frijol crecidas bajo deficiencia de hierro permite la expresión del sistema “Turbo” (Moog y Brüggemann 1994, Susín *et al.* 1996). La función fisiológica es

definitivamente un mecanismo para incrementar la concentración de Fe(II) en la superficie celular para la captación por parte de las raíces (Moog y Brüggemann 1994).

Con respecto al gen que codifica la Fe(FQ-R), Robinson *et al.* (1999) aislaron el gene FRO2 en *Arabidopsis thaliana*, FRO2 pertenece a una superfamilia de flavocitocromos que transportan electrones a través de las membranas. Se predice que FRO2 codifica un polipéptido de 725 aminoácidos con sitios de conservados de unión a FAD y NADH. FRO2 tiene seis dominios hidrofóbicos dentro de su región amino-terminal, adicionalmente tiene 2 dominios también hidrofóbicos dentro de la región carboxi-terminal, los cuales forman las hélices transmembranales. Esto sugiere que en una región intracelular de FRO2, que contiene los sitios probables de unión al cofactor están anclados en ambos extremos de los espacios membranales. Dos pares de residuos de histidina que coordinan el grupo hemo en FRO2 descansan sobre dos hélices transmembranales y están en localizaciones equivalentes a los residuos His en los miembros de la superfamilia FRE1 y gp91phox (Robinson *et al.* 1999). El gene FRO2 pertenece a una familia de genes de 8 miembros en *Arabidopsis*; los otros 7 genes *FRO* no han sido funcionalmente caracterizados (Yi y Guerinot 1996, Robinson *et al.* 1999, Vert *et al.* 2002).

Una vez que el hierro es captado por las por las células de las raíces debe ser transportado a las diferentes partes de la planta. El Fe es probablemente transportado como Fe(III) en el xilema acompañado con citrato u otras especies aniónicas. Después que el Fe(III) llega al apoplásto de la hoja, este debe cruzar varios sistemas de membranas, incluyendo las de las células del mesófilo y cloroplastos. Se sabe poco acerca de cómo el Fe(III) puede ser captado por las células del mesófilo (González-Vallejo *et al.* 2000).

Los genes de *Arabidopsis* IRT1 y IRT2 pertenecen a una gran familia de transportadores de metales llamada ZIP. La expresión de estos genes se induce cuando las raíces se someten en condiciones de crecimiento sin hierro. Ver *et al.* (2001) demostraron que una mutante en el gen *IRT1* en *Arabidopsis* muestra un aspecto clorótico y tiene severos defectos de crecimiento en el suelo, llegando a la muerte. Este defecto es

restablecido con la aplicación de hierro. Las plantas mutantes no toman hierro y son defectuosas para acumular otros cationes divalentes en condiciones de bajo hierro. Mediante una fusión del IRT1-Proteína verde fluorescente (GFP), se observó una expresión transitoria localizada en la membrana plasmática. Estos autores, también demostraron a través de un análisis con plantas transgénicas con el gen reportero GUS e hibridación *in situ* que, *IRT1* se expresa en la capa celular externa de las raíces, específicamente en condiciones de deficiencia de hierro. Los resultados demuestran que el IRT1 es el principal transportador responsable de la captación de metales de alta afinidad en condiciones de deficiencia de hierro (Vert *et al.* 2002).

Curie *et al.* (2000), reportaron la secuencia de cinco proteínas NRAMP en *A. thaliana* en sus resultados destaca la secuencia de AtNRAMP1 que es capaz de complementar una levadura mutante (*fet3fet4*) defectuosa en la captación de hierro, además el transcrito de AtNRAMP1 se acumula en las raíces pero no en las hojas en respuesta a la deficiencia de hierro. Finalmente, la sobreexpresión de AtNRAMP1 en plantas transgénicas de *A. thaliana* incrementa la resistencia de las plantas a concentración de de hierro tóxicas.

Adicional a las respuestas fisiológicas consideradas anteriormente se sabe que las plantas crecidas en condiciones limitantes de hierro cambian la morfología radicular. Los nutrientes como el nitrato, fosfato y hierro actúan como señales que pueden ser percibidas por las plantas. Esas señales disparan mecanismos moleculares que modifican la división celular y los procesos de división celular dentro de la raíz y tienen un profundo impacto sobre la arquitectura de la raíz. Importantes procesos de desarrollo, como la formación de pelos radiculares, crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales son particularmente sensibles a los cambios en las concentraciones internas y externas de nutrientes. Las respuestas de la arquitectura de la raíz a los nutrientes puede ser modificada por reguladores del crecimiento vegetal, como las auxinas, citocininas y etileno, sugiriendo que el control nutricional del desarrollo de la raíz puede estar mediado por cambio en la síntesis de hormonas (López-Bucio *et al.* 2003).

2.2.4. Estrategas II

Las plantas con estrategia II liberan fitosideróforos, que son ligandos de bajo peso molecular específicos para el Fe(III) en respuesta a la deficiencia de hierro. Son aminoácidos no proteínicos sintetizados a partir de la metionina vía nicotianamida (NA) para dar ácidos mugineicos (figura 3), que quelan eficientemente Fe(III) mediante los grupos amino y carboxilo (Higuchi 1999). Se piensa que el complejo Fe(III)-ácido mugineico que se internaliza por un sistema específico de transporte. Una estrategia similar de quelación es usada por una amplia variedad de bacterias y hongos (Fox y Guerinot 1998)

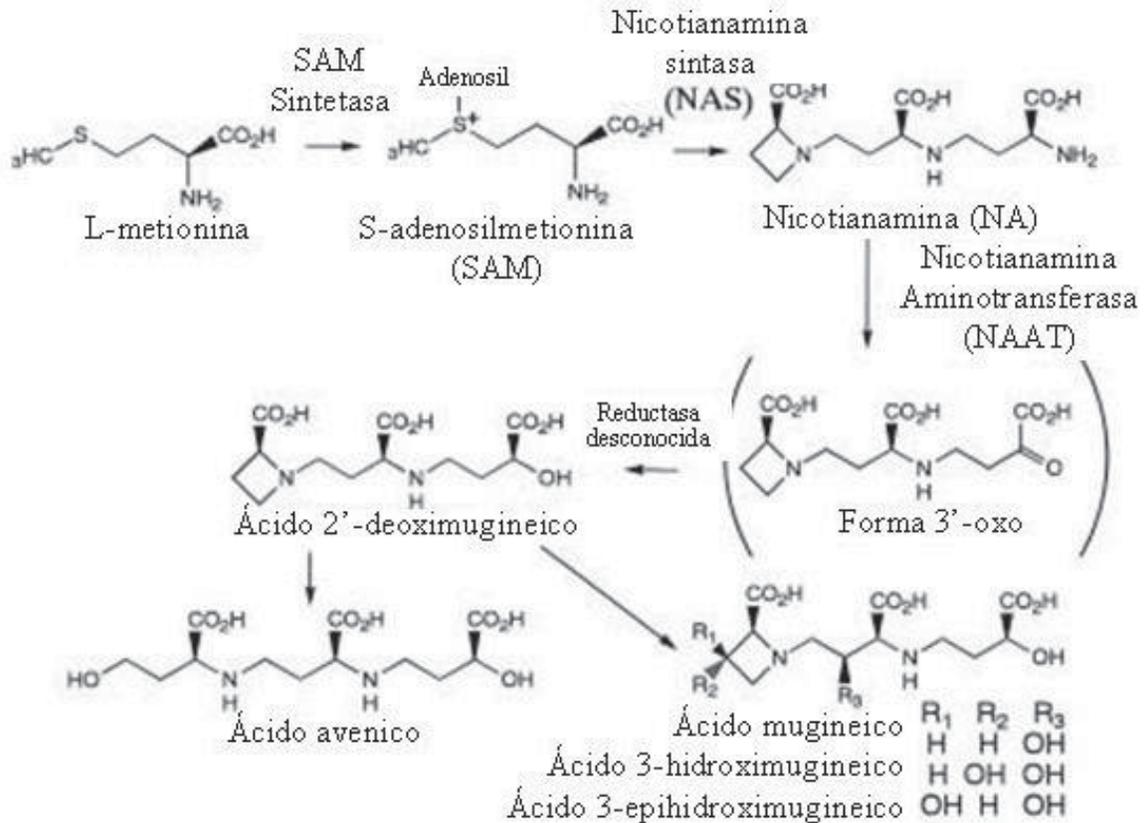


Fig. 3.- Síntesis de fitosideróforos (Higuchi 1999)

A pesar de que la adquisición de Fe por las gramíneas por medio de fitosideróforos es altamente específica, algunas consideraciones críticas se deben de tomar en cuenta debido a que la función de los fitosideróforos también forma complejos con otros

nutrimentos y pueden ser metabolizados por microorganismos de la rizosfera (Awad *et al.* 1994)

Con respecto al transportador del complejo Fe(III)-fitosideróforo se conoce que la mutante “yellow stripe” en maíz, deficiente en la producción de la proteína transmembranal YS1, es también deficiente en la captación de este complejo, por lo tanto YS1 ha sido sugerido como el transportador de Fe(III)-fitosideróforo. Curie *et al.* (2001) demostraron que YS1 regula la captación de hierro. La expresión de YS1 en una levadura mutante deficiente en la captación de Fe reestablece el crecimiento específicamente en un medio con Fe(III)-fitosideróforo. Bajo condiciones de deficiencia de Fe, el RNA mensajero de *ysl* se incrementa en raíces y brotes.

Recientemente Bauer y Berezky (2003) destacan de manera resumida los genes que codifican los componentes estructurales de las plantas con estrategia I y II que has sido descritos usando técnicas moleculares, genéticas y bioquímicas y se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Genes involucrados en las respuestas de captación de hierro en la raíz

Función del producto génico	Nombre	Organismo	Función del producto génico en la captación de hierro	Métodos para la identificación del gen	Regulación genética en respuesta al suplemento de hierro
Ferrico quelato reductasa	<i>Atfro2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hierro reductasa en estrategias I	Genética directa, Gen candidato	Inducción en raíces -Fe
	<i>Psfro1</i>	<i>Pisum sativum</i>	Hierro reductasa	Candidate approach, complementación en levaduras	Inducción en raíces y hojas -Fe
Transportadores ZIP	<i>Atirt1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transportador de Fe II en la epidermis de la raíz de estrategias I	Complementación en levaduras, genética reversa	Sobre-regulación en raíces -Fe
	<i>Atirt2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato, identificación, complementación en levaduras	Sobre-regulación en raíces -Fe
	<i>Leirt1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato, complementación en levaduras	Sobre-regulación en raíces -Fe
	<i>Leirt2</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato, complementación en levaduras	Expresión similar en raíces +/- Fe
	<i>Psirt1</i>	<i>Pisum sativum</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato	Inducción en raíces -Fe
	<i>Osirt1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato, complementación en levaduras	Inducción en raíces -Fe
Transportadores NRAMP	<i>Atnramp 1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato, complementación en levaduras	Sobre-regulación en raíces -Fe, baja expresión con sobre-regulación en hojas -Fe
	<i>Atnramp 3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato, complementación en levaduras	Sobre-regulación en raíces y hojas -Fe
	<i>Atnramp 4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato, complementación en levaduras	Sobre-regulación en raíces y hojas -Fe
	<i>Lenramp 1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Supuesto transportador de hierro (metal)	Gen candidato	Sobre-regulación en raíces -Fe
	<i>Lenramp 3</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Supuesto transportador de hierro (metal)	Gen candidato	Expresión similar en raíces y hojas +/- Fe
	<i>Osnramp 1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Transportador de hierro (metal)	Gen candidato, complementación en levaduras	No analizado
	<i>Osnramp 3</i>	<i>Oryza sativa</i>	Supuesto transportador de hierro (metal)	Gen candidato	No analizado
Transportadores YSL	<i>Zmys1</i>	<i>Zea mays</i>	Transportador de Fe III-fitosideróforo en estrategias II	Genética directa, complementación en levaduras	Inducción en raíces y hojas -Fe
Transportadores MATE	<i>Atfrd3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Supuesto transportador	Genética directa	Débil sobre-regulación en raíces -Fe
Nicotianamina sintasa	<i>Lechl</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Nicotianamina sintasa	Genética directa, ensayos enzimáticos	Expresión similar en raíces y hojas +/- Fe
	<i>Hvns</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Nicotianamina sintasa en estrategias II	Purificación enzimática	Inducción en raíces -Fe
	<i>Osnas</i>	<i>Oryza sativa</i>	Nicotianamina sintasa	Candidate approach	Inducción en hojas y raíces -Fe, expresión basal
Síntesis de fitosideróforos	<i>Hvnaata</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Nicotianamina aminotransferasa en estrategias II	Purificación enzimática	Inducción en raíces -Fe
	<i>Hvnaatb</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Supuesta dioxigenasa	Mapeo, escrutinio diferencial de biblioteca de cDNA	Inducción en raíces -Fe
Reguladores	<i>Lefer</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Regulador en estrategias I, supuesto factor de transcripción	Genética directa	Expresión similar en raíces y hojas +/- Fe

2.3. La clorosis férrica en las plantas

El hierro es un elemento esencial requerido para la respiración, fotosíntesis, síntesis de DNA, síntesis de clorofila, fijación de nitrógeno, y producción de hormonas (Vert *et al.* 2002). Como se ha mencionado, la abundancia de hierro en los suelos es suficiente para sostener un crecimiento vegetal normal sin embargo en la mayoría de los suelos el hierro se encuentra comúnmente como polímeros oxihidróxidos, óxidos, fosfatos y otros complejos insolubles de composición general FeOOH . En ambientes aeróbicos el Fe(III) libre se encuentra a una concentración aproximada de 10^{-17} M, un valor que por abajo del requerido para el óptimo crecimiento de las plantas. En condiciones anaeróbicas en suelos ácidos puede haber una sobrecarga celular de hierro que causa serio daño a las plantas debido a que el hierro libre cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno (Ver *et al.* 2002)

La clorosis férrica en las plantas cultivadas y árboles frutales es un desorden nutricional que afecta a una gran variedad de cultivos en todo el mundo. Es un viejo problema ya que desde 1907 Molz describió sus características (Mengel 1994). Este problema ha sido extensamente documentado (Chen *et al.* 1994, Wei *et al.* 1994, Mengel 1994, Tagliavini y Rombolà 2001, Ver *et al.* 2002). En años recientes, un número creciente de trabajos se han realizado acerca de la disponibilidad de hierro en los suelos y la adquisición de este elemento por las raíces de las plantas. Sin embargo los factores que afectan y determinan a la clorosis férrica, no están completamente entendidos y hasta ahora los medios disponibles para corregir la clorosis férrica en el campo no son completamente satisfactorios (Mengel 1994).

En casos severos de deficiencia por hierro el resultado es una pérdida económica muy elevada. La deficiencia de hierro se caracteriza por un amarillamiento de las hojas jóvenes, mientras las hojas más maduras frecuentemente son verdes, y el crecimiento a menudo se encuentra disminuido, independientemente si las hojas son verdes o cloróticas (Gruber y Kosegarten 2002). El amarillamiento se debe a una disminución en la síntesis de clorofila. La vía metabólica involucrada en la síntesis de clorofila es ilustrada en la figura 4.

La misma vía es también operativa para los grupos hemo. Se ha observado que en plantas con deficiencia de Fe hay una disminución en la tasa de condensación de glicina y succinil CoA para formar el ácido amino laevulinico (ALA) que es el precursor de las porfirinas incluyendo la clorofila. Millar *et al.* (1982) menciona que la tasa de formación de ALA esta controlada por el Fe, mientras que Machold y Stephan (1969) reportaron que el Fe es también necesario en el paso de oxidación de coproporfirinogeno en la síntesis de clorofila.

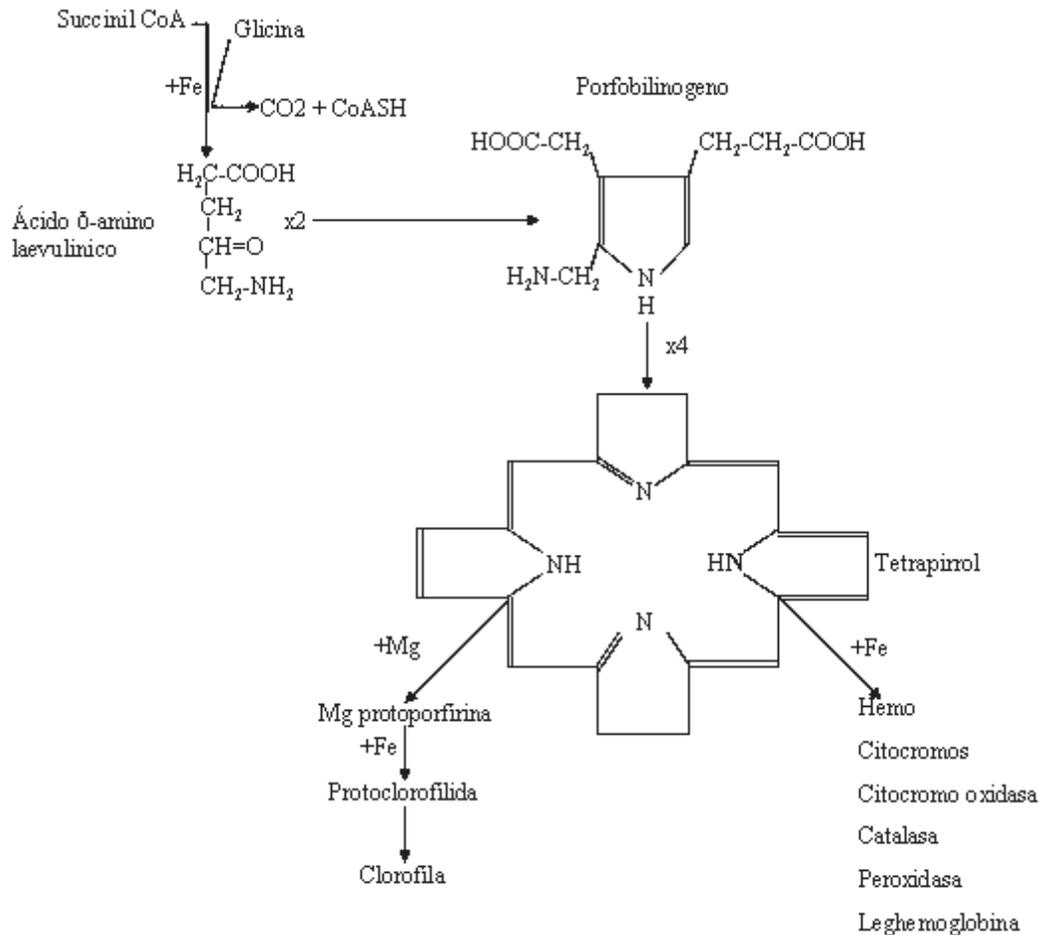


Figura 4. Función del Fe en la biosíntesis de clorofila y enzimas que contienen grupos hemo (Mengel y Kirbby 2001)

En muchos casos las hojas de plantas Fe-deficientes tienen concentraciones totales de Fe similares a las encontradas en las hojas de las plantas Fe-eficientes, a lo que se le llama clorosis paradójica (Abadía 1992). Debido a esta razón Mengel (1994) hipotetizó que la clorosis por deficiencia de hierro en plantas crecidas sobre suelos calcáreos no es causada

por la baja adquisición de hierro, sino por una restringida removilización del hierro desde el apoplásto de la raíz al apoplásto de la hoja y del apoplásto de la hoja al simplásto de la misma. Esta situación aplica tanto a estrategias I como estrategias II.

Para formular esta hipótesis Mengel se apoyó en resultados de algunos autores como Schaumberger (1990) el cual creció un cultivar Fe-eficiente (Mutin) y un cultivar Fe-ineficiente (Anjou) de maíz en macetas experimentales con 6 suelos que difieren en sus características fisicoquímicas, particularmente el pH y la concentración de CaCO_3 . Los resultados destacan que la concentración de hierro en las raíces es superior a la de las hojas aún a pH altos. Otro resultado que apoya al anterior es el presentado por Mengel (1994) quien estudió plantas de durazno de España y vid de Franconia de Alemania en donde las plantas muestran una severa clorosis aun cuando las concentraciones del Fe en las raíces son elevadas.

En este mismo sentido Mengel y Geurtzem (1988) reportaron que plantas cloróticas por deficiencia de Fe, reverdecieron dentro de tres días siempre que las raíces se expusieron a una solución de amonio o agua destilada con pH 3.5. Esto significa que hay una removilización del Fe de las raíces a las partes aéreas de la planta, proceso que implica la captación de Fe por parte de la FQ-R que es dependiente de pH. El bicarbonato es un fuerte amortiguador y puede neutralizar los H^+ liberados por la bomba de protones de la membrana plasmática de la raíz que usualmente da como resultado que disminuya el pH del apoplásto, tales condiciones inhiben la actividad de la FQ-R. El paso crítico de la clorosis es la reducción de Fe(III) a Fe(II) en el apoplásto de la raíz. De aquí la importancia de esta enzima y las condiciones que influyen su actividad. El siguiente punto crítico es la removilización del Fe de la raíz a las partes aéreas y por último el paso del Fe a las células de las hojas.

Al respecto de la captación de Fe por parte de las hojas, González-Vallejo *et al.* (2000) midieron la actividad de la FQ-R de protoplastos del mesofilo de la remolacha (*Beta vulgaris* L.) en condiciones de deficiencia y óptimas de hierro. La actividad de la FQ-

R fue dependiente de la luz y del pH. Un pH superior de 6.0 disminuye marcadamente la actividad de la FQ-R en plantas hierro-suficientes y hierro-deficientes. Los datos sugieren que si el pH del espacio apoplástico es elevado permite la acumulación de pozas de Fe fisiológicamente inactivas dando origen a la clorosis.

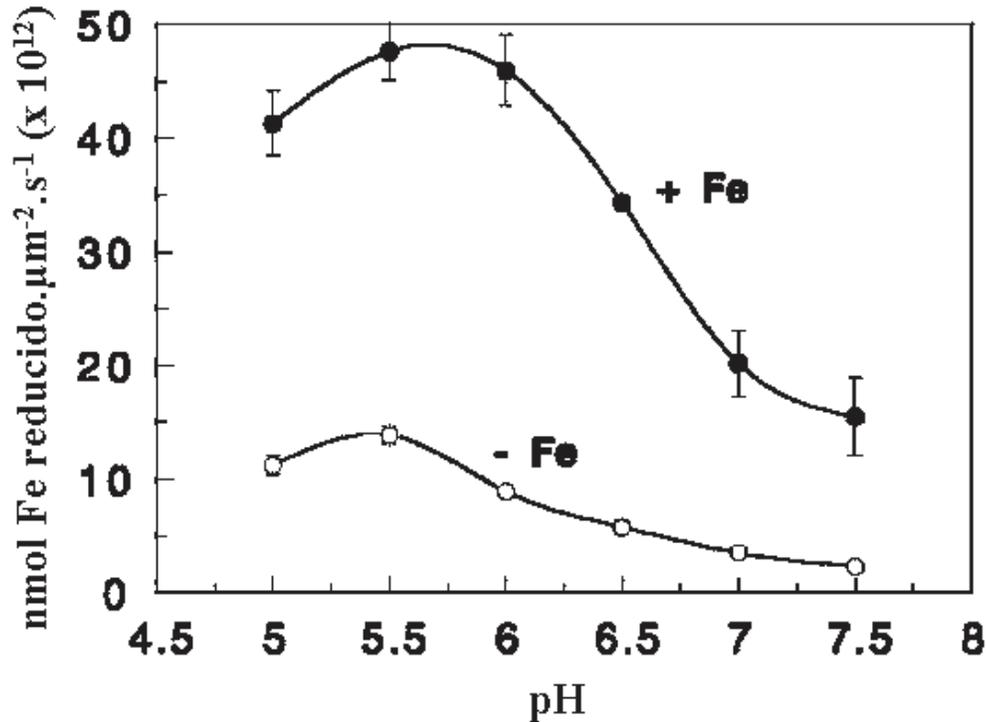


Figura 5. Dependencia del pH en la actividad medida *in vivo* de FQ-R de protoplastos aislados de hojas de remolacha con Fe-suficiente y Fe-deficiente. Las medidas fueron realizadas con 400 μM Fe(III)-EDTA como sustrato. Las muestras fueron preiluminadas con luz roja (PPFD 90 μmol m⁻² s⁻¹). Los datos son medias ± desviaciones estándar de dos experimentos con tres replicas cada uno.

2.4 La rizosfera

La inmediata vecindad de las raíces de las plantas es de particular importancia para la regulación de la nutrición vegetal. Esta parte del suelo que esta directamente influenciada por las raíces es llamada rizosfera y se extiende alrededor de 1 a 3 mm de la superficie de la raíz hacia el suelo. (Mengel y Kirbi 2001). Esta zona particular esta caracterizada por una distinta comunidad microbiana, que difiere del suelo abierto en su composición y actividad (Sharma *et al.* 2005).

Los microbios de la rizosfera y sus funciones están altamente influenciados por la raíz de la planta y a su vez las comunidades de hongos y bacterias de la rizosfera tienen un alto impacto sobre el crecimiento vegetal. Las especies vegetales que crecen en ambientes con bajos nutrientes emplean los exudados radiculares como señales para asociarse con microbios simbióticos involucrados en la nutrición vegetal (Dakora y Phillips 2002).

Una variación en la estructura de la comunidad tienen efectos sobre los procesos en los ecosistemas (reciclamiento de nutrientes, descomposición de compuestos orgánicos) o sobre la interacción planta-microorganismo (crecimiento de patógenos, liberación de rizobacterias promotoras del crecimiento o microorganismos modificados genéticamente), entender como los procesos de la comunidad bacteriana afectan los procesos que caracterizan a un ecosistema es de interés central en ecología. La cantidad y descomposición de materiales orgánicos liberados por las plantas son factores importantes que determinan la estructura y función de la comunidad microbiana en la rizosfera, la cual sufre constantes cambio bajo el efecto de los exudados de la raíz. (Jaeger *et al.*1999). Las sustancias exudadas por la raíz puede ser compleja y variada como serian mucílagos, enzimas extracelulares, deposiciones celulares de la raíz, azúcares simples y complejos, compuestos fenólicos, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, purinas, nucleósidos y moléculas inorgánicas y gaseosas como HCO_3^- , OH^- , H^+ , CO_2 , H_2 (Dakora y Phillips 2002).La diferenciación de la composición química de los exudados radiculares se encuentra relacionada a los géneros, especies, cultivares edad de la planta y las interacciones bióticas y abióticas (Patkowska 2002).Se ha demostrado que la deficiencia de hierro causa un

incremento en las concentraciones de ácidos orgánicos en las raíces, exudados del tallo y hojas de diferentes especies vegetales. El incremento en la concentración de ácidos orgánicos en las raíces de las plantas hierro-deficientes es completamente ubicuo y sucede en plantas tanto de estrategia I y II. Sin embargo en las hojas el incremento en la concentración de ácidos orgánicos no siempre ocurre y se restringe únicamente al citrato (Abadía *et al.* 2002). Los compuestos fenólicos son compuestos químicos que solubilizan Fe, P y otros nutrientes de fuentes no disponibles para la captación por las plantas. Cuando existe una deficiencia de Fe, las plantas, especialmente las dicotiledóneas liberan moléculas fenólicas que influyen la movilidad del Fe y P, como un ejemplo de esto es la liberación por parte de la alfalfa en condiciones de Fe-deficiencia de la fitoalexina isoflavonoide [2-(3,5-dihydroxyphenyl)-5,6-dihydroxybenzofuran] que disuelve fuertemente el fosfato férrico, que hace el Fe y P disponible para la utilización por las plantas y también sirve como defensa contra patógenos (Dakora y Phillips 2002).

En varias especies vegetales, la concentración de ácidos orgánicos en las raíces son más altas en los genotipos Fe-eficientes que en las Fe-ineficientes. La unión entre el incremento de la concentración de ácidos orgánicos y otras respuestas de la raíz a la deficiencia de hierro, como el aumento en la actividad de la H-ATPasa y ferrico-quelato-reductasa se han propuesto. Generalmente bajo condiciones de deficiencia de Fe en las plantas con estrategia I suceden las tres respuestas. La acumulación de ácidos orgánicos, sin embargo, no siempre se desarrolla en paralelo con el incremento en la actividad de la ferrico-quelato-reductasa y ATPasa (Abadía *et al.* 2002).

Dado que la rizosfera se caracteriza por una alta actividad biológica se considera a las rizobacterias como microorganismos que afectan la salud de la planta, su desarrollo y adaptación ambiental, de esta manera la efectiva colonización de la rizosfera por bacterias puede contribuir a los siguientes procesos: (1) causar enfermedades por patógenos de plantas, (2) controlar las enfermedades por supresión de fitopatógenos, (3) fitoestimulación, como ejemplo la promoción del crecimiento vegetal por la producción de fitohormonas, (4)

biofertilización y (5) biorremediación, ej. La degradación o inactivación de químicos peligrosos en el ambiente (Dekkers 1999, Shekcar *et al.* 2002).

2.4.1 Efecto de los microorganismos sobre la captación de Fe

El efecto de los microorganismos rizosféricos sobre la captación del Fe ha sido documentado. Existen muchos reportes que demuestran que el Fe quelado por sideróforos microbianos puede ser utilizado por las plantas (Lopper y Henkels 1999), por ejemplo la Pseudobactina de *Pseudomonas putida* sirve como una fuente de hierro para monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se encontró que la Fe-rizoferritina del hongo *Rhizopus arrhizus* es tan efectiva para remediar la clorosis como el FeEDDHA en tomate (Bar-Ness *et al.* 1992, Chen 1998, Römheld 2002).

De forma análoga a lo que sucede en plantas de estrategia II, bajo condiciones de deficiencia de Fe, muchos microorganismos producen sideróforos para la adquisición de Fe (Crowley *et al.* (1992) demostraron que cultivos no axénicos de maíz tienen tasas de captación de Fe de 2 a 34 veces mayores que plantas axenicamente crecidas suplementadas con 1 μM de Fe (tabla 2). Sin embargo es posible que los microorganismos puedan competir con las plantas por el limitado Fe disponible, contribuir en cambios de pH y potencial redox de la rizosfera (Crowley *et al.* 1992, Chen *et al.* 1998).

Tabla 2. Efecto de la población microbiana sobre la captación y removilización *in situ* en plantas de maíz inoculadas suplementadas con 1 μM de ferrioxamina B o ácido ferrico-hidroximugineico

Sideróforo	Tratamiento	Tasa de captación de hierro		Fe removilizado	
		+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
(nmol g ⁻¹ peso seco de la raíz 4h ⁻¹)					
FOB	Normal	1.6a	3.4a	0.4b	0.6b
	Inoculo de suelo	2.6a	29.4b	0.2ab	0.2ab
	<i>A. flavescens</i>	1.4a	7.2a	0.1a	0.1a
HMA	Normal	983a	1409b	228a	641b
	Inoculo de suelo	451a	895a	129a	98a
	<i>A. flavescens</i>	505a	1673b	118a	263a

Tomado de Crowley *et al.* (1992)

La utilización de materia orgánica incrementa la biomasa microbiana en cantidad y actividad. Chen *et al.* (1998), realizaron un experimento con plantas de soya y avena en una solución libre de Fe a pH 7.5. Las semillas germinadas fueron transplantadas a una nueva solución con fuentes de hierro (FeCl_3 , FeEDDHA, y Fe acompañado con quelantes producidos por microorganismos de composta (FeCCM). El peso seco de las plantas y el contenido de hierro fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) cuando el Fe fue suplementado como FeCCM que cuando el Fe se suplemento como FeCl_3 y similar a FeEDDHA (figura 6). La captación de Fe por la avena cuando fue suplementada con FeCCM fue dos veces mayor que con FeEDDHA y FeCl_3 (figura 6). Los CCM pueden unirse al Fe en condiciones un poco básicas y aumentar efectivamente la nutrición de soya y avena. Similares resultados respecto a la utilidad de la composta en la corrección o disminución de la clorosis férrica han sido obtenidos (Albuzio *et al.* 2002, D’Orazio *et al.* 2002, Carrillo-Castañeda 2002).

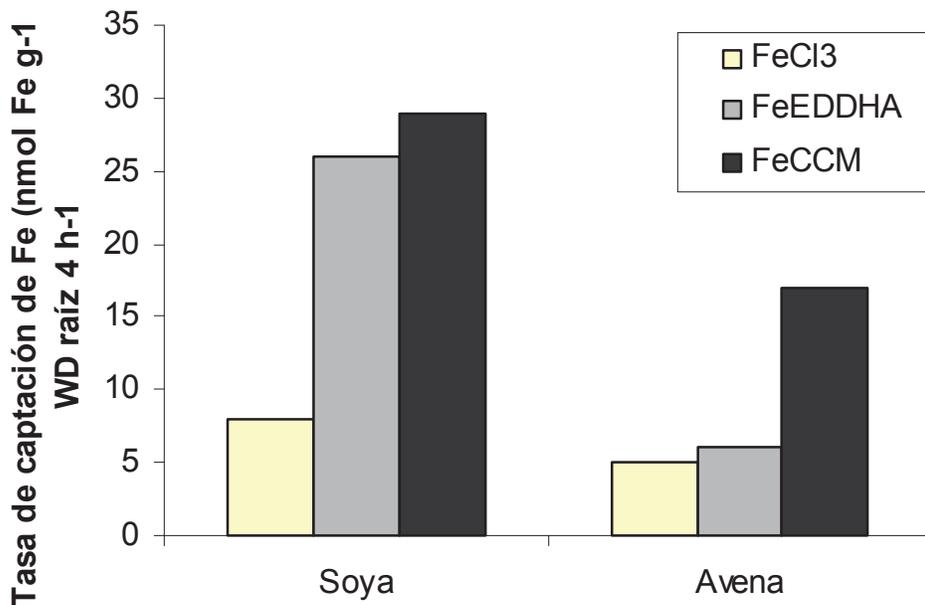


Figura 6. Tasas de captación de Fe por soya y avena suplementadas con $1\mu\text{M } ^{59}\text{FeCl}_3$, $^{59}\text{FeEDDHA}$ y $^{59}\text{FeCCM}$ a pH. 7.5. Tomado de Chen *et al.* (1998)

En contraste a los datos anteriores es posible que los microorganismos puedan competir con las plantas por el Fe disponible. Por ejemplo Becker *et al.* (1985) encontraron que la pseudobactina de *Pseudomonas* sp. B10 disminuye la captación de Fe en maíz y en chicharo. Barr-Ness (1992) encontró que cuando se suplemento a plantas de maíz con el fitosideroforo HMA (ácido epi-3 hidroximugineico) acompañado con hierro, bajo distintas densidades poblacionales de microorganismos rizosféricos en diferentes condiciones de cultivo (plantas axénicas, sin inocular o inoculadas) y encontró que al incrementar la densidad de microbiana resulta en una disminución en la tasa de captación de Fe, presumiblemente debido a la degradación del FeHMA (tabla 3).

Tabla 3. Tasas de captación y removilización de ^{55}Fe en plantas de maíz Fe-suficiente (+Fe) y Fe-deficiente (-Fe)

Tratamiento	Tasa de captación de ^{55}Fe		Tasa de removilización de ^{55}Fe		UFC mL ⁻¹
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	
FeHMA					
Sin inocular	2578 b	3465 b	1572 b	2217 b	1.8×10^3
Bacterias del suelo	1231 c	1578 c	743 c	707 c	9.0×10^9
Antibiótico	4758 a	5057 a	3257 a	3822 a	6.0×10^1

Tomado de Bar-Nes *et al.* 1992

2.5. Reducción microbiana del hierro

2.5.1. El ciclo del hierro

Las ferrico reductasa catalizan la reducción de hierro ferrico Fe(III) a hierro ferroso Fe(II). Aunque el hierro es el cuarto elemento más abundante sobre la tierra, no se encuentra fácilmente disponible en el ambiente. Mientras en suelos y ambiente sedimentarios son ricos en hierro el hierro es considerado un elemento traza en hábitats acuáticos. El hierro ferroso es liberado al ambiente a partir de los minerales que contienen hierro y que esta presente en rocas, suelos o sedimentos (figura 7). El Fe(II) es estable en condiciones anaeróbicas o ácidas, fácilmente se oxida químicamente a Fe(III) en condiciones aeróbicas a pH superiores a 5 (Schröder *et al.* 2003). El Fe(III) es también

generado por la acción de la comunidad microbiana que usa Fe(II) como donador de electrones para respirar oxígeno o nitrato, o como fuente de electrones para la fotosíntesis bajo condiciones anaeróbicas. En cada caso el Fe(III) se forma y reacciona fácilmente en ambientes húmedos para formar precipitados como hidróxidos, óxidos, fosfatos y sulfatos con muy baja solubilidad (10^{-18} M). Consecuentemente, muchos ambientes que son aparentemente ricos en hierro contienen una concentración libre de hierro de menos de 1 μ M que es considerada el umbral para sostener la vida. La disponibilidad del hierro se incrementa en ambientes que son ricos en compuestos orgánicos incluyendo sustancias húmicas. Las sustancias húmicas resultan de la incompleta degradación de compuestos orgánicos como la lignina, y pueden quelar una variedad de metales incluyendo el Fe(III). Muchos microbios secretan metabolitos intermediarios como el citrato o especialmente sintetizados como los sideróforos que quelan Fe(III) y hacen más accesible para la reducción y/o la captación celular (Guerinot 1994). La reducción de Fe(III) con el propósito de la incorporación intracelular es llamada reducción asimilatoria. En contraste la reducción asimilatoria sirve para la generación de energía como combustible para la propagación celular (Braun y Braun 2002, Visca *et al.* 2002). Ambas vías son esenciales en ciclo global de hierro (Figura 7).

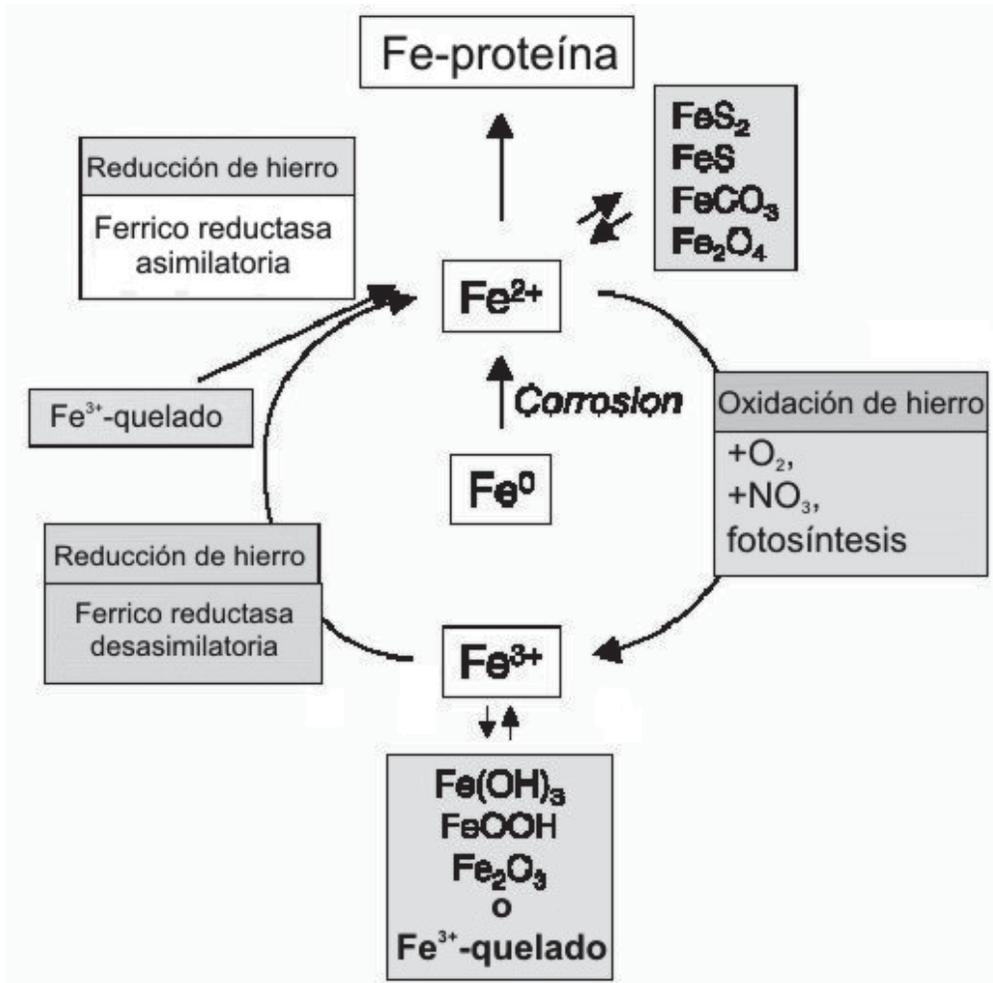


Figura 7. La función de las ferrico reductasas en el ciclo del hierro (Schröder *et al.* 2003)

2.5.2. Reducción asimilatoria de hierro

Las ferrico-reductasa son enzimas claves de la vía asimilatoria de hierro, esta vía es común en todos los organismos vivientes con excepción de un pequeño grupo de bacterias ácido lácticas homofermentativas (figura 7). Dependiendo del organismo el $Fe(III)$ quelado es reducido por una ferrico reductasa antes o después de transportarse dentro de la célula. La reducción sucede por un mecanismo, que involucra como cofactor a la flavina en procariones y al citocromo tipo-b en levaduras (Schröder *et al.* 2003).

En general la reducción del $Fe(III)$ acomplejado resulta en un débil complejo $Fe(II)$ -quelado con poca afinidad que permite la disociación del complejo y la liberación del $Fe(II)$

para el transporte o la incorporación celular. El mecanismo de quelación ocurre para el citrato y también para los sideróforos producidos por una gran diversidad de microorganismos. Como resultado de la reducción se produce Fe(II) es disponible para la incorporación celular dentro de proteínas que contienen grupos hemo o que solamente tienen hierro. El exceso de hierro es secuestrado por proteínas que almacena hierro como la ferritina y la bacterioferritina (Schröder *et al.* 2003).

2.5.3. Reducción desasimilatoria de hierro

La reducción microbiana desasimilatoria de Fe(III) influencia grandemente los ciclos biogeoquímicos del carbono y muchos metales. La reducción de Fe(III) se considera el cambio químico más importante que toma lugar en el desarrollo de los suelos anaeróbicos y sedimentos (Loneragan 1996). La reducción microbiana de Fe(III) a Fe(II) ha sido estudiada no solamente por su influencia en la geoquímica del hierro sino también porque el Fe(III) es uno de los más abundantes aceptores de electrones potenciales para la descomposición de la materia orgánica en ambientes sedimentarios (King y Garey 1999).

La reducción desasimilatoria de Fe(III) puede ser definida como el uso de Fe(III) como un aceptor externo de electrones, tanto precipitados de Fe(III) y una gran variedad de especies Fe(III) acomplejado pueden ser utilizados como aceptor terminal de electrones, como resultado de este metabolismo se genera Fe(II) y llega a ser disponible para los organismos que vivan simultáneamente con microbios respiradores de hierro (Vargas *et al.* 1998). La reducción desasimilatoria de hierro difiere de formas de reducción asimilatoria de hierro en que bajo condiciones fisiológicas normales, cantidades significativas de Fe(II) se acumulan en la parte externa de la célula. La reducción desasimilatoria de Fe(III) se encuentra exclusivamente en bacterias y arqueas especialistas y es parte esencial del ciclo de hierro (Lovley y Coates 2000).

Una amplia variedad de hongos y bacterias reducen Fe(III) bajo diferentes condiciones. Esos organismos han sido típicamente identificados como microorganismos

Fe(III) desasimilatorios de acuerdo a la acumulación de Fe(II) en cultivos bajo condiciones anaeróbicas en medio orgánicamente complejos. Alternativamente suspensiones celulares crecidas aeróbicamente han sido probadas en sus capacidades para reducir Fe(III) (Lovley 1991).

2.5.3.1 Reductores de Fe(III) fermentadores y respiradores

Los primeros organismos que utilizan Fe(III) como aceptor de electrones (así sea de forma trivial) mientras crecen en condiciones anaerobias son los organismos que tienen metabolismo fermentativo. Starkey y Halvorson (en Lovley 1991) encontraron que el Fe(III) fue reducido en cultivos anaeróbicos de *Clostridium sporogenes* o *E. coli* creciendo en un medio con glucosa o peptona, Roberts encontró que *Bacillus polymyxa* (en Lovley 1991) reduce Fe(III) mientras fermenta la glucosa. Subsecuentes estudios demostraron que una amplia variedad de microorganismos fermentativos reducen Fe(III) durante el crecimiento anaeróbico y otros microorganismos son capaces de reducir Fe(III) bajo condiciones de cultivo aeróbicos.

La reducción de Fe(III) es solamente una vía menor para el flujo de electrones en los microorganismos que se sabe reducen Fe(III) mientras metabolizan azúcares o aminoácidos fermentables. En el primer estudio cuantitativo de este metabolismo Roberts encontró que *B. polymyxa* reduce 41 moles de Fe(III) por 100 moles de glucosa metabolizada en un medio de concentración definida de glucosa-asparagina. La completa oxidación de un mol de glucosa a dióxido de carbono con Fe(III) como aceptor de electrones es como sigue (Lovley 1991):



Los productos primarios del metabolismo de microorganismos Fe(III) reductores son ácidos, alcoholes y H₂. La mayoría de los electrones transferidos al Fe(III) durante el metabolismo de azúcares y aminoácidos resulta de la oxidación de los productos de la

fermentación. Existe suficiente evidencia experimental para concluir que la reducción de Fe(III) es únicamente un proceso menor para la oxidación de la materia orgánica fue soportado por estudio en sedimentos de lagos que indican que al adicionar Fe(III) ocurren únicamente cambios menores en el metabolismo fermentativo en sedimentos a favor de la formación de más productos de fermentación oxidados (Lovley 1993). Los productos de la fermentación no parecen ser oxidados con la reducción de Fe(III). Sin embargo el asilamiento de microorganismos que pueden oxidar hidrógeno, ácidos grasos y compuestos aromáticos con el Fe(III) como el único aceptor de electrones ha permitido desarrollar un nuevo modelo que sugiere como los microorganismos Fe(III) reductores pueden completamente oxidar un complejo de materia orgánica hasta dióxido de carbono. En este modelo (Figura 8) una matriz compleja de materia orgánica es hidrolizada a pequeños componentes como azúcares, aminoácidos ácidos grasos y compuestos aromáticos a través de la actividad de enzimas hidrolíticas que producen una variedad de microorganismos. Los azúcares y aminoácidos son primeramente metabolizados por microorganismos fermentativos. Esos microorganismos fermentativos pueden reducir pequeñas cantidades de Fe(III) durante su metabolismo, de forma coordinada.

El acetato, es el más importante ácido producido durante la fermentación y puede ser oxidado por microorganismos respiradores de Fe(III) con metabolismo similar a *Geobacter metallireducens* (Lovley y Phillips 1989). El lactato y piruvato no se espera que sean importantes productos en la fermentación en sedimentos Fe(III) reductores pero cuando están presentes pueden completamente oxidarse por organismos con metabolismo similar a *Shewanella putrefaciens* (Lovley y Phillips 1989). Muchos compuesto aromáticos pueden ser oxidados directamente a dióxido de carbono con la reducción de Fe(III) por microorganismos con metabolismo similar a GS-15 (*Geobacter metallireducens*). Sin embargo algunos compuestos aromáticos, como aminoácidos aromáticos, que son fácilmente fermentables, pueden primeramente ser metabolizados por microorganismos fermentativos. Los ácidos grasos también pueden ser oxidados bajo condiciones de reducción de Fe(III) (Lovley 1991, Lovley 1993).

Este modelo es consistente con toda la información microbiológica y geoquímica disponible sobre los ambientes y microorganismos Fe(III)-reductores. La cooperación activa de microorganismos fermentativos y Fe(III)-reductores esta en concordancia con las capacidades y limitaciones metabólicas conocidas de microorganismos Fe(III)-reductores (Lovley 1991)

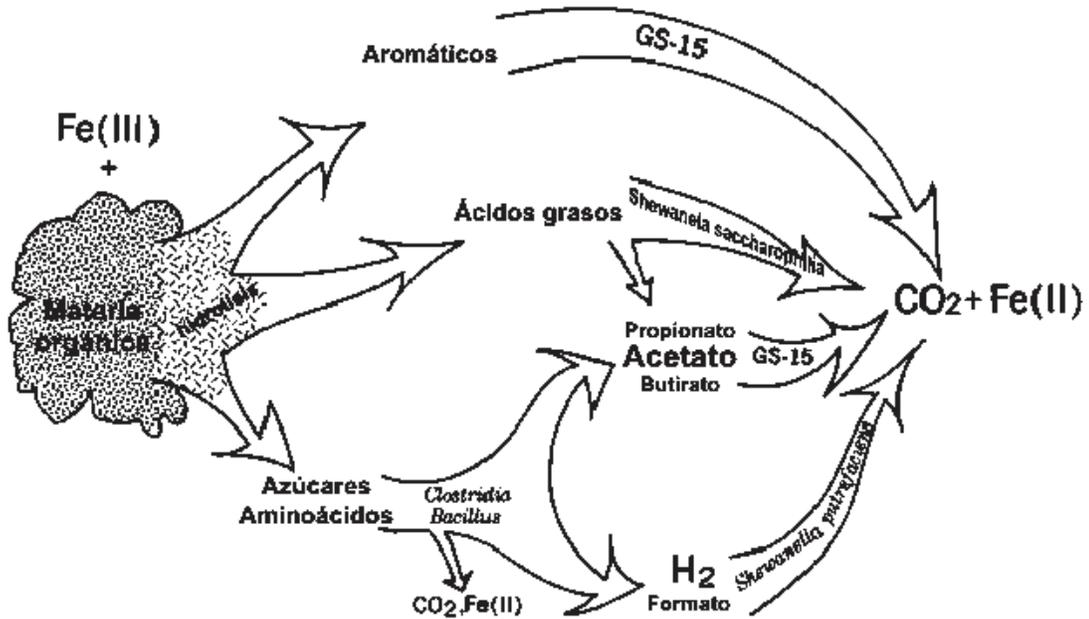


Figura 8. Modelo para la oxidación de un complejo de materia orgánica con Fe(III) sirviendo como el único aceptor de electrones, con ejemplos de organismos que pueden catalizar varias reacciones. Un modelo similar también aplica en sedimentos en los cuales la reducción de Mn(IV) es el aceptor final de electrones (Lovley 1991)

2.6. Los microorganismos ferrirreductores utilizados en el presente estudio

En el 2003 Velásquez cuantificó la población de bacterias ferrirreductoras de la rizosfera de maíz utilizando una modificación del método número más probable, adicionando ferrozina, que en presencia de Fe(II), produce un complejo colorido. De los tubos positivos para la presencia de Fe(II) inoculados con las más altas diluciones de una suspensión de suelo rizosférico de maíz, se obtuvieron 3 aislados, que fueron etiquetados como sigue: UMCV1, UMCV2 y UMCV3, también se obtuvo el aislado UMCV4 que fue aislado del mismo modo de la rizosfera de frijol. Estos aislados fueron probados en su capacidad para reducir citrato férrico cuando crecen en un caldo nutritivo y se obtuvo que los cuatro aislados son capaces de reducir este compuesto a diferencia de un control sin inocular como se muestra en la figura 9.

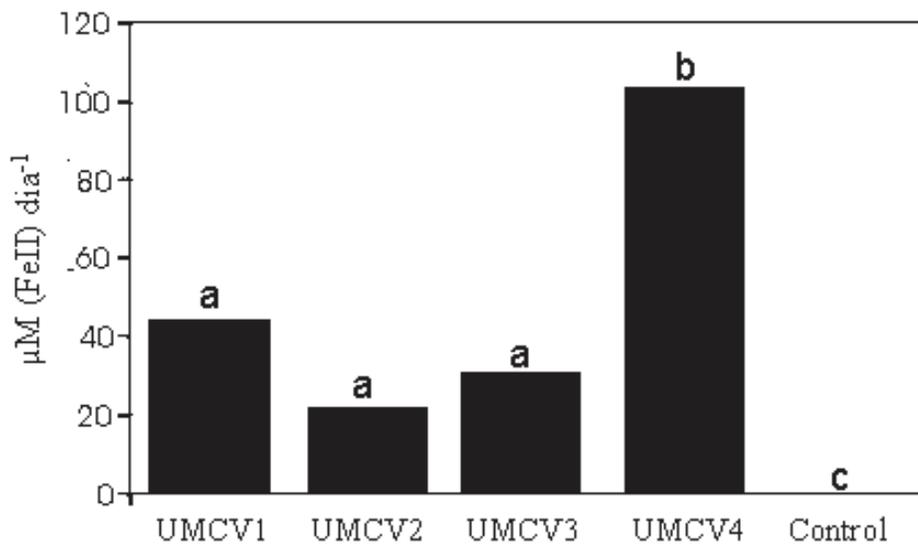


Figura 9. Reducción del citrato Fe(III) por aislados obtenidos de la rizosfera del maíz (UMCV1, UMCV2, UMCV3) y del frijol (UMCV4) por Velásquez (2003)

También determino la reducción del citrato férrico de la población total que coloniza la rizosfera de maíz y de frijol crecidos en un suelo ligeramente ácido utilizando como tratamientos plantas crecidas en suelo estéril, plantas inoculadas con los aislados

previamente mencionados y plantas crecidas en el suelo sin esterilizar (“natural”), encontrando que en la rizosfera de maíz se da una mayor actividad reductora hasta en un 1077 % mas que los tratamientos inoculado y estéril (figura 10 panel A). De la misma manera al estimar la reducción del citrato ferrico por las bacterias rizosfericas presentes en el frijol, la reducción es alta en las plantas crecidas en un suelo estéril, aunque es destacable la tendencia a la reducción en las plantas inoculadas (figura 10 panel B)

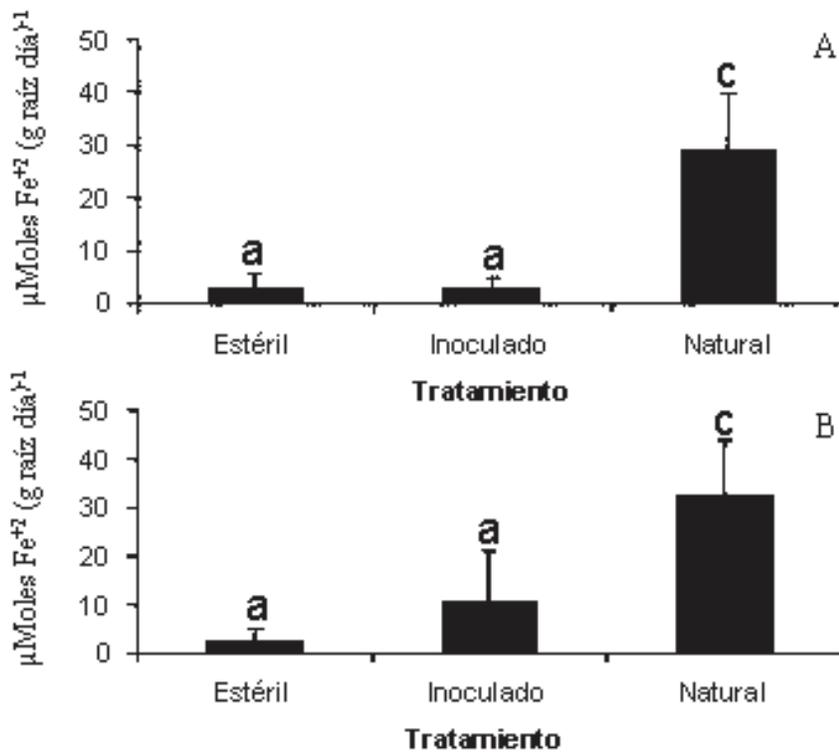


Figura 10. Reducción del citrato ferrico por organismos rizosfericos. (A) plantas de maíz crecidas en suelo ligeramente ácido de Uruapan, Mich. (B) plantas de frijol crecidas en el mismo suelo. Las plantas fueron crecidas en suelo: estéril, suelo inoculado con los 4 aislados UMCV y natural se refiere al suelo sin esterilizar. Letras diferentes representan promedios estadísticamente significativos con la prueba de Tukey $p > 0.05$ (Velásquez 2003).

Las rizobacterias ferriredutoras en interacción con el frijol

Considerando que las plantas con estrategia I tienen estrictamente que reducir el hierro antes de que este pueda ser captado, y que existe una gran población de microorganismos que colonizan la raíz y que pueden reducir hierro, es probable que la reducción por los microorganismos sea una fuente de Fe(II) que facilite su posterior captación por parte de las raíces.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Las rizobacterias ferrirreductoras colonizan la rizosfera de frijol y contribuyen a su aprovisionamiento de hierro.

3.2 OBJETIVO GENERAL

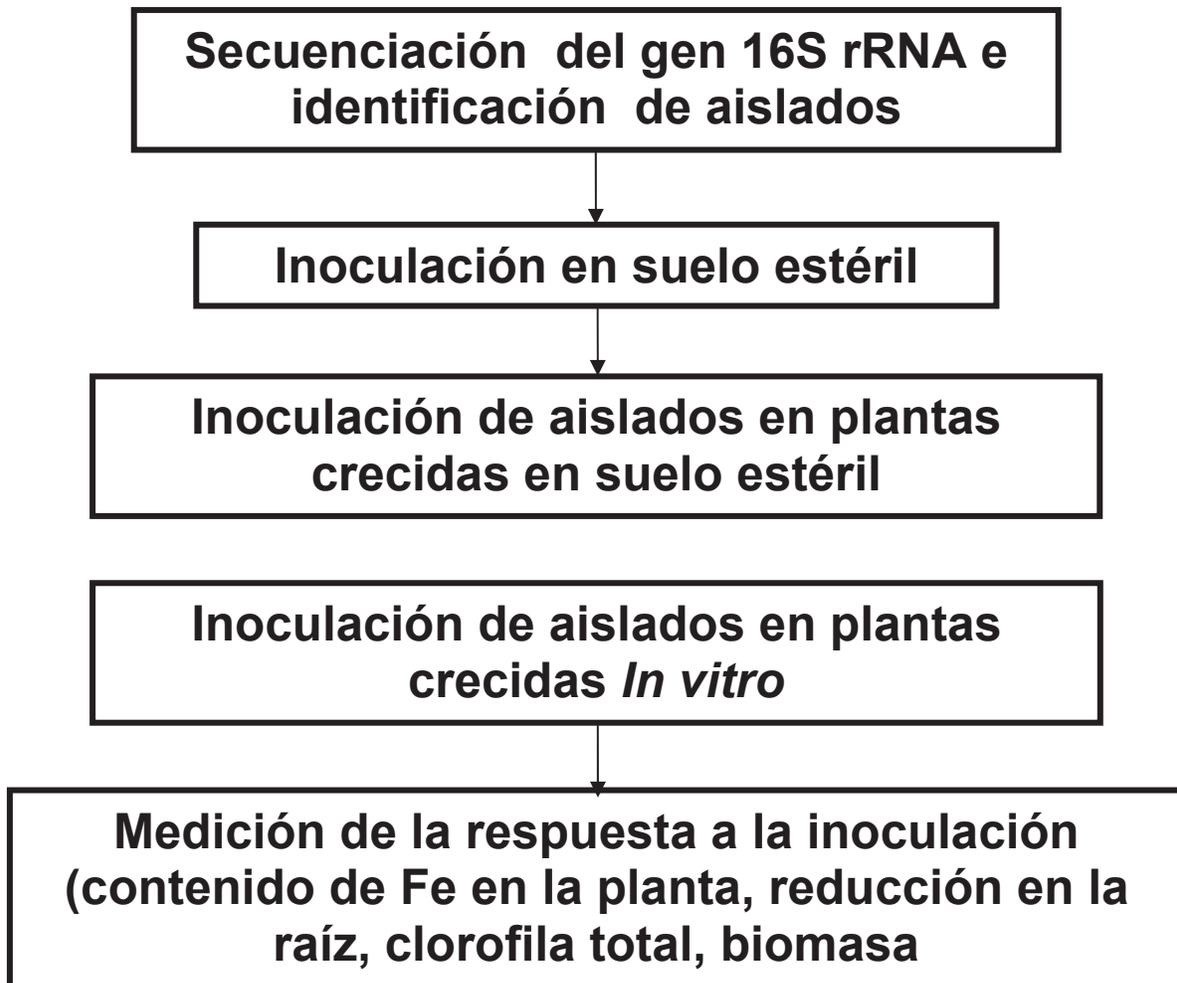
Determinar la influencia de las rizobacterias ferrirreductoras en la disponibilidad del hierro en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. v. Flor de Mayo bajo) en condiciones alcalinas.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar las cepas ferrirreductoras por medio de las secuencias del gen 16S rRNA.
- ✓ Cuantificar la capacidad de reducción férrica en suelo de las cepas identificadas.
- ✓ Cuantificar la colonización de la rizosfera de frijol por cepas ferrirreductoras.
- ✓ Cuantificar la adquisición de hierro en plantas de frijol colonizadas por rizobacterias ferrirreductoras
- ✓ Evaluar el efecto de la colonización de la rizosfera de frijol por cepas ferrirreductoras en el crecimiento vegetal.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental queda esquematizada de la siguiente manera:



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas

Se utilizaron las cepas aisladas por Velásquez (2003), que son: UMCV1, UMCV2, UMCV3 obtenidas de la rizosfera del maíz y UMCV4 aislado de la rizosfera de frijol.

Semillas de frijol

Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* v. Flor de Mayo Bajío) susceptible a la clorosis (Hernández *et al.* 1996, Cortinas y Escobar 1999) Todas las semillas se obtuvieron de la colección de semillas del Laboratorio de Microbiología Ambiental de CINVESTAV Unidad Irapuato.

5.2 MEDIOS DE CULTIVO

Agar nutritivo (AN)

Las cuatro cepas fueron crecidas en agar nutritivo que contiene: 3 g/L de extracto de carne, 5 g/L de peptona de gelatina solidificado con 15g/L de agar bacteriológico, el medio fue esterilizado a 120 °C durante 20 minutos. Fue utilizado como medio de rutina para el crecimiento de las cepas.

Caldo nutritivo (CN)

El caldo nutritivo fue preparado con 3 g/L de extracto de carne y 5 g/L de peptona de gelatina. Fue esterilizado en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Fue suplementado con 600 µM de citrato-Fe(III). Este medio fue utilizado para evaluar la reducción de las cepas UMCV.

Solución nutritiva para plantas (Wolfgang y Schmidt 1994)

Esta solución fue utilizada para regar las plantas de frijol crecidas en suelo alcalino. La formulación es la siguiente: KNO₃ 3 mM, CaCl₂ 1.5 mM, K₂SO₄ 1.5 mM, NaH₂PO₄ 1.5 mM, NaCl 0.5 mM, H₃BO₃ 25 μM, MnSO₄ 1 μM, ZnSO₄ 0.5μM, CuSO₄ 0.5 μM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.05 μM. La solución fue ajustada a pH 8.5 utilizando NaOH. Se esterilizo en autoclave 120 °C durante 20 minutos.

Suelo.

Se utilizo el suelo del Lometon municipio de Tarimbaro (19°46'46.61'' N, 101°08'06.07'' W) como medio para el crecimiento de plantas de frijol. Este suelo se reporta por el INEGI como un suelo alcalino el cual es propicio para limitar la disponibilidad de Fe ya que en estas condiciones forma precipitados insolubles (Guerinot y Yi 1994). El suelo fue analizado por el Laboratorio Nacional para la fertilidad de Suelos del INIFAP-Celaya y presenta las siguientes características fisicoquímicas.

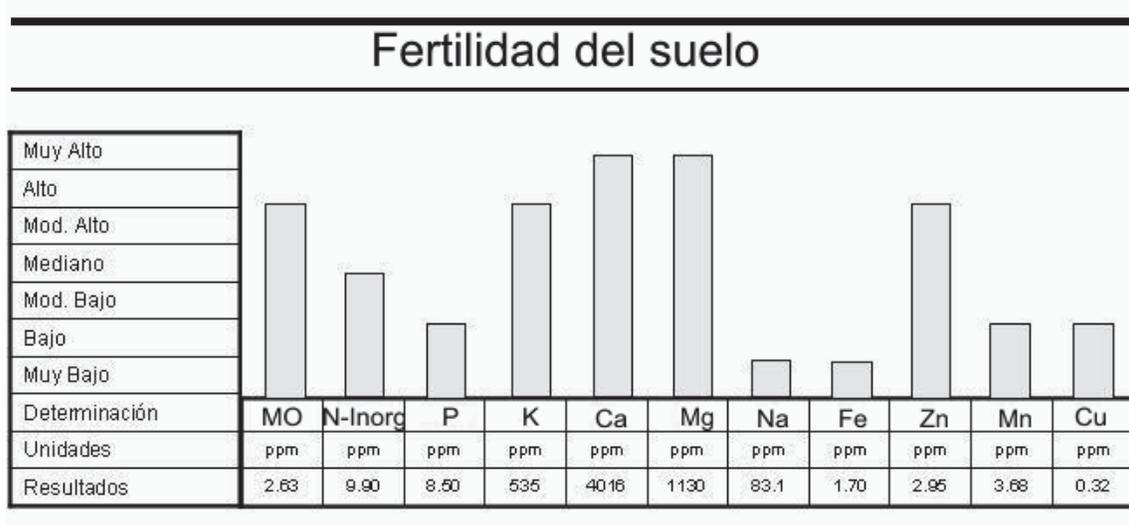


Figura 11. Análisis elemental del suelo de el Lometón municipio. De Tarímbaro. Fue analizado por el laboratorio Nacional para la fertilidad del suelo de INIFAP-CELAYA

Las rizobacterias ferrirreductoras en interacción con el frijol

Las características físicas del suelo son las siguientes

Arcilla: 40.76%	Limo: 29.80%	Arena: 19.44%
Tipo de suelo:	Franco arcilloso	
Punto de saturación:	122% Muy alto	
Capacidad de Campo:	91.5%	
Densidad aparente:	1.65 g/cm ³	
Carbonatos totales:	35.2% Extremadamente alto	
pH:	8.9	

Para los experimentos el suelo se seco al aire y se tamizo con una maya de 0.5 cm. para posteriormente esterilizarse en autoclave, 1 hora diaria 120 °C durante 5 días, al final del proceso de esterilización se comprobó la esterilidad diluyendo aproximadamente 0.1 g de suelo en 500 µL de H₂O estéril y se sembraron 100 µL de la dilución en placas con agar nutritivo.

Medio Mineral para el crecimiento de plantas (MM)

Se utilizo este medio para mantener y crecer plantas de frijol y para la visualización de la reducción “in vivo”. Tiene la siguiente formulación: KNO₃ 5 mM, MgSO₄ 2 mM, Ca(NO₃)₂ 2 mM, K₂HPO₄ 2.5 mM, H₃BO₃ 70 µM, MnCl₂ 14 µM, ZnSO₄ 1 µM, CuSO₄ 0.5 µM, NaCl 10µM, Na₂MoO₄ 0.2 µM, Tris 5 mM, se solidifico con agar bacteriológico 0.7%, el pH se ajusto con NaOH a 8.5. De acuerdo al tipo de experimento se le adicionaron 40 o 100 µM de FeAQDS (ácido 9,10-antraquinona-2-6-disulfonico) y 100 µM de Ferrozina (3-2-(pyridil)-5,6-bis(ácido sulfonico 4-fenil)-1,2,4-triazina). El medio se esterilizo en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

5.3 IDENTIFICACION DE LOS AISLADOS

Obtención del ADN genómico

Para obtener ADN genómico se utilizó el método del shock térmico (De Medici *et al.* 2003). Se cosecharon los inóculos previamente crecidos en placas con agar nutritivo y se colocaron en 200 μ L de agua destilada estéril, se incubaron en baño maría a 95° durante un minuto e inmediatamente fueron colocados en hielo por un minuto, el procedimiento fue repetido cinco veces, posteriormente se centrifugo 14000 rpm y el sobrenadante se recuperó, se corroboró la presencia de ADN mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Amplificación del gen 16S rRNA por PCR

Se utilizó como templado 0.5 μ L del sobrenadante obtenido anteriormente, 0.5 μ L de oligonucleótido fD1 (5' CCGAATTCGT CGACAACAGA GTTTGATCCT GGCTCAF 3'), 0.5 μ L del oligonucleótido FD1 (5' CCCGGGATCC AAGCTTAAGG AGGTGATCCA GCC 3') útiles para la amplificación del gen 16S rRNA de la mayoría de las eubacterias (Weisburg *et al.* 1991), y 23 μ L del kit PCR mix Hig Fidelity de Invitrogen. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de 95°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos a 94° C por un minuto, 55° C por dos minutos, 72° C por dos minutos y un ciclo de extensión de cinco minutos a 72°C. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio utilizando TAE 1X como buffer de corrida. Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb DNA ladder (Gibco BRL) para identificar la banda de 1500 pb correspondiente al producto de amplificación para el gen 16S rRNA.

Limpieza de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit GENE CLEAN v 3.1. Se cortó la banda de interés y se pesó. Se adicionaron 3 volúmenes de KI utilizando como criterio por cada 100 mg de peso de la banda se utilizaron 100 μ L de KI y se incubó en termoblock a 55 ° C hasta que se fundió el gel. Se adicionaron 7 μ L de suspensión de vidrio y se incubó 5

min. a temperatura ambiente. Se centrifugo por 5 segundos y se lavo con 500 μ L de NewWhas, este paso fue repetido 3 veces. Se resuspendió la pastilla en 7 μ L de H₂O y se centrifugo por 30 segundos tres veces. Se corroboró la limpieza del producto de PCR en gel de agarosa al 1%.

Secuenciación del gen 16S r RNA

El producto purificado fue secuenciado utilizando el kit Big Dye Terminador v. 3.2. Se utilizaron 2 μ L del producto limpio y amplificado y mezclo con 2 μ L de buffer de secuenciación, 4 μ L de Big Dye Terminador v. 3.2, 1 μ L del oligonucleotido fD1 y para secuenciar el otro extremo se utilizo 1 μ L del oligo rD1 en otra reacción, y se aforo con 11 μ L de H₂O destilada estéril para tener un volumen final de reacción de 20 μ L. La mezcla de secuenciación se llevo al termociclador durante 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: 96 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos, y 60 °C 4 minutos. La reacción de secuenciación fue purificada utilizando los 20 μ L de la reacción anterior a la cual se le agrego 2 μ L de EDTA 125 mM, 2 μ L de acetato de sodio 3 M pH 4.8, 50 μ L de etanol absoluto, se incubo la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente se centrifugo 20 min. a 13 000 rpm, se retiro el sobrenadante y se adicionaron 250 μ L de etanol al 70% frío, se mezclo en vortex y se centrifugo 10 minutos a 12 000 rpm, se retiro el sobrenadante y se secaron las muestras en un ultraconcentrador a 55 ° C, se resuspendió con 25 μ L de TSR, se mezclo en vortex y se incubo a 95 °C por 2 minutos e inmediatamente después se pasaron las muestras al hielo. Las muestras se colocaron en tubos para secuenciación y las secuencias fueron obtenidas en un equipo automático ABM PRISM 310 GENETIC ANALYZER.

Identificación de los aislados

Las secuencias obtenidas son parciales y tienen en promedio 350 pb y fueron sometidas a un análisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se recuperaron las secuencias de los organismos que mostraban alineamientos significativos en el BLAST y se usaron como referentes. Estas secuencias fueron alineadas con la secuencia del organismos a identificar, las secuencias referentes se recortaron manualmente al tamaño de la secuencia del organismos de interés debido a que esta solo era una secuencia parcial. Se hizo un nuevo alineamiento múltiple con las secuencias debidamente recortadas. Los alineamientos fueron transformados en árboles filogenéticos utilizando el método de mínima evolución. Los análisis de secuencias fueron realizados en el programa MEGA versión 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>).

Accesiones en el gene bank

El árbol de la figura 13 fue construido con las secuencias bajo las siguientes accesiones: *Bacillus* sp. AY572486, *Bacillus megatrium* DQ207561, *Bacillus megaterium* AJ880757, *Bacillus megaterium* AY37901, *Bacillus pumilus* ATCC 7061, *Bacillus subtilis* GeneID:[936895](#), *Bacillus cereus* ATCC 14579 GeneID:[1202382](#), *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 GeneID:[3029666](#). *Arthrobacter agilis* AF440440, *Arthrobacter agilis* AJ577725, *Arthrobacter agilis* AF511518, *Arthrobacter nitroguajacolicus* AJ785758, *Arthrobacter gandensis* AJ491107, *Arthrobacter tecti* AJ639828, *Arthrobacter luteolus* AJ243422, *Arthrobacter.citreus* X80737, *Arthrobacter sulfureus* AB046358, *Arthrobacter crystallopoietes* AF329834, Se utilizo como secuencia externa *Stenotrophomonas maltophilia* A1w2 AY512625.

El árbol de la figura 14 se realizo con las siguientes secuencias: *Stenotrophomonas maltophilia* LMG X959241, *Stenotrophomonas maltophilia* BL-13 AB194324, *Stenotrophomonas maltophilia* AF533952, *Stenotrophomonas maltophilia* AJ131919, *Stenotrophomonas acidaminiphilia* AF273079, *Stenotrophomonas dokdonensis* DQ178977,

Pseudomonas syringae, *Pseudomonas aureginosa* PAO1, *Pseudomonas flourecens* y se utilizo como secuencia externa a *Bacillus megaterium* AY379001

5.4. REDUCCION DEL HIERRO EN EL SUELO

Para estimar la reducción del hierro en el suelo efectuada por los aislados UMCV se utilizo la técnica de Lovley y Phillips 1987 con algunas modificaciones. Se coloco 1 gramo de suelo en un tubo eppendorf de 1.5 mL el cual fue saturado con H₂O y se esterilizo en autoclave 1 hr diaria a 120 °C durante 5 días. Una vez esterilizado el suelo se llevo a cabo un experimentos bajo las siguientes condiciones: suelo estéril, suelo estéril + ácido nitrilotriacetico (NTA) y suelo estéril + glucosa a los cuales se les agrego 1 mL de una suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^9 UFC/mL (figura 12 panel A) de cada uno de los aislados (UMCV1, UMCV2, UMCV3, UMCV4), Los aislados fueron inoculados por separado. Como controles del experimento se utilizaron: suelo estéril, suelo no estéril, suelo estéril + NTA, suelo no estéril + NTA, suelo estéril + glucosa y suelo no estéril + glucosa a los cuales se les agrego 1 mL de H₂O destilada estéril, tratamientos y controles fueron realizados por triplicado.

Una vez inoculados con la suspensión bacteriana, se incubo por 7 días a 28°-30° C. Posteriormente se tomo aproximadamente 0.1 g de suelo de cada tratamiento y se le adiciono 2 ml de HCL 0.5 M, se dio vortex fuerte durante 30 segundos y se dejo incubar 1 hr a temperatura ambiente, se tomo una alícuota de 100 µL y se mezclo con 900 µL ferrozina (0.1% ferrozina, 50mM de HEPES) se midió la absorbencia en el espectrofotómetro una longitud de onda visible a 562 nm. La cantidad de Fe(II) fue estimada en base a una curva patrón con sulfato ferroso (figura 12 panel B).

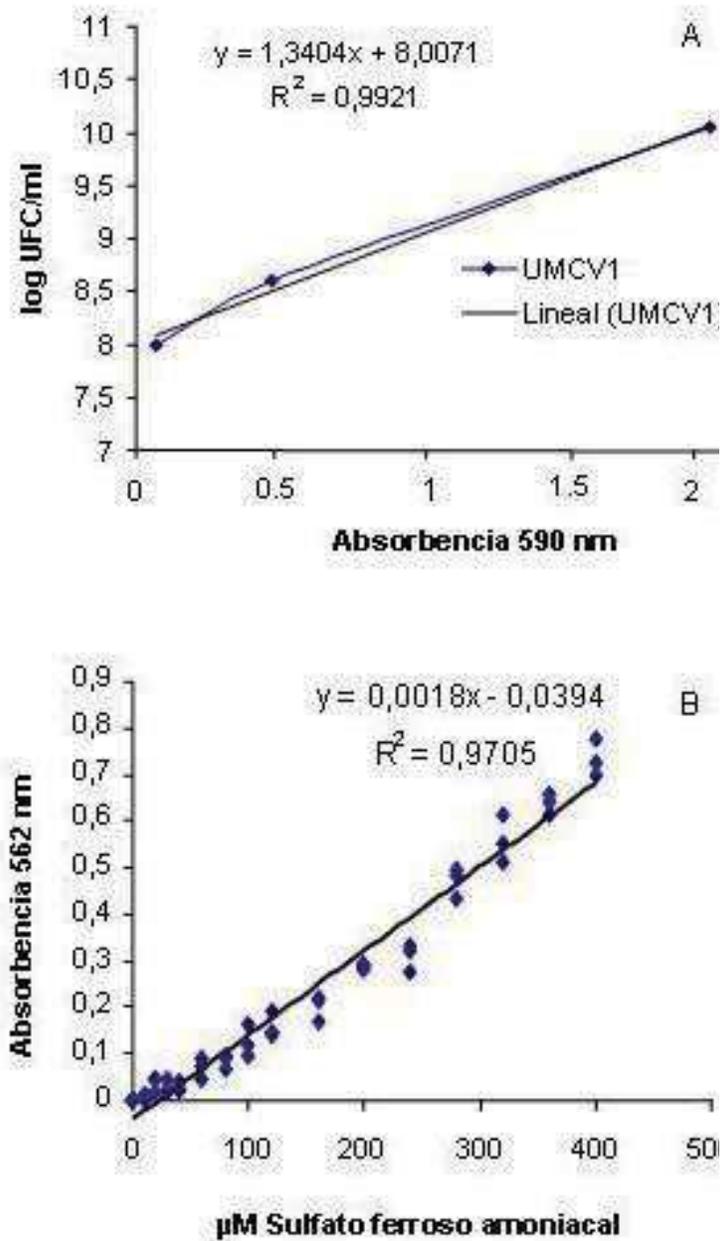


Figura 12. Curvas patrón. (A). curva patrón de la cepa UMCV1. (B) curva patrón para la determinación de la concentración de Fe(II)

5.5. EXPERIMENTOS EN SUELO

Preparación de los Inóculos

Los aislados UMCV1, 3 y 4 fueron crecidos en agar nutritivos 24 hr antes de la inoculación en plantas, el aislado UMCV2 se creció 48 hr antes del experimento por que es el tiempo en que tarda incubándose para que aparezcan las primeras colonias. Se cosecharon los aislados crecidos en placas con agar nutritivo y se resuspendieron en agua destilada estéril hasta lograr una DO. de 0.74 que corresponde a 1×10^9 UFC/mL. (figura 12 panel A)

Desinfección de la semilla

Las semillas de frijol *Phaseolus vulgaris* v. Flor de Mayo Bajío susceptible a la clorosis férrica (Hernández *et al.* 1996) fueron esterilizadas superficialmente bajo el siguiente protocolo:

Hyclin 15% 5 minutos

Alcohol 70% 3 minutos

Peroxido de hidrogeno 3% 30 segundos

Hipoclorito de Sodio 20% 3 minutos

Después de cada paso siempre se enjuagaron las semillas con H₂O destilada estéril.

Las semillas desinfectadas se germinaron en agar nutritivo para comprobar la esterilidad.

Inoculación de aislados ferrirreductores a plantas de frijol

Cuando las semillas germinaron se colocaron en un tubo de vidrio de 20 cm. de longitud que contenida 15g de suelo estéril proveniente del Lometón municipio de

Tarímbaro y se inocularon con 1 mL de la suspensión de los aislados UMCV1, UMCV2, UCMV3 y 4. Las plantas fueron colocadas en una cámara con Luz continua y se dejaron crecer por 15 días, manteniéndolas al 50% de la capacidad de campo y regadas con una solución nutritiva con macro y micronutrientes reportada por Wolfgang y Schmidt (1994) la cual fue ajustada a un pH de 8.5. Al término del experimento se cuantifico El peso fresco, el peso seco, la clorofila total, la reducción en la raíz y el contenido de Fe en cenizas.

Biomasa

Los pesos frescos fueron determinados al final del experimento, se peso por separado la raíz y la parte aérea en una balanza analítica, el peso total fue determinado por la suma del peso fresco aéreo y el peso fresco de la raíz. Para determinar el peso seco, la parte aérea y la parte radicular fueron colocadas en bolsas de plástico y se secaron en una incubadora a 55 °C por 15 días hasta obtener peso constante.

Contenido de Clorofila

La clorofila se determino por el método de Jeffrey y Humphrey 1975. Se corto una hoja joven y se peso, se trituro en un mortero con nitrógeno liquido, la hoja triturada se coloco en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se le agrego 1.5 mL de acetona al 100% y se dejo incubar 12 hr a 4 °C, se leyó la absorbancia a 663 nm y la cantidad de clorofila fue estimada mediante la formula: clorofila total (mg/L) = $A_{663} \times 36$.

Reducción en la raíz

La actividad ferrirreductora en las raíces se cuantifico de acuerdo a una modificación a King y Garey (1999). Las raíces fueron cortadas en una campana de flujo laminar para evitar que se contaminaran, fueron enjuagadas con agua destilada estéril, se recuperaron las raíces y fueron nuevamente colocadas en agua destilada estéril y se dio vortex por 30 segundos, las raíces fueron incubadas 24 hr a 28-30 °C en 20 mL de solución que contenía: citrato ferrico 1 mM, 0.5 g de glucosa/L, 0.5 g de acetato de sodio/L y 0.25 g K_2HPO_4/L Se tomo una alícuota por triplicado de 100µL y se le agrego 900 µL de ferrozina

0.1% en 50 mM de HEPES, se leyeron las muestras en el espectrofotómetro a una absorbencia de 562 nm, para asegurar la esterilidad al final de la determinación de la reducción se pesaron las raíces.

Determinación de Fe en Cenizas

Una vez determinado el peso seco la porción aérea y la raíz fueron calcinadas en una mufla a 750 °C durante 10 minutos, las cenizas fueron colocadas en 5 ml de solución con HCl 0.25 M, hidroxilamina 0.25 M, se tomo una alícuota de 100 µL y se mezcló con 900 de ferrozina 0.1%, se leyó al espectrofotómetro a 562 nm. Bajo condiciones ácidas la hidroxilamina reduce el Fe(III) a Fe(II) y de esta manera el Fe total se puede determinar por el método de la ferrozina (Lovley y Phillips 1987). La estimación del Fe se hizo en base a una curva patrón de sulfato ferroso (figura 11 panel B).

Colonización de la raíz

Antibiogramas. Para prevenir contaminaciones en los experimentos de colonización de la raíz, se decidió aplicar antibióticos a los medios de cultivo empleados que sirvieran como factor de selección de cada una de las cepas empleadas en estos experimentos. Con este objeto la resistencia de las cepas a los antibióticos se determinó en base a un antibiograma. Los antibiogramas fueron realizados de la siguiente manera: Las cepas fueron crecidas en agar nutritivo, las colonias crecidas fueron retiradas de la caja con una asa bacteriológica y se resuspendieron en 0.5 µL hasta obtener una D.O de 0.4, se tomaron 100 µL de la suspensión y fueron esparcidos homogéneamente en placas con agar nutritivo, a cada caja se le colocó un multidisco Gram⁺ y Gram⁻ de BIO-RAD, los tratamientos fueron realizados por triplicado, se midió el halo de inhibición y se determinó la susceptibilidad de los aislados de acuerdo a la clasificación del proveedor.

Los antibiogramas mostraron las siguientes características:

Tabla 4. Antibiograma para las cepas UMCV

Antibiótico	Aislado			
	UMCV1	UMCV2	UMCV3	UMCV4
Ampicilina	MS	S	R	I
Ceftriaxona	R	S	R	MS
Cloranfenicol	S	S	R	I
Cefalotina	R	S	R	I
Nitrofurantoina	R	I	R	R
Carbenicilina	R	S	R	I
Pefloxacina	S	MS	R	S
Netilmicina	S	MS	R	I
Gentamicina	S	MS	R	S
Cefotaxima	R	S	R	R
Trimetoprim-sulfa	S	I	R	I
Amikacina	R	MS	R	I
Eritromicina	R	S	R	S
Ceftazidima	I	S	R	R
Cefalotina	R	S	R	R
Penicilina	R	S	R	R
Dicloxacilina	S	S	R	R
Cefuroxima	R	S	R	R
Cefotaxima	R	S	R	R
Tetraciclina	S	S	R	S

R=resistente I=Intermedio MS=Moderadamente sensible S=Sensible

Inoculación y cuantificación de la colonización de las raíces. Las plantas de frijol fueron inoculadas con 1 mL de suspensión de los aislados UMCV1-4, cada tercer día las raíces fueron sacadas, enjuagas en agua estéril, agitadas en vortex por 30 s y colocadas en matraces con 10 mL de solución de fosfatos salina y se agitaron durante una hora a 200 rpm para obtener una suspensión de las rizobacterias, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de la suspensión y 0.1 mL de las diluciones fueron esparcidas en placas por triplicado con agar nutritivo con antibiótico de selección como se muestra a continuación:

UMCV1 75 microgramos/ml de ceftriaxona

UMCV2 25 microgramos/ml de nitrofurantoina

UMCV3 100 microgramos/ml de ampicilina

UMCV4 100 microgramos/ml de ampicilina

Después de 24 h de incubación a 30° C se contaron las colonias por placa. Se pesaron las raíces para expresar los resultados sobre el peso fresco.

5.6. EXPERIMENTOS EN MEDIO NUTRITIVO

Semillas desinfectadas de frijol fueron puestas a germinar en matraces de 1L que contenía 250 mL medio mineral (MM). Una vez geminadas las semillas se dejaron crecer por 3 días y se transplantaron a tubos con que contenían 25 ml del mismo medio suplementado con 40 μ M de FeAQDS, 1 mM de Ferrozina y 1 mL de suspensión 1×10^4 UFC/mL de las aislados UMCV1, 2, 3 y 4. Todos los medio y soluciones stock fueron preparados con agua desionizada estéril. La reducción se visualizo por un cambio de color en el medio. Al final del experimento se determino el peso fresco y el peso seco y el Fe en la parte aérea y raíz mediante las técnicas descritas anteriormente.

Para cuantificar la concentración del FeAQDS reducido se realizo otro experimento en las mismas condiciones que el anterior solo que se utilizaron 100 μ M de FeAQDS y 1 mL de Suspensión bacteria 1×10^9 UFC/mL. Se estimo la concentración del ion ferroso mediante comparación con una curva de calibración visual (figura 13) que contenía la misma formulación en macro y micronutrientes que el medio en donde fueron crecidas las plantas de frijol, el pH fue de 8.5, a esta medio se le adicionaron diferentes concentraciones de sulfato ferroso amoniacal y ferrozina 1 mM. Al final del experimento se cuantificaron los pesos secos frescos, y contenido de Fe en cenizas, además se midieron las siguientes estructuras, longitud de la raíz principal, longitud al cotiledón y longitud de las raíces laterales.

Las rizobacterias ferrirreductoras en interacción con el frijol

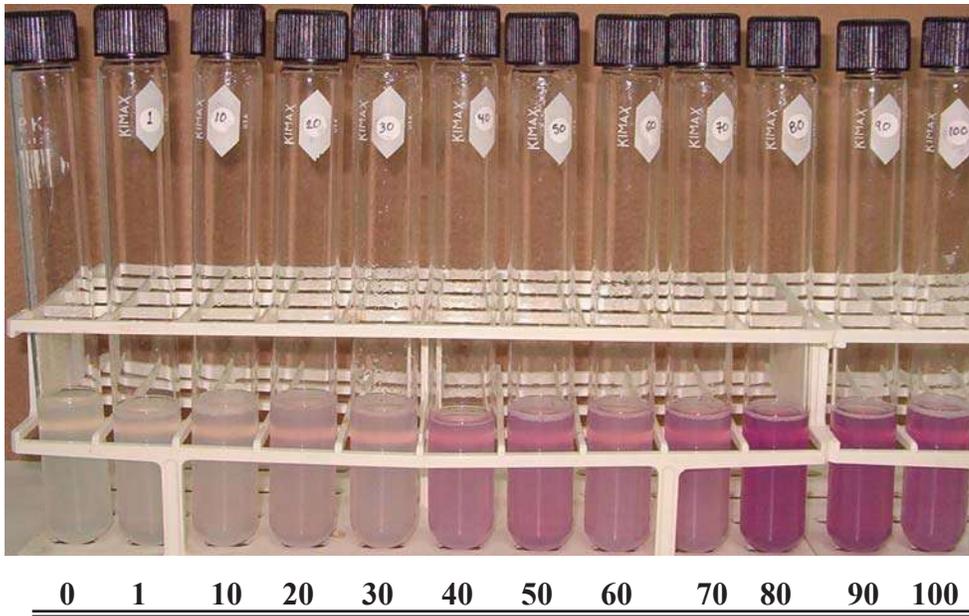


Figura 13. Curva patrón de Fe(II). Se utilizo en MM a pH 8.5 con diferentes concentraciones de sulfato ferroso amoniacal como fuente de Fe(II) y ferrozina 100 μ M como indicador del hierro reducido. La curva se realizo por triplicado y una fotografía representativa fue tomada.

5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A todas las variables se les realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks $p > 0.05$ en el programa JMP versión 3.2.2. Cuando se confirmaba la normalidad se realizó un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiple de Tukey $p > 0.05$ en el Programa ESTATISTICA for WINDOWS versión 6.0, cuando las variables no mostraban normalidad se efectuó una prueba no paramétrica en el programa JMP v. 3.2.3. Para las variables cuantificadas en el suelo se realizó un análisis de correlación múltiple.

Tabla 5. Distribución de las Variables cuantificadas en experimentos en Suelo alcalino estéril

Variable	Distribución	Numero de muestras
Fe(II) reducido en el suelo por los aislados	Normal	3
Fe(II)+ NTA reducido en el suelo por los aislados	No normal	3
Fe(II) + Glucosa reducido en el suelo por los aislados	Normal	3
Reducción en la raíz	Normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8
Clorofila	Normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8
Fe en la raíz	Normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8
Fe en la parte aérea	Normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8
Fe acumulado en la parte aérea	No normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8
Peso fresco aéreo	Normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8
Peso fresco raíz	Normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8
Peso seco aéreo	Normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8
Peso seco raíz	Normal	UMCV1=10, UMCV2=9, UMCV3=10 UMCV4=4 Control=8

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación de los aislados

Se obtuvieron secuencias parciales de DNA del gen 16S rRNA para los aislados de los extremos 5'-3' y 3'-5' para los aislados UMCV1 (367 y 381 pb), UMCV2 (340 pb y 388pb) UMCV3 (224 y 397 pb) y UMCV4 (300 pb), estas secuencias fueron incluidas en el GENE BANK y .los números de acceso se enlistan en la tabla 6.

Aislado	5'- 3'	3'-5'
UMCV1	AY553859,	AY553860
UMCV2	AY553856	Ay553858
UMCV3	Ay553862	AY553863
UMCV4		Ay626375

El análisis BLAST de las secuencias (tabla 7) demuestra que el aislado UMCV1 tiene homología con *Bacillus megaterium* en un 99%, también tiene alta homología con otros bacilos, pero estos no se encuentra identificados a nivel específico. El aislado UMCV2 presenta homología con varias especies del género *Arthrobacter*, los aislados UMCV3 UMCV4 tiene homología con diferentes especies del género *Stenotrophomonas* (tabla 7).

En busca de tener una mayor claridad acerca de la posición taxonómica de cada uno de los aislados se construyeron árboles filogenéticos con las secuencias con alta similitud y el aislado de interés.

Tabla 7. Alineamientos más significativos obtenidos por análisis BLAST de las secuencias 16S rRNA de los aislados UMCV

Aislado			
UMCV1 (381pb) Gram +	<i>Bacillus</i> sp (30) Homología 99%	<i>Bacillus megaterium</i> (21) Homología 99%	Bacterias del suelo no cultivadas (19) Homología 99%
UMCV2 (388pb) Gram +	<i>Arthrobacter agilis</i> (3) Homología 99-100%	<i>Arthrobacter gandensis</i> (3) Homología 99%	<i>Arthrobacter luteolos</i> (1) Homología 98%
UMCV3 (399pb) Gram -	<i>Stenotrophomonas</i> sp (16) Homología 100%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (40) Homología 100%	<i>Xilela fastidiosa</i> (2) Homología 100%
UMCV4 (299pb) Gram -	<i>Stenotrophomonas</i> sp (15) Homología 100%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (38) Homología 100%	<i>Xilela fastidiosa</i> (2) Homología 100%

Para los aislados UMCV1 y UMCV2 se construyó un árbol único con las secuencias 3'-5' (figura 14) debido a que ambas cepas son bacterias Gram+, sin embargo no se hace ninguna inferencia filogenética entre estas dos cepas, la interpretación se hace para cada uno de los grupos resultantes. En este sentido es muy clara la separación del aislado UMCV2 que queda bien agrupada con diferentes especies del género *Arthrobacter* y la cepa UMCV1 queda completamente separada de la cepa UMCV2 y agrupada con diferentes miembros del género *Bacillus*. La cepa UMCV2 queda formando un grupo monofilético con organismos de la especie *Arthrobacter agilis*. De acuerdo al árbol generado, esta especie se encuentra cercanamente emparentada a *A. subterraneus* y *A. tecti*; esta especie fue originalmente descrita por Ali-Cohen en 1889 como *Micrococcus agilis* y renombrada como *Arthrobacter agilis* por Koch *et al.* 1995.

Las rizobacterias ferrirreductoras en interacción con el frijol

De acuerdo a la filogenia inferida de las secuencias de 16S rRNA, a cepa UMCV1 se encuentra claramente dentro del grupo monofilético formado por las distintas cepas de la especie *Bacillus megaterium* y se esta perfectamente separada de otras especies de bacilos como *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. pumilus*. *Bacillus megaterium* fue originalmente descrito por Bary en 1884.

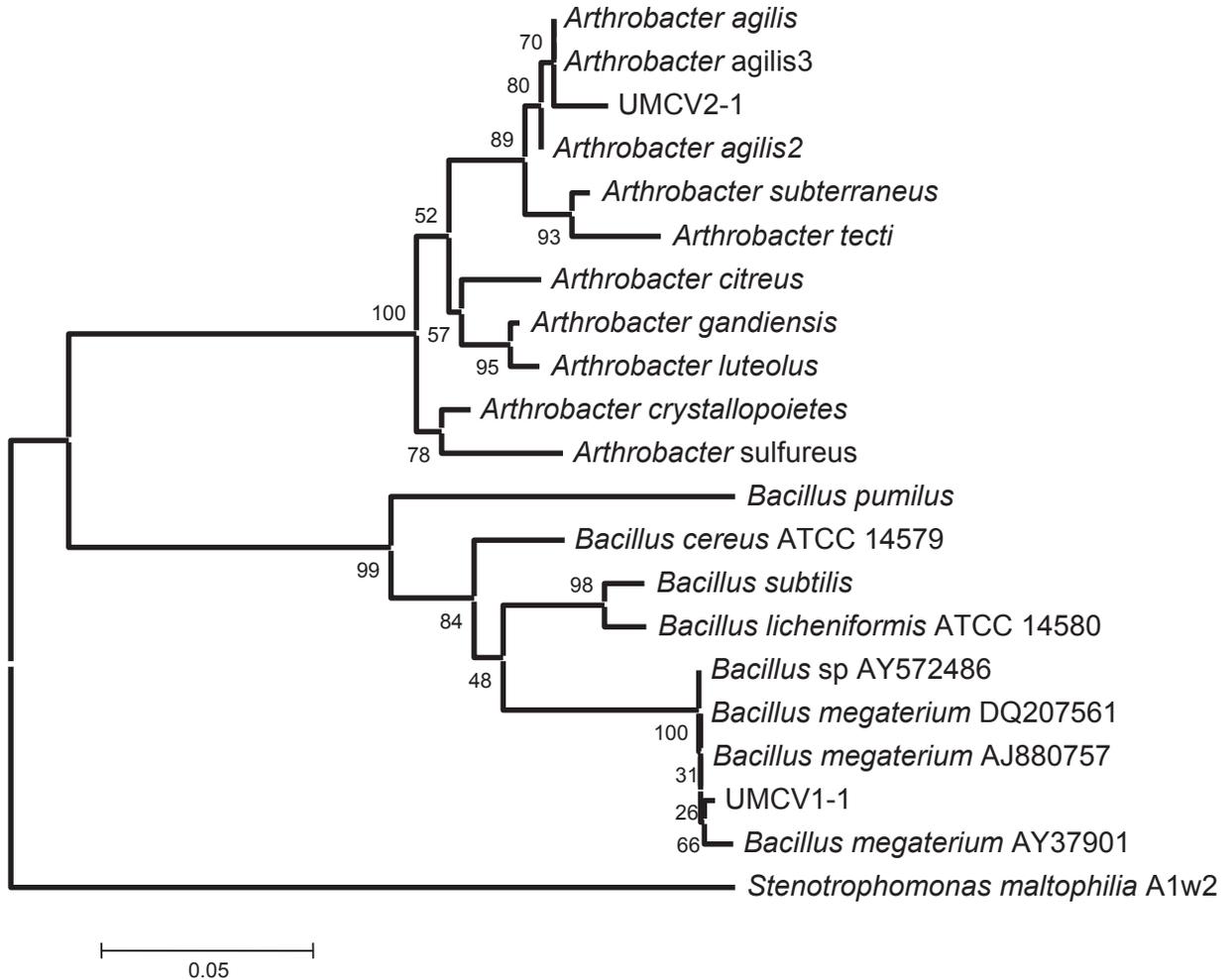


Figura 14. Árbol filogenético inferido de secuencias de 16S rRNA muestra la localización molecular de la cepa UMCV1 en el cluster *Bacillus* y UMCV2 en el cluster *Arthrobacter*. Se utilizo el método de mínima evolución para inferir la posición de 360 pb en promedio. Los valores de Boobstraps >50% se representan como porcentaje de 1000 replicas en cada nodo. La barra de la derecha representa la proporción de transiciones/transversiones

También se generaron los árboles con las secuencias 5'-3' para los aislados UMCV1 y UMCV2 y la topología es similar a los árboles mostrados en este trabajo por lo que las figuras no se incluyen. A reserva de tener análisis que refuerce la posición taxonómica de estas cepas, como sería el tener la secuencia del gen 16s rRNA completa y una batería de pruebas bioquímicas, se considerará la siguiente clasificación para las cepas UMCV1 y UMCV2.

Clasificación para la cepa UMCV1

Dominio: Bacteria

División: Firmicutes

Subdivisión: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Genero: *Bacillus*

Especie: *Bacillus megaterium* de Bary 1884

Clasificación para la cepa UMCV2

Bacteria

Actinobacteria

Actinobacteridae

Actinomicetales

Micrococcineae

Micrococaceae

Arthrobacter

Arthrobacter agilis Koch 1995

Para los aislados UMCV3 y UMCV4 ambas secuencias fueron similares a organismos del género *Stenotrophomonas*, de acuerdo al análisis BLAST, razón para construir un árbol filogenético que agrupe las secuencias de ambos aislados. Este se construyó con las secuencias 3'-5' y es el que se presenta en la figura 15, el árbol generado para la secuencias 5'-3' no se muestra por presentar una distribución similar al que se enlista abajo.

El aislado UMCV3 y UMCV4 forma una rama monofilética con las secuencias de *Stenotrophomonas maltophilia* y separado de *Stenotrophomonas dokdonensis*, anteriormente se consideraba a esta especie como miembro del género *Pseudomonas* y Anzai *et al.* En el 2000 la reclasifico en el género *Stenotrophomonas*, por lo que el árbol generado en este trabajo esta en concordancia con trabajos previos al observarse una separación clara con *Pseudomonas*. De acuerdo con Berg *et al.* 2004, *Stenotrophomonas maltophilia* es una especie importante en el ámbito biotecnológico y clínico. Los aislados ambientales de *S. maltophilia* son altamente resistentes a antibióticos y su perfil de resistencia no depende de su fuente de aislamiento, esta alta resistencia es compatible con el perfil generado en el presente trabajo. El análisis de secuencias de 16S rRNA efectuado por los autores mencionados previamente soportan una alta diversidad intraespecífica y junto con propiedades fenotípicas sugieren que las especies asociadas a plantas se consideren como *Stenotrophomonas rizophila*. Al igual que las cepas de origen rizosférico, las cepas de origen clínico muestran también efectos estadísticamente significativos sobre la promoción del crecimiento aunque generalmente en cantidades menores que los aislados ambientales (Berg *et al.* 2004).

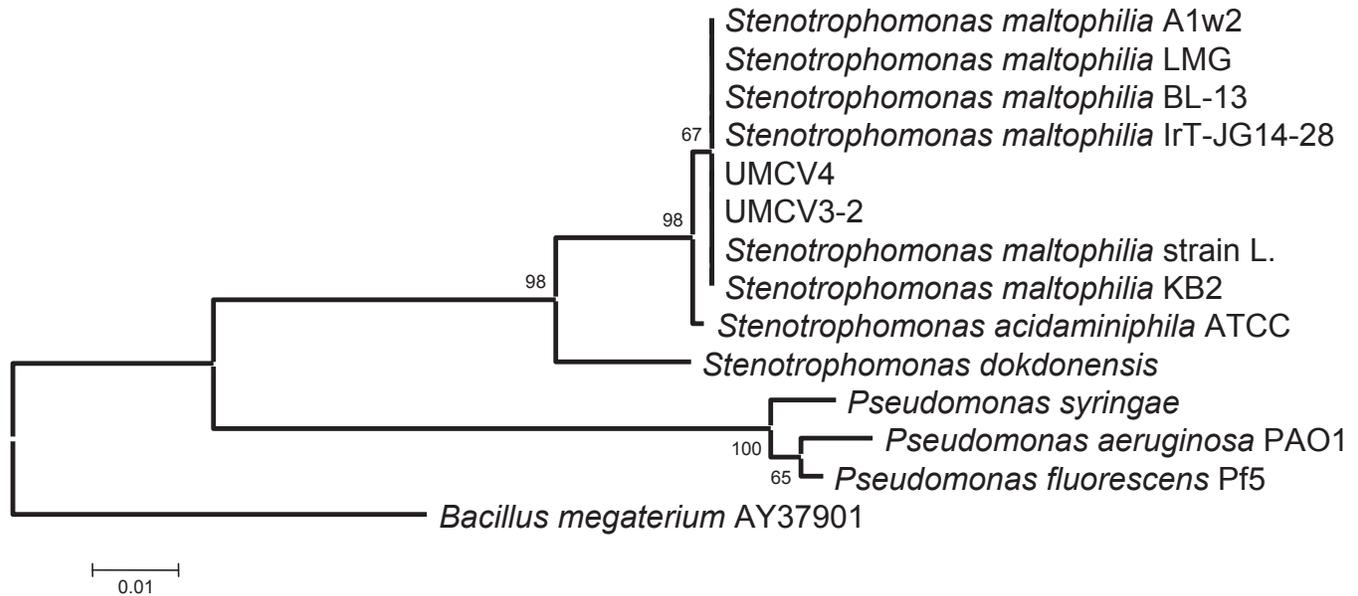


Figura 15. Árbol filogenético de las cepas UMCV3 y UMCV4 inferido a partir de secuencias de 16S rRNA por el método de mínima evolución. Los valores de Boobstraps mayores del 50% se representan como porcentaje de 1000 replicas en cada nodo, se consideraron 224 y 300 posiciones respectivamente. La barra de la derecha representa la proporción de transiciones/transversiones.

De acuerdo a la evidencia presentada anteriormente los aislados UMCV3 y UMCV4 quedarían incluidos en la especie *S. maltophilia* con la siguiente clasificación:

Clasificación para las cepas UMCV3 y UMCV4

Bacteria

Proteobacteria

Gammaproteobacteria

Xanthomonadales

Xantomonadaceae

Stenotrophomonas

Stenotrophomonas maltophilia

6.2 Reducción de hierro por cepas UMCV en suelo alcalino.

La capacidad reductora de las cepas en suelo estéril fue estimada, la cepa UMCV1 reduce cantidades mayores que el control estéril (figura 16 panel A) si bien no son estadísticamente significativas, sin embargo es notable que el nivel de reducción del aislado UMCV1 tampoco existe diferencia estadística con el control no estéril que presentó la máxima reducción en estas condiciones y que si es significativamente diferente del control estéril. Con la adición de NTA la reducción del hierro por la cepa UMCV1 no se ve aumentada (figura 16 panel B), pero al adicionar glucosa como fuente de carbono y energía se aumenta notablemente la reducción siendo esta similar a la estimada para el control no estéril lo que habla de que esta cepa por si sola tiene un potencial reductor semejante al estimado para toda la comunidad bacteria siempre que exista una fuente de carbono y energía , caso muy similar fueron los datos obtenidos para la cepa UMCV2 ya que esta en el suelo reduce cantidades muy similares a las detectadas para el control estéril y la reducción medida cuando se le adiciona NTA no aumenta considerablemente (figura 16 panel A y B), sin embargo con la adición de glucosa la reducción aumenta (figura 15 panel C) de 15 $\mu\text{M Fe(II)/g}$ suelo a 125.333 $\mu\text{M Fe(II)/ g}$ suelo. Para la cepa UMCV3 la reducción medida en el suelo sin NTA ni glucosa fue estadísticamente superior a la encontrada en el control con suelo estéril, pero muy similar a lo obtenido con las cepas UMCV1 Y UMCV2 (figura 16 panel A) sin embargo cuando se le adiciona NTA (figura 16 panel B) se detectan los niveles más altos de hierro reducido incluso comparado cuando a esta cepa se le adiciona glucosa (pero no NTA), Esto probablemente se deba a que esta cepa tenga preferencia por el sustrato Fe(III)-NTA. Para el caso de la cepa UMCV4 al igual que la cepa UMCV3 la cantidad de Fe(II) medida en el suelo sin NTA ni glucosa fue estadísticamente superior a la encontrada en el control con suelo estéril y se comporto de manera similar a las cepas UMCV1 y UMCV2 en lo que corresponde a una reducción que se ve notablemente aumentada cuando se adiciona una fuente de carbono. La reducción más alta detectada (figura 16 panel C) corresponden a el control no estéril suplementado con glucosa (143.477 $\mu\text{M Fe(II)/g}$ suelo) sin embargo este valor no es estadísticamente diferente a lo cuantificado para las cepas UMCV1 y UMCV2 (116.431 $\mu\text{M Fe (II)}$ y 125.335 $\mu\text{M Fe(II)/g}$ suelo). El Fe(II) producto de la reducción por la cepas UMCV3 y

UMCV4 suplementadas con glucosa si es estadísticamente menor (59.368 y 63.681 $\mu\text{M/g}$ suelo respectivamente) a lo obtenido por el control no estéril (143.477 $\mu\text{M/g}$ suelo). Como se observa claramente, en general, en el suelo no rizosférico empleado en el experimento, la adición de una fuente de carbono y energía aumentó grandemente la reducción férrica. Esto sugiere que solo los microorganismos implantados en un ambiente rizosférico pueden reducir el hierro de manera más efectiva ya que pueden derivar energía de los exudados radiculares a diferencia de los microorganismos que se encuentran en un suelo abierto (no rizosférico) en donde las fuentes de carbono se encuentra más limitadas o son complejas (p.ej. celulosa y lignina) y más difíciles de degradar. El hecho de que las diferentes cepas reduzcan cantidades diferentes de hierro bajo diferentes condiciones de incubación, sugiere fuertemente que la capacidad de utilización de sustrato son diferentes y estas diferencias son características particulares para cada cepa.

La reducción de Fe(III) se considera uno de los cambios químicos más importantes que toman lugar en el desarrollo de los suelos anaeróbicos y en sedimentos (Lovley 1991), y se asume que las bacterias hierro-reductoras desasimilatorias (DIRB) juegan un papel importante en estos procesos ya que utilizan al Fe(III) como aceptor final de electrones en la respiración anaeróbica (Caccavo 1999). Existen trabajos acerca de la reducción del Fe(III) del suelo que se han llevado a cabo en estrictas condiciones de cultivo anaeróbicas (Hamman y Ottow 1974, Coccavo 2001, Glassauer 2002, Kostka *et al.* 2002). Adicionalmente la mayoría de las investigaciones con DIRB a menudo se efectúan con complejos-Fe solubles como el citrato férrico más que los minerales que contiene Fe(III) en el suelo (Glasauer 2002).

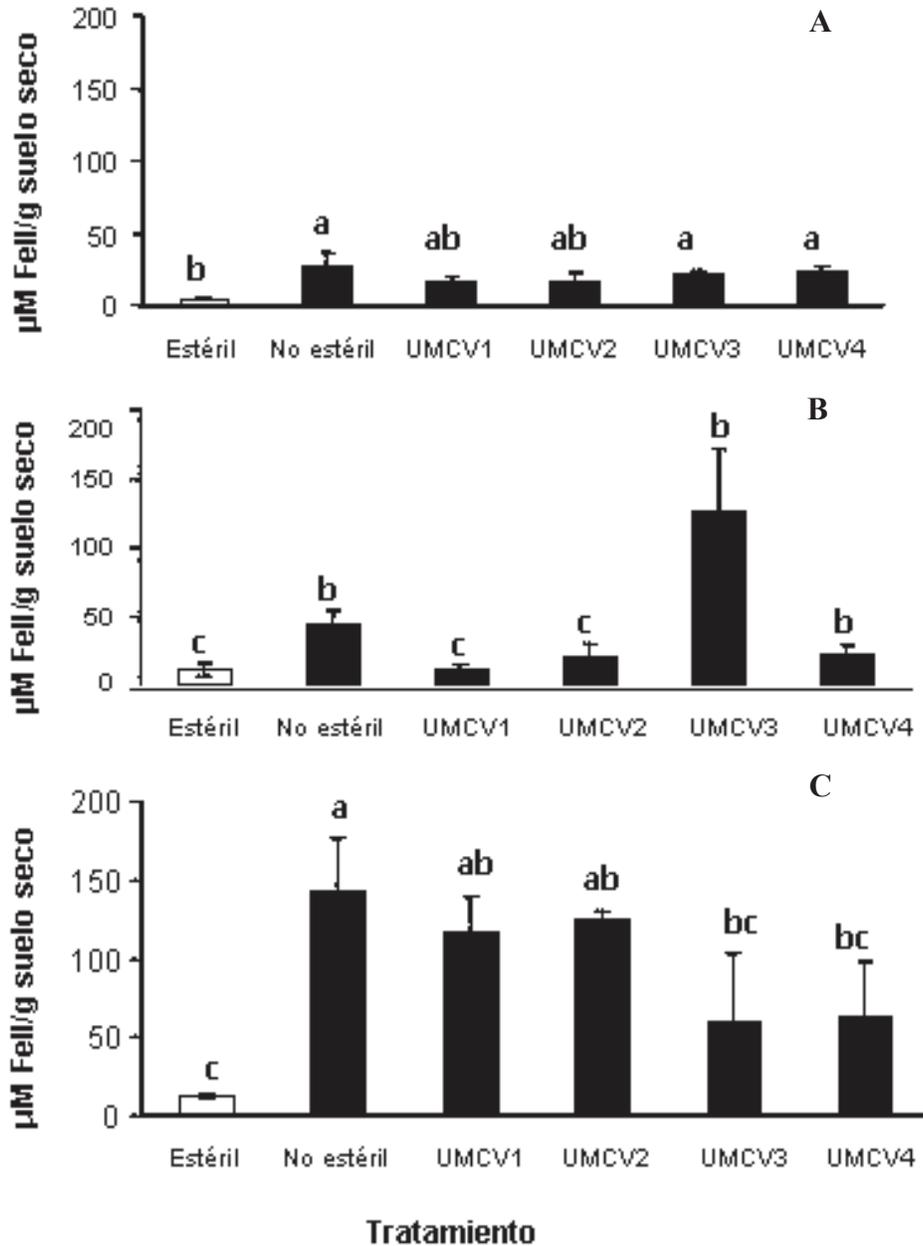


Figura 16. Reducción de Fe(III) presente en el suelo por diferentes cepas UMCV. (A) reducción de Fe(III) realizada por las diferentes cepas UMCV en suelo estéril. (B) reducción de Fe(III) efectuada por las cepas UMCV en suelo suplementado con ácido nitrilotriacético. (C) reducción de Fe(III) por cepas UMCV suplementado con glucosa. El Fe(II) se estimó después de incubar las bacterias por 7 días extrayéndolo con HCl y estimando su concentración por el método de la ferrozina. Letras similares no muestran significancia estadística con la prueba de Tukey $p < 0.05$ para (A) y (C) y con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para (B).

Poco ha sido el papel en el ciclo del hierro que se le ha dado a bacterias con metabolismo fermentativo facultativo, de acuerdo a el experimento llevado a cabo en el presente trabajo, se observo la reducción de hierro del suelo en condiciones de cultivo aeróbicas. Aunque las condiciones a las que se realizaron los experimentos de reducción de hierro no son anaeróbicas, pues ningún tratamiento se realizo para eliminar el oxígeno del suelo, se esperaría que los microorganismos inoculados consumieran el oxígeno libre, y las condiciones del sistema cambiaran a microaerofilicas, esto podría asegurar la reducción de Fe(III) del suelo.

González *et al.* (1999) estudio la colonización microbiana de pinturas rupestres en España, determino por medio de un perfil de ácidos grasos metil esterificados (FAME) que la mayoría de los aislados corresponden a *Bacillus megaterium* y que este organismo es capaz de reducir el Fe(III) de las rocas, así como los pigmentos basado en hierro de las pinturas. Demostró además que el *Bacillus* sp (cepa 9A) es capaz de reducir la hematita, un mineral que contienen hierro, lo anterior es consistente con la reducción efectuada por la cepa UMCV1 la cual de acuerdo al análisis de secuenciación tiene alta similitud con *Bacillus megaterium*.

6.3 Interacción planta-cepas UMCV en suelo alcalino estéril.

6.3.1 Colonización bacteriana de la raíz de frijol

Las cepas UMCV fueron inoculadas a plantas de frijol a una razón de 1×10^9 UFC/mL, estas cepas no tuvieron competencia interespecífica debido a que el suelo en donde fueron mantenidas las plantas fue estéril y toda vez que que las cepas fueron aisladas de un ambiente rizosférico, las probabilidades de colonización se estimaron altas, sin embargo las cepas UMCV1, UMCV2 Y UMCV3 fueron aisladas de la rizosfera de maíz (Velásquez 2003), de esta manera se hace indispensable demostrar que estas cepas tiene la capacidad de colonizar la raíz de frijol, mientras que la cepa UMCV4 fue aislada de la rizosfera de frijol por lo que se podría esperar que colonizara exitosamente a esta planta.

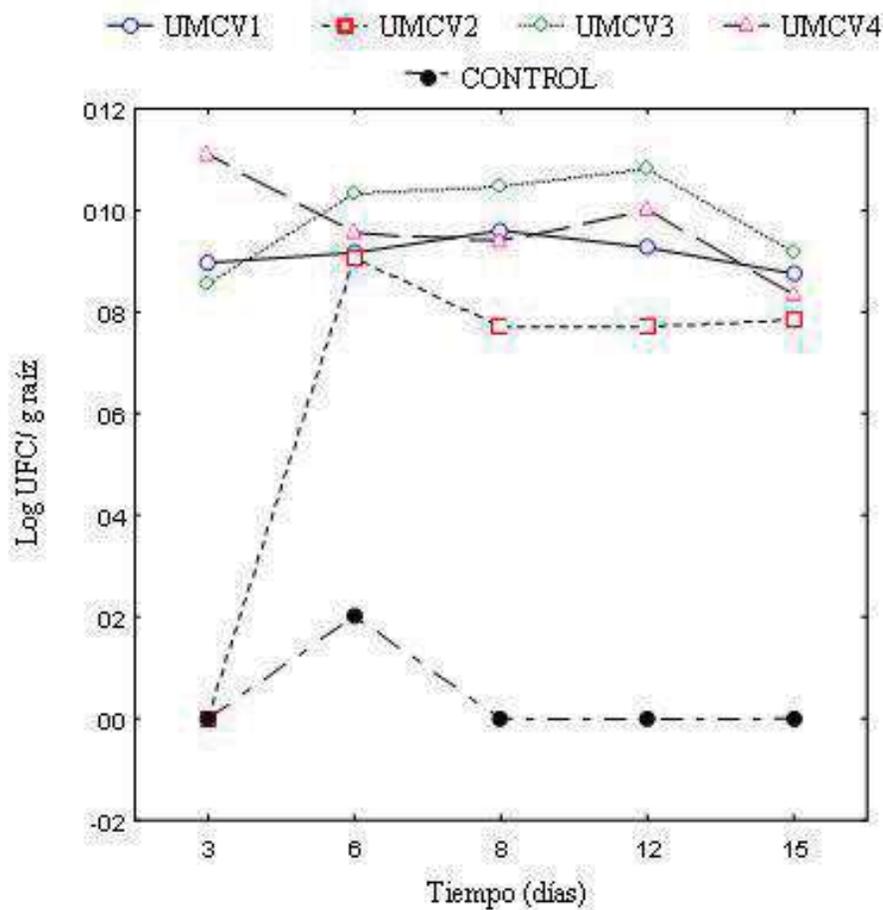


Figura 17. Cinética de colonización de las raíces de frijol por cepas UMCV. Los valores son promedios de 3 replicas. El encabezado de la figura representa el significado del tipo de línea para cada una de las cepas.

En la figura 17 se observa la cinética de colonización inicial es mayor para la cepa UMCV4, una colonización un poco menor pero comparable, presentaron inicialmente los aislados UMCV1 y UMCV3 que se comportaron de manera muy similar a lo largo del experimento, sin embargo durante los días 6 al 9 la mayor cuenta de colonias fue para la cepa UMCV3. La cuenta viable para la cepa UMCV2 siempre fue menor comparada con las otras 3 cepas, incluso al tercer día después de la inoculación no fue detectable en la raíz. Al final del experimento las cuatro cepas se encontraron colonizando la raíz en densidades similares. Se encuentra bien documentado el hecho de diversos microorganismos aislados de la rizosfera de diferentes especies vegetales e inoculadas en otras en donde se demuestra que estos aislados colonizan efectivamente la rizosfera de plantas diferentes a las que inicialmente fueron aisladas, se ha demostrado que cepas para promotoras del crecimiento

vegetal tienen efecto sobre diversas especies vegetales (Kloeper *et al.* 1980, Sharma y Nowak 1998, Egamberdiyeva y Höflich 2002), el éxito de la colonización en condiciones de esterilidad de suelo deriva del hecho de que las bacterias utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, la colonización de cepas en plantas diferentes a las de su fuente de aislamiento también se ha observado bajo condiciones de suelo no esteril. Un aspecto de la hipótesis de trabajo es que las rizobacterias ferrirreductoras pueden colonizar la rizosfera de frijol y los datos experimentales comprueban la capacidad de las cepas UMCV de colonizar al frijol

6.3.2 Efecto bacteriano en la biomasa de frijol

Al cuantificarse la biomasa de las plantas colonizadas con las cepas UMCV al cabo de 15 días se obtuvo que la cepa UMCV1 incrementa el peso fresco de la parte aérea con respecto al control sin inocular y también comparado con las plantas inoculadas con la cepa UMCV2, el peso fresco total también es mayor cuando las plantas son inoculadas con la cepa UMCV1 (tabla 8), la biomasa de la raíz no se modificó significativamente con la inoculación bacteriana, los pesos secos aéreos y el peso seco total también fue mayor cuando las plantas se encuentran colonizadas por la cepa UMCV1, de hecho el mayor peso seco total y peso seco de la raíz se obtuvo en las plantas inoculadas con esta cepa. Las plantas inoculadas con la cepa UMCV2 (tabla 8) mostraron una tendencia a aumentar el peso fresco aéreo, de la raíz y total pero estadísticamente no hubo diferencias con los controles no inoculados. La colonización de la cepa UMCV3 en plantas de frijol dio como consecuencia un aumento en el peso fresco de la parte aérea únicamente, cuando se compararon a los pesos secos, la parte aérea y el peso total demostraron que son mayores que los pesos de las plantas control (tabla 8). Los pesos frescos obtenidos para las plantas colonizadas con la cepa UMCV4 fueron mayores en la parte aérea, en la raíz y el peso total (tabla 8), es destacable que con esta cepa el peso fresco de la raíz es similar al peso de la parte aérea, el mayor peso fresco total fue obtenido en las plantas inoculadas con esta cepa y son mayores no solo con respecto al control sino también con respecto a los pesos fresco totales ganados por las plantas inoculadas con las cepas UMCV2 y UMCV3. Con respecto

a los pesos secos obtenidos con la cepa UMCV4, estos fueron mayores pero no fueron estadísticamente diferentes que el control no inoculado y que las plantas inoculadas con las otras 3 cepas. Los pesos frescos y secos de la raíz muestran una tendencia a ser uniformes y semejantes con respecto al control y entre las diferentes cepas inoculadas (tabla 8).

Tabla 8. Biomasa de frijol tratado con cepas UMCV

Tratamiento	Peso fresco (gramos)			Peso seco (gramos)		
	Aéreo	Raíz	Total	Aéreo	Raíz	Total
Control	0,870±0,165c	0,552 ±0,207b	1,422 ±0,349c	0,073 ± 0,020c	0,053 ± 0,006b	0,126 ± 0,022b
UMCV1	1,279± 0,217a	0,637 ±0,211b	1,917 ±0,320ab	0,112 ± 0,036a	0,053 ± 0,007b	0,166 ± 0,040a
UMCV2	0,991±0,069bc	0,812 ±0,172b	1,803 ± 0,211bc	0,080 ± 0,012bc	0,070 ± 0,014a	0,150 ± 0,023ab
UMCV3	1,183 ±0,176ab	0,630 ±0,259b	1,814 ± 0,296bc	0,109 ± 0,007ab	0,057 ±0,011ab	0,167 ± 0,012a
UMCV4	1,202 ±0,258ab	1,213 ±0,196a	2,416 ± 0,453a	0,086 ± 0,007abc	0,064 ± 0,007ab	0,150 ± 0,011ab

Letras diferentes representan promedios estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey α 0.05

El aumento de biomasa tiene relación con dos aspectos importantes: (1) Una enzima de universal importancia que contienen hierro es la ribonucleótido reductasa, que cataliza la reducción de ribonucleótidos difosfato (ADP, GDP, CDP, TDP) a desoxiribonucleótidos en todos los organismos (Andersson *et al.* 2001). El hierro es por lo tanto un elemento esencial para la síntesis de DNA y sin esta reacción ningún crecimiento nuclear puede ocurrir (Mengel y Kirbbi 2001). El posible aumento en la disponibilidad del hierro del suelo al ser reducido por los aislados UMCV bien podría tener significado en el aumento de la biomasa de las plantas inoculadas. (2) La otra vertiente que podría explicar el aumento en el peso de las plantas es un posible efecto promotor del crecimiento no nutrimental. Se conoce que existen una serie de mecanismos por los cuales bacterias de vida libre y rizobacterias estimulan el crecimiento vegetal. Los mecanismos que causan la promoción del crecimiento vegetal debido a determinantes bacterianos incluyen la producción de hormonas como el ácido indol acético, el ácido giberélico, las citocininas y la solubilización de fosfato (Glick 1995, Arkhipova *et al.* 2005). Ryu *et al.* (2005) inoculó 8 rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre plantas silvestres y mutantes defectuosas en la percepción de hormonas de *A. thaliana* y encontró que cuando las cepas se inoculan a una distancia de 2 cm. algunas de las cepas provocan una inhibición del

crecimiento sin embargo cuando se inoculan a una distancia de 6 cm. de la raíz de diferentes líneas de *Arabidopsis* incrementa el peso fresco aéreo, la promoción del crecimiento se encontró que esta relacionada con la señalización de brasinosteroides, AIA, ácido salicílico, giberelinas y etileno.

6.3.3 Reducción en la raíz y contenido de clorofila

Una vez comprobada que las cepas tienen capacidad de reducir el hierro del suelo y colonizar la rizosfera del frijol y que la biomasa de las plantas inoculadas se ve modificada por su efecto, se llevó a cabo una serie de experimentos tendientes a conocer si las cepas ferrirreductoras tienen la capacidad de hacer más accesible el hierro para las plantas, debido a que se ha demostrado que la reducción es un paso obligado y necesario para que las plantas estrategia I como el frijol puedan captar el hierro del suelo. El suelo que se utilizó en estos experimentos tiene un pH de 8.9 con una muy baja cantidad de hierro (1.70 ppm), al tener este pH las condiciones de limitación de hierro son altas ya que se estima que en estas condiciones el hierro se encuentra principalmente como óxidos e hidróxidos férricos que son muy insolubles, este suelo es de tipo franco arcilloso con un elevado porcentaje de bicarbonatos, situación ideal para reproducir fenómenos de estrés por hierro en diferentes plantas. Los experimentos fueron llevados a cabo con frijol (*Phaseolus vulgaris* v. flor de mayo bajío) que es una variedad susceptible a la clorosis férrica (Hernández *et al.* 1996) La capacidad de los aislados UMCV1-4 de reducir hierro acoplada a la fermentación, permite que otros organismos con los cuales coexistan (plantas por ejemplo) puedan aprovechar el hierro reducido para sus propios procesos biológicos.

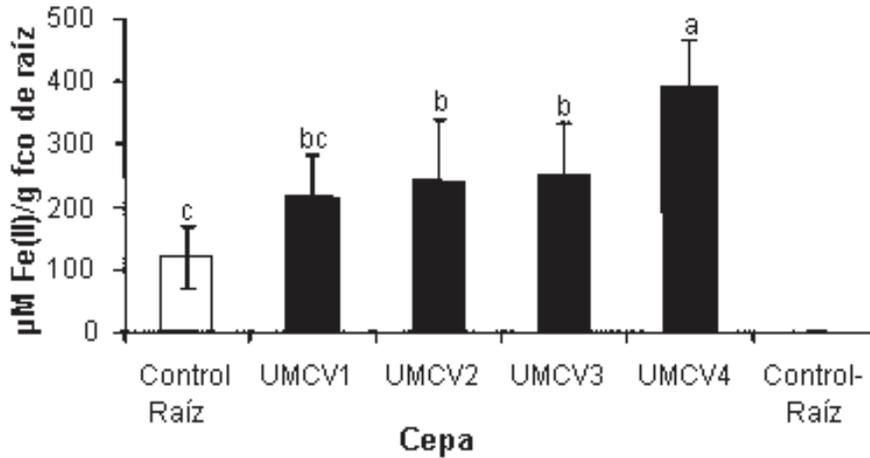


Figura 18. Reducción de Fe(III)-Cittrato en la rizosfera de frijol por las cepas rizosféricas UMCV. Las raíces fueron cortadas a los 15 días y enjuagadas con H₂O destilada estéril. Se colocaron en un tubo estéril con H₂O y se dio vortex por 30 s. Posteriormente se incubaron con una solución con citrato ferrico 1 mM, 0.5 g de glucosa/L, 0.5 g de acetato de sodio/L y 0.25 g K₂HPO₄/L. Después de incubarse por 24 hr. a 28 °C-30 °C se estimo el Fe(II) por el método de la ferrozina. Las letras diferentes representan significancia estadística con la prueba de Tukey <0.05.

Cuando se determinó la reducción del citrato férrico por las cepas ferrirreductoras en la rizosfera de frijol, se observó que en todos los casos la reducción fue mayor en las raíces de las plantas inoculadas (figura 18) y se detectaron valores de reducción estadísticamente significativos para el caso de la reducción dada por las cepas UMCV2, UMCV3 y UMCV4, ya que el hierro reducido es más disponible que el Fe(III) se hipotetizó que las plantas en donde existiera una mayor reducción férrica en la raíz, tendrían un mayor contenido de clorofila.

Se ha demostrado ampliamente que las plantas crecidas en medios de baja disponibilidad del hierro presentan clorosis, esta característica hace de la clorosis marcador de la nutrición de la deficiencia de hierro (Gruber y Kosegarten 2002). La clorofila en las hojas de frijol tratadas con las cuatro cepas ferrirreductoras mostró una tendencia a ser mayor que en las plantas control (figura 19) sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas en el contenido de clorofila con ningún tratamiento, esto puede ser debido a que

en esta etapa fenológica de las plantas no tengan deficiencias de hierro debido a que este elemento se encuentra almacenado en los cotiledones.

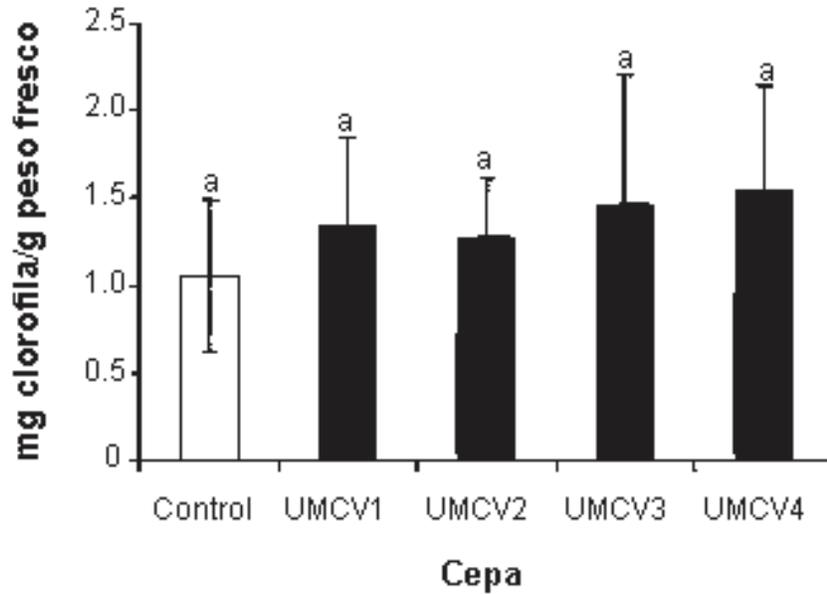


Figura 19. Contenido de clorofila total en hojas jóvenes de frijol (*Phaseolus vulgaris* v. Flor de Mayo Bajío) tratadas con cepas ferrirreductoras UMCV. Letras iguales son estadísticamente similares con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

6.3.4 Contenido de hierro

En la figura 20 se observa que la cantidad de Fe es mucho mayor en la raíz que en la parte aérea, situación que es común y que ha sido documentada ampliamente (González-Vallejo *et al.* 2000). Se ha observado que cuando las plantas crecen en un medio con alto contenido de bicarbonatos, el pH de apoplásto de la raíz se eleva y ocasiona que el hierro que fue captado por la raíz se vuelva a oxidar ocasionando grandes pozas de hierro que se inmoviliza en la raíz y que no puede ser removilizado a la parte aérea (Gruber y Kosegarten 2002). De acuerdo con el análisis fisicoquímico del suelo el porcentaje de bicarbonatos del suelo del Lometón es de 32.2%, considerado extremadamente alto y que seguramente tienen influencia sobre el pH del apoplásto de la raíz del frijol inmovilizando el hierro que ingresa a la raíz. No se encontraron diferencias en el contenido de Fe en la raíz con ninguna

cepa inoculada con respecto al control sin inocular. El contenido de Fe en la parte aérea de las plantas inoculadas con las cuatro cepas mostró una tendencia a ser mayor que el de las plantas sin inocular. Las diferencias mayores y significativas en la Concentración de Fe en la parte aérea se dan en las plantas inoculadas con las cepas UMCV2 y 3. Cuando se expresa el contenido de Fe como la cantidad total de Fe presente en las plantas, se observan también una tendencia a aumentar el contenido de Fe con todas las cepas inoculadas, siendo mayor la cantidad de Fe en la parte aérea en las plantas inoculadas con la cepa UMCV1 y UMCV3. Es obvio que en las diferencias encontradas en el Fe total es un factor importante en la biomasa total de la planta, sin embargo el crecimiento mismo de la planta está comprometido (Vert *et al.* 2002) por un suministro deficiente de Fe, en este sentido el aumento en biomasa aérea, manteniendo una concentración de Fe no solo similar sino superior a la encontrada en los controles sin inocular es un claro indicativo de un mejor suministro de Fe a la planta.

Los datos sugieren que la reducción en la raíz provocó un aumento en el hierro en la parte aérea para los casos de las plantas inoculadas con las cepas UMCV1 UMCV2 y UMCV3. Caso contrario ocurrió con la cepa UMCV4 en donde, los valores de reducción obtenidos fueron los mayores (figura 18) y el contenido de hierro de estas plantas fue similar al de las plantas control (figura 20), si bien la reducción del citrato férrico fue la mayor, esta forma de medir este proceso implica cortar la raíz e incubarla en una solución con Fe(III)-citrato y la reducción que se estima es la que las bacterias realizaron en esta solución lo cual no implica necesariamente que en el suelo suceda lo mismo. Al respecto el experimento en donde fue inoculada la cepa UMCV4 en el suelo (figura 16) suplementada con glucosa, situación que bien podría ser más cercano a lo que en realidad pudiera estar ocurriendo en el suelo, la reducción no fue la más grande comparada con las otras tres cepas y con el control, de tal manera que esta cepa inoculada a las plantas crecidas en suelo, la reducción no sea suficiente como para que tenga un efecto importante sobre la acumulación del hierro en el tejido aéreo.

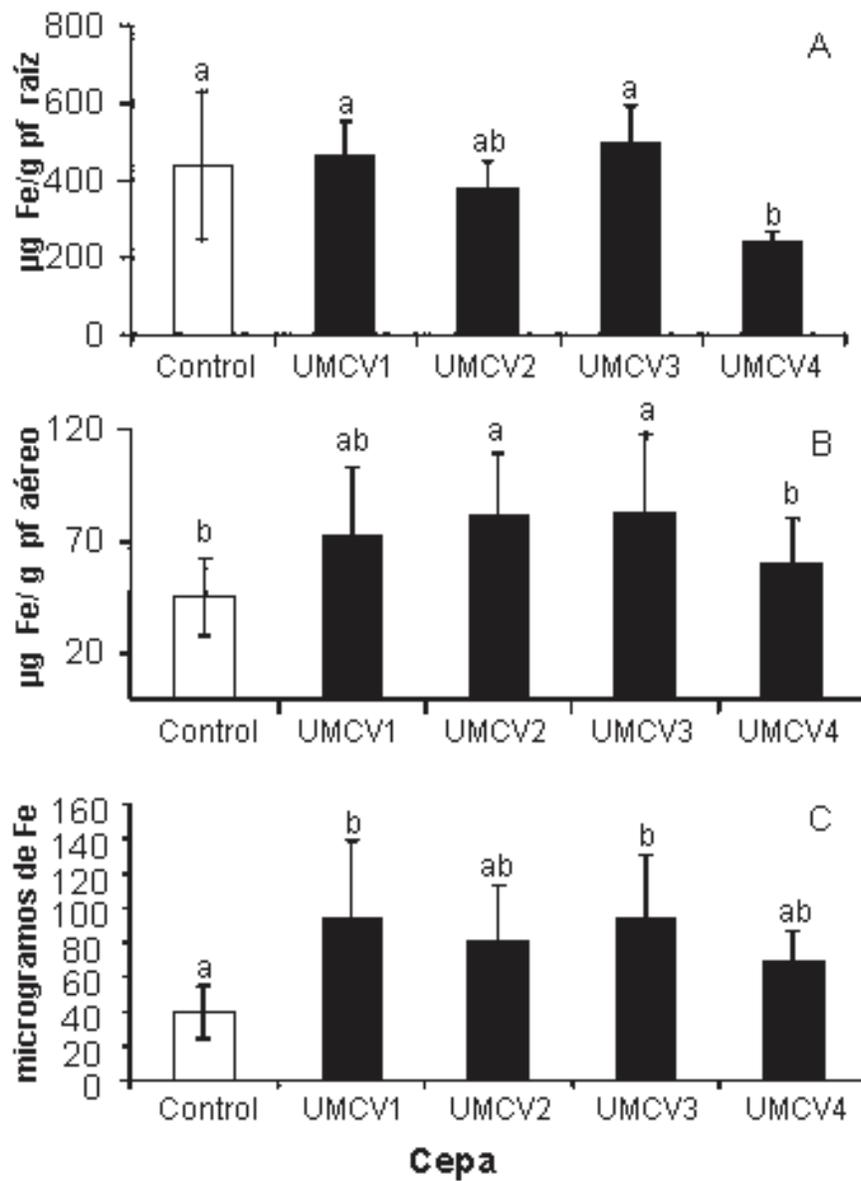


Figura 20. Contenido de hierro total en plantas tratadas con cepas ferrirreductoras UMCV. Se estimó el hierro total en cenizas por el método de la ferrozina a los 15 días de tratamiento con una solución extractora HCl-hidroxilamina 0.25 M (A) Concentración de hierro por gramo de peso fresco de raíz. (B) Concentración de hierro por gramo de peso fresco aéreo. (C) cantidad de hierro en la parte aérea. Letras diferentes representan promedios estadísticamente significativos con la prueba de Tukey $p < 0.05$

La existencia de un paso de reducción de Fe(III) a Fe(II) obligatorio antes de la captación del Fe por parte de las raíces de plantas dicotiledóneas (Mascher y Römheld 1994), sugiere que cualquier proceso de reducción en el ambiente rizosférico pudiera tener efecto sobre la captación de este elemento, y de acuerdo a los resultados obtenidos, las bacterias rizosféricas ferrirreductoras pueden hacer más soluble el hierro y por lo tanto más fácilmente disponible para la planta.

Una vez que el Fe es captado por la raíz, debe ser transportado a diferentes partes de la planta. El Fe se transporta como Fe(III) en el xilema acompañado con citrato u otras especies aniónicas, especialmente ácidos orgánicos (González-Vallejo 2000). Este mecanismo implica que transportadores activos en la raíz deben cargar el hierro de las células corticales al xilema. Los transportadores de eflujo de hierro no han sido caracterizados a nivel molecular en plantas (Curie y Briat 2003). Dado que una vez en el xilema el Fe(II) se reoxida a Fe(III), es probable que el aumento en la concentración de hierro en la parte aérea de las plantas tratadas se deba a el hecho de que al ingresar una mayor cantidad de hierro en forma reducida, una parte de este se oxide, sin embargo otra parte probablemente no y pueda movilizarse a la parte aérea.

Otra hipótesis altamente especulativa, es que el ingreso al simplasto de la planta de altas cantidades de Fe(II) que no tuvo que ser reducido por la planta, altere su equilibrio de protones provocando una baja en el pH que se traduzca en una menor tasa de reoxidación de Fe y en una mayor tasa de nueva reducción de Fe(III) en. En este sentido, ya se ha documentado en hojas de girasol que una baja en el pH apoplástico incrementa la reducción férrica.

Poco documentado es el hecho del transporte del hierro desde los tejidos vía la savia del floema, sin embargo está bien establecido que la savia del floema contiene hierro. Una de las moléculas identificadas como potencial transportador de metales es la nicotianamina (Curie y Briat 2003).

Se sabe que los microorganismos participan activamente en procesos que tienen que ver con el aporte de nutrientes a las plantas como es el caso de bacterias fijadoras de nitrógeno tanto de vida libre y simbióticas, micorrizas que aportan fósforo, entre otros mecanismos (Crowley *et al.* 1992) con respecto al hierro, se conoce que los microorganismos pueden producir sideroforos que pueden ser utilizados por las plantas cuando se encuentran en un medio con deficiencia de hierro, pero también se ha demostrado que bajo condiciones de baja solubilidad de este elemento los microorganismos que liberan sideroforos tienen una mayor afinidad por este compuesto y llegan a competir por el hierro con las plantas (Bar-Ness *et al.* 1992, Chen 1998, Römheld 2002),

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, las plantas inoculadas tienen una mayor biomasa y un mayor contenido de hierro aéreo por lo que se puede concluir que, las bacterias desimilatorias hierro-reductoras (DIRB) fermentativas también juegan un papel activo en los procesos de asimilación de hierro por parte de las raíces de las plantas.

Considerando que la semilla de frijol tiene una reserva importante de hierro, es de esperarse que una inoculación con bacterias ferrirreductoras en plantas que tengan una semilla chica, tengan muchos menos nutrientes almacenados y que en estas circunstancias la inoculación favorezca mucho más a este tipo de plantas

6.3.5 Correlación de las variables

Se realizó un análisis de correlación múltiple y se consideraron como correlaciones significativas las mayores a 0,8 de acuerdo al criterio de Manly (1994).

Los resultados de este análisis demuestran que la clorofila se encuentra correlacionada fuertemente con la reducción en la raíz, aunque estadísticamente no se encontraron diferencias en el contenido de clorofila en plantas inoculadas y no inoculadas, si existen diferencias numéricas, debido a estas diferencias, se encuentra una correlación positiva ($R^2=0.9014$), de esta manera la reducción en la raíz aumenta el hierro disponible lo cual se ve reflejado en el contenido de clorofila. El contenido de hierro en la parte aérea se

encuentra correlacionado con el peso seco total y con la colonización de las cepas en la raíz. El hierro, como ya se discutió con más detalle anteriormente es un elemento esencial para el crecimiento vegetal, por esta razón se encuentra correlacionado con el peso seco total, adicionalmente, la colonización influye el contenido de hierro aéreo debido a que al reducirlo en la raíz, este es más disponible para la planta. El contenido mayor de hierro en la parte aérea correlacionado a la colonización, se deba, probablemente a que las bacterias inoculadas pudieran ser endofíticas y una que ingresan a la raíz, puedan continuar con la actividad de ferrirreducción y que el hierro pueda ser removilizado a la parte aérea, una explicación alternativa pudiera ser que la rizobacterias liberen algún factor (desconocido por el momento), que promueva la síntesis de proteínas transportadoras y de flujo hacia la parte aérea o que las bacterias modifique el pH del interior de la raíz y que se facilite de esta manera la removilización de la pozas de hierro acumulado en la raíz. El hierro de la raíz esta correlacionado únicamente con el hierro total situación clara ya que no hubo diferencias en el hierro estimado en la raíz con ningún tratamiento.

Tabla 9. Correlación múltiple para las variables cuantificadas en experimentos en suelo estéril

Variable	Reducción en raíz	Hierro aéreo	Hierro raíz	Hierro total	Peso fresco total	Peso seco total	Clorofila	Colonización
Reducción en raíz	1							
Hierro aéreo	0,2526	1						
Hierro raíz	-0,75	0,2919	1					
Hierro total	-0,6736	0,4228	0,9902	1				
Peso fresco total	0,2047	0,6531	0,026	0,1201	1			
Peso seco total	0,4114	0,8199	0,2506	0,3574	0,6238	1		
Clorofila	0,9014	0,4868	-0,3946	-0,3026	0,2491	0,7177	1	
Colonización	0,6849	0,8204	-0,1094	0,0163	0,6725	0,9204	0,852	1

Se correlacionaron los valores promedio obtenidos como producto de la inoculación de las cepas UMCV en plantas de frijol a los 15 días de tratamiento. Los valores de R² mayores a 0.8 se resaltan con fondo gris.

La cantidad de hierro se encuentra correlacionado con el peso fresco total y es una evidencia de porque cuando los resultados de la cantidad de hierro se expresan como un monto total y no como una concentración existen diferencias significativas con respecto al control, esto implica que el aumento en la biomasa causado por la inoculación bacteriana

no diluye el contenido de Fe en el tejido. De acuerdo a este análisis la colonización en las raíces es el factor que mas influencia tiene sobre los otros factores, ya que se correlacionan positiva y significativamente con el contenido del hierro en la parte aérea, el peso seco total y la clorofila. Esto concuerda con la hipótesis de que las bacterias ferrirreductoras incrementan el suministro de Fe a la planta. En este mismo sentido, adicional, si se excluyen los datos de las plantas no inoculadas, la correlación entre Fe total y Fe en la parte aérea se incrementa desde un 0.42 (no significativo) a un 0.82 que según el criterio de Manly (1994) es significativo.

6.4 Experimentos “*in vitro*”

Con fines de visualizar la reducción producida “*in vivo*” por las cepas que colonizan la raíz, se llevo a cabo un experimento utilizando ferrozina como un indicador del hierro ferroso en el medio, los tratamientos consistieron en inocular por separado las cuatro distintas cepas en plantas de frijol que tenían 3 días de crecimiento en un medio mineral sin ninguna fuente de carbono o energía , el mismo medio pero sin planta se inoculo a una densidad bacteriana similar a los experimentos con planta.

Los tratamiento en donde se inoculo la bacteria junto con plantas dio como resultado el hecho de que siempre se visualizo un color púrpura típico (figura 21) de la unión del hierro ferroso con la ferrozina, las plantas control mostraron un nulo o casi nulo cambio de color. Los tubos en donde se incubaron los aislados en el medio planta de frijol, siempre se visualizo el cambio de color (figura 21) que demuestra la aparición de hierro reducido, el cambio de color en estos tubos fue predominante de la parte media al fondo del tubo, lo que sugiere que las condiciones microaerofílicas favorecen la reducción o quizás evitan la reoxidación del hierro ferroso.

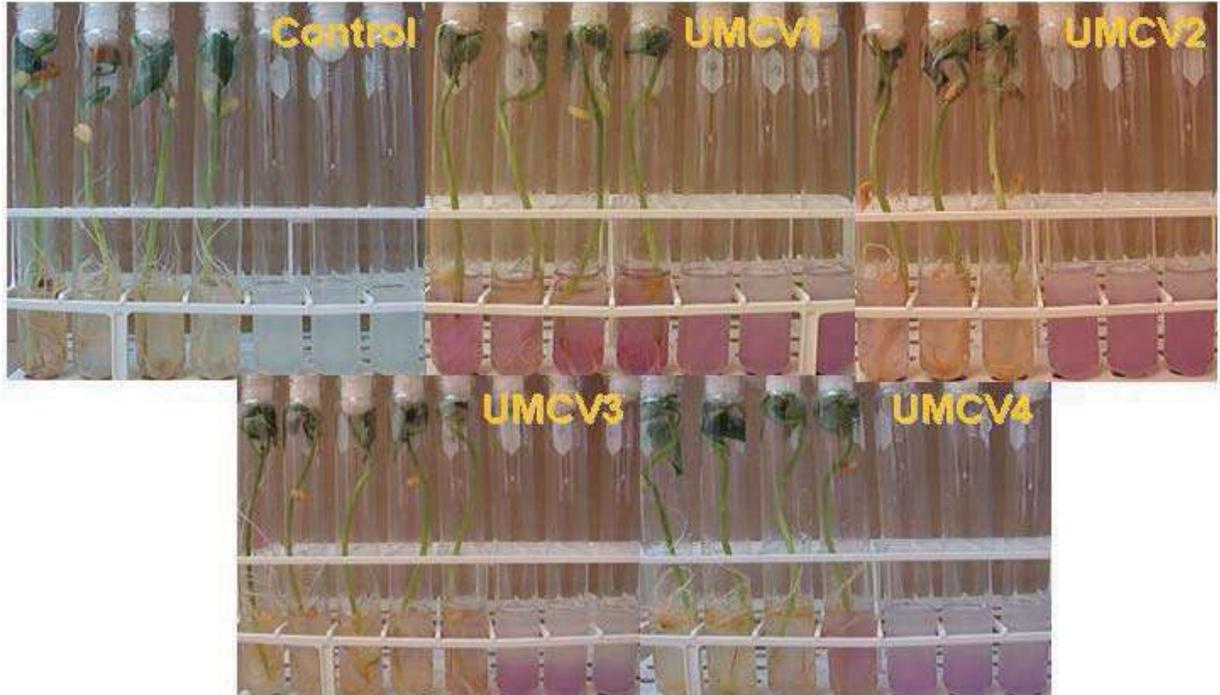


Figura 21. Visualización de la reducción. Los tubos contienen medio mineral (MM) a un pH 8.5. como fuente de hierro se utilizó FeAQDS $40 \mu\text{M}$ y ferrozina $100 \mu\text{M}$ como indicador de Fe(II). Se inocularon 1×10^4 UFC/mL de cada una de las cepas UMCV y se tomó la fotografía a los 15 días

6.4.1 Cinética de concentración de Fe(II) “*in vivo*”

De acuerdo a la evidencia anterior se determinó que con la metodología antes seguida se visualiza de una manera adecuada la concentración del hierro ferroso en el medio y se efectuó una cuantificación a través del tiempo de la concentración del hierro ferroso producido por el metabolismo bacteriano en un segundo experimento donde se aumentó la concentración de FeAQDS y se aumentó también la densidad del inóculo con el objetivo de obtener resultados más claros.

La cuantificación se inició al tercer día después de la inoculación, a este tiempo se encontró que la máxima concentración de hierro ferroso en el medio se encontró en las plantas inoculadas con la cepa UMCV3 (figura 22, panel A), a este mismo tiempo se observó una concentración de aproximadamente $25 \mu\text{M}$ de Fe(II) en el medio con frijol inoculado con las cepas UMCV2, UMCV1 y UMCV4 (figura 22, panel A). Después del sexto día se observa una disminución en la concentración del hierro ferroso, hacia el día 12

la concentración del ferroso es nula para los tratamientos en donde se inocularon las cepas UMCV1, UMCV3, UMCV4 y para la cepa UMCV2, aunque disminuye notablemente la concentración de hierro ferroso, este nunca llega a ser de cero (figura 22, panel A). Las mayores concentraciones de ferroso fueron obtenidas en los tubos inoculados con la cepa UMCV3. (que es la misma cepa que tuvo una mayor reducción en suelo con NTA, mayor colonización de la raíz en experimentos en suelo, promovió mayor concentración de Fe en los tejidos vegetales, y mayor monto total de Fe en la planta discutir a este respecto). En las plantas controles se determinó una mínima concentración de hierro ferroso por lo que se asume que el aumento del color en los tubos está determinado principalmente por la ferrirreducción de las bacterias y no por la reducción propiciada por las FQ-R de las raíces de frijol.

Cuando se estimó la concentración de hierro ferroso en tubos en donde no fueron crecidas plantas de frijol se observó el cambio de color del medio producto de la aparición del ion ferroso mediado por el metabolismo bacteriano (figura 22, panel B), situación que había sido demostrada anteriormente con $40 \mu\text{M}$ FeAQDS. En el día 3 después de la inoculación se observó que el aislado UMCV3 (figura 22, panel B) es el que reduce una mayor cantidad de hierro comparado con la producción de hierro de las otras tres cepas, situación que concuerda con lo estimado en la visualización de la reducción en los tubos en donde los tratamientos consistieron en inocular las cepas en medios en donde existía planta, es notable que a este mismo tiempo (día 3 después de la inoculación) la concentración de hierro ferroso detectada en los tubos con los tratamientos frijol-cepa UMCV es mayor que en los tubos en donde únicamente se encuentra la bacteria y que sugiere que las plantas proveen de alguna fuente de carbono útil para las cepas ya que la reducción se ve favorecida. Hacia el día 6 se detectó la máxima concentración de hierro reducido en los tubos donde fueron inoculadas las cepas UMCV1 y UMCV3, mientras que las cepas UMCV2 y UMCV4 alcanzan este punto máximo hasta el día 12 (figura 2,1 panel B), no se observa disminución en la concentración del ion ferroso una vez que alcanza el estado estacionario, la pérdida de color solo se observa en los tubos en donde existe la interacción planta-microorganismo. Sin embargo cuando se determinó la cantidad de hierro en el tejido

de las plantas inoculadas esta no fue diferente de las plantas control. Interesantemente hubo reducción en los tubos con planta y sin planta sin que existiera ninguna fuente de carbono en el medio, debido a que las bacterias fueron crecidas en agar nutritivo y de este medio fueron cosechadas directamente, las bacterias utilicen reservas de carbono para efectuar la reducción.

Los experimentos anteriores fueron planeados con el propósito de visualizar la reducción de una manera clara, con plantas completas, es decir, sin cortar las raíces, estos experimentos no fueron diseñados con el propósito de correlacionar la reducción y el aporte de hierro a las plantas, de esta manera se utilizó la ferrozina que es un compuesto que unido a el Fe(II) forma un complejo color púrpura, de esta manera la ferrozina también se utiliza como competidor por el ion ferroso en los medios de cultivo (Schikora y Schmidt 2001). De todas maneras se cuantificó el contenido de hierro en los tejidos de las plantas, y los resultados se describen a continuación.

Las rizobacterias ferrirreductoras en interacción con el frijol

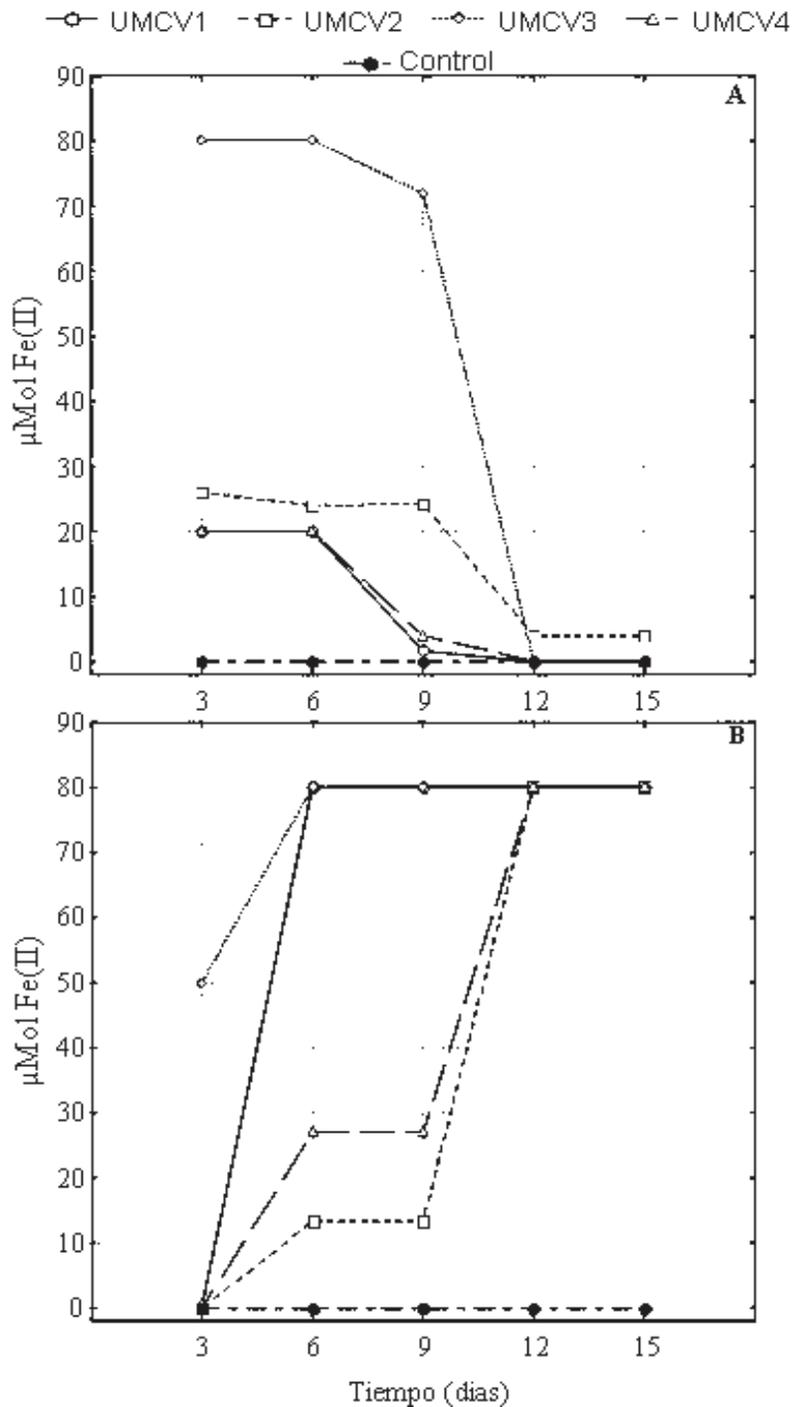


Figura 22. Cinética de concentración de Fe(II). (A) Cinética de concentración de Fe(II) acumulado en tubos con plantas de frijol crecidas en medio mineral e inoculados con cepas UMCV. (B) Cinética de concentración de Fe(II) en tubos con medio mineral inoculados con cepas UMCV. En todos los casos se utilizaron 100 μMol de FeAQDS, 100 μMol de ferrozina y 1×10^9 UFC/mL de cada una de las cepas. La estimación se realizó en base a una curva patrón visual con medio mineral y sulfato ferroso como se describe en materiales y métodos. Los encabezados señalan el significado de las líneas.

6.4.2 Concentración de Fe en los tejidos.

Cuando se estimó la cantidad de hierro en el tejido se encontró que cuando las plantas fueron crecidas en un medio con 40 μM de FeAQDS las plantas control tienen más Fe por gramo de tejido fresco que las plantas tratadas con las cuatro cepas ferrirreductoras (tabla 10), cuando se aumenta la concentración de hierro en el medio a 100 μM , aumenta la concentración de hierro en la parte aérea aunque no significativamente tanto para las plantas control como para las plantas inoculadas con las cuatro cepas UMCV. El control crecido con 100 μM de hierro fueron las plantas que tuvieron más hierro en la parte aérea (tabla 10).

En lo que respecta a la cuantificación de hierro en la raíz se estimó que cuando las plantas crecen en un medio con 40 μM de FeAQDS se acumula una mayor cantidad de hierro en las raíces que en la parte aérea (tabla 10), sin embargo cuando las plantas son mantenidas en un medio con 100 μM de hierro y con una densidad bacteriana mayor se observan cantidades similares tanto en la parte aérea como en la raíz (tabla 10).

En lo que respecta a el Fe en la raíz con 40 μM las raíces inoculadas con la cepa UMCV2 tiene una mayor cantidad de hierro comparadas con el control y con la cepa UMCV3 y UMCV4 (tabla 10), con la cepa UMCV3 crecida en medio con 100 μM de FeAQDS se cuantifican los niveles más bajos de hierro, la cantidad de hierro en la raíz de las plantas crecidas con 100 μM FeAQDS siempre es menor que la cantidad de hierro determinada para las plantas crecidas con 40 μM de FeAQDS, esto se debe a que en estos tratamientos la densidad bacteriana fue mayor en los tratamientos con 100 μM de Fe AQDS y probablemente se redujo una mayor cantidad de hierro que al unirse a la ferrozina quedo una mayor cantidad de hierro indisponible para las plantas de frijol y por eso se cuantifican cantidades menores de hierro. En la cuantificación de hierro total se observa que las plantas con mayor cantidad de hierro total son las tratadas con la cepa UMCV2 cuando son crecidas en un medio con 40 μM de FeAQDS (tabla 10). Aun cuando se encuentra

Las rizobacterias ferrirreductoras en interacción con el frijol

diferencias numéricas en la cuantificación del hierro no se encontraron diferencias estadísticas con ninguna de las cepas ni con el control.

Con respecto a hierro total cuantificado en las plantas crecidas con 100 μM de FeAQDS este siempre fue menor que en las plantas crecidas con 40 μM aunque no se encontraron diferencias estadísticas con ningún factor (concentración de hierro en el medio y el factor cepa).

Tabla 10. Contenido de Fe ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en plantas de frijol tratadas con cepas ferrirreductoras UMCV

Cepa	Aéreo		Raíz		Total	
	40 μM^{A}	100 μM^{A}	40 μM	100 μM	40 μM	100 μM
Control	23,65 \pm 6,50ab ^B	32,62 \pm 3,94 a ^B	46,25 \pm 10,78bc	24,61 \pm 5,78 bcd	69,90 \pm 15,12ab	57,23 \pm 9,72abcd
UMCV1	15,30 \pm 1,67c ^B	18,13 \pm 2,31 bc	51,72 \pm 16,41ab	27,00 \pm 8,98cd	67,03 \pm 16,36abc	45,14 \pm 8,11cd
UMCV2	11,07 \pm 2,62c	18,29 \pm 0,94bc	73,86 \pm 3,81a	19,71 \pm 4,01 d	84,93 \pm 2,78a	38,01 \pm 4,38d
UMCV3	16,65 \pm 1,18 bc	16,70 \pm 5,87bc	27,17 \pm 8,23cd	23,32 \pm 3,04 d	44,75 \pm 9,79bcd	40,02 \pm 3,35 dc
UMCV4	18,28 \pm 1,98 bc	13,42 \pm 1,57c	39,30 \pm 14,30bcd	20,93 \pm 4,11d	57,58 \pm 14,40bcd	34,60 \pm 4,43 d

A. Se refieren a diferentes concentraciones de FeAQDS en el medio en donde fueron crecidos las plantas de frijol

B. Se comparan los promedios \pm desviación estándar tratados con diferentes cepas a una misma concentración de FeAQDS y se comparan los promedios para una misma cepa a diferente concentración de FeAQDS

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares de acuerdo a la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$

Es interesante notar que en los experimentos en donde había plantas inoculadas con la cepas UMCV hubo una tendencia a disminuir el color en el medio desde el día 6 después de la inoculación y que en los tubos en donde se inoculo a la bacteria, el color jamás desapareció, lo cual probablemente se deba a que las plantas puedan estar tomando el hierro en le medio, sin embargo cuando se cuantificaron los niveles de hierro en las plantas tratadas no hubo una aumento en la concentración de hierro en las plantas inoculadas, este resultado es contrastante y posiblemente se deba a una combinación de las siguientes consideraciones: (1) De acuerdo a la literatura se tiene conocimiento que cuando las plantas son nutridas con nitrato como única fuente de nitrógeno el pH del medio tiende a

aumentar, debido a que este elemento se internaliza por medio de un cootransporte protón/nitrato a través de la membrana plasmática de la raíz (Mengel 1994) y en el caso del experimento se utilizó KNO_3 , y la pérdida de color posiblemente se deba a un aumento en el pH y por lo tanto una probable oxidación del Fe(II) que se traduce en una pérdida de color, (2). De acuerdo a datos de Bar-Nes 1992, en estudios de captación de Fe en maíz determino que al adicionar BPDS que es un fuerte agente quelante para Fe(II) y actúa inhibiendo la captación de Fe(II), pero resultados de Jeffreys y Wallace en 1968 demuestran que plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) tienen tallos y peciolos púrpuras cuando crecen en soluciones con altas concentraciones (>1 mM) de FeEDDH (color rojo) indicando que grandes cantidades de la molécula sin reducir fueron captados, lo anterior sugiere que existe un proceso de captación de Fe pasivo (la ferrozina es un quelante de Fe(II) y no se observó en ningún momento que las plantas de frijol hubieran tenido un color púrpura, por lo que al parecer el complejo Fe(II)-ferrozina no penetró en las plantas. (3) bajo condiciones de pH elevado del medio, las plantas inducen la síntesis de H^+ -ATPasas cuya función es liberar protones para acidificar el medio y solubilizar nutrientes (Mengel 1994), datos de Pinton *et al.* (1999) demuestran que cuando el Fe es incluido en el medio de cultivo acompañado con sustancias húmicas se estimula la liberación de H^+ y para el caso particular se utiliza Fe acompañado con AQDS que es un análogo de ácidos húmicos, esto podría explicar el hecho de que las plantas control tengan cantidades de hierro similares a las tratadas, debido a que las plantas fueron capaces de acidificar el medio y solubilizar el hierro para después tomarlo (4) la ferrozina es un quelante de Fe(II) y lo hace indisponible (Schikora y Schmidt 2001), esto podría traducirse en diferencias en el contenido de hierro en la planta, ya que las plantas inoculadas con bacterias ferrirreductoras se observa que existe Fe(II) en el medio el cual se encuentra quelado con la ferrozina y por lo tanto menos disponible para la planta, estos dos últimos aspectos podrían explicar el porque en los experimentos *in vitro* las plantas inoculadas tienen menos hierro que las plantas control.

Dado que no existieron diferencias claras en las cantidades de hierro en las plantas inoculadas y en las plantas control, se hace evidente que la ferrozina es un factor que esta

determinando este tipo de comportamiento y además se especuló que posiblemente las plantas control puedan acidificar el medio y solubilizar el hierro y captarlo. En un primer experimento se midió la capacidad de amortiguamiento del medio en donde fueron crecidas las plantas de frijol comparado con el suelo básico proveniente del Lometón. Se demostró que el medio en donde fueron crecidas las plantas de frijol tiene una reducida capacidad de amortiguación ya que se requieren en promedio 0.166 meq de H^+ para bajar el pH del medio de 8.5 a 7.5 y tan solo 0.366 meq para bajar el pH a 6.5 (figura 22). Por el contrario se requieren 100.8 meq de H para bajar el pH del suelo de 8.5 a 7.5 y hasta 610.8 para bajarlo en una unidad más (figura 23) lo que representa un volumen promedio de 14 mL de HCL 1N. Esto tiene una relevancia biológica importante debido a que las plantas crecidas en medio mineral pudieran tener la capacidad de acidificar el medio y por lo tanto poder solubilizar nutrientes como el Fe de una manera más fácil, mientras que estas mismas plantas cuando son crecidas en suelo básico enfrentan un ambiente con una capacidad de amortiguación tal que la planta no tenga la capacidad de solubilizar nutrientes por medio de la liberación de protones y esto explicaría muy posiblemente las diferencias encontradas en biomasa y cantidad de hierro obtenidas en las plantas crecidas con hierro comparadas con las plantas crecidas en el medio mineral.

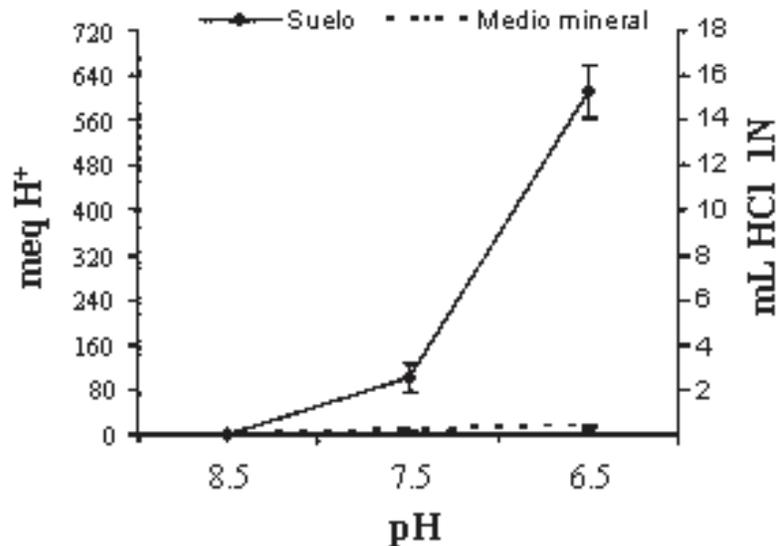


Figura 23. Capacidad de amortiguamiento del suelo básico del Lometón (pH 8.9) y el medio mineral (pH 8.5).

Cuando se observaron con detenimiento las raíces se considero que había un cambio en la arquitectura de las raíces de las plantas inoculadas, por lo que se pensó que los cambios posiblemente se debían a que las cepas muy probablemente sean promotoras del crecimiento. Para poder tener una medida del posible efecto promotor del crecimiento las raíces fueron contadas y medidas.

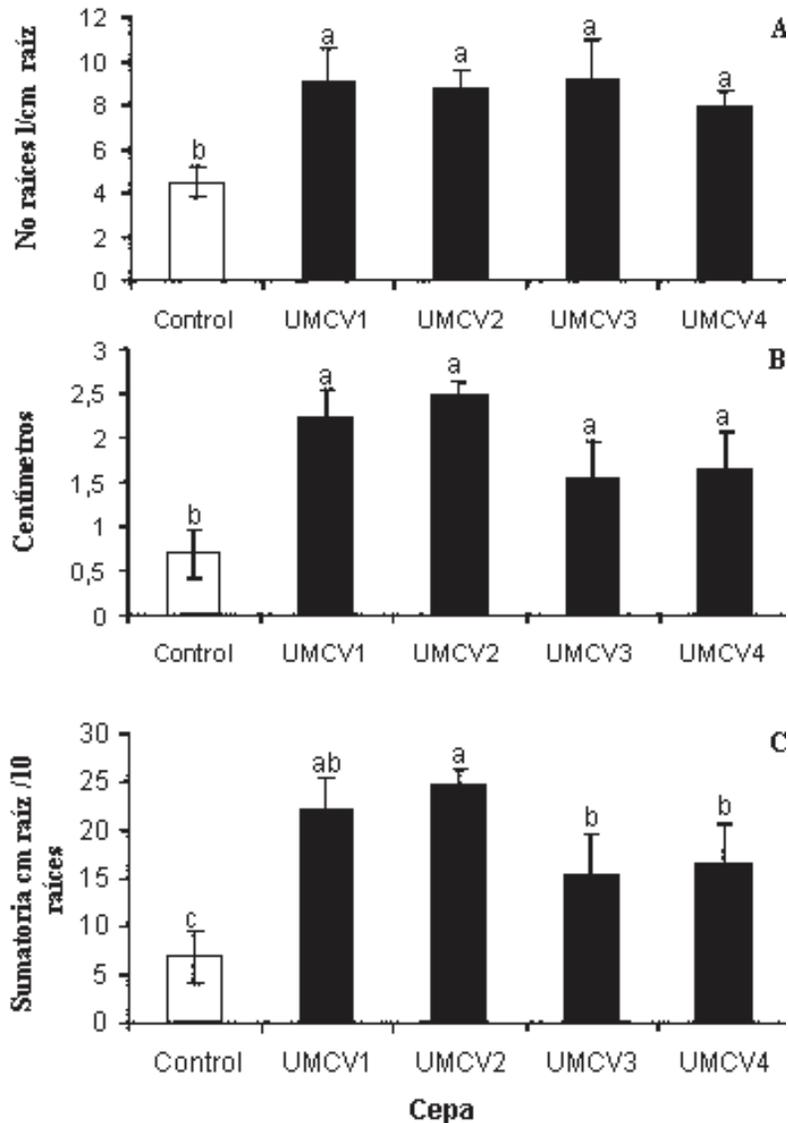


Figura 24. Cambios en la arquitectura de la raíz de plantas de frijol inoculadas con cepas UMCV. Valores promedio para: (A) Numero de raíces laterales /cm de raíz principal, (B) longitud de las raíces laterales y (B) sumatoria de la longitud de 10 raíces laterales. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba de Tukey $p < 0.05$

Se determino que las cepas que las cuatro cepas aumentan notablemente el numero de raíces laterales (figura 24, panel A) y la longitud de las raíces laterales (figura 24, panel B), no habiendo diferencias para estas dos variables entre las cepas, pero encontrándose diferencias con el control no tratado. Al sumar la longitud de las raíces laterales y da como resultado que las plantas tratadas con las cepas UMCV1 Y UMCV2 suman una mayor longitud de raíz lateral que el control (figura 24, panel C), asimismo las plantas tratadas con las cepas UMCV3 y UMCV4 también suman una mayor longitud que las raíces laterales de las plantas control (figura 24 panel C), sin embargo la sumatoria de la misma es menor que el de las raíces de las plantas inoculadas con las cepas UMCV1 y UMCV2.

De manera visual se estimo que las plantas de frijol tratadas con la cepa UMCV1 se ven más saludables, por lo que se considero realizar un experimento únicamente con la esta cepa, se considero necesario utilizar un control sin Fe ya que en los experimentos realizados en suelo no se observan diferencias en cuanto a la clorofila, lo cual muy posiblemente se deba a que las plantas tengan cubierta sus necesidades de hierro debido a que se ha reportado que este elemento se encuentra en gran cantidad en el cotiledón (Moraghan *et al.* 2002).

6.5 Interacción frijol-UMCV1

El primer experimento consistió estimar nuevamente la reducción de hierro realizada únicamente por la cepa UMCV1 (figura 25), lo cual fue consistente con los resultados anteriores ya que se observa un color característico del hierro reducido unido a la ferrozina en el tubo, se estimo la concentración de hierro ferroso a través del tiempo, y se observo que un día después de la inoculación se estimo una concentración de 20 μMol , la máxima concentración de hierro ferroso ocurrió en los días tres y cuatro después de la inoculación (figura 25), después de estos días se observo una disminución de la concentración del ferroso en el tubo debida a la interacción planta-microorganismo que probablemente se deba a la captación del fe por parte de la planta de frijol.

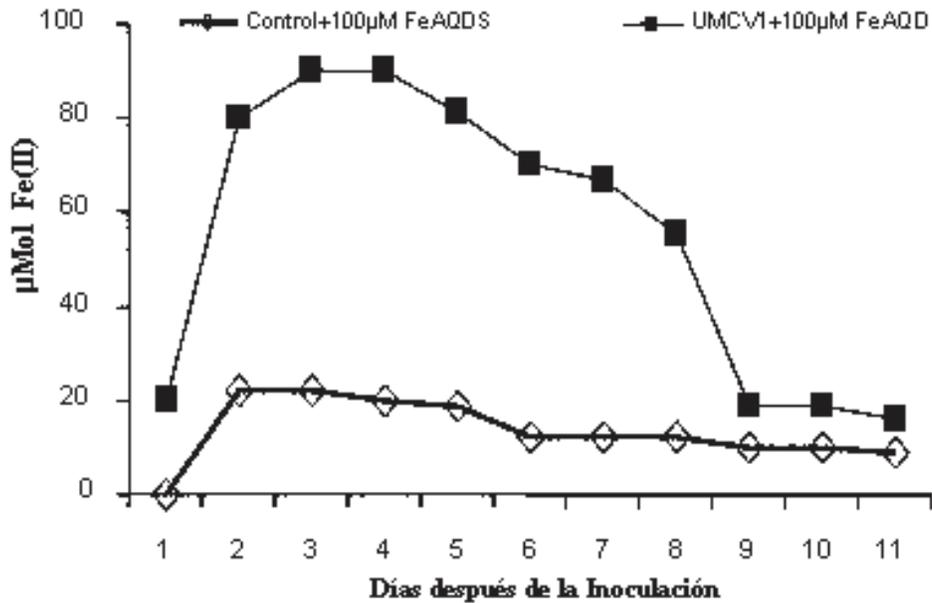


Figura 25. Cinética de concentración de Fe(II) acumulado en tubos con plantas de frijol crecidas en medio mineral e inoculados con cepas UMCV1. Se utilizaron 100 µMol de FeAQDS, 100 µMol de ferrozina y 1×10^9 UFC/mL de la cepa UMCV1. La estimación se realizó en base a una curva patrón visual con medio mineral y sulfato ferroso como se describe en materiales y métodos. Los encabezados señalan el significado de las líneas.

Se cuantificó la concentración de hierro en el tejido aéreo y en la raíz y se observó que cuando los resultados se expresan como hierro acumulado este es mayor en la parte aérea de las plantas inoculadas con la cepa UMCV1 (figura 26, panel B). No se encontraron cantidades de hierro diferentes en las raíces inoculadas con respecto a las plantas no inoculadas (figura 26, paneles A y B). Se demostró que la cantidad total acumulada es similar tanto en plantas que fueron crecidas en un medio suplementado con 100 µMol de FeAQDS y las raíces de las plantas que fueron crecidas en un medio sin ninguna fuente de hierro (figura 26, paneles A y B), lo cual es una evidencia que las plantas de frijol tienen cubiertas sus necesidades de hierro ya que lo toman del hierro almacenado en el cotiledón.

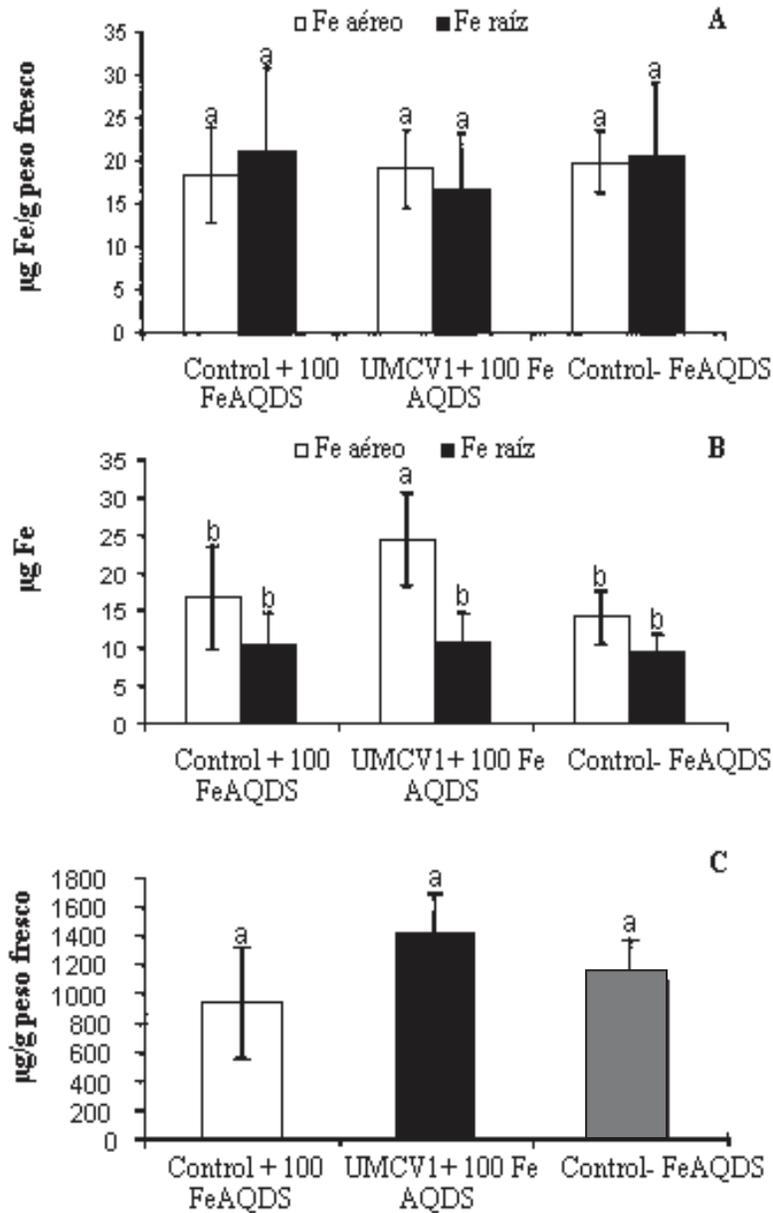


Figura 26. Contenido de hierro total y clorofila en plantas tratadas con la cepa ferrirreductora UMCV1. Se estimó el hierro total en cenizas por el método de la ferrozina a los 15 días de tratamiento con una solución extractora HCl-hidroxilamina 0.25 M (A) Concentración de hierro en raíz y parte aérea en plantas de frijol crecidas en tres diferentes condiciones (medio con FeAQDS y sin inocular, Medio con FeAQDS inoculado con UMCV1 y medio sin FeAQDS y sin inocular). (B) cantidad total de hierro en la raíz y parte aérea (C) Concentración de clorofila. Letras diferentes representan promedios estadísticamente significativos con la prueba de Tukey $p < 0.05$

Se cuantifico el peso fresco y el peso seco. Las plantas tratadas con la cepa UMCV1 tienen un mayor peso fresco en la parte aérea, un mayor peso fresco de la raíz y por tanto mayor peso fresco total (figura 27, panel A), no se encontraron diferencias en peso fresco en ninguna de las tres variables descritas anteriormente entre las plantas crecidas en un medio con 100 μ M de FeAQDS y las plantas crecidas en un medio sin ninguna fuente de hierro (figura 27 panel A). El peso seco aéreo de las plantas tratadas con la cepa UMCV1 fue diferentes de las plantas control con hierro y sin hierro (figura 27, panel B), el peso seco de la raíz fue diferente del control con hierro y similar al control sin hierro (figura 27, panel B), el peso seco total fue mayor en las plantas inoculadas con la con la cepa UMCV1, el peso seco fue casi igual entre las plantas crecidas con hierro y sin hierro (figura 27, panel B).

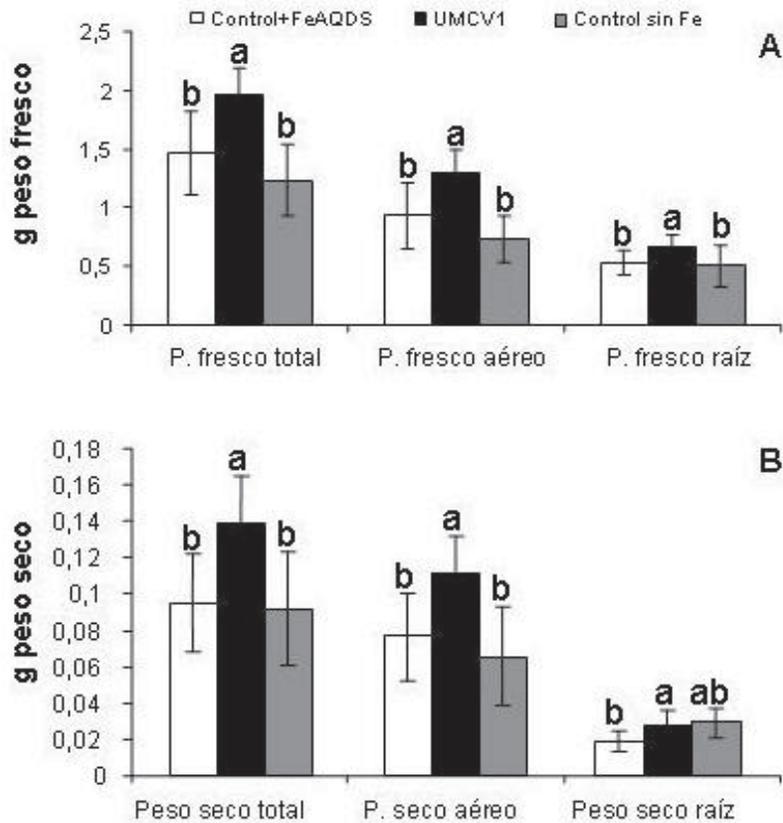


Figura 27. Biomasa de plantas de frijol. Los frijoles fueron crecidos en medio mineral bajo 3 condiciones diferentes: con 100 FeAQDS y sin inocular, con FeAQDS inoculados con la cepa UMCV1 y sin FeAQDS sin inocular. (A) peso fresco de la raíz, aéreo y total. (B) peso seco de la raíz, aéreo y total. Las diferencias estadísticas significativas con la prueba de Tukey $p < 0.05$ se expresan con letras

Las rizobacterias ferrirreductoras en interacción con el frijol

Se estimaron variables agronómicas utilizadas para poder determinar el efecto promotor del crecimiento en la figura 28 panel A se observa que la longitud al cotiledón es mayor en las plantas tratadas que en las no tratadas, de la misma manera la longitud de la raíz principal es mayor en las plantas inoculadas con la cepa UMCV1 (figura 28, panel C)

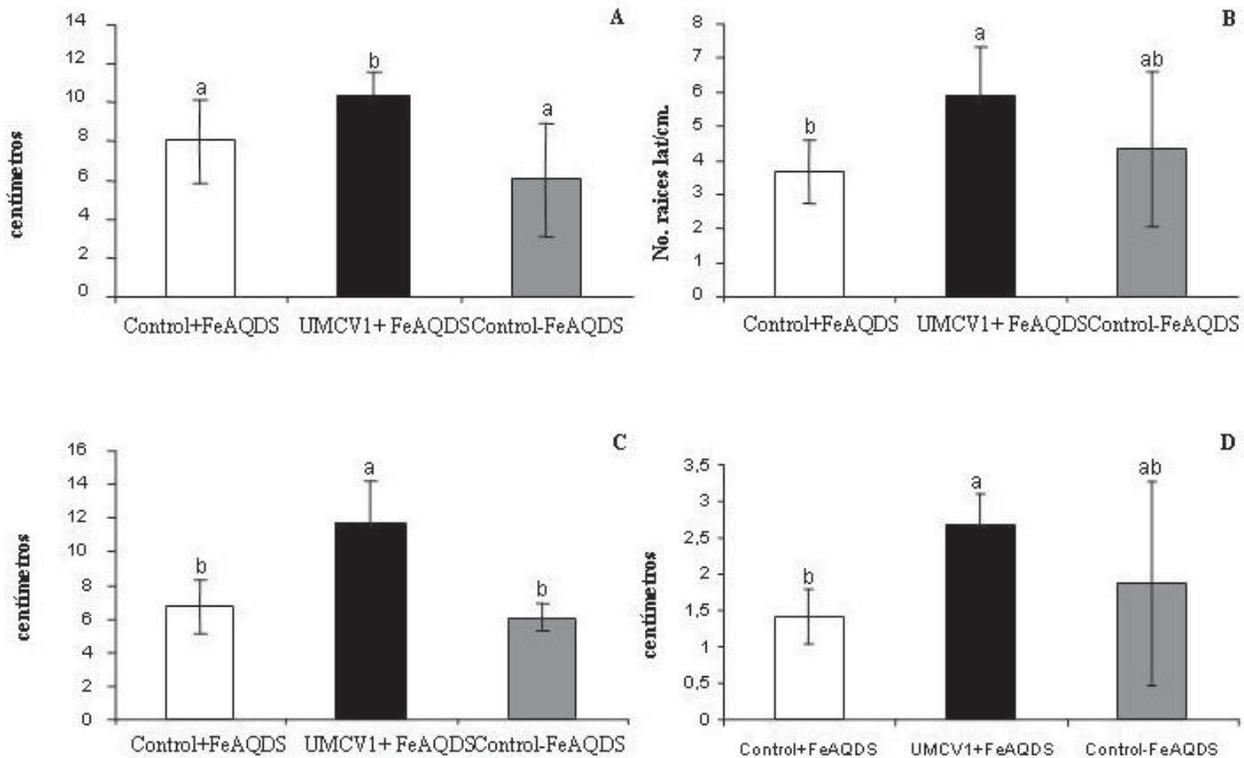


Figura 27. Cambios en el crecimiento vegetal de plantas de frijol inoculadas con la cepa UMCV1. Los frijoles fueron crecidos en medio mineral bajo 3 condiciones diferentes: con 100 μ M FeAQDS y sin inocular, con 100 μ M FeAQDS inoculados con la cepa UMCV1 y sin FeAQDS sin inocular. (A) Longitud del cuello de la planta al cotiledón. (B) Numero de raíces laterales/ cm. (C) Longitud de la raíz principal. (D) Longitud de las raíces laterales. Letras diferentes representan promedios estadísticamente significativos con la prueba de Tukey $p < 0.05$

La cantidad de raíces laterales (figura 28, panel B) y el promedio de la longitud de estas raíces (figura 28, panel D) es también mayor en las plantas tratadas con las cepas UMCV1 que en los controles, existe una mayor variabilidad en cuanto a la cantidad de

raíces laterales y el promedio de la longitud de estas en las plantas control sin ninguna fuente de hierro, en promedio estas estructuras no son mayores con respecto a las plantas no inoculadas suplementadas con hierro, sin embargo estas estructuras tampoco son mayores a las plantas tratadas con la cepa UMCV1, el hecho de que proliferen las raíces laterales se ha demostrado que bajo condiciones de hierro limitante las plantas encienden mecanismos de diferenciación que tienen como consecuencia un aumento en la cantidad de raíces laterales y pelos radiculares (Romera *et al.* 1999), muy probablemente aunque las plantas tengan cubiertas sus necesidades mínimas de hierro en esta etapa, puedan percibir bajos niveles de este elemento y enciendan mecanismos para captar el hierro que a futuro será de vital importancia para sus procesos fisiológicos tales como el relleno de la semilla, ya que en estas etapas de maduración y fructificación las plantas de frijol aumentan considerablemente sus necesidades de hierro.

El efecto promotor del desarrollo, aunque no descrito formalmente en la literatura, se saben algunos aspectos por medio de los cuales se podría atribuir este fenómeno, por ejemplo *Bacillus megaterium* relacionado a la cepa UMCV1 es una bacteria formadora de esporas encontrada comúnmente en el suelo, se han descrito efectos promotores del crecimiento vegetal atribuibles a diferentes especies de *Bacillus* (Ryu *et al.* 2005), Los generos *Arthrobacter* y *Stenotrophomonas* son habitantes comunes de la rizosfera (Crowley *et al.* 1992, Berg *et al.* 2004).

En la figura 29 se observa se observa que las plantas control no presentan ningún cambio de color en el medio adicionado con ferrozina, el desarrollo de las plantas es menor a esta fecha comparado con las plantas tratadas con la cepa UMCV1 en donde en el medio se observa el vire de color debido a la ferrozina cuando el hierro se reduce, a los 15 días es evidente que las plantas tratadas con la cepa UMCV1 tienen un aspecto más saludable y un mayor desarrollo que las plantas no inoculadas, esto podría explicarse en función del efecto promotor del crecimiento, las plantas inoculadas con esta cepa presentan una mayor cantidad de raíces laterales, esto es importante porque las plantas se encuentran en un medio con un pH de 8.5 y en estas condiciones el hierro no es el único elemento que se

precipita, sino en general, los demás nutrientes son menos solubles lo que haría que las plantas tengan limitaciones de otros nutrientes diferentes del Fe, el tener una mayor cantidad de raíces es una ventaja adaptativa para poder tener una mayor superficie de contacto con el medio y por lo tanto una mayor posibilidad de captar nutrientes. El sistema radicular de las plantas ejecuta muchas funciones adaptativas incluyendo la captación de agua, nutrientes, anclaje al suelo y el establecimiento de interacciones bióticas en la rizosfera. Los cambios en la arquitectura radicular, afectan profundamente la capacidad de las plantas para tomar nutrientes y agua (Lopez-Bucio *et al.* 2003).

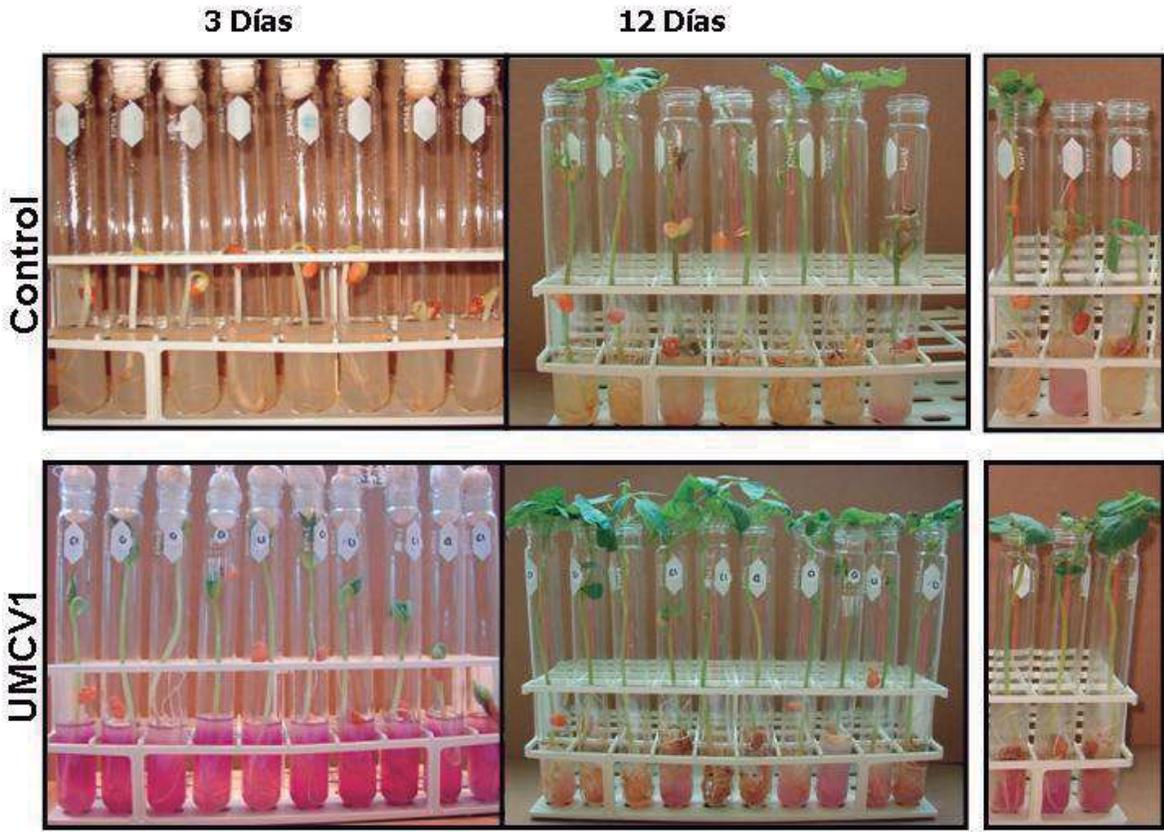


Figura 29. Visualización de la reducción y desarrollo vegetal de plantas control sin inocular y tratadas con la cepa UMCV. Las plantas fueron crecidas en medio mineral con 100 μM de FeAQDS y se utilizó la ferrozina como indicador de Fe(II). Al cabo de 15 días se observa un mayor crecimiento vegetal en las plantas inoculadas con la cepa UMCV1.

6.6 El efecto promotor del desarrollo

El efecto promotor del desarrollo, aunque no descrito formalmente en la literatura, se saben algunos aspectos por medio de los cuales se podría atribuir este fenómeno, por ejemplo *Bacillus megaterium* relacionado a la cepa UMCV1 es una bacteria formadora de esporas encontrada comúnmente en el suelo, se han descrito efectos promotores del crecimiento vegetal atribuibles a diferentes especies de *Bacillus* (Choong-Min *et al.* 2005), Los generos *Arthrobacter* y *Stenotrophomonas* son habitantes comunes de la rizosfera (Crowley *et al.* 1992, Berg *et al.* 2004).

Queda claro que las cepas UMCV tengan la capacidad de reducir el hierro a partir de los minerales que contienen este elemento en el suelo, este hecho es muy interesante porque la mayoría de los experimento con relación a la reducción de hierro se utilizan fuentes de hierro solubles, y en el suelo el hierro se encuentra principalmente de forma insoluble, existe diferencias en cuanto a las capacidades de reducción entre las diferentes cepas aquí estudiadas. La evidencia experimental, tanto de pruebas “*in vitro*” como “*in vivo*” es suficiente para considerar que la ferrirreducción ocurre en la rizosfera de plantas de frijol. Esta reducción tiene efecto sobre el aumento de biomasa y contenido de hierro en la parte aérea.

Los datos apuntan a que el incremento en biomasa esta relacionado por un mecanismo combinado que involucra tanto el incremento en la biodisponibilidad del hierro y el efecto promotor del desarrollo. El incremento en el contenido aéreo, se encuentra probablemente influenciado por una posible colonización del tejido radicular y reducción en el mismo, que haría suponer que las rizobacterias son endofíticas, otros fenómenos que se pudieran modificar con la colonización de rizosfera seria una baja de pH del apoplásto que facilitaría la remoción del hierro al tejido aéreo o que liberen algún factor que promueva la síntesis de proteínas de transporte en la raíz y la hojas, sin embargo, ninguna evidencia se tiene sobre ninguno de los aspectos anteriormente descritos y lo propuesto es meramente especulativo en función únicamente de la observación de que plantas inoculadas tienen un mayor contenido de hierro en la parte aérea. Queda claro que las rizobacterias

UMCV son promotoras del crecimiento vegetal, los mecanismos exactos por los cuales se modifica la arquitectura de la raíz deberán ser elucidados, dado la literatura que existe se especula que puedan ser hormonas. Los datos apuntan a que la ferrirreducción de las cepas UMCV modifican el contenido de hierro en el tejido aéreo, será necesario confirmar este fenómeno con otras plantas, sobre todo, será muy interesante contar y probar este mismo tipo de experimentos en plantas mutante que no tengan capacidad de reducir hierro, estas plantas, muestran clorosis severa, por lo tanto, una vez inoculadas las plantas con rizobacterias ferriredutoras y revierte este fenotipo por medio de un reverdecimiento de las hojas definitivamente se podrá concluir que la ferrirreducción bacteriana tiene influencia sobre la disponibilidad de hierro. Los datos experimentales son interesantes debido a que el contexto ecológico la ferrirreducción no había sido tomado en cuenta como un fenómeno que inflencie la captación de hierro por parte de las plantas con estrategia I. Los mecanismos exactos por lo cual aumenta la disponibilidad del hierro en las plantas deberán ser aclarados.

7. CONCLUSIÓN

Las rizobacterias ferrirreductoras UMCV1, UMCV2 y UMCV3 colonizan la rizosfera de frijol y contribuyen a su aprovisionamiento de hierro.

8. LITERATURA CITADA

Abadía, J., López-Millán., A.F., Rombolà, A y Abadía, A. 2002. Organics acids and Fe deficiency: a review. *Plant and Soil* 241: 75-86.

Abadía, J. 1992. Leaf responses to Fe deficiency: a review. *J Plant Nutr* 15: 1699–1713

Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko¹, E.V y Kudoyarova¹, G.R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*. 272: 201–209

Schikora, A y Schmidt, W. 2001. Iron Stress-Induced Changes in Root Epidermal Cell Fate Are Regulated Independently from Physiological Responses to Low Iron Availability. *Plant Physiology*. 125:1679–1687

Anzai, Y., Hongik, K., Ju-Young, P., Wakabayashi, H y Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 1563–1589.

Albuzio, A., Nardi, S., D’Orazio, V. y Provenzano, M.R. 2002. Compost improved by Iron(II) Incorporation. *International Simposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Udine Italy. Abstracts pp 14.

Andersson, J., Bodevin, S., Westman, M., Sahlin, M y Sjöberg, B.M. 2001. Two active site asparagines are essential for the reaction mechanism of the class III anaerobic ribonucleotide reductase from bacteriophage T4. *Journal of Biological Chemistry*. 44: 40457-40463.

Awad, F., Römheld, V y Marschner, H. 1994. Effect of root exudates on mobilization in the rhizosphere an uptake of iron by wheat plants. *Plant and Soil*. 165:213-218.

Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Römheld, V y Marschner, H. 1992. Short-Term Effects of Rhizosphere Microorganisms on Fe Uptake from Microbial Siderophores by Maize and Oat. *Plant Physiol.*100: 451-456.

Bates, G. W. 1982. Parallels in plant and human iron nutrition. *Plant Nutr.* 5(4-7):269-276.

Bauer, P y Berezky, Z. 2003. Gene networks involved in iron acquisition strategies in plants. *Agronomie* 23: 447-454.

Becker, J. O., Hedges, R. W. y Messens E. 1985 Inhibitory effect of pseudobactina on the uptake of iron by higher plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1090-1093.

Berg, C., Ribbec, K., Paetzold, H., Hagemann, M., Martínez, J y Roder, A. 2004. Clinical and environmental *Stenotrophomonas* strains: diversity and differentiation. *Memorias del 10° Congreso internacional sobre ecología microbiana. Cancún, Mexico.* pp 332.

Bienfait, H.F. 1985. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *J Bioenerg. Biomembr.* 17: 73-83

Braun, V. y Braun, M. 2002. Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:194-201.

Caccavo, Jr.F. 1999. Protein-mediated adhesion of the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY to hydrous ferric oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5017-5022.

Caccavo, Jr.F. 2002. Adhesion of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria to Fe(III) minerals. *Geomicrobiology Journal.* 19: 161-177.

Carrillo-Castaneda, G., Juárez, M.J., Peralta-Videa, J.R., Gómez, E., Tiemannb, K.J., Duarte-Gardea, M y Gardea-Torresdey, J.L. 2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research*. 6: 391–399

Chaney, R.L., Brown, J.C y Tiffin, L.O. 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol*. 50: 208-213.

Chen, L., Dick, W.A., Streeter, J.G y Hoitink, H.A.J. 1998. Fe chelates from compost microorganisms improve Fe nutrition of soybean and oat. *Plant and Soil* 200: 139-147

Clark, R. B. 1991. Iron: unlocking agronomic potential. *Solutions* 35(3):24-28.

Connolly, E, L., Campbell, N.H., Grots, N., Prichard, Ch.L y Guerinot, M.L. 2003. Overexpression of the FRO2 Ferric Chelate Reductase Confers Tolerance to Growth on Low Iron and Uncovers Posttranscriptional Control. *Plant Physiology* 133:1102-1110.

Cortinas, E. H y J. C. Miller Jr. 1999. Avances en el estudio de la herencia de la clorosis férrica en frijol comun. *Agrociencia* 33: 47-50.

Crowley, D.E., Römheld, V., Marschner, H y Szaniszlo, P.J. 1992. Root-microbial effects on plant iron uptake from siderophores and phytosiderophores. *Plant and Soil* 142: 1-7.

Curie, C., Alonso, J.M Le Jean, M., Ecker, J.R y Briat, J.F. 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J*. 347: 749-755.

Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F y Walker E.L. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 2001. 18;409(6818):346-9.

Curie, C. y Briat, J.F. 2003 Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54: 183-206.

Dakora, F.E y Phillips, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245: 35–47.

De Bary, A. 1884. *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bacterien.* Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.

De Medici, D., Croci, L., Celibato, E., Di pasquale, S., Filectici, E y Toti, L. 2003. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3456-3461.

de Weger, L. A., van der Bij A. J., Dekkers, L. C., Simons, M., Wijffelman, C. A., Lugtenberg, B. J. J. 1995. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17:221-228.

Dekkers, L.C., Phoelich, C. C., van der Fits L., Lugtenberg, B. J. J. 1998. A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc. Acad. Sci.* 95:7051-7056.

Dekkers, L.C., Phoelich, C y Lugtenberg, B.J.J. 1999. Bacterial traits and genes involved in rhizosphere colonization. *Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.*

D’Orazio, Ma., Provenzano, R., Albuzio, A. 2002. Improvement of compost by Iron(II) incorporation: a spectroscopic analysis approach. *International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants.* Udine Italy. Abstracts pp 15.

Dakora, F.D y Phillips, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments *Plant and Soil* 245: 35–47.

Egamberdiyeva, D y Höflich, G. 2002. Root colonization and growth promotion of winter wheat and pea by *Cellulomonas* spp. at different temperatures. *Plant Growth Regulation*. 38: 219–224

Frossard, E., Marcel Bucher, M., Mächler, F., Mozafar, A y Hurrel, R. 2000. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J. Sci. Food. Agri.* 80:861-879.

Fox, T.Ch y Guerinot, M.L. 1998. Molecular Biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49:669-96

Glasauer, S., Langley, S y Beveridge, T.J. 2002. Intracellular iron minerals in a dissimilatory iron-reducing bacterium. *Science*. 295:117-119.

Gonzalez, I., Laiz, L. B., Hermosin, B., Caballero, B., Incerti, C y Saiz-Jimenez, C. 1999. Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atalnterra shelter (south Spain). *Journal of Microbiological Methods*. 36: 123-127.

González-Vallejo, E.B., Morales, F., Cistué, L., Abadía, A y Abadía, J. 2000. Iron Deficiency Decreases the Fe(III)-Chelate Reducing Activity of Leaf Protoplasts. *Plant Physiology*. 122: 337–344.

Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109–117.

Gruber, B y Kosegarten, H. 2002. Depressed growth of non-chlorotic vine grow in calcareous soils is an iron deficiency symptom prior to leaf chlorosis. J. Plant Nutr. Soil Sci. 165: 111-117

Grusak, M.A. 2000. Strategies for improving the iron nutritional quality of seed crops: Lessons learned from the study of unique iron-hyperaccumulation pea mutants. Pisum Genetics Vol. 32: 1-6

Guerinot, M.L y Yi, Y. 1994. Iron: nutritious, noxious and not readily available. Plant Physiol 104:815-820.

Guerinot, M.L. 1994. Microbial iron transport. Annu. Rev. Microbiol. 48:743-772.

Hammann, R y Ottow, J.C.G. 1974. Reductive dissolution of Fe_2O_3 by Sacharolytic Clostridia and *Bacillus polymyxa* under anaerobic conditions. Eingegangen. 108-115.

Hernández, R.I., Alcanzar, G., Tirado, J.L y Carrillo, C. 1996. Susceptibilidad y mecanismos de adaptación de genotipos de frijol a al clorosis férrica. Agrociencia 30:13-19

Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N-K y Mori, S. 1999. Cloning of Nicotianamine Synthase Genes, Novel Genes Involved in the Biosynthesis of Phytosiderophores Plant Physiology. 119 :471-479.

Jaeger, I.I.I., Lindow, Ch., Miller, S.E., Clark, W., Firestone, M.K. 1999. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensor of sucrosa and tryotophan. Appl. Environ. Microbiol. 65:2685-2690.

Jeffreys, R. A. 1968. Detection of iron ethylenediamine di(o-hydrophennylicetate) in plant tissue. Agron J. 60:613-616.

Jeffrey y Humphrey. 1975. Biochem. Biophys. Plańis. 167: 191-194.

King, G.M y Garey, M.A.1999. Ferric iron reduction by bacteria associated with the roots of freshwater and marine macrophytes. Appl. Environ. Microbiol. 65:4393-4398.

Koch, C., Schumann, P., y Stackebrandt, E. 1995. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:837-839.

Kostka, J.E., Dava, D.D., Hayley, S., Dolhopf, S y JosepStucki, J.W. 2002. Growth of iron (III)-reducing bacteria on clay minerals as the sole electron acceptor and comparison of growth yields on a variety of oxidized iron forms. Appl. Environ. Microbiol. 68: 6256-6262.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M y Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature.286: 885-886.

Lee, R.V. y Lerma, J.N. 1991. Evaluación del ácido sulfúrico y elementos menores aplicados en el agua de riego para el control de clorosis en trigo-sorgo a través del tiempo. Cd. Delicias, Chih. Memorias XXIV Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Pachuca, Hgo. México. p. 39.

Lee, R.V., Beltrán, F.M de J., Lerma, J.N y Licón, T.P. 1998. Aplicación de ácido sulfúrico en el riego corrige la clorosis férrica de los cultivos en suelos calcáreos. Terra 16:149-161.

Lindsay, W. L. y Schwab, A. P.1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. J. Plant Nutrition 5: 821-840.

Las rizobacterias ferrirreductoras en interacción con el frijol

Lopper, E.J. y Henkels, M.D. 1999 Utilization of Heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 5357-5363.

López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A y Herrera-Estrella, L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* . 6:280–287.

Lopez-Millan, A.F., Morales, F., Andaluz, S., Gogorcena, Y., Abadía, A., De Las Rivas, J y Abadía, J. 2000. Responses of sugar beet roots to iron deficiency changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiol.* 124: 885-897.

Lovley, D.R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews.* 55: 259-287

Lovley, D.R. 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 263-290

Lonnergan, D.J., Jenter, H.L., Coates, J.D., Phillips, E.J., Schmid, T. M y Lovley, D.R. 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *J. Of Bact.* 178: 2402-2408.

Lovley, D.R y Phillips, E.J.P. 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1536-

Lovley, D. R y Phillips, E.J.P. 1989. Requirement for a microbial consortium to complete oxidize glucose in Fe(III)-reducing systems. *App. Environ. Microbiol.* 55: 3234-3236.

Lovley, D.R y Coates, J.D. 2000. Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 252-256

Machold, O. y Stephan, U.W. 1969. The function of iron in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *Phytochemistry* 8:2189-2192.

- Manly, B.F.J. 1994. Multivariate Statistical Methods. 2ª edición. Chapan & Hall. 1-215
- Marschner, H y Römheld, V. 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. Plant and Soil 165: 261-274.
- Mengel, K. 1994. Iron availability in plant tissues-iron chlorosis on calcareous soils. Plant and Soil 165: 275-283.
- Mengel, K y Geurtzen, G.1988. Relationship between iron chlorosis and alkalinity in Zea mays. Physiol. Plant. 72: 460-464
- Mengel, K. y Kirbi, E.A editores. Principles of Plant Nutrition. Kluwer Academia Publishers 2001. 5ª edición. Pp553-583.
- Millar, G.M., Deney, A., Pushnik, J y Yu, M-H. 1982. The formation of δ -aminolevulinate a precursor of chlorophyll in barley and the role of iron. J. Plant. Nutr.5: 289-300.
- Moog, P.R y Brüggemann, W. 1994. Iron reductase systems on the plant membrane-A review. Plant and Soil 165:241-260.
- Moraghan, J.T., Padilla,J., Etchevers, J.D., Grafton, K y Acosta-Gallegos, J. A. 2002. Iron accumulation in seed of common bean. Plant and Soil 246: 175–183.
- Mori., S. 1999. Iron acquisition by plants. Current Opinion in Plant Biology. 2: 250–253.
- Patokowska, E. 2002. The role of rhizosphere antagonistic microorganisms in limiting the underground parts of spring wheat. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Horticulture. Vol 5.

Las rizobacterias ferriredutoras en interacción con el frijol

Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Angolon, F y Varanini, Z. 1999. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant and Soil*. 210: 145-157.

Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L y Guerinot, M.L. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soil. *Nature*. 397: 694-697.

Romera, F.J., Alcantara, E., De La Guardia, M. 1999. Ethylene Production by Fe-deficient Roots and its Involvement in the Regulation of Fe-deficiency Stress Responses by Strategy I Plants. *Annals of Botany Company*. 83: 51-55

Römheld, V. 1987 Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Plantarum* 70: 231-234.

Römheld, V. 2002. New perspectives for a sustainable iron management rhizosphere processes and plant microbial interactions. International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Udine Italy. Abstracts pp 6.

Ryu, Ch-M., Chia-Hui, H., Loey, R.D y Kloepper, J.W. 2005. Study of mechanism for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*. 269: 285-292.

Sharma, S., Aneja, M.K., Mayer, J., Much, J.C y Schloter, M. 2005 Characterization of Bacterial Community Structure in Rhizosphere Soil of Grain Legumes. *Microbial Ecology* 49: 407-415

Sharma, V.K. y Nowak, J. 1998. Enhancement of Verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. Strain PsJN). *Can. J. Microbiol.* 44: 528–

Schikora, A y Schmidt, W. 2001. Iron Stress-Induced Changes in Root Epidermal Cell Fate Are Regulated Independently from Physiological Responses to Low Iron Availability. *Plant Physiology*. 125 1679–1687.

Schmidt, W. 2003 Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *TRENDS in Plant Science* Vol.8 No.4: 188-193.

Schröder, M.D., White, Ch.A., Kunnimalaiyaan, M y Patricia S. Vary, P.S. 2003. Sequencing and Characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium* QM B1551. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 26888–6898.

Shekhar, C., J.K. Johri, y Singh, H.B. 2002. Survival of the rizosphere-competent biocontrol strain *Pseudomonas flourecens* NBRI2650 in the soil and phytosphere. *Can. J. Microbiol.* 38 : 588-601.

Sparla, F., Bagneresi, P., Scagliarini, S y Trost, P.1997. NADH:Fe(III)-chelate reductase of maize roots is an active cytochrome b5 reductase. *FEBS Letter* 414: 571-575.

Susín, S., Abadia, A., González-Reyes, J.A., Lucena, J.J y Abadia, J. 1996. The pH requirement for in vivo activity of the iron deficiency-induced “turbo” ferric chelate reductase: a comparison of the iron-deficiency-induced iron reductase activities of intact plants and isolated plasma membrane fractions in sugar beet. *Plant Physiol.* 110: 111-123.

Tagliavini, M y Rombolà, A.D. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *European Journal of Agronomy* 15:71-92.

Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E.L y Lovley, D.R. 1998. Microbial evidence for Fe(III) reduction on early earth. *Nature.* 395: 65-67.

Velásquez, B.C. 2003. Contribución de las bacterias ferrirreductoras al suministro de hierro en plantas de maíz (*Zea mays*.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología UMSNH. Moleria, Michoacán. 50 pp.

Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L, Briat, J.F., y Curie, C. 2002. IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell* 14: 1223-1233.

Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J y Lamont, I.L. 2002. Iron transport and regulation, cell signaling and genomics: lesson from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 45:1177-1190.

Wei, L.C., Ocumpaugh, W.R y Loepert, R.H. 1994. Plant growth and nutrient uptake characteristics of Fe-deficiency chlorosis susceptible and resistant subclovers. *Plant and Soil* 165: 235-240.

Weisburg, W., Barns, S.M., Pelletier, D.A., y Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703

Yi, Y y Guerinot, M.L. Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *The plant Journal.* 10: 835-844.