

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA
FERRIRREDUCTORA DE LAS RIZÓSFERAS DE LIMÓN
(*Citrus aurantifolia* Christm Swingle) Y MAÍZ (*Zea mays*)
CRECIDOS EN SUELO ALCALINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Claudia Duarte Sotelo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. EDUARDO VALENCIA CANTERO

CO-DIRECTOR

Dr. ERNESTO GARCÍA PINEDA

Morelia, Mich. Julio 2007

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Biodiversidad	7
2.1.1. Índices de biodiversidad	7
2.1.2. Diversidad microbiana	9
2.1.3. Bacterias con capacidad de reducción desasimilatoria de Fe³⁺	10
2.2. Rizósfera	13
2.2.1. Hierro en el suelo	15
2.2.2. Clorosis férrica	17
2.3. Plantas Estrategas I y II	18
2.3.1. Limón (<i>Citrus aurantifolia</i> Christm Swingle)	24
2.1.2. Maíz (<i>Zea mays</i>)	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO GENERAL	28
5.1. Objetivos particulares	28

6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1. Origen de las muestras	29
6.1.1. Suelo	29
6.1.2. Material vegetal	29
6.1.3. Condiciones de crecimiento de las plantas	30
6.2. Cuenta y aislamiento de bacterias con capacidad de reducir Fe³⁺	31
6.2.1. Obtención de aislados bacterianos	31
6.2.2. Cuantificación de actividad reductora de aislados bacterianos por el método de la ferrozina	32
6.2.3. Purificación de aislados	33
6.3. Análisis por restricción de ADNr amplificado (ARDRA)	33
6.3.1. Obtención de ADN total	33
6.3.2. Amplificación de ADNr 16S	34
6.3.3. Restricción de los productos de PCR	35
6.4. Tratamiento estadístico	35
6.4.1. Medición de diversidad alfa y beta	36
7. RESULTADOS	37
7.1. Densidad poblacional bacteriana total	37
7.2. Cinética de crecimiento de aislados bacterianos	38
7.3. Determinación de actividad de reducción de Fe³⁺	39
7.3.1. Actividad de reducción de Fe ³⁺ determinada en medio extracto de suelo	39
7.3.1.1. Clasificación de aislados bacterianos, crecidos en medio líquido extracto de suelo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción	42

7.3.2. Actividad de reducción de Fe ³⁺ determinada en caldo nutritivo, al momento de adicionar la ferrozina	47
7.3.2.1. Clasificación de aislados, incubados en caldo nutritivo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción	49
7.4. Análisis de restricción de ADNr amplificado (ARDRA)	55
7.5. Análisis de la diversidad encontrada	57
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIÓN	67
10. LITERATURA CITADA	68
11. APÉNDICES	83
11.1. Medios de cultivo	83
11.1.1. Extracto de suelo sólido	83
11.1.2. Extracto de suelo líquido para evaluar actividad de ferrireducción	83
11.1.3. Medio MS (Modificado de Murashige y Skoog 1962)	84
11.2. Soluciones amortiguadoras	85
11.2.1. Ferrozina al 0.1%	85
11.2.2. Amortiguador fosfato de sodio	86
11.2.3. Amortiguador SET	86
11.2.4. Amortiguador TAE(Tris-acetato)	86
11.2.5. Sulfato ferroso amoniacal	87
11.3. Determinación de actividad reductora	87
11.4. Estadística	87

Figura 1. Modelo de oxidación de materia orgánica donde el Fe^{3+} funciona como único aceptor externo de electrones. A partir de carbohidratos y aminoácidos las bacterias reductoras de hierro en forma desasimilatoria, oxidan dichos compuestos hasta CO_2 y hay una reducción del hierro. Se señalan los organismos que catalizan las diferentes reacciones (Modificado de Lovley 1991).

12

Figura 2. La deficiencia por hierro en plantas Estrategas I promueve la liberación de protones H^+ y la secreción de moléculas orgánicas quelantes para solubilizar el Fe^{3+} el cual es reducido por la enzima FRO2 y tomado por el transportador IRT1 localizado en la epidermis radicular (Modificada de Bauer y Bereczky, 2003).

19

Figura 3. En plantas Estrategas II el primer paso en la síntesis de fitosideróforos es la conversión de tres moléculas de S-adenosil metionina en nicotianamina, la segunda enzima es la nicotianamina transferasa (NAAT) que cataliza la conversión de nicotianamina en ácido dexosimugineico, el complejo FS- Fe^{3+} es internalizado a través del transportador YS1 (Modificada de Bauer y Bereczky, 2003).

21

Figura 4. Densidad de la población bacteriana total de las rizósferas de limón, maíz y suelo no rizosférico. Letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey $p \geq 0.05$

37

Figura 5. Cinética de crecimiento de aislados bacterianos prove-

nientes de rizósferas de limón (L2-65), de maíz (M4-76) y suelo - no rizosférico (S3-91). Estos valores son el resultado de réplicas por triplicado.

39

Figura 6. Histograma de la prueba de normalidad. JMP 3.2.2. Cada barra muestra la frecuencia de ocurrencia del rango de valores representado en el eje de las "Y", si la variable es continua cada valor queda representado por una barra. En el recuadro de la derecha la media de la muestra queda señalada con la línea media y los cuartiles 25° y 75° son las líneas extremas del rectángulo. La llave identifica el intervalo de confianza del 95% alrededor de la media. Si una muestra se distribuye normalmente los valores se arreglan simétricamente alrededor de la media aritmética, si la muestra normal es suficientemente grande, entonces aproximadamente el 68% de los valores están dentro de una desviación estándar con respecto a la media.

40

Figura 7. Perfiles de capacidad de reducción de aislados bacterianos - crecidos en medio líquido extracto de suelo, obtenidos de tres ambientes diferentes. En los tres paneles el eje de las "Y" hace referencia al número de aislados (frecuencias acumuladas) que presentaron determinada capacidad de reducción ($\mu\text{M de Fe}^{3+} \text{ A}_{560} \text{ día}^{-1}$) expresada en el eje de las "X".

43

Figura 8. Categorización de aislados, crecidos en medio líquido extracto de suelo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción, _

obtenidos de tres ambientes diferentes: Reductores basales de 6 a 150, reductores de 151 a 300 y altos reductores $> 301 \mu\text{M Fe}^{3+} \text{ A}_{560} \text{ día}^{-1}$. 45

Figura 9. Histograma de la prueba de normalidad. JMP 3.2.2. Cada barra muestra la frecuencia de ocurrencia del rango de valores representado en el eje de las "Y", si la variable es continua cada valor queda representado por una barra. En el recuadro de la derecha la media de la muestra queda señalada con la línea media y los cuartiles 25° y 75° son las líneas extremas del rectángulo. La llave identifica el intervalo de confianza del 95% alrededor de la media. Si una muestra se distribuye normalmente los valores se arreglan simétricamente alrededor de la media aritmética, si la muestra normal es suficientemente grande, entonces aproximadamente el 68% de los valores están dentro de una desviación estándar con respecto a la media. 48

Figura 10. Perfiles de capacidad de reducción de aislados bacterianos obtenidos de tres ambientes diferentes, crecidos en caldo nutritivo. En los tres paneles el eje de las "Y" hace referencia al número de aislados (frecuencias acumuladas) que presentaron determinada capacidad de reducción ($\mu\text{M de Fe}^{3+} \text{ A}_{560} \text{ día}^{-1}$) expresada en el eje de las "X". 50

Figura 11. Categorización de aislados crecidos en caldo nutritivo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción, obtenidos de tres ambientes diferentes: reductores basales (40 a 700), reducto-

res (701 a 2000) y altos reductores ($> 2001 \mu\text{M Fe}^{3+} \text{ A}_{590}$).

52

Figura 12. Dendrograma de diversidad obtenido por el método de mínima varianza, a partir del ARDRA. Los aislados obtenidos de rizósfera de limón son nombrados con una "L" seguida de su clave numérica de identificación, los aislados obtenidos de rizósfera de maíz son nombrados con una "M" seguida de su clave numérica de identificación y los aislados provenientes de suelo no rizosférico son nombrados con una "S" seguida de su clave numérica de identificación. Los aislados subrayados fueron clasificados como reductores. En negritas se indican las bacterias cuya identidad se conoce por secuenciación parcial del gene que codifica para el ARNr 16S.

56

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Actividad específica de reducción de aislados bacterianos incubados en medio líquido extracto de suelo	44
Tabla 2. Comparación de las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas en los aislados bacterianos, crecidos en medio líquido extracto de suelo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción.	46
Tabla 3. Actividad específica de reducción de aislados bacterianos incubados en caldo nutritivo + NTA-Fe ³⁺ , medida al momento de adición la ferrozina	51
Tabla 4. Comparación de las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas en los aislados bacterianos de acuerdo a su capacidad específica de reducción en caldo nutritivo + NTA-Fe ³⁺ .	53
Tabla 5. Diversidad alfa encontrada en las diferentes comunidades bacterianas de estudio.	58

RESUMEN

Se ha reportado que las plantas han desarrollado estrategias adaptativas para movilizar el hierro, sin embargo la posibilidad de que algunos microorganismos asociados a especies vegetales de importancia agrícola, como el limón y el maíz, en particular bacterias con capacidad de reducirlo en forma desasimilatoria también participen en su solubilización ha sido poco investigada.

Este trabajo tuvo como objetivo cuantificar la capacidad de las rizobacterias presentes en limón y maíz para reducir Fe^{3+} , así como caracterizar dichas poblaciones. Se aislaron un total de 1,485 colonias bacterianas de las que 1,132 presentaron actividad de reducción de Fe^{3+} , la cual se obtuvo a través de dos experimentos por separado utilizando como medio de incubación medio líquido extracto de suelo en el primero y en el segundo caldo nutritivo.

Los resultados obtenidos del primer experimento muestran que los aislados de limón tuvieron una media de actividad específica de reducción 27% superior a los del control mientras que dicho valor fue 7% menor entre los de rizósfera de maíz con respecto al control. En el segundo experimento, la media de actividad específica de reducción fue 22% (aislados de limón) y 17% (aislados de maíz) superior a la encontrada en aislados provenientes del control.

De acuerdo a su capacidad específica de reducción, los aislados se clasificaron como reductores basales, reductores y altos reductores. En el

primero experimento los reductores basales fueron los más abundantes, los altos reductores se encontraron en cantidades similares en todos los tratamientos y fueron los menos frecuentes sin embargo, los reductores de rizósfera de limón fueron 2 veces más frecuentes que los de maíz y 1.3 veces más frecuentes que los del control.

En el segundo experimento se obtuvieron agrupamientos similares a los del ensayo anterior para los reductores basales y altos reductores, las diferencias se observaron en la categoría de reductores que fueron 1.5 veces más frecuentes los aislados de rizósfera de limón que los de rizósfera de maíz. Para ambos experimentos un análisis de frecuencias mostró que dichas diferencias fueron altamente significativas.

La caracterización de los aislados bacterianos se realizó con base al método ARDRA, las digestiones enzimáticas sobre los productos de amplificación se realizaron a 75 aislados escogidos en forma aleatoria. Con la información generada por el ARDRA se construyó un dendrograma de diversidad con el método de mínima varianza, que generó seis agrupamientos bacterianos, del I al IV se congregaron bacterias Gram positivas, mientras que en el V y VI se agruparon bacterias Gram negativas.

Se encontró una diversidad alfa superior en ambientes rizosféricos con respecto al control, mientras que el valor encontrado para la diversidad beta (0.06) señala que las especies compartidas entre tratamientos son pocas.

Los resultados obtenidos indican que hay una selección vegetal para albergar poblaciones de bacterias ferrirreductoras en condiciones de alcalinidad del suelo.

Palabras clave: ARDRA (análisis de restricción de ADNr amplificado), bacterias ferriredutoras.

1. INTRODUCCIÓN

La característica más sorprendente de este planeta es la existencia de vida y el rasgo más singular de la vida es su diversidad, las especies que actualmente habitan la Tierra son el resultado de miles de millones de años de selección natural.

El análisis de la diversidad se relaciona con la conservación de la poza genética microbiana, su vinculación a la sustentabilidad de los ecosistemas y la diversidad fisiológica, dentro de la cual es de particular interés resaltar la capacidad de algunos microorganismos de reducir Fe^{3+} , debido a que una deficiencia recurrente en sistemas agrícolas es la ocasionada por la deficiencia de dicho elemento ocasionada por su baja solubilidad.

Desde hace tiempo se ha propuesto que la diversidad y actividad de los microorganismos de la rizósfera de especies vegetales diferentes podría estar relacionada con la variación de exudados y que los cambios temporales y espaciales de fuentes de carbono que se presentan a lo largo del sistema radicular influyen en la composición y estructura de la comunidad rizosférica bacteriana. Por su parte, los microorganismos también influyen sobre las especies vegetales que colonizan estableciendo con ellas relaciones simbióticas, mutualistas o de competencia (Grayston y Campbell 1996, Graystone *et al.* 1998).

Las interacciones ecológicas de este hábitat también están influidas por otros factores bióticos y abióticos: temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes

minerales, entre los que el hierro puede llegar a ser un factor de competencia dada su extrema insolubilidad (Lindsay 1982), que en suelos calcáreos o alcalinos se acentúa en función de la dependencia del valor de pH para su solubilización lo que promueve la deficiencia de hierro conocida como clorosis férrica (Kraemer 2003).

Para superar la indisponibilidad del hierro en el suelo las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas han desarrollado estrategias adaptativas para movilizarlo, las cuales incluyen: la acidificación del medio circundante a la rizósfera a través del bombeo de protones al exterior de la raíz, la liberación de sustancias quelantes y/o reductoras que favorecen la reducción de Fe^{3+} quelado hacia la raíz, o bien su reducción en el suelo a través de una enzima férrico quelato reductasa localizada en la membrana citoplásmica de los pelos radiculares (Römheld 1987, Hell y Stephan 2003), y el transporte de Fe^{2+} al interior de la célula por una proteína transportadora de metales (Buglio *et al.* 2002). Estas plantas han sido clasificadas como Estrategas I.

Mientras que el mecanismo de toma de hierro de las gramíneas implica la liberación de ligandos orgánicos de bajo peso molecular que poseen una alta afinidad y especificidad para unirse a ese elemento, llamados fitosideróforos y un sistema transportador de alta afinidad del complejo FS- Fe^{3+} que no reconoce quelatos sintéticos ni bacterianos (Takagi 1976, Winkelmann 1992). Estas plantas se han clasificado como Estrategas II (Römheld 1987).

Gran parte de la actividad del hierro en las plantas está implicada en reacciones rédox en mitocondrias, peroxisomas y cloroplastos en donde

participa en la síntesis de clorofila. Debe hacerse notar que la vegetación natural rara vez es clorótica, por lo tanto en cierto grado la agricultura moderna con la selección para mayores rendimientos y con el uso intensivo de fertilizantes nitrogenados son responsables de la deficiencia de hierro (Chen y Barak 1982).

Aunado a lo anterior los suelos alcalinos o calcáreos, que en México cubren hasta un 60% del territorio también inciden sobre la manifestación de clorosis férrica (Amparano 1973). Al respecto, varios reportes señalan que en suelos calcáreos la clorosis férrica es una de las principales limitantes de la producción en cultivos de frutales (Tagliavini y Rombolá 2001, Maldonado *et al.* 2001), así como de cultivos básicos como maíz, frijol, trigo y sorgo (Masalha *et al.* 2000, Cortinas *et al.* 1999, Lee Rodríguez *et al.* 1998).

En este trabajo se utilizaron como modelos experimentales plantas de limón y maíz para investigar sus poblaciones bacterianas ferrirreductoras, situación que permitió hacer una comparación entre plantas Estrategas I y II, ya que si bien los procesos de la biosfera dependen de las actividades microbianas, sólo aproximadamente 5,000 mil organismos no eucariotas han sido formalmente descritos; en contraste, por ejemplo, con el medio millón de especies de insectos descritos (Bull *et al.* 2000).

2. ANTECEDENTES

2.1. Biodiversidad

La biodiversidad o diversidad biológica se define como “la variabilidad entre los organismos vivientes de todas las fuentes: terrestres, marinas y otros sistemas acuáticos, así como las diferencias entre los complejos ecológicos de los que forman parte, lo cual incluye la diversidad dentro de las especies, entre las especies y los ecosistemas” (UNEP 1992).

El conjunto de seres vivos que conforman un ecosistema constituye un patrimonio insustituible, porque cada especie alberga en su genoma la información de millones de años de adaptaciones evolutivas (Lobo 2001).

Las especies que actualmente habitan la Tierra, son el resultado de más de 3 mil millones de años de selección natural, que favoreció la eficiencia, la productividad y la especialización. Dichas especies son las catalizadoras que capturan y transforman energía y materia. Producen alimentos, combustibles, fibras, medicinas, reciclan desperdicios, purifican el agua, dirigen los ciclos biogeoquímicos, generan la fertilidad del suelo y proveen otros bienes y servicios a los ecosistemas (Tilman 2000).

2.1.1. Índices de biodiversidad

Desde los ecosistemas a las poblaciones y los genes, los niveles de organización de la vida son heterogéneos y están incluidos unos en otros. La

diversidad encontrada dentro de las especies es la base fundamental de la biodiversidad a niveles superiores. Toda la diversidad genética surge en el ámbito molecular y está íntimamente ligada con las características fisicoquímicas de los ácidos nucleicos (Martínez 1997).

Una aproximación molecular utilizada para medir la diversidad es el polimorfismo del ADN entre individuos (Hunter y Sulzer 1996, Mallet 1996), el cual puede determinarse mediante una amplia variedad de técnicas; como son: el polimorfismo de restricción en la longitud de los fragmentos (RFLP), el análisis de ADNr amplificado (ARDRA), que se refieren a cambios en segmentos contiguos específicos del ADN (Solbrig 1991, Hunter y Sulzer, 1996), o el polimorfismo ampliado aleatoriamente (RAPD's).

El número de especies es la medida que se utiliza con mayor frecuencia para medir la diversidad y para comprender los cambios de la misma con relación a la estructura del paisaje (Gaston 1996, Moreno 2001); en este contexto, la separación de los componentes alfa, beta y gamma (Whittaker 1972) puede ser de gran utilidad, principalmente para monitorear y medir los efectos de las actividades humanas (Halffter 1998).

La diversidad alfa es la riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea; la diversidad beta es el grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades en un paisaje, y la diversidad gamma es la riqueza de especies del conjunto de comunidades que integran un paisaje, resultante tanto de la diversidad alfa como de la diversidad beta (Whittaker 1972).

Los métodos para evaluar la diversidad alfa pueden basarse en la cuantificación del número de especies presentes (riqueza específica) y en la distribución proporcional del valor de importancia de cada especie (abundancia relativa de los individuos, su biomasa, cobertura, productividad, etc.); estos últimos a su vez pueden clasificarse según se basen en dominancia o equidad de la comunidad (Moreno 2001).

La medición de la diversidad beta está basada en proporciones o diferencias que pueden evaluarse con base en índices o coeficientes de similitud, disimilitud o de distancia entre las muestras a partir de datos cualitativos o cuantitativos (Magurran 1988).

Los índices de diversidad y abundancia de microorganismos pueden ser utilizados como bioindicadores de la estabilidad de un ecosistema y pueden servir para describir la dinámica poblacional de un sitio (Atlas y Bartha 1998).

2.1.2. Diversidad microbiana

La vida en la Tierra no sería posible sin los microorganismos, los procesos de la biósfera dependen totalmente de las actividades microbianas, pese a ello, el conocimiento sobre diversidad biológica, particularmente microbiana, en términos de riqueza de especies, distribución local y global, y la interacción que establecen con otros organismos en ecosistemas aéreos, acuáticos o terrestres es incompleto, considerando que el número de especies descritas es de 1,8 millones, de las que sólo aproximadamente un 8% son microorganismos (Bull *et al.* 2000).

Durante las últimas décadas el estudio de la diversidad bacteriana, basada en secuencias de ADNr 16S ha permitido obtener información relevante que sugiere que más del 50% de los procariotes del suelo pertenecen a grupos de los que no hay representantes en cultivos bacterianos (Prosser 2002); además ha permitido delinear un mapa robusto de la evolución, enseñando que la principal fuente de diversidad de la vida es la bacteriana (Pérez *et al.* 1998).

La diversidad microbiana en ecosistemas terrestres se ve influenciada por la variación temporal y espacial de exudados radiculares particularmente de fuentes de carbono (Grayston y Campbell 1996, Grayston *et al.* 1998). Dentro de esa comunidad microbiana, las poblaciones de bacterias ferrirreductoras pueden llegar a tener densidades de 1×10^6 células/g (Alexander 1994).

Aún cuando ya han sido identificados y descritos procariotes que reducen Fe^{3+} en forma desasimilatoria bajo diferentes condiciones (Roberts 1947, Lovley 1981, Cornwell 1988), no hay reportes sobre la función ecológica que su capacidad de reducir Fe^{3+} pueda conferirles, ni sobre la diversidad de las mismas asociadas a especies agrícolas de importancia económica.

2.1.3. Bacterias con capacidad de reducción desasimilatoria de Fe^{3+}

La capacidad de algunos microorganismos de reducir Fe^{3+} se conoce desde el siglo XIX, pero aún a finales del siglo XX muchos microbiólogos consideraban que la reducción del Fe^{3+} en ecosistemas naturales no era resultado de procesos enzimáticos (Lovley 1991), esto debido a que no se

conocían microorganismos, que en forma eficiente, acoplaran la oxidación de materia orgánica a la reducción del Fe^{3+} como único aceptor de electrones.

Sin embargo, la descripción de este tipo de organismos (Roberts 1947, Cornwell 1988, Lovley 1991) ha permitido caracterizarlos como reductores desasimilatorios de Fe^{3+} , de acuerdo a la acumulación de Fe^{2+} en medios de cultivo orgánicos complejos (Lovley 1981).

La reducción desasimilatoria de Fe^{3+} se define como el uso de éste como aceptor externo de electrones durante el metabolismo (fig. 1). Difiere de la reducción asimilatoria, porque durante este proceso el hierro reducido es asimilado por la célula para ser incorporado a enzimas o como cofactor; otra diferencia entre ambos tipos de reducción, es que durante el proceso de reducción desasimilatoria se espera que se acumulen cantidades significativas de Fe^{2+} fuera de la célula (Lovley 1991).

Entre los primeros organismos que se demostró que utilizaba el Fe^{3+} como aceptor de electrones al crecer bajo condiciones anaeróbicas, se incluyen a los que tienen un metabolismo fermentativo primario: *Escherichia coli*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus lactis* (Roberts 1947). Pero no fue hasta 1987 cuando se aisló el primer microorganismo que acoplaba la reducción de Fe^{3+} a la oxidación de materia orgánica: *Geobacter metallireducens* (Chappelle 2001). También se han descrito organismos que reducen Fe^{3+} bajo condiciones aeróbicas (Cornwell 1988).

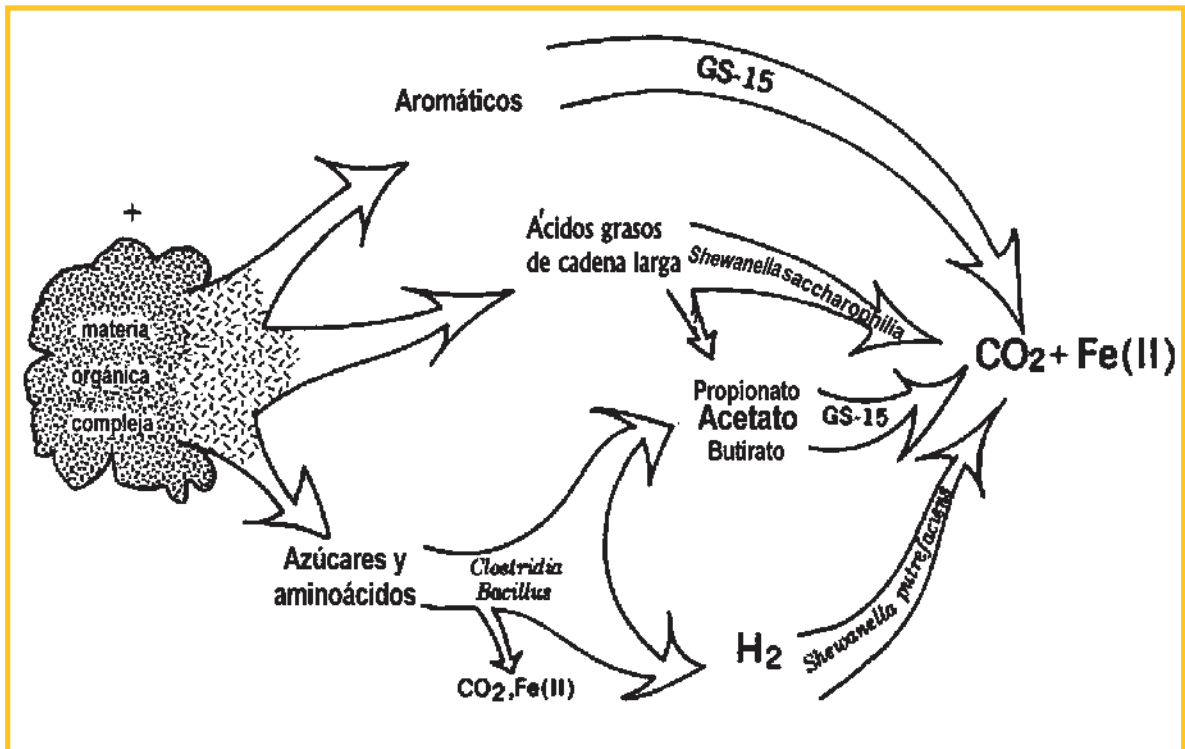


Figura 1. Modelo de oxidación de materia orgánica donde el Fe³⁺ funciona como único aceptor externo de electrones. A partir de carbohidratos y aminoácidos las bacterias reductoras de hierro en forma desasimilatoria, oxidan dichos compuestos hasta CO₂ y hay una reducción del hierro. Se señalan los organismos que catalizan las diferentes reacciones (Modificado de Lovley 1991).

Las bacterias reductoras de Fe³⁺ no forman un grupo taxonómico definido, muchas se ubican dentro del linaje de las proteobacterias (Brock *et al.* 1999), son microorganismos que difieren marcadamente en su metabolismo.

Las reductasas férricas son enzimas claves para la toma asimilatoria del hierro, presente en prácticamente todos los organismos vivos, con excepción de algunas bacterias homofermentativas de ácido láctico (Schröder *et al.* 2003). La reducción se da a través de un mecanismo que involucra un cofactor del tipo flavina en procariotes.

Mientras que las reductasas férricas desasimilatorias se enfrentan a la dificultad de utilizar un aceptor de electrones insoluble, actúan como enzimas

terminales del transporte de electrones que se encuentran unidas a la membrana citoplásmica. La reducción del hierro está acoplada a la generación de una fuerza protón-motriz a través de la membrana, que se usa para generar ATP (Schröder *et al.* 2003).

Las proteínas predominantes durante la transferencia de electrones al Fe^{3+} son del tipo citocromo *c* el cual, dependiendo de su coordinación puede asumir un rango de potenciales rédox. Adicionalmente, los citocromos tipo *c* son ideales para la transferencia de electrones entre Fe^{3+} , proteínas y quinonas (Vargas *et al.* 1998, Richardson 2000).

La mayoría de los reductores de Fe^{3+} , no son capaces de reducirlo en presencia de oxígeno (Lovley 1995); sin embargo en el suelo se presentan microcosmos con interfases óxico-anóxico en las que algunas bacterias podrían estar reduciéndolo. En el caso de suelos agrícolas esto se ve favorecido por la presencia de vegetación, con la consecuente producción de carbono y ligandos orgánicos que favorecen el rápido ciclamiento del hierro en la rizósfera (Weiss 2003).

2.2. Rizósfera

Se define como la porción de suelo adyacente e influida por las raíces vivas de las plantas (Bowen y Rovira 1999); alberga una comunidad microbiana diferente a la del suelo no rizosférico debido a la interacción de factores bióticos y abióticos: exudados radiculares (Schilling *et al.* 1998, Yang y

Crowley 2000), disponibilidad de nutrientes inorgánicos, pH, temperatura y competencia por hierro y carbono (Curl y Truelove 1986).

La rizósfera, típicamente ha sido caracterizada como una zona de deposición de Fe^{3+} (Mendelsson *et al.* 1995), con un alto potencial para una rápida reducción del ion férrico con valores de hasta $60 \mu\text{mol Fe}^{3+}/\text{g}$ raíz (Weiss *et al.* 2003). Las reacciones rédox a nivel de la rizosfera están acopladas a variaciones diurnas y estacionales de la actividad fotosintética durante el desarrollo de la planta, lo que incide en la velocidad de la liberación de oxígeno a través de las raíces, permitiendo que algunas regiones del sistema radicular soporten una mayor deposición de óxidos cristalinos de Fe^{3+} , para posteriormente en ausencia de oxígeno promover su reducción.

Este modelo de ciclamiento de hierro en la rizósfera es consistente con la presencia de un número sustancial de bacterias oxidantes y reductoras de hierro por centímetro de raíz de planta, lo que sugiere que hay tolerancia en la variación de oxígeno (Weiss *et al.* 2003).

También, como consecuencia de la respiración vegetal, a lo largo del sistema radicular hay liberación de electrones y protones, los cuales se combinan con el oxígeno para formar agua, y dado que la superficie de la raíz está más reducida que la solución del suelo, la relación $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ es mayor y el hierro es absorbido en forma más rápida por las raíces vegetales (Lindsay y Schwab 1982).

Otro factor que influye sobre el potencial de reducción del Fe^{3+} en la rizósfera es la producción de quelantes orgánicos, liberados a través de las raíces, que mantienen al Fe^{3+} en forma soluble y permiten que se difunda a sustancias

húmicas o a micrositios anaeróbicos, en donde sirve como aceptor externo de electrones (Weiss *et al.* 2003).

2.2.1. Hierro en el suelo

El hierro es el elemento más abundante en el planeta, ocupa el cuarto lugar como constituyente de las rocas de la corteza terrestre (Krauskopf 1983) y aproximadamente el 5% del peso total de ésta (Mengel y Kirkby 1987). A pesar de su abundancia la deficiencia por hierro afecta a más de 3,000 millones de habitantes en el planeta (World Health Organization 1999). Su importancia radica en que es un elemento esencial en reacciones celulares por su capacidad reversible de cambio de valencia entre Fe^{2+} y Fe^{3+} .

El hierro también se requiere para el transporte de electrones durante la respiración y la fotosíntesis y en reacciones catalíticas donde participan proteínas unidas a metal que utilizan oxígeno, hidrógeno o agua como sustratos (Karlin 1993).

Las formas iónicas de este elemento tienen una propensión marcada para formar complejos coordinados de seis ligandos que contengan O, N y S; esa propiedad, aunada al amplio rango de potencial rédox cubierto por enzimas que contienen hierro, favorece la participación de éste en reacciones como reducción de ribonucleótidos o en reacciones donde hay rendimiento de energía a través de transferencia de electrones durante la respiración y la fotosíntesis (Guenirot y Yi 1994).

Químicamente hablando, los organismos tienen tres formas de disolver óxidos de Fe^{3+} : la protonación, la quelación y la reducción (Guenirot y Yi 1994).

En el suelo, las bacterias, los hongos y las plantas (gramíneas) lo secuestran utilizando sideróforos (SF), ligandos orgánicos de bajo peso molecular que poseen una alta afinidad y especificidad para unirse al hierro (Takagi 1976, Winkelmann 1992).

Estos quelantes orgánicos no se definen por su estructura química sino por su afinidad, especificidad y su función biológica para tomar hierro. Los valores de la constante de estabilidad del complejo SF- Fe^{3+} están entre 10^{23} - 10^{52} (Ams *et al.* 2002), comparada con 10^{20} del complejo EDTA- Fe^{3+} . Se pueden mencionar ciertos rasgos comunes en la estructura química de los casi 500 sideróforos conocidos:

- a) Masa molecular entre 500 y 1,500 Da
- b) Los grupos por los que se unen los sideróforos microbianos son: hidroxicarboxilatos, hidroxamatos, catecolatos, mientras que los sideróforos vegetales se unen a grupos carboxilato, hidroxilo y amino.
- c) La mayoría son ligandos que satisfacen completamente la coordinación esférica interna del hierro en proporción 1:1 (Boukhalfa y Crumblis 2002).

En comparación con los fitosideróforos, los sideróforos microbianos tienen una mayor afinidad por el hierro pero, la menor afinidad de los primeros queda parcialmente compensada por la alta velocidad de exudación en gramíneas, lo que promueve concentraciones locales de ligandos en el orden de milimoles en la rizósfera (Römheld 1991). La concentración de sideróforos

bacterianos en el suelo típicamente es del orden submicromolar, de esta manera, los FS pueden tener un efecto igual o mayor al momento de solubilizar óxidos de hierro (Powell *et al.* 1989).

2.2.2. Clorosis férrica

Gran parte de la actividad del hierro en plantas está implicada en reacciones rédox en mitocondrias, peroxisomas y cloroplastos. A pesar de no formar parte de la molécula de clorofila el hierro se requiere para su síntesis en un proceso que relaciona al Fe^{2+} en la condensación del ácido succínico y de la glicina para formar ácido aminolevulinico, precursor de la síntesis de grupos pirroles, los que a su vez se condensan para formar protoporfirina; entonces el magnesio es incorporado a la molécula para formar clorofila a través de una acción catalítica del hierro (De Kock 1971).

En suelos cultivables, la deficiencia por hierro no responde a bajas concentraciones del mismo sino a su baja biodisponibilidad ya que se encuentra unido a otros minerales y su cinética de disolución es lenta (Kraemer 2003), condición que promueve una deficiencia de hierro en plantas conocida como clorosis férrica, resultado de un desequilibrio nutritivo que afecta a numerosas especies vegetales sobre todo en suelos calcáreos (Chen y Barak 1982), en los que la presencia de carbonato de calcio genera cantidades apreciables del ion bicarbonato en la rizósfera, debido a la mayor presión parcial de dióxido de carbono en las capas superficiales del suelo (Pestana 2003).

Sin embargo, el que algunas especies vegetales crecidas en suelos neutros o alcalinos no presenten síntomas de deficiencia por hierro indica que éstas han desarrollado mecanismos de adaptación para movilizarlo. De acuerdo al mecanismo de captación que utilizan para tomarlo se han clasificado como plantas Estrategas I o Estrategas II (Römheld 1987).

2.3. Plantas Estrategas I y II

Décadas de investigación sobre la respuesta vegetal ante la deficiencia por hierro, han permitido establecer que las plantas han desarrollado dos sistemas diferentes para tomarlo.

La primera estrategia (Römheld 1987, Hell y Stephan 2003) implica tres componentes adaptativos:

- a) Reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} en la superficie radicular y toma del Fe^{2+} .
- b) Movilización del hierro a través de la expulsión de H^+ fuera de la raíz, que se compensa a través de la toma de cationes como K^+ , NH_4^+ para mantener la neutralidad eléctrica además de exudación de OH^- en cantidades equivalentes.
- c) Liberación de sustancias reductoras o quelantes a través de las raíces, comúnmente fenoles y ligandos como el citrato, lactato, succinato, fumarato, malato y acetato, que permiten la acidificación de la rizósfera aún en suelos calcáreos (Dinkelacker *et al.* 1989, Fun *et al.* 1997).

En plantas Estrategas I el paso más importante para tomar hierro es la reducción del ion férrico en la superficie de la raíz (fig. 2) por una férrico

quelato reductasa localizada en la membrana (Chaney *et al.* 1972, Robinson *et al.* 1999).

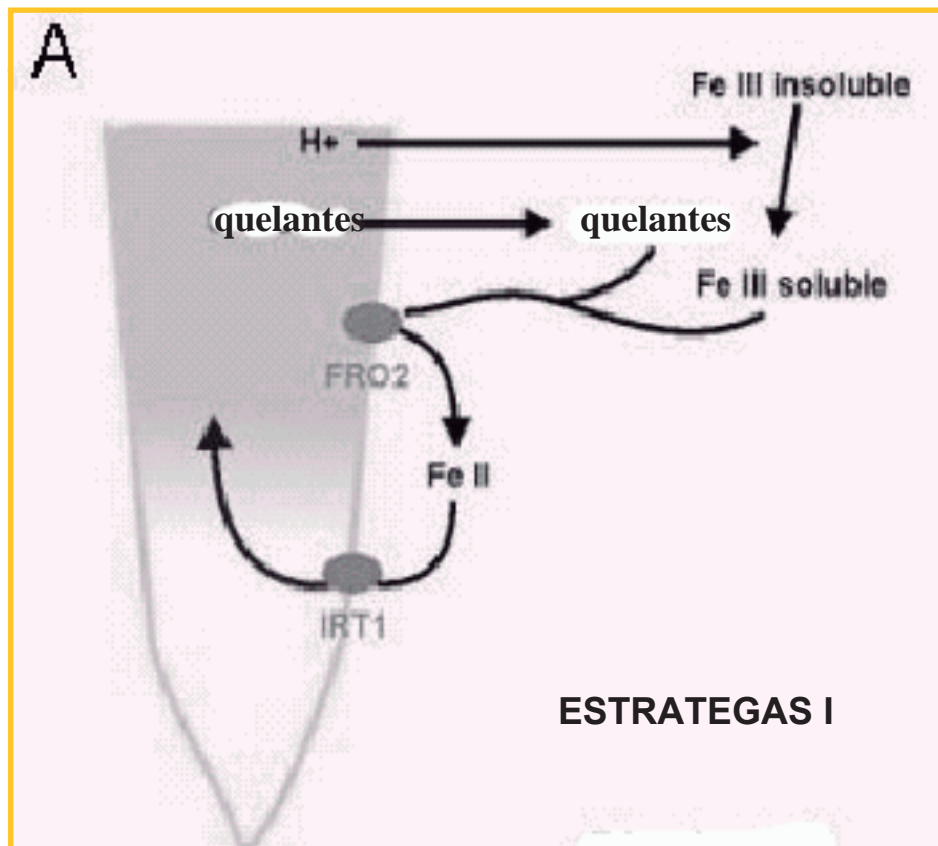


Figura 2. La deficiencia por hierro en plantas Estrategias I promueve la liberación de protones H^+ y la secreción de moléculas orgánicas quelantes para solubilizar el Fe^{3+} el cual es reducido por la enzima FRO2 y tomado por el transportador IRT1 localizado en la epidermis radicular (Modificada de Bauer y Berczky, 2003).

Se ha propuesto que dicha enzima es dependiente de NADH y se sabe que el gen que la codifica (*Atfro2*) pertenece a la familia de genes *fro* de plantas (Robinson *et al.* 1999).

Las células radicales absorben las formas reducidas de hierro a través de una proteína transportadora de Fe^{2+} , IRT1 (Eide *et al.* 1996, Guerinot 2000, Luca *et al.* 2001, Schmidt 2003), localizado en el plasmalema (Vert *et al.*

2002), codificado por genes involucrados en el transporte de metales de las familias ZIP, IRT1 y NRAMP (Eide *et al.* 1993, Korshunova *et al.* 1999, Rogers *et al.* 2000), que tienen un amplio rango de sustratos, dentro de los cuales el Fe^{2+} es tomado en forma preferente sobre el Fe^{3+} . Las adaptaciones fisiológicas de la zona apical van acompañadas de cambios morfológicos en la epidermis radicular e incluyen:

a) Diferenciación y elongación en pelos radiculares (Schikora y Schmidt 2001), cambio favorecido por auxinas y etileno (Tanimoto *et al.* 1995, Masucci y Schiefelbein 1996).

b) Diferenciación en células de transferencia, caracterizadas por presentar el retículo endoplásmico rugoso y el citoplasma grandes, abundancia de mitocondrias, membranas internas densamente empaquetadas e invaginaciones de la pared secundaria que favorecen un incremento de la superficie de la membrana plasmática (Gunning y Pate 1969).

Las Estrategas I están ampliamente distribuidas en plantas superiores, dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas; sin embargo, son muy propensas a ser inhibidas a valores altos de pH y/o niveles elevados de bicarbonato en suelos calcáreos debido a la dependencia química de la solubilización del Fe^{3+} del valor de pH (Toulon *et al.* 1989).

Las Estrategas II (fig. 3) sólo se han reportado en gramíneas (Römheld 1987), en las que la deficiencia por hierro induce la liberación de moléculas quelantes de Fe^{3+} , los FS; este sistema de toma de hierro implica varios pasos:

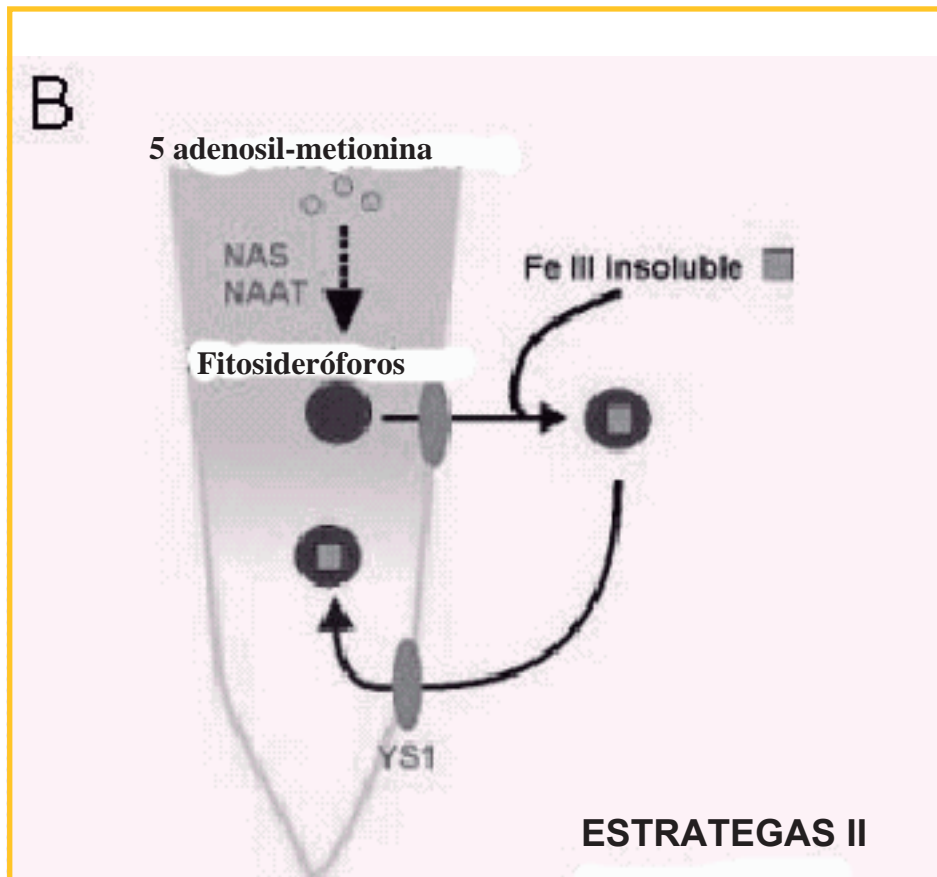


Figura 3. En plantas Estrategas II el primer paso en la síntesis de fitosideróforos es la conversión de tres moléculas de S-adenosil metionina en nicotianamina, la segunda enzima es la nicotianamina transferasa (NAAT) que cataliza la conversión de nicotianamina en ácido dexosimugineico, el complejo FS-Fe³⁺ es internalizado a través del transportador YSI (Modificada de Bauer y Bereczky, 2003).

a) Biosíntesis intracelular de FS

b) Exudación de FS al espacio extracelular.

c) Reconocimiento y toma del complejo FS-Fe³⁺ a través de las raíces por transportadores denominados YSI que pertenecen a la familia de transportadores oligopeptídicos OPT (Boukhalfa y Crumblis 2002, Schaaf *et al.* 2004).

Los genes que codifican para el transportador del complejo FS-Fe³⁺ pertenecen a las familias NRAMP o IRT1 (Eide *et al.* 1996, Curie *et al.* 2000,

Thomine *et al.* 2000). Estos FS incluyen hidroxí y ácidos imunocarboxílicos (ácido mugineico, ácido desoximugineico, ácido epi-hidroximugineico, ácido avénico). La toma del complejo FS-Fe³⁺ es altamente específica, no reconociendo quelatos sintéticos o microbianos (Yehuda *et al.* 1996).

La liberación de los FS es diurna y alcanza su pico máximo a unas pocas horas de la salida del sol; la síntesis de FS se suspende cuando la planta ha restablecido sus niveles adecuados de hierro (Graham y Stangoulis 2003).

El complejo ácido desoximugineico-Fe³⁺ está cargado negativamente a pH neutro mientras que a pH 5 la mayoría de los complejos no presentan carga (von Wirén 2000), es por ello que aun en presencia de bicarbonato, las plantas Estrategas II inducen la liberación de FS, los cuales gracias a su solubilidad y a que su carga es menos positiva, son libres para difundirse al interior de las raíces (Bauer y Bereczky 2003).

El primer paso en la síntesis de FS, que es la conversión de tres moléculas de S-adenosil metionina en nicotianamina, también es crucial para las plantas Estratega I (Ling *et al.* 1999); ya que esta molécula distribuye intra e intercelularmente al hierro y otros metales (Stephan *et al.* 1993, Mori 1999).

La segunda enzima crítica en la producción de FS es la nicotianamina transferasa (NAAT) que cataliza la conversión de nicotianamina en ácido desoximugineico (Takahshi *et al.* 1999).

Un prerrequisito para regular el hierro es que exista un componente que lo detecte; se ha sugerido que es el hierro mismo el que activa o reprime tal sensor y que podría unirse directamente a un regulador, por ejemplo, el hierro podría alterar la estabilidad del ARNm, la capacidad de unión al ADN,

la interacción proteína-proteína o activar una cadena de transducción de señales.

Otra posibilidad es que el hierro se una a algún componente interno de la planta, la presencia o ausencia del mismo podría ser detectada por ciertos componentes fisiológicos, traducida en una segunda señal que entonces actuaría como una cascada de transducción de señales hasta llegar al nivel del ADN.

Se predice que hay diferentes señales y mecanismos regulatorios involucrados, ya que la regulación en Estrategas I y II se presenta a diferentes niveles (Bauer y Bereczky 2003).

Generalmente se considera que las plantas dependen de un solo sistema, ya sea Estratega I o II, para la toma de hierro; sin embargo, existen trabajos que reportan que algunas especies de gramíneas también expresan en forma constitutiva la ruta dependiente de la reducción para la toma de hierro (Bugio *et al.* 2002). La enzima que participa en este proceso de reducción se purificó de raíces de maíz y fue identificada como una flavoproteína monomérica de 32 kDa con unión no covalente a FAD. Esta enzima en presencia de NADH reduce citrato-Fe³⁺ y además puede utilizar al citocromo *b*₅ como aceptor alternativo de electrones (Sparla *et al.* 1997). Otros trabajos reportan que en gramíneas, como cebada y maíz, el sistema transportador de Fe²⁺ está ausente o se expresa a niveles muy bajos (Zaharieva y Römheld 2001). Hasta el presente, la liberación de FS no se ha detectado en plantas Estratega I.

En ambos tipos de estrategias las respuestas inducidas se restringen a las zonas apicales de las raíces y se detienen por completo cuando los niveles normales de hierro se han alcanzado (Graham 2003).

2.3.1. Limón (*Citrus aurantifolia* Christm Swingle)

Los llamados cítricos, del griego Kitrón que significa limón, constituyen el género *Citrus* de la familia de las Rutáceas. El origen del género se sitúa en el sureste de Asia, son árboles de entre 3 y 5 m de altura, con numerosas ramas con espinas duras y gruesas; presentan hojas unifoliadas de color verde pálido, flores solitarias o en racimos axilares, el fruto es oval con cáscara gruesa y punteada de glándulas.

En árboles de limón la clorosis férrica se observa como un amarillamiento intervenal que inicia al momento de la apertura de los brotes florales (Tagliavini y Rombolá 2001), éstos árboles frutales toman el hierro a través de los ápices radiculares, por lo tanto el número de éstos durante el período de crecimiento puede ejercer influencia sobre la absorción del elemento, ya que es durante ese período de intensa demanda del nutriente cuando las lluvias provocan un aumento en la concentración de CaCO_3 en el suelo (Tagliavini *et al.* 2000a).

Otro aspecto de la nutrición por hierro en árboles de limón está en relación a su tamaño, ya que después de ser absorbido tiene que ser transportado a distancias considerables hasta alcanzar la copa de los árboles.

México en el año 2004 fue el primer productor de limón a nivel mundial (FAOSTAT 2004) con una producción de 1,988 mil ton mientras que según datos de SAGARPA a junio del 2006 se habían cosechado en Michoacán 250,000 ton producción que lo coloca como el 2° productor a nivel nacional de este cítrico (SAGARPA 2006).

2.1.2. Maíz (*Zea mays*)

Aunque el origen exacto del maíz es debatido, la mayoría de los investigadores señalan que proviene del teocintle una gramínea silvestre nativa del Valle central de México hace aproximadamente 7,000 años (Doebley 1990).

Se utiliza para producir forraje y como base para la fabricación de una gran cantidad de alimentos, productos farmacéuticos y productos de uso industrial. Actualmente el maíz se cultiva en la mayoría de los países del mundo y es la tercera cosecha en importancia, después del trigo y el arroz.

En el 2004, la producción mexicana de maíz fue de 22 millones de ton de las que entre un 90 y 95% se cultivaron en el ciclo primavera-verano y Michoacán fue uno de los cinco principales estados productores durante dicho ciclo (Centro de Estudios de Finanzas Públicas 2004).

La elección de estas dos especies vegetales para realizar la presente investigación se basó en sus características contrastantes: el maíz es una planta Estratega II, con una ruta de transporte no reductora del complejo FS-Fe³⁺, particularmente efectiva a valores alcalinos de pH y a concentraciones

muy bajas del complejo FS- Fe^{3+} (Marschner 1995, Schaaf *et al.* 2004), mientras que el limón se clasifica como una planta Estratega I, con una mayor propensión a presentar síntomas de deficiencia por hierro.

3. JUSTIFICACIÓN

México es el primer productor a nivel mundial de limón y el maíz es la gramínea más importante en nuestro país; sin embargo, se desconoce la función ecológica y la participación bacteriana en la solubilización de Fe^{3+} en la rizósfera, favoreciendo el incremento de Fe^{2+} y por lo tanto, la toma de ese nutriente a través de los pelos radiculares en estas especies vegetales, así como las diferencias o semejanzas en la composición de su población de bacterias.

4. HIPÓTESIS

La diversidad y la proporción de bacterias ferrirreductoras en la comunidad rizósferica del limón, es mayor con respecto a la que existe en el suelo no rizosférico y en la rizósfera de plantas de maíz en suelos alcalinos.

5. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar y caracterizar a las poblaciones de bacterias ferrirreductoras asociadas a las rizósferas de limón y maíz crecidos en suelo alcalino.

5.1. Objetivos particulares

5.1.1. Cuantificar la capacidad de reducción de Fe^{3+} de rizobacterias de dos especies vegetales con estrategias adaptativas I y II, crecidas en suelo alcalino.

5.1.2. Determinar y comparar la diversidad bacteriana ferrirreductora de limón y maíz, crecidos en suelo alcalino.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Origen de las muestras

6.1.1. Suelo

El suelo utilizado se colectó en El Lometón, Mpo. de Tarímbaro, Michoacán (19°42'N y 101°8'O). Se tomó una muestra compuesta de 0 a 20 cm de profundidad, se secó a temperatura ambiente y se tamizó con una malla con abertura de 4 mm. El suelo se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Se determinó la capacidad de campo (CC), pesando 100 g de suelo seco tamizado que se colocó en un embudo con papel filtro y agua corriente, la solución se dejó decantar 24 h. La CC del suelo fue de 1.03 ml/g. El pH se determinó utilizando un potenciómetro, fue de 8.6.

6.1.2. Material vegetal

Las semillas de limón (*Citrus aurantifolia* var. criollo) se obtuvieron de frutos maduros. Las semillas de maíz (*Zea mays* var. Asgrow A-791) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Cinvestav. I.P.N. (Unidad Irapuato).

Para desinfectar las semillas de limón se colocaron 1 h en agua destilada, 20 min a una solución que contenía hipoclorito al 10% y extrán al 15% y se

enjuagaron con agua estéril, después se colocaron en frascos con medio estéril MS (Murashige y Skoog 1962) (Apéndice 11.1.3.). Se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente hasta su germinación (~15 a 20 días).

Las semillas de maíz fueron desinfectadas superficialmente por inmersión sucesiva en 100 ml de cloruro de benzalconio al 10%, en etanol al 70% y en hipoclorito al 10%; en cada inmersión se agitaron a 120 rpm durante 5 min, antes de colocarlas en la solución siguiente, las semillas eran enjuagadas con agua estéril (Velásquez-Becerra 2003). Posteriormente se colocaron en cajas Petri que contenían 25 ml de agar bacteriológico, se incubaron a 30°C hasta su germinación (~2 a 4 días).

6.1.3. Condiciones de crecimiento de las plantas

Las semillas germinadas se plantaron en macetas con aproximadamente 1 kg de suelo alcalino seco y tamizado, que se mantuvo a un 70% de su CC, utilizando solución nutritiva MS esterilizada (pH 7), para suplementar todos los nutrientes excepto hierro. Previo a la plantación de las semillas el suelo fue asperjado con fungicida Captan al 2%.

Se plantaron 10 macetas: 5 con semillas de limón, 5 con semillas de maíz, en cada maceta se plantó una semilla, 5 macetas sin semilla se utilizaron como control. Se colocaron en una cámara de crecimiento en forma aleatoria bajo condiciones de luz y temperatura constantes, se movían diariamente para asegurar condiciones uniformes.

6.2. Cuenta y aislamiento de bacterias con capacidad de reducir Fe³⁺

6.2.1. Obtención de aislados bacterianos

La cosecha de plántulas se realizó a los 10 días para maíz y a los 105 días de crecimiento para el limón. El contenido de las macetas se colocó sobre plástico, removiendo cuidadosamente el sistema radicular. El suelo rizosférico se definió como aquél que quedaba firmemente adherido a las raíces después de haberlas sacudido.

Cada raíz fue manejada por separado (Picard *et al.* 2000). Se colocaron en matraces con 100 ml de agua destilada y estéril, se agitaron 20 s en vórtex, de ahí fueron colocadas en tubos de ensaye con 9 ml de amortiguador de fosfato. (Apéndice 11.2.2.).

Para obtener el peso seco del suelo rizosférico, el contenido del tubo de ensaye sin raíz se evaporó a 55°C.

El aislamiento de colonias se realizó por el método de cuenta viable en placa, se inocularon 100 µl del contenido del tubo de ensaye sobre medio extracto de suelo (Modificado de Olsen y Bakken, 1987).

Las siembras se realizaron por triplicado, se incubaron 10 días a 30°C, posteriormente de cada placa se aislaron en forma aleatoria 33 colonias (495 por tratamiento). Cada colonia fue inoculada por separado en viales que contenían 1 ml de medio líquido extracto de suelo adicionado con ácido nitrilotriacético férrico 40 mM (Fe³⁺-NTA).

Para determinar el tiempo de incubación de los aislados en los viales se obtuvieron los valores de densidad poblacional a 590 nm utilizando un espectrofotómetro. Se realizó una cinética de crecimiento bacteriano, se eligieron al azar 30 viales inoculados, 10 de cada tratamiento, y se midió su crecimiento diariamente durante 10 días.

6.2.2. Cuantificación de actividad reductora de aislados bacterianos por el método de la ferrozina

La concentración del ion ferroso se determinó por el método de la ferrozina (Sorensen 1982), la cual se acompleja con el Fe^{2+} generando un color magenta intenso y estable, que fue leído a una longitud de onda de 562 nm en un espectrofotómetro (Apéndice 11.3.).

La actividad de reducción de hierro de los aislados se determinó con dos metodologías diferentes en dos experimentos por separado:

a) Al 9º día de crecimiento con una repetición a cada uno de los 1,485 aislados crecidos a 30°C en medio líquido extracto de suelo adicionado con ácido nitrilotriacético férrico 40 mM (Apéndice 11.1.2.); los viales fueron adicionados con la ferrozina y se mantuvieron otras 24 h en incubación. Al terminó de ese lapso se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 562 nm. (Kosegarten *et al.* 1999, Vélazquez-Becerra 2003)

b) A 24 h de crecimiento a 30°C en caldo nutritivo a aproximadamente 150 aislados de cada tratamiento elegidos en forma aleatoria en réplicas por

triplicado, los viales fueron adicionados con 100 µl de ferrozina y en ese momento se realizó la lectura de absorbancia reducción a 562 nm en un espectofotómetro (Sorensen 1982, Nielsen 2002).

Los valores de absorbancia obtenidos en cada uno de los experimentos anteriores se ajustaron a curvas de calibración, utilizando una solución de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (Apéndice 11.2.2.).

Para ambos experimentos se utilizaron las cepas G2 *Geobacillus thermoleovorans* y G9 *Bacillus* sp como controles positivo y negativo, respectivamente (Valencia-Cantero 2003).

6.2.3. Purificación de aislados

De los aislados que presentaron actividad de reducción durante el segundo experimento, se seleccionaron aleatoriamente 25 por tratamiento, los cuales fueron purificados a través de 3 siembras consecutivas en placa sobre agar nutritivo, las cajas se incubaron durante 24 h a 30°C.

6.3. Análisis por restricción de ADNr amplificado (ARDRA)

6.3.1. Obtención de ADN total

Para obtener el ADN total de los aislados bacterianos, las células se cultivaron en 3 ml de caldo nutritivo durante 12 h a 30°C, se colectaron por centrifugación a 12,000 rpm 3 min se resuspendieron en 200 µl de

amortiguador SET (Apéndice 11.2.3.). Se agregó lisozima para una concentración final de 1mg/ml, los viales se incubaron 1 h a 37°C. Posteriormente se adicionó SDS al 10% y se incubaron a 55°C con agitación ocasional durante 2 h, después se agregó 1/3 de NaCl 5M y un volumen de cloroformo, se incubaron 30 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min. El ADN se precipitó con un volumen de isopropanol, se mantuvo en hielo 5 m y se colectó por centrifugación 12,000 rpm por 10 min. La pastilla se lavó con 200 µl de etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 50 µl de agua desionizada (Pospiech y Neumann 1995). La integridad del ADN se revisó por electroforésis en un gel de agarosa al 0.7% en amortiguador TAE (Apéndice 11.2.4.).

6.3.2. Amplificación de ADNr 16S

Se utilizaron oligonucleótidos universales, reportados por Weisburg *et al.* (1991) FD1 (5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y RD1 (5'CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC3'), los cuales fueron diseñados para amplificar regiones conservadas de fragmentos de aproximadamente 1,500 pb. Los tubos contenían 1 µl de ADN (~200 ng/µl), 0.5 µl de cada uno de los oligos (50 ng/µl), 1 µl de *Taq* polimerasa y 22 µl (22U/µl) de mezcla de reacción (Invitrogen). La desnaturalización del ADN se hizo a 95°C por 3 min, la activación inicial de las enzimas a 94°C por 1 min *el alineamiento a 55°C por 1 min, polimerización a 72°C por 2 min* (30 ciclos a partir de *) con una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos

de amplificación se revisaron por electrofóresis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE.

6.3.3. Restricción de los productos de PCR

Los productos de PCR sin purificar fueron digeridos con la endonucleasa *Hha* I (5'GCG/C3') en reacciones por separado (Chéneby *et al.* 1998, Rogel *et al.* 2001, Blackwod *et al.* 2002, Philippot *et al.* 2002). Las digestiones se realizaron durante 2 h en volúmenes finales de 20 µl a 37°C. Las reacciones contenían 7 µl del producto amplificado, 2 µl de amortiguador, 1 µl de enzima (10 U/µl) y 10 µl de agua desionizada estéril. Los productos digeridos se revisaron por electrofóresis en gel de agarosa al 2% utilizando amortiguador TAE.

Los perfiles de restricción se clasificaron en base a presencia o ausencia de fragmentos, a través de una matriz binaria que se analizó utilizando el método de varianza mínima con el programa estadístico MSVP 3.

6.4. Tratamiento estadístico

La cuantificación de poblaciones bacterianas totales fue el resultado de la media de tres repeticiones en placa de agar con medio de cultivo extracto de suelo, en base a una *n* de cinco plantas por tratamiento o de muestras de suelo no rizosferico.

Para evaluar los resultados de los experimentos de reducción de hierro se realizó una prueba de normalidad de χ^2 , las diferencias en actividad de reducción específica de Fe^{3+} entre tratamientos se analizaron utilizando las pruebas de Wilcoxon/Kruskal-Wallis y la prueba χ^2 con ayuda del programa JMP versión 3.2.2. (Apéndice 11.4.).

6.4.1. Medición de diversidad alfa y beta

La diversidad bacteriana se calculó a partir de la ecuación del índice de Shannon-Weaver $H' = -\sum p_i \ln p_i$, donde p_i = abundancia proporcional de cada biotipo.

Valores de H' próximos a cero indican una baja diversidad y valores próximos a 4 alta diversidad (Shannon 1948).

Las semejanzas entre las especies presentes en los tratamientos, que es una medida de la diversidad beta (Pielou 1975, Magurran 1988), se calculó con el coeficiente de similitud de Jaccard: $I_j = c/a+b+c$, donde a = número de especies presentes en el sitio A, b = número de especies presentes en el sitio B y c = número de especies presentes en ambos sitios. Este análisis se realizó a partir de los datos obtenidos del ARDRA.

El intervalo de valores para este índice va de 0, cuando no hay especies compartidas, hasta 1 cuando los dos sitios tienen la misma composición de especies (Moreno 2001).

7. RESULTADOS

7.1. Densidad poblacional bacteriana total

Se determinó la población heterotrófica total del suelo no rizosférico y de los suelos rizosféricos de limón y maíz. Las poblaciones aisladas de las rizósferas de limón y maíz, tuvieron valores de 8.1, densidad estadísticamente diferente del 6.5 encontrado en el suelo control. El cociente de la relación de densidad poblacional rizosfera de limón/suelo fue de 44, el valor de esa misma relación para maíz fue de 57. Los valores de densidad poblacional total se muestran en la figura 4.

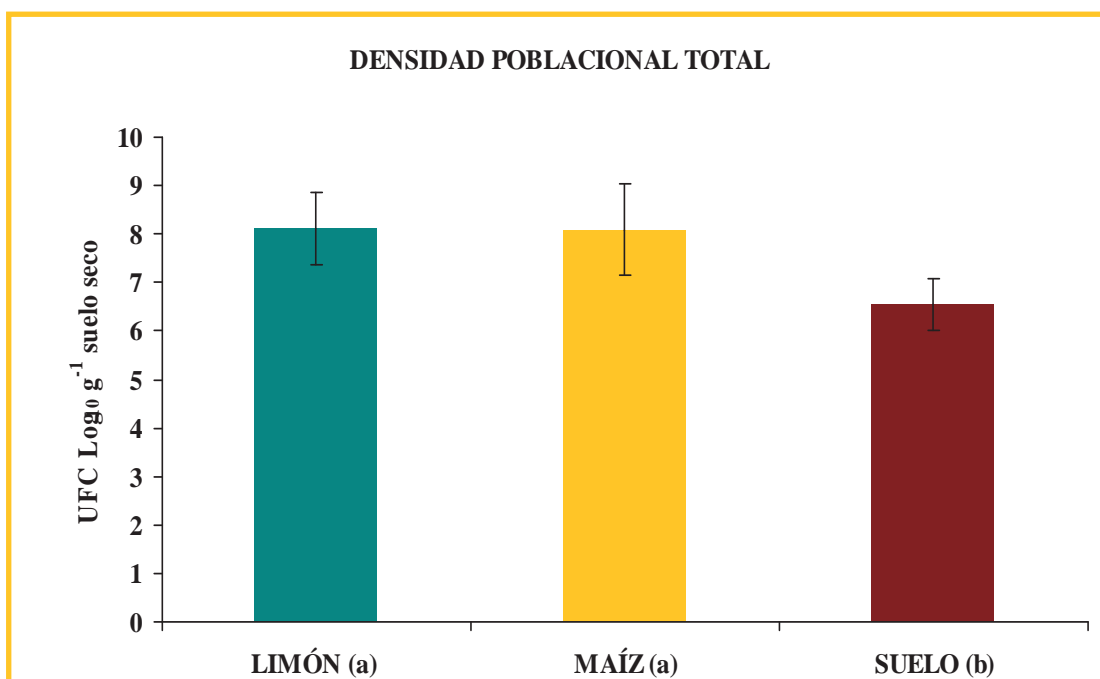


Figura 4. Densidad de la población bacteriana total de las rizósferas de limón, maíz y suelo no rizosférico. Letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey $p \geq 0.05$.

7.2. Cinética de crecimiento de aislados bacterianos

Para los dos tratamientos y el control, el primer aislamiento de colonias se hizo a los diez días de haber inoculado cajas Petri usando como sustrato sólido el medio de cultivo extracto de suelo.

Previo al aislamiento de colonias se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por el método de cuenta viable en placa. La selección de los aislados se realizó en forma aleatoria, tomando como base el criterio de que para que una placa sea estadísticamente representativa debe tener por lo menos 30 colonias. Las cajas Petri se dividieron en 4 secciones y de cada segmento se tomaron 8 ó 9 colonias, por lo que de cada rizósfera se aislaron 99 colonias.

Para establecer el tiempo de incubación en medio líquido, previo a la toma del valor de reducción específica, se consideró mantener los aislados bacterianos en crecimiento el mismo período que se mantuvieron en placa. Además se realizó una cinética de crecimiento a 30 aislados bacterianos tomados en forma aleatoria (10 de cada tratamiento). De acuerdo a la figura 5, se observa que los aislados llegaban a la fase estacionaria entre los días 9 y 10, lapso en el que teóricamente el crecimiento celular se detiene; sin embargo, en esa fase muchas funciones celulares, metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos pueden continuar.

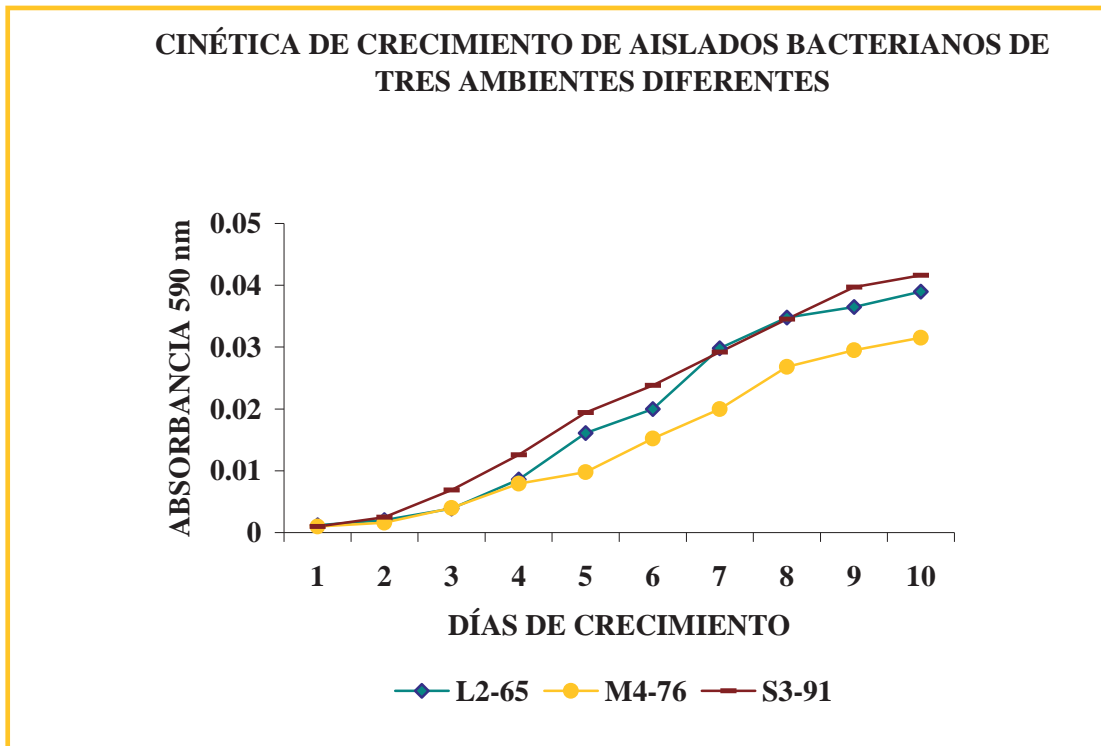


Figura 5. Cinética de crecimiento de aislados bacterianos provenientes de rizósferas de limón (L2-65), de maíz (M4-76) y suelo no rizosférico (S3-91). Estos valores son el resultado de réplicas por triplicado.

Con la información obtenida de este experimento, todos los aislados fueron evaluados en su capacidad de reducción de Fe^{3+} a los días 10 de crecimiento.

7.3. Determinación de la actividad de reducción de Fe^{3+}

7.3.1. Actividad de reducción de Fe^{3+} , determinada en medio extracto de suelo

La actividad específica de reducción de Fe^{3+} fue determinada individualmente a 1,485 aislados bacterianos obtenidos de las rizósferas de limón, de maíz y del suelo no rizosférico.

Los valores de reducción específica obtenidos de cada uno de los aislados primero fueron analizados con una prueba de normalidad para determinar la distribución de las muestras (fig. 6).

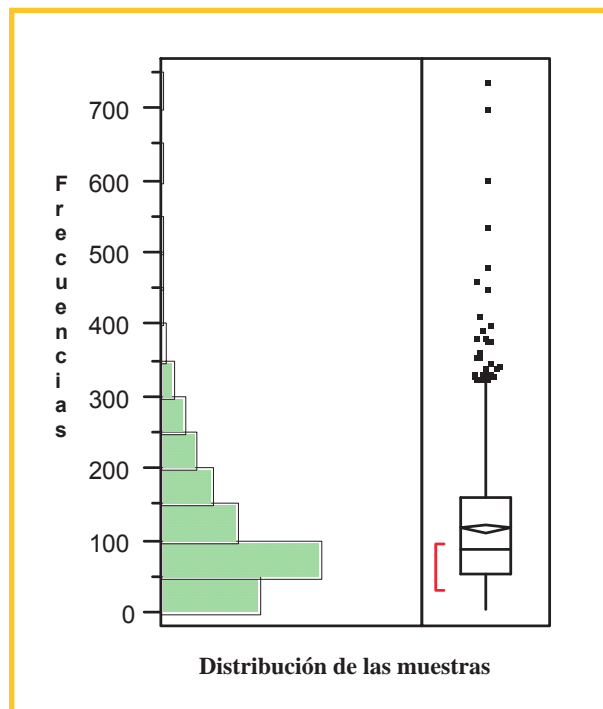


Figura 6. Histograma de la prueba de normalidad. JMP 3.2.2. Cada barra muestra la frecuencia de ocurrencia del rango de valores representado en el eje de las “Y”, si la variable es continua cada valor queda representado por una barra. En el recuadro de la derecha la media de la muestra queda señalada con la línea media y los cuartiles 25° y 75° son las líneas extremas del rectángulo. La llave identifica el intervalo de confianza del 95% alrededor de la media. Si una muestra se distribuye normalmente los valores se arreglan simétricamente alrededor de la media aritmética, si la muestra normal es suficientemente grande, entonces aproximadamente el 68% de los valores están dentro de una desviación estándar con respecto a la media.

La prueba anterior indicaba que, en los experimentos realizados, los valores de reducción específica no siguieron una distribución normal, por lo que se decidió realizar el contraste de Kruskal-Wallis, alternativa no paramétrica del método ANOVA, que sirve para contrastar la hipótesis de que k muestras cuantitativas han sido obtenidas de la misma población.

Para efectos del análisis estadístico, sólo se incluyeron 1,132 aislados provenientes de las rizósferas de limón (347) maíz (403) y suelo control (382), que fueron los aislados que presentaron crecimiento (valores de densidad óptica a 590 nm superior a 0.02.). También se excluyeron del análisis los aislados que aún con una densidad óptica por arriba de 0.02, no presentaron actividad de reducción de Fe^{3+} .

De acuerdo a las mediciones realizadas en el espectrofotómetro, la reducción realizada por los aislados fue de $2.16 \times 10^5 \mu\text{M de Fe}^{3+} \text{ A}_{562} \text{ día}^{-1}$; de ese valor el 60% fue realizada por aislados obtenidos de rizósfera de limón, 19.3% por aislados de rizósfera de maíz y el resto (19.5%) por los aislados del control.

En cada uno de los tratamientos y el control los aislados tuvieron variaciones en cuanto a su capacidad de reducción (fig. 7), esos resultados se expresan como frecuencias acumuladas de aislados que presentaron una determinada capacidad de reducción de hierro.

La actividad promedio de ferrirreducción de los aislados provenientes de rizósfera de limón fue de 141, la de los de maíz de 104 y la de los aislados del control de $111 \mu\text{M de Fe}^{3+} \text{ A}_{562} \text{ día}^{-1}$ (tabla 1). Estos resultados indican que los aislados provenientes de limón tuvieron una media de actividad

específica de reducción 26% por arriba de los aislados obtenidos del control, mientras que la media de actividad específica de reducción de los rizósfera de maíz fue 2% menor a la encontrada en el control. La diferencia entre tratamientos la diferencia fue 29% superior entre los aislados provenientes de rizósfera de limón con respecto a los de maíz, diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis considerando un α de 0.01.

7.3.1.1. Clasificación de aislados bacterianos crecidos en medio líquido extracto de suelo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción.

El criterio empleado para categorizar la capacidad de reducción de Fe^{3+} de los aislados fue tomado de Nielsen *et al.* (2001). Se consideró como positivo reductor un aislado que tuviera por lo menos el doble de la capacidad de ferrirreducción del control negativo. Los controles usados como referencia para categorizar la capacidad de reducción de los aislados obtenidos en los tres tratamientos fueron las cepas G2 *Geobacillus thermoleovorans* ($158 \mu\text{M Fe}^{2+} \text{ A}_{562} \text{ día}^{-1}$) y G9 *Bacillus* sp. ($70 \mu\text{M Fe}^{2+} \text{ A}_{562} \text{ día}^{-1}$) reportadas por Valencia-Cantero (2003).

En cada uno de los tratamientos y el control se clasificaron como reductores basales los aislados con una capacidad de reducción de 6.7 a $150 \mu\text{M Fe}^{2+} \text{ A}_{562} \text{ día}^{-1}$, (fig. 8) como reductores los aislados con capacidad de reducción de 151 a $300 \mu\text{M Fe}^{2+} \text{ A}_{562} \text{ día}^{-1}$ y como altos reductores los aislados con capacidad de reducción mayor de $301 \mu\text{M Fe}^{2+} \text{ A}_{562} \text{ día}^{-1}$.

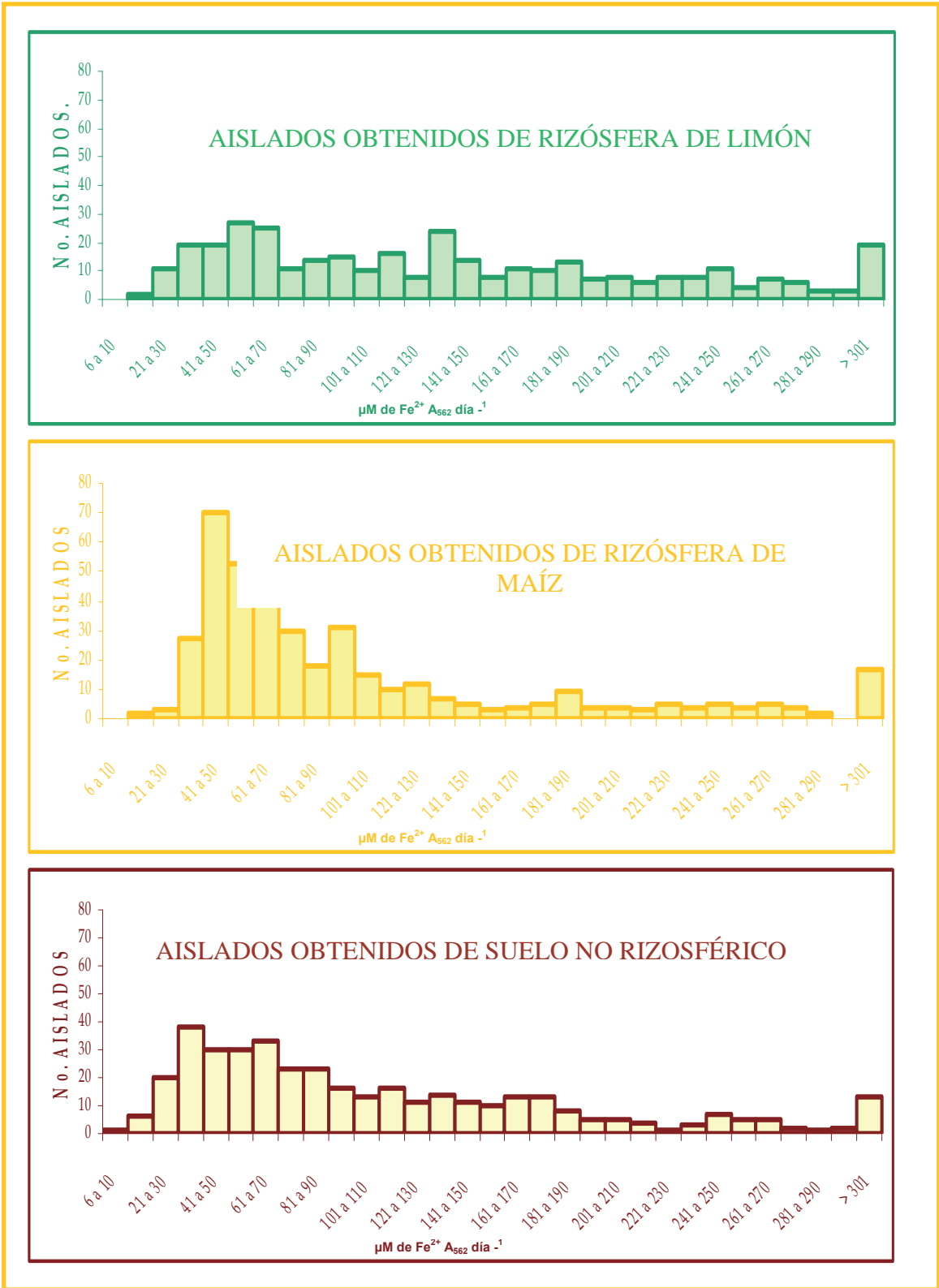


Figura 7. Perfiles de capacidad de reducción de aislados bacterianos crecidos en medio líquido extracto de suelo, obtenidos de tres ambientes diferentes. En los tres paneles, el eje de las “Y” hace referencia al número de aislados (frecuencias acumuladas) que presentaron determinada capacidad de reducción (μM de Fe^{2+} A₅₆₂ día⁻¹) expresada en el eje de las “X”.

Tabla 1. Actividad específica de reducción de aislados bacterianos incubados en medio líquido extracto de suelo.

Origen de los aislados	No. de aislados	Media de actividad específica de reducción [†] $\mu\text{M Fe}^{2+} \text{ A}_{562} \text{ día}^{-1}$
LIMÓN	347	141 [±] 93 ^A
MAÍZ	403	104 [±] 84 ^B
SUELO	382	111 [±] 83 ^B

[†] Medias marcadas con letras distintas indican diferencia significativa a un α de 0.01 según la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis.

Las diferencias entre las frecuencias con que sucedieron las distintas categorías de aislados fueron analizadas mediante una prueba de independencia de X^2 (tabla 2) encontrándose que dichas frecuencias están estadísticamente relacionadas con el ambiente de origen de los aislados, considerando un α de 0.01.

En los tres ambientes de origen predominaron los aislados clasificados como reductores basales. En la categoría de reductores es donde se observaron las mayores diferencias entre tratamientos. El 32% de los aislados obtenidos de la rizósfera de limón, fueron considerados como reductores, mientras que

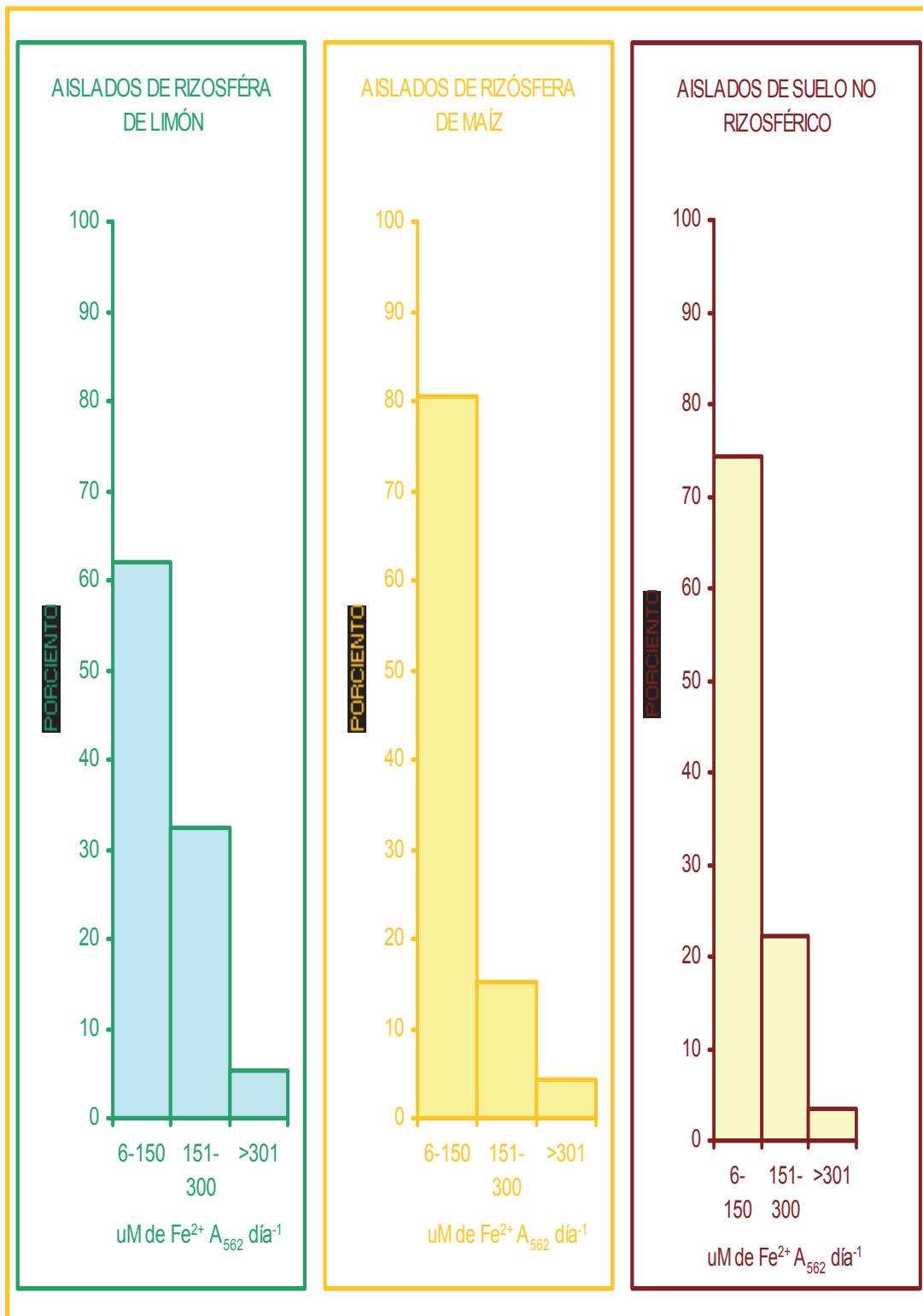


Figura 8. Categorización de aislados bacterianos crecidos en medio líquido extracto de suelo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción, obtenidos de tres ambientes diferentes. Reductores basales de 6 a 150, reductores de 151 a 300 y altos reductores $> 301 \mu\text{M Fe}^{2+} A_{562} \text{ día}^{-1}$.

sólo el 15% de los aislados que se obtuvieron de rizósfera de maíz se incluyeron en esa categoría.

Tabla 2. Comparación de las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas en los aislados bacterianos crecidos en medio líquido extracto de suelo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción.

Origen de los aislados	Reductores		Altos
	basales 6 a 150 μM Fe^{2+} A_{562} día ⁻¹	Reductores 151 a 300 μM Fe^{2+} A_{562} día ⁻¹	reductores > 300 μM Fe^{2+} A_{562} día ⁻¹
LIMÓN	215 ^{A†}	113 ^A	19 ^A
	252 ‡	79	15
MAÍZ	325 ^B	61 ^B	17 ^A
	293	92	17
SUELO	284 ^B	85 ^B	13 ^B
	278	87	16

† Frecuencia de aislados observada en cada una de los intervalos de reducción. Las frecuencias para un mismo intervalo marcadas con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

‡ Los valores escritos en cursivas representan las frecuencias esperadas para cada intervalo si dicha frecuencia fuera independiente del origen de la muestra.

En una situación intermedia, el 25% de los aislados provenientes de suelo no rizosférico fueron reductores. Los aislados altos reductores se distribuyeron de una manera más homogénea, significando entre el 3 y el 5% de los aislados de sus respectivos ambientes de procedencia. Es claro que la diferencia en la capacidad media de ferrirreducción de los aislados bacterianos de las rizosferas de limón y maíz expresada en la tabla 1, no fue

debida a la presencia de aislados altos reductores, ya que éstos estuvieron en proporciones semejantes en las rizósferas de los dos tratamientos, sino en las bacterias consideradas como reductoras, que estuvieron en una proporción de casi el doble en la rizófera de limón respecto a la de maíz.

Mientras que los aislados reductores basales se aislaron en cantidades superiores de rizósfera de maíz y del control, comparados con el número de los mismos, obtenidos de rizósfera de limón.

La baja capacidad de reducción de dichos aislados incidió de forma negativa sobre el valor de la media de reducción del tratamiento maíz y del control, haciendo que el valor de la misma fuera estadísticamente superior para los aislados provenientes de limón.

Los resultados anteriores indicaban que los aislados tenían capacidad de reducción elevada. Con la finalidad de descartar la posibilidad de que dicha actividad no fuera de tipo biológico, se decidió medir la actividad de reducción al momento de aplicar la ferrozina, a 150 aislados de cada tratamiento, elegidos de manera aleatoria, de entre los que en el ensayo anterior presentaron capacidad de reducción (Dell'Orto *et al.* 2000, Schikora y Schmidt 2001).

7.3.2. Actividad de reducción de Fe^{3+} , determinada en caldo nutritivo, al momento de adicionar la ferrozina

Se determinó la actividad específica de reducción de Fe^{3+} en réplicas por triplicado a aislados obtenidos aleatoriamente de cada tratamiento y el control (150 de cada uno).

En este segundo ensayo nuevamente los valores de reducción específica obtenidos de cada uno de los aislados fueron analizados con una prueba de normalidad para determinar la distribución de las muestras (fig. 9).

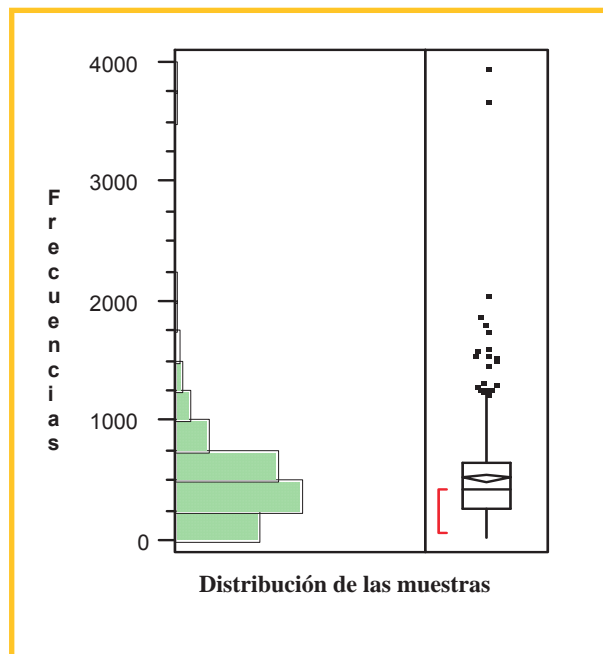


Figura 9. Histograma de la prueba de normalidad. JMP 3.2.2. Cada barra muestra la frecuencia de ocurrencia del rango de valores representado en el eje de las “Y”, si la variable es continua cada valor queda representado por una barra. En el recuadro de la derecha la media de la muestra queda señalada con la línea media y los cuartiles 25° y 75° son las líneas extremas del rectángulo. La llave identifica el intervalo de confianza del 95% alrededor de la media. Si una muestra se distribuye normalmente los valores se arreglan simétricamente alrededor de la media aritmética, si la muestra normal es suficientemente grande, entonces aproximadamente el 68% de los valores están dentro de una desviación estándar con respecto a la media.

Como en el experimento descrito en el apartado 7.3.1. la prueba de normalidad indicaba que la distribución de las muestras no se ajustaba a una

curva de normalidad, por lo que los resultados de este segundo ensayo también se analizaron estadísticamente usando el contraste de Kruskal-Wallis.

En cada uno de los tratamientos y el control los aislados tuvieron variaciones en cuanto a su capacidad de reducción (fig. 10); esos resultados se expresan como frecuencias acumuladas de aislados que presentaron una determinada capacidad de reducción de hierro. La actividad promedio de ferrirreducción de los aislados provenientes de rizósfera de limón fue de 725, de los de maíz 460 y la de los aislados del control fue de 390 μM de Fe^{2+} A₅₆₂ (tabla 3).

Estos resultados indican que los aislados provenientes de limón tuvieron una media de actividad específica de reducción 1.9 veces mayor que la de los aislados obtenidos del control, porcentaje significativamente superior a lo observado en el experimento anterior (1.3 veces), mientras que la media de actividad específica de reducción de los de rizósfera de maíz fue al contrario del ensayo previo, 1.2 veces mayor a la encontrada en el control.

A pesar de los elevados valores del error estándar, particularmente en el caso de los aislados de rizósfera de maíz, entre tratamientos los aislados provenientes de rizósfera de limón tuvieron en promedio una reducción específica de 1.6 veces superior con respecto a los de maíz, diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis considerando un α de 0.01.

7.3.2.1. Clasificación de aislados, incubados en caldo nutritivo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción

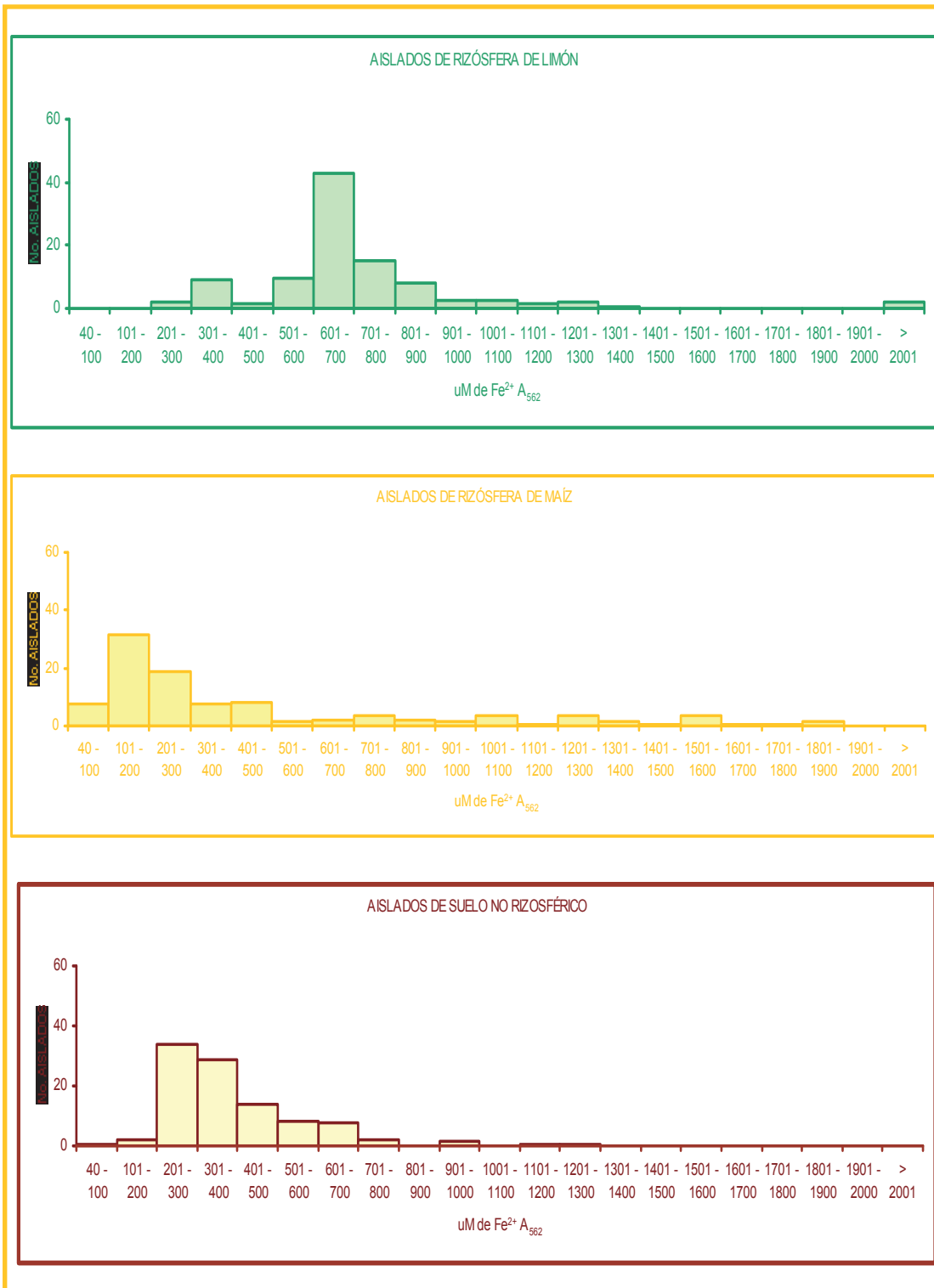


Figura 10. Perfiles de capacidad de reducción de aislados bacterianos, crecidos en caldo nutritivo, obtenidos de tres ambientes diferentes. En los tres paneles el eje de las “Y” hace referencia al número de aislados (frecuencias acumuladas) que presentaron determinada capacidad de reducción (μM de Fe^{2+}) expresada en el eje de las “X”.

Tabla 3. Actividad específica de reducción de aislados bacterianos incubados en caldo nutritivo + NTA-Fe³⁺, medida al momento de adicionar la ferrozina.

Origen de los aislados	No. de aislados	Media de actividad específica de reducción [†] μM Fe ²⁺ A ₅₆₂ día ⁻¹
LIMÓN	145	725 [±] 432 ^A
MAÍZ	145	460 [±] 455 ^B
SUELO	145	390 [±] 180 ^B

[†] Medias marcadas con letras distintas indican diferencia significativa a un α de 0.01 según la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis.

Los criterios y controles para categorizar la capacidad de reducción de los aislados obtenidos en los tres tratamientos fueron los utilizados en el experimento anterior, las cepas G9 con actividad de reducción de 342 μM Fe²⁺ A₅₆₂ como control negativo y G2 con actividad de reducción de 1,030 μM Fe²⁺ A₅₆₂ como control positivo (Valencia-Cantero 2003).

En cada uno de los tratamientos y el control se clasificaron como reductores basales los aislados con una capacidad de reducción de 40 a 700, como reductores los aislados con capacidad de reducción de 701 a 2000 y como altos reductores los aislados con capacidad de reducción mayor de 2001 μM Fe²⁺ A₅₆₂ (fig. 11).

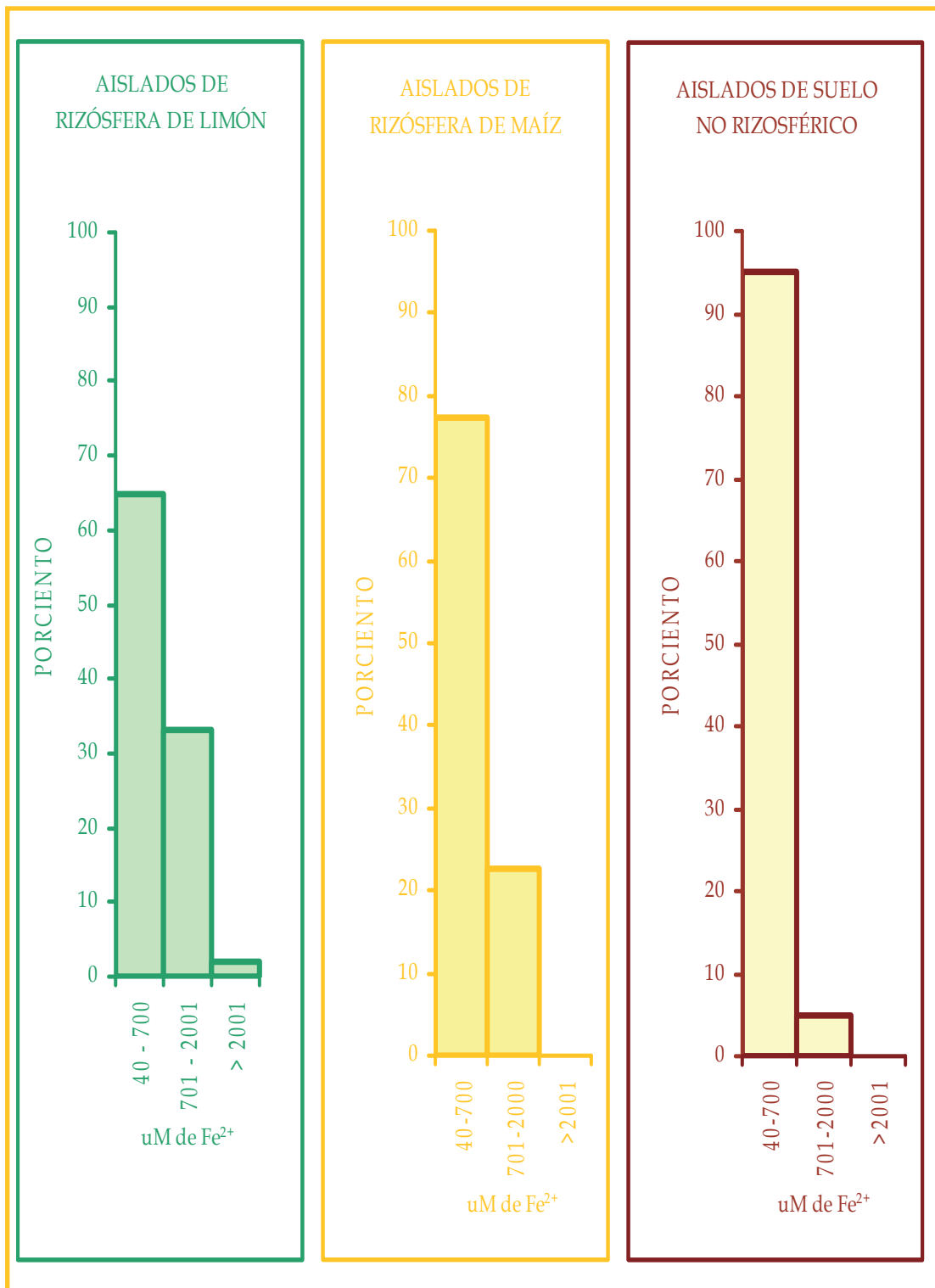


Figura 11. Categorización de aislados bacterianos crecidos en caldo nutritivo, de acuerdo a su capacidad específica de reducción, obtenidos de tres ambientes diferentes. Reductores basales de 40 a 700, reductores de 701 a 2000 y altos reductores > 2001 $\mu\text{M Fe}^{2+}$. La reducción se midió al momento de adicionar la ferrozina.

Al igual que en el ensayo descrito en el apartado 7.3.1. las diferencias entre las frecuencias con que sucedieron las distintas categorías de aislados fueron analizadas mediante una prueba de independencia de X^2 (tabla 4), encontrándose que dichas frecuencias están estadísticamente relacionadas con el ambiente de origen de los aislados, considerando un α de 0.01.

Tabla 4. Comparación de las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas en los aislados bacterianos, crecidos en caldo nutritivo de acuerdo a su capacidad específica de reducción en el caldo nutritivo + NTA-Fe³⁺

Origen de los aislados	Reductores		Altos
	basales 40 a 700 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ A ₅₆₂	Reductores 701 a 2000 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ A ₅₆₂	reductores > 2001 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ A ₅₆₂
LIMÓN	94 ^{A†} 114 ‡	48 ^A 29	3 ^A 1
MAÍZ	112 ^B 114	33 ^B 29	0 ^A 1
SUELO	138 ^B 114	7 ^B 29	0 ^B 1

† Frecuencia de aislados observada en cada una de los intervalos de reducción. Las frecuencias para un mismo intervalo marcadas con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

‡ Los valores escritos en cursivas representan las frecuencias esperadas para cada intervalo si dicha frecuencia fuera independiente del origen de la muestra.

Nuevamente en este ensayo, en los tres ambientes de origen predominaron los aislados clasificados como reductores basales, el 27% provenían del

tratamiento limón, el 32% de rizósfera de maíz y 40% del control. El 54% de los reductores fueron obtenidos de rizósfera de limón, el 37% de rizósfera de maíz y el resto (8%) del control, altos reductores en este segundo ensayo sólo se obtuvieron de aislados de rizósfera de limón.

En este segundo ensayo las diferencias en la capacidades medias de ferrirreducción de los aislados bacterianos de las rizosferas de limón y maíz (tabla 3), también se debieron a los aislados clasificados como reductores y, a diferencia del ensayo anterior, a la presencia de altos reductores sólo obtenidos de rizósfera de limón, además de una mayor proporción de reductores basales obtenidos de rizósfera de maíz y del control.

Nuevamente la elevada proporción de reductores basales incidió de forma negativa sobre el valor de la media de reducción del tratamiento maíz y del control, haciendo que el valor de la misma fuera estadísticamente inferior a la de los aislados provenientes de limón.

Los resultados obtenidos con este experimento confirmaron que la cuantificación de actividad de reducción del experimento anterior era de origen biológico. La mayor actividad específica de reducción observada en este experimento probablemente se debió a la mayor concentración de nutrientes en el medio de cultivo y que, pese a la diferencia en los tamaños de la población entre los dos experimentos y, a las diferencias en las condiciones experimentales, en ambos casos el patrón de comportamiento observado fue que los aislados obtenidos fueron capaces de reducir hierro, que esa capacidad varió inter e intra-tratamiento y que en los aislados

obtenidos de la rizósfera de limón se observó el perfil de mayor capacidad de reducción desasimilatoria de hierro.

A partir de estos resultados, de los aislados de este segundo experimento se seleccionaron en forma aleatoria 25 aislados por tratamiento para realizarles el análisis por restricción de ADNr amplificado (ARDRA).

7.4. Análisis de restricción de ADNr amplificado (ARDRA)

Este análisis se realizó por digestión del gen de ARNr 16S amplificado con la enzima *Hha* I (Chéneby *et al.* 1998, Rogel *et al.* 2002, Blackwod *et al.* 2002, Philippot *et al.* 2002).

Al número y tamaño de las bandas obtenidas para cada producto de amplificación se le denominó patrón de digestión. Con el patrón de digestión de todos los productos amplificados se construyó una matriz de datos en la cual, la presencia de una banda de tamaño específico se indicó con el dígito 1 y la ausencia de la banda con un cero. Posteriormente esa información se analizó utilizando el programa MSVP3, para construir el dendrograma de la figura 12.

Se uso el método de mínima varianza dada la información que se ingresó en la matriz de datos. Este tipo de análisis permite clasificar variables en grupos, los objetos comprendidos dentro de cada grupo son lo más homogéneos entre si y entre los distintos

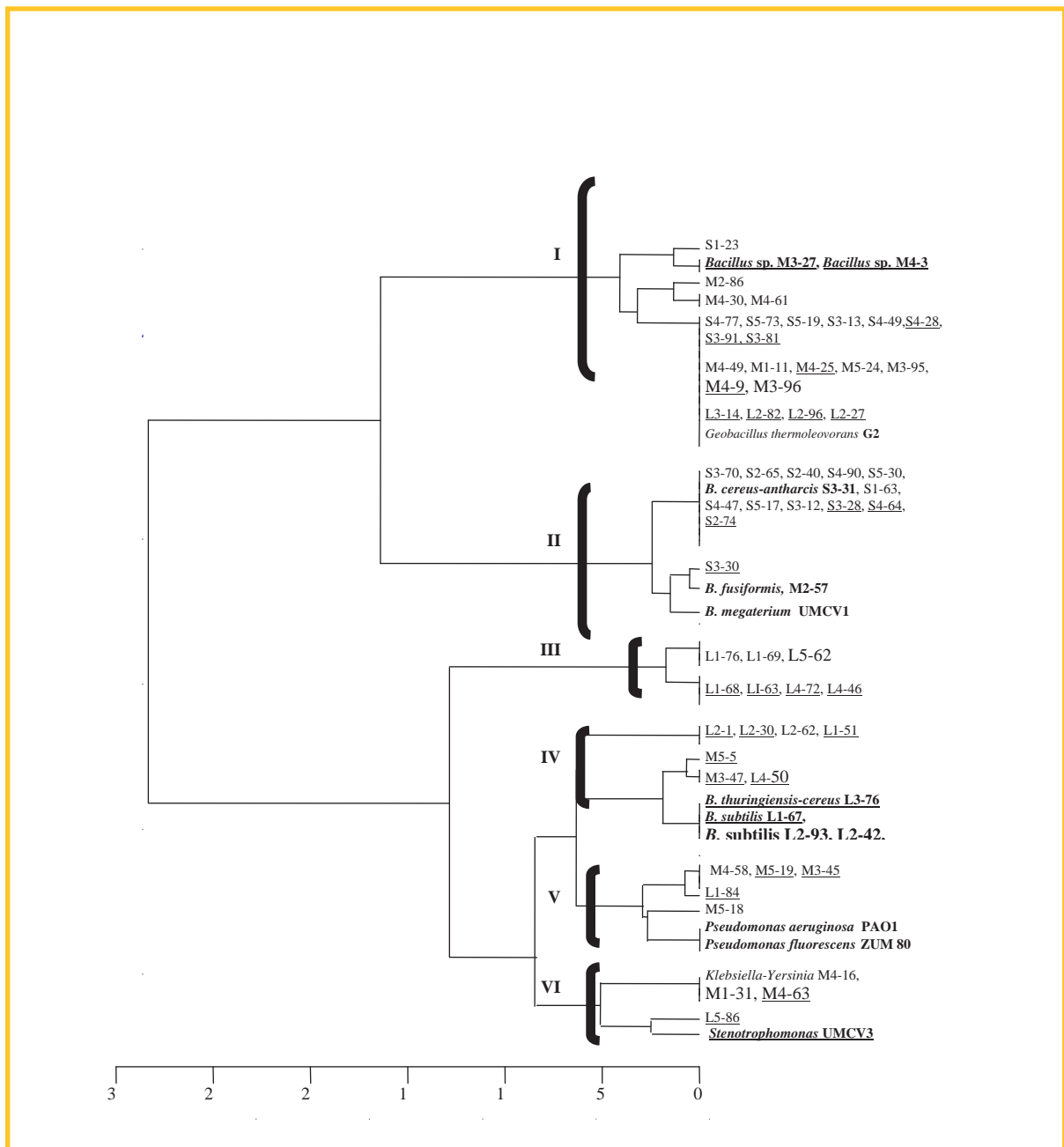


Figura 12. Dendrograma de diversidad obtenido por el método de mínima varianza, a partir del ARDRA. Los aislados obtenidos de rizósfera de limón son nombrados con una “L” seguida de su clave numérica de identificación. Los aislados obtenidos de la rizósfera de maíz son nombrados con una “M” seguida de su clave numérica de identificación, y los aislados provenientes de suelo no rizosférico son nombrados con una “S” seguida de su clave numérica de identificación. Los aislados subrayados fueron clasificados como reductores. En negritas se marcan las especies de bacterias cuya identidad se conoce por secuenciación parcial del gene que codifica para el ARNr 16S. En números romanos se indican agrupamientos de acuerdo a las semejanzas de los patrones de restricción.

grupos se presenta la mayor heterogeneidad posible. En el dendrograma la longitud de las ramas representa la distancia entre los distintos nodos del mismo.

Algunos de los aislados que se sometieron al ARDRA, se utilizaron para determinar la secuencia parcial del gen ARNr 16S y sus secuencias fueron confrontadas con la información de las bases de datos con la finalidad de identificarlos, los cuales en el dendrograma se indican con el nombre genérico de acuerdo a la secuencia más parecida obtenida del análisis Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

La identificación de los aislados que se observa en el dendrograma de la figura 12, muestra que el género predominante en los tres ambientes fue *Bacillus*, de entre los cuales 87% fueron Gram positivos y 13% Gram negativos. También se observa una tendencia a agrupar en el mismo nodo aislados obtenidos de un mismo ambiente, para su interpretación se decidió relacionarlos en 6 grupos que se marcan en el dendrograma, del I al IV se agregaron bacterias Gram positivas, y en los grupos V y VI bacterias Gram negativas.

7.5. Análisis de la diversidad encontrada

Los datos de las digestiones enzimáticas fueron utilizados para evaluar la diversidad alfa con el índice Shannon-Weaver (tabla 5), en el que valores cercanos a cero indican una baja diversidad y valores cercanos a 4 una alta diversidad.

Para evaluar la diversidad beta se utilizó el Coeficiente de Similitud de Jaccard, (tabla 5) en el que el intervalo va de 0, cuando no hay especies compartidas entre dos sitios, a 1 cuando ambos sitios comparten las mismas especies.

El resultado del análisis indica que la diversidad alfa fue mayor en las rizósferas de limón y maíz con respecto al control, en cuanto a la cantidad de especies compartidas entre los tratamientos es baja entre limón y maíz sólo se comparten un 6% de las especies, limón y suelo 8% y suelo y maíz un 16%. Estos resultados apoyan la idea de que las especies vegetales seleccionan sus poblaciones de bacterias con capacidad para reducir hierro.

Tabla 5. Diversidad alfa y beta encontrada en las diferentes comunidades de estudio

DIVERSIDAD ALFA

TRATAMIENTOS

INDICE SHANNON	LIMÓN	MAÍZ	SUELO
	2.7	2.3	1.8

DIVERSIDAD BETA

TRATAMIENTOS

COEFICIENTE JACCARDAD	LIMÓN-SUELO	LIMÓN-MAÍZ	MAÍZ-SUELO
	0.08	0.06	0.16

8. DISCUSIÓN

El más común de los desórdenes nutricionales causados por micronutrientes que actúa como limitante para el desarrollo vegetal y la producción agrícola, principalmente en suelos calcáreos o neutros, es la clorosis férrica. En México se estima que entre el 50 y 60% de los suelos tienen características que favorecen la manifestación de la clorosis férrica (Lee Rodríguez *et al.* 1988)

Algunos de los métodos empleados para combatir la insuficiencia por hierro, como el uso de quelatos sintéticos, tienen que ser aplicados de manera periódica pues no solucionan el problema de manera permanente, situación que los convierte en poco redituables en términos económicos. Sin embargo, la posibilidad de que las bacterias rizosféricas puedan solubilizar el Fe^{3+} presente en el suelo y contribuir a su disponibilidad para la planta ha sido poco estudiada (Valencia Cantero *et al.* 2007).

Por otro lado, es un hecho que la diversidad fisiológica bacteriana rizosférica incluye la capacidad de muchas bacterias de reducir el hierro en forma desasimilatoria; sin embargo, no existen reportes de estudios sobre la diversidad de este tipo de bacterias asociadas a especies vegetales de importancia agrícola, como son el maíz y el limón. Como consecuencia no existen estudios que asocien esta diversidad fisiológica a las estrategias de obtención de Fe de la planta o que propongan el uso de esta diversidad

fisiológica como herramienta biotecnológica para combatir el problema de la clorosis férrica.

En este trabajo se cuantificó la actividad de reducción bacteriana de dos especies vegetales de importancia agrícola, asimismo, se hizo un primer estudio exploratorio sobre la diversidad de dichas bacterias. En general los resultados de este trabajo muestran que las rizobacterias asociadas a plantas con diferentes estrategias adaptativas para movilizar el hierro, albergan poblaciones bacterianas cuyas capacidades ferrirreductoras responden a dichas estrategias vegetales, es decir, las plantas de limón (Estrategia I) tienden a favorecer el crecimiento de una flora bacteriana con una capacidad reductora mayor que la capacidad de reducción de la flora bacteriana de una planta Estrategia II como el maíz.

El efecto rizosférico encontrado en este trabajo concuerda con reportes previos (Graystone *et al.* 1998 Bowen y Rovira 1999); ese efecto se atribuye al hecho de que la rizósfera es un ambiente dinámico que varía como resultado del tipo de suelo, las prácticas de cultivo, de la especie vegetal, su estado fisiológico de maduración (Campbell *et al.* 1997, Griffiths *et al.* 1999) y, de manera preponderante la excreción de hasta un 40% de los fotosintatos liberados por las plantas (Cambel y Graves 1990), los cuales facilitan la solubilización de nutrientes como hierro y fósforo (Römhheld 1987, López-Bucio *et al.* 2003), y modifican la composición de la flora bacteriana (Kourtev *et al.* 2003).

Generalmente el cociente rizósfera/suelo (R/S) varía entre 5 y 20; sin embargo, es frecuente encontrar cocientes con valores de hasta 100 (Atlas y

Bartha 1998), por lo que los valores de dicha la relación R/S encontrados en este trabajo (44 y 57 limón y maíz respectivamente) concuerdan con lo reportado en la literatura (Graystone *et al.* 1998 Bowen y Rovira 1999).

Otro factor que se ha reportado que influye sobre la estructura de la comunidad rizosférica es la competencia por hierro (Raaujinadkers *et al.* 1995) y, se ha demostrado que la destrucción de la flora microbiana ocasiona severos desajustes en nutrición por hierro, tanto en especies Estratega I como Estratega II (Masalha *et al.* 2000). Esto sugiere que las especies vegetales tienen capacidades diferentes para estimular la colonización de poblaciones de bacterias que les sean benéficas, situación que probablemente se presenta entre plantas Estratega I. Estas tienen que activas varios mecanismos que a valores de pH neutros o alcalinos implican un mayor gasto energético para solubilizar y tomar el hierro presente en el suelo, a diferencia de las plantas Estratega II, cuyo mecanismo adaptativo para tomar el hierro es menos susceptible de ser inhibido en condiciones alcalinas.

En la actualidad, se ha acumulado evidencia que demuestra que la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} por la férrico-quelato reductasa (FR-Q) es el paso limitante en la tasa de captación del hierro (Moog y Bruggemann 1994, Grusak 2000, 1990, Conolly *et al.* 2003), dado que este forma parte de la Estrategia I para toma de Fe y que se inhibe a pH alcalino. En este estudio se consideró que la colonización de bacterias que reducen Fe^{3+} en forma desasimilatoria podría significar una ventaja ecológica para cítricos como el limón.

El procedimiento utilizado en este trabajo para inducir el crecimiento bacteriano buscó mimetizar el ambiente del cual fueron obtenidos los aislados: el suelo que generalmente es un ambiente oligotrófico (Aagot *et al.*, 2001). Las bajas concentraciones de nutrientes favorecieron el crecimiento de bacterias de ese tipo capaces de crecer en medios de cultivo bajos en nutrientes (Kurnetsov *et al.* 1983).

El lento crecimiento bacteriano, observado por medio de la cinética que se realizó, podría ser la respuesta al medio de cultivo usado; situación que marcó las diferencias detectadas en la capacidad de reducción férrica entre los dos ensayos realizados. Cuando ésta se evaluó a las 24 h, los aislados se había cultivado en medio líquido extracto de suelo, mientras que el sustrato de crecimiento para el segundo ensayo fue caldo nutritivo, medio rico en nutrientes, lo que probablemente incrementó su capacidad fisiológica de reducción. Un aspecto adicional a considerar es la posible reoxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , dado que ambos experimentos se hicieron en presencia de oxígeno. En el primer experimento, el tiempo de incubación fue de 10 días, permitiendo un mayor periodo de exposición de Fe^{3+} al oxígeno y su posible oxidación, mientras que en el segundo experimento fue de solo un día con el consecuente menor tiempo de exposición al oxígeno.

A pesar de las diferencias encontradas en cuanto a la capacidad de reducción férrica entre los dos ensayos, es claro que en ambos hubo reducción, que se observó una tendencia de comportamiento semejante entre los tratamientos y el control bajo ambas condiciones experimentales; situación que está de acuerdo con la hipótesis de que las plantas de limón

(Estrategas I) estimulan un mayor crecimiento de las poblaciones bacterianas rizosféricas ferrirreductoras, mientras que las plantas de maíz (Estrategas II) lo hacen en menor medida. Aunado a lo anterior, se sabe que la rizósfera es un ambiente dinámico en el que muchos factores participan en la composición de la comunidad microbiana (Sato y Jiang 1996, Campbell *et al.* 1997, Griffiths *et al.* 1999), uno de esos factores puede ser la competencia por hierro, elemento esencial para microorganismos y vegetales, como lo demuestra el trabajo realizado por Yang y Crowley (2000), quienes reportaron que el estado nutricional por hierro explicaba hasta un 40% de la variación en la estructura de la comunidad microbiana asociada a raíces de cebada. Por otra parte, Masalha *et al.* (2000) al trabajar con plantas de girasol y maíz, demostraron que los microorganismos desempeñan un papel central en la obtención de hierro, sugiriendo que mantienen un suministro de Fe continuo y suficiente para satisfacer las necesidades del vegetal y propusieron que en el caso de plantas con Estratega I, los sideróforos bacterianos solubilizan Fe^{3+} y lo transportan hasta la raíz donde es reducido y asimilado por la planta.

En ese mismo sentido, Valencia Cantero *et al.* (2007), mostraron que plantas de frijol (Estrategia I) crecidas en suelo alcalino e inoculadas con rizobacterias ferrirreductoras tienen un mayor crecimiento y un contenido de Fe en los tejidos que plantas no inoculadas. Así mismo, Jin *et al.* (2006), mostraron que plantas de trébol (Estrategia I) crecidas en suelo alcalino ejercen un efecto de selección en las poblaciones de rizobacterias a través de la exudación radicular de compuestos fenólicos, el 86% de las poblaciones seleccionadas por este mecanismo producen sideróforos y el

71% producen auxinas. En ausencia de su microbiota bacteriana las plantas de trébol tienen un crecimiento sensiblemente menor, a menos que se les fertilice con Fe de forma foliar.

Las diferencias encontradas con respecto a la capacidad de reducción férrica entre bacterias aisladas de la rizósfera y las del suelo no rizosférico, coinciden con lo reportado por Weiss *et al.* (2003), quienes encontraron que mayores cantidades de Fe^{3+} pobremente cristalizado y posiblemente la presencia de sustancias húmicas, aunado a un mayor potencial de reducción de Fe^{3+} de la rizósfera, comparada con el suelo alejado de las raíces, sugieren que la rizósfera es un sitio de una alta actividad microbiana que cicla el hierro, lo cual también se asocia al hecho de que la presencia de vegetación favorece su ciclamiento a través de la producción de carbono disponible y ligandos orgánicos (Gribsholt y Kristenser 2002).

En este trabajo también fueron aisladas e identificadas algunas bacterias provenientes de cada uno de los tratamientos y del control. Los resultados obtenidos de los análisis de diversidad muestran una predominancia de bacterias Gram positivas, situación remarcable dado que existe una gran cantidad de reportes relacionados con diversidad bacteriana rizosférica en los que se menciona preponderancia de bacterias Gram negativas como habitantes de estos nichos ecológicos. Picard *et al.* (2000) reportaron que el 89.8% de los aislados que ellos identificaron usando el método ARDRA al analizar la composición bacteriana de rizósfera de maíz lo componían bacillos Gram negativos del género *Pseudomonas*. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Barbena *et al.* (2003), quienes realizaron un

estudio sobre diversidad bacteriana en suelos bajo diferentes tipos de prácticas agrícolas, a través de electroforesis desnaturalizante en gel, y encontraron una predominancia del 95% de bacterias Gram positivas. Otros estudios basados en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos realizados en suelos con alto contenido de arcilla como el de este estudio, pero cultivados con arroz y por tanto anegados, también señalan una predominancia de bacterias Gram positivas (Kimura y Asakawa, 2006, Okabe *et al.* 2000).

Una limitación conocida para el método ARDRA es la posibilidad de duplicación de patrones de bandeo aun cuando estos deriven de aislados bacterianos diferentes, digeridos en sitios distintos pero de las mismas longitudes. Esta limitación puede restar definición a nuestros resultados e introducir errores, que en este trabajo no pudieron ser cuantificados. Sin embargo, como se observa en la figura 12, bacterias previamente identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 produjeron un patrón de bandeo idéntico y se agruparon juntas, del mismo modo, los aislados L1-67, L2-93 y L2-42 que fueron identificados como *B. subtilis* por el análisis de secuencias de fragmentos de sus ADNr de 16S, también se agruparon juntos.

Los resultados de los análisis de diversidad señalan que la diversidad alfa fue mayor en rizósferas de limón y maíz con respecto al control. En cuanto a la cantidad de especies compartidas entre los tratamientos, esta fue baja entre limón y maíz ya que sólo comparten un 6% de las especies, limón y suelo 8% y, suelo y maíz un 16%.

Estos resultados apoyan la idea de que en efecto las especies vegetales seleccionan sus poblaciones de bacterias con capacidad para reducir hierro.

9. CONCLUSIÓN

Los aislados provenientes de rizósfera de limón tuvieron en promedio una actividad reductora mayor que los aislados de rizósfera de maíz. También se observó una mayor proporción de reductores y altos reductores entre los aislados provenientes de rizósfera de limón que entre los de rizósfera de maíz. El perfil de ferrirreducción de los aislados de suelo no rizosférico y el de aislados de rizósfera de maíz fue similar.

Los agrupamientos bacterianos obtenidos a partir del ARDRA permitieron establecer claramente que la diversidad alfa encontrada en las rizósferas de limón y maíz fue superior a la encontrada en el suelo no rizosférico además de que las comunidades bacterianas de los tratamientos fueron diferentes.

Es decir que la hipótesis bajo la cual se estableció este trabajo de investigación en el sentido de que las poblaciones bacterianas que habitan una planta Estrategia I favorecen el establecimiento de una flora bacteriana con mayor actividad reductora de hierro con respecto a una planta Estratega II, además de que son colonizadas por especies diferentes, fue demostrada.

10. LITERATURA CITADA

1. **Aagot N, Nybroe O, Nielsen P, Johsen K** (2001) An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. *Appl Environ Microbiol* 11: 5233-5239.
2. **Alexander M** (1994) Introducción a la microbiología del suelo. 2ª reimpresión. AGT. Editor, S.A. México pp: 27-404.
3. **Amparano C F** (1973) Evaluación del comportamiento y la susceptibilidad de la clorosis férrica de 14 variedades de soya en suelos calcáreos bajo condiciones de invernadero. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
4. **Ams D A, Maurice P A, Hersma L E, Forsythe J H** (2002) Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolite. *Chem Geol* 188: 161-170.
5. **Atlas R M, Bartha R** (1998) Microbial Ecology. Fundamentals and applications. Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. USA. pp. 100-105.
6. **Baudoin E, Benizri E, Guckert A** (2002) Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Appl Soil Ecol* 19: 135-145.

7. **Bauer P, Berezky Z** (2003) Gene networks involved in iron acquisition strategies in plants. *Agron* 23: 447-454.
8. **Blackwood Ch B, Marsh T, Kim S-H, Paul E A** (2002) Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2: 926-932.
9. **Boukhalfa H, Crumbliss A L** (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* 15: 325-339.
10. **Bowen G D, Rovira A D** (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv Agron* 66: 1-102.
11. **Bowen G D, Rovira A D** (1991) En: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. Eds. *Plant Roots: The hidden half*. Marcel Dekker New York pp: 642-649.
12. **Brock T D, Madigan M T, Parker J** (1999) *Biology of microorganisms*. Prentice Hall. USA pp: 718-720.
13. **Bugio N, Yamaguchi H, Nishizawa K, Nakanishi H, Mori S** (2002) Cloning an iron-regulated metal transporter form rice. *J Exp Bot* 53: 1677-1682.
14. **Bull A T, Ward A C, Goodfellow M** (2000) Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microb Mol Ecol Rev* 3: 573-606.
15. **Cambel R, Graves M** 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. pp:11-34. En: *The Rhizosphere*. (Lynch J. Ed). Wiley Interscience Publication. England.

15. **Campbell C D, Grayston S J, Hirst D J** (1997) Use of rhizosphere carbon source in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *J Microbiol Methods* 38: 33-41.
16. **Centro de estudios de finanzas públicas** Cámara de Diputados. Congreso de la Unión 054/2004. www.cefp.org.mx.
17. **Connolly E L, Campbell N H, Grotts N, Prichard C L, Guerinot M L** (2003) Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol* 133: 1102-1110.
18. **Cornwell J C** (1988) Iron and manganese reduction in lacustrine sediments. *EDS. Transac Geophys Union* 69: 1106.
19. **Cortinas E H M, Miller Jr J C** (1999) Avances en el estudio de la herencia de la clorosis férrica en el frijol común. *Agrociencia* 33: 47-50.
20. **Curie C, Alonso J M, Le Jean M, Ecker J R, Briat J F** (2000) Involvement of Nramp1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J* 347: 749-755.
21. **Curl E A, Truelove B**, Eds. (1986) *The Rhizosphere*: Springer, New York, 288 pp.
22. **Chaney R L, Brown J C, Tiffin L O** (1972) Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol* 50: 208-213.
23. **Chapelle F H** (2001) *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*. John Wiley & Sons Inc USA pp: 99-100, 272-273.
24. **Chen Y, Barak P** (1982) Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Adv Agron* 35: 217-240.

- 25. Chéneby D, Hartmann A, Hénsult C, Topp E, Germon J C (1998)** Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N₂O in two soils. *Biol Fertil Soils* 28: 19-26.
- 26. Dell'Orto M, Santi S, De Nisi P, Cesco S, Varanini Z, Zocchi G, Pinto R (2000)** Development of Fe deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L) roots: involvement of plasma membrane H⁺-ATPase activity. *J Exp Bot* 51: 695-701.
- 27. De Kock P C (1971)** Excess phosphorus and iron chlorosis. *Calif Agr* 7: 303-812.
- 28. Dinkelacker B, Römheld V, Marschner H (1989)** Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin. *Plant Cell Environ* 12: 285-292.
- 29. Doebley J F (1990)** Molecular systematics of Zea (Gramineae) *Maydica* 35: 143-150.
- 30. Eide D, Davis-Kaplan S, Jordan I, Sipe D, Kaplan J (1992)** Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem* 267: 20774-20781.
- 31. Eide D, Brodenus M, Fett K, Guerinot M L (1996)** A novel iron regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93: 5624-5628.
- 32. Fun T W-M, Lane A N, Pedler J, Crowley D, Higashi R M (1997)** Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 251: 57-68.
- 33. FAOSTAT (2004)** Statics database (<http://www.fao.org/statistics>).

- 34. Gaston K J** (1996) Species richness: measure and measurement. In: Biodiversity. A Biology of Number and Difference. K. J. Gaston (Ed.) Blackwell Science, Cambridge, pp: 77-113.
- 35. Graham R D, Stangoulis C R** (2003) Trace elements uptake and distribution in plants. *J Nutr* 133:1502-1505.
- 36. Grayston S J, Campbell C D** (1996) Functional biodiversity of microbial communities in the rhizosphere of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiol* 16: 1031-1038.
- 37. Grayston S J, Wang S, Campbell C D, Edwards A C** (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 30: 369-378.
- 38. Gribsholt B, Kristensen E** (2002) Impact of sampling methods on sulfate reduction rates and dissolved organic carbon (DOC) concentrations in salt marsh sediment. *Wetlands Ecol Manag* 10: 371:379.
- 39. Griffiths B S, Ritz K, Ebbelwhite N, Dobson G** (1999) Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem* 31: 145-153.
- 40. 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* 32: 1-6.
- 41. Guerinot M L** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Bioch Biophys Acta* 1465: 190-198.
- 42. Guerinot M L, Yi Y** (1994) Iron: nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiol* 104: 815-820.

- 43. Gunning B E S, Pate J S** (1969) "Transfer cells" plant cell with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes: their occurrence, structure and development. *Protoplasma* 68: 107-133.
- 44. Jin X C, Wang S R, Zhao H C, Bu Q Y, Chu J Z, Cui A, Zhou X N, Wu F C** (2006) Lake sediments alkaline phosphatase effect of lake sediments of different trophic states on alkaline phosphate activity. *Lake Reservoir Management* 11: 169-176.
- 45. Halffter G.** (1998) A strategy for measuring landscape biodiversity. *BioScience* 16: 3-17.
- 46. Hell R, Stephan U W** (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216: 541-551.
- 47. Hunter Jr M L, Sulzer.** (1996) Genetic diversity. In: *Fundamentals of conservation biology*. M. L. Hunter Jr. y A. Sulzer (Eds). Blackwell Science, Cambridge, MA. pp: 79-103.
- 48. Karlin K D** (1993) Metalloenzymes, structural motifs and inorganic models, *Science* 261: 701-708.
- 49. Kimura M, Asakawa S** (2006) Comparison of community structures of microbiota at main habitats in rice fields ecosystems based on phospholipids fatty acid analysis. *Biofertilization* 43: 20-29.
- 50. Korshunova Y O, Eide D, Clark W G, Guerinot M L, Pakrasi H B** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* 40: 37-44
- 50. Kosegarten H U, Bernd Hoffmann, Mengel K** (1999) Apoplastic pH and Fe³⁺ reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiology* 121: 1069-1079.

- 51. Kourtev P S, Ehrenfeld JG, Haggblom M** (2003) Experimental analysis of the effect of exotic and native plant species on the structure and function of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 35: 895-905.
- 51. Kraemer S M** (2003) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci* 66: 3-18.
- 52. Krauskopf K B** (1983) Geoquímica de los micronutrientes. En: *Micronutrientes en agricultura*. Mortvedt J J, Giordano P M, Lindsay W L. Comps. AGT Ed Méx pp: 7-43.
- 53. Kurnetsov S I, Doping G A, Lapteva N A** (1983) Inicial phase of starvation and activity of bacteria at surfaces. *Appl Environ Microbiol* 46: 978-984.
- 54. Lee R V, Beltrán F M J, Lerma M J N, Licón T L P** (1998) Aplicación de ácido sulfúrico en el riego corrige la clorosis férrica de los cultivos en suelos calcáreos. *Terra* 16: 149-161.
- 55. Lindsay W L, Schwab A P** (1982) The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J Plant Nutrition* 5: 821-840
- 56. Lobo J M** (2001) En: *Métodos para medir la biodiversidad M&T-Manuales y Tesis Sea*, vol. 1. Zaragoza, pp. 84.
- 57. López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6: 280–287.
- 58. Lovley D R** (1995) Microbial reduction of Iron, manganese and other metals . *Adv Agron* 54: 175-231.

- 59. Lovley D R** (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev* 2: 259-287.
- 60. Luca P, Hurrell R, Ptrykus I.** (2001) Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor Appl Genet* 102: 392-397.
- 61. Luigi Ch, Tabacchioni S, Bevivino A** (1993) Interactions between rhizosphere microorganisms under iron limitation. *Arch Microbiol* 160: 68-73.
- 62. Magurran A E** (1988) Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press. New Jersey pp. 179.
- 63. Maldonado T R, Etchevers B J D, Alcántara G G, Rodríguez A J, Colinas L M T** (2001) Estado nutrimental del limón mexicano en suelos calcimórficos. *Terra* 19: 163-174.
- 64. Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Ö, Mengel K** (2000) The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soil* 30: 433-439.
- 65. Masucci J D, Schiefelbein J W** (1996) Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 8: 1503-1517.
- 66. Marschner H** (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants 2nd ed. Academic Press, London.
- 67. Martínez M** (1997) Sistemática molecular: comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Bol Soc Bot Méx* 60: 123-126.
- 68. Mendelssohn I A, Kleiss B A, Wakeley J S** (1995) Factors controlling the formation of oxidized root channels – a review. *Wetlands* 15: 37-46.

- 69. Mengel K, Dirkby E A** (1987) Principles of Plant Nutrition. 4th Ed International Potash Institute Worbaufen-Bern Switzerland.
- 70. Moog P R, Bruggemann W** (1994) Iron reductase systems on the plant membrane: a review. *Plant Soil* 165: 241-260.
- 71. Moreno C E, Ghalffter G** (2000) Assessing the completeness of bat biodiversity inventories using species accumulation curves. *Journal Appl Ecol.* 37: 149-158.
- 72. Moreno C E** (2001) Métodos para medir la biodiversidad M&T-Manuales y Tesis Sea, vol. 1. Zaragoza, pp. 84.
- 73. Mori S** (1999) Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol* 2: 250-253.
- 74. Murashige T Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
- 75. Nielsen J L Juretschko S, Wagner M, Nielsen P H** (2001) Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography. *Appl Environ Microbiol* 68: 4629–4636.
- 76. Okabe A, Oike H, Toyota K, Kimura M** (2000) Comparison of phospholipid fatty acid composition in floodwater and plow layer soil during the rice cultivation period in a japanese paddy field. *Soil Sci. Plant Nutr* 46: 893-904.
- 77. Olsen R A Bakken L R** (1987) Viability of soil bacteria: optimization of plate counts within diferent size groups. *Microbial Ecol* 13: 75-87
- 78. Pérez S, Suárez M, Torralba A, Varela de S M V** (1998) Aplicación de métodos moleculares en taxonomía y filogenia (<http://scriptsnaturae.com>)

- 77. Pestana M, De Varennes A, Abadía J, De Araújo F E** (2003) Evaluación de la tolerancia a la clorosis férrica de portainjertos de cítricos en solución nutritiva. *Todo CITRUS* 22: 5-9
- 78. Philippot L, Piutti S, Martín-Laurent F, Hallet S, Germon J C** (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl Environ. Microbiol.* 12: 6121-6128.
- Picard C, Di Cello f, Ventura M, Fani R, Guckert A** (2000) Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl Environ Microbiol* 66: 948-955.
- 79. Pospiech A, Neumann B** (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet* 11: 217-218.
- 79. Powell P E, Cline G R, Reid C P P, Szaniszlo P J** (1980) Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelator in soils. *Nature* 287: 833-834.
- 80. Prosser J I** (2002) Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil* 244: 9-17.
- 81. Raaijndekers J M, Van Der Sluis I, Koster M, Baker P A H M, Weisbeek P J, Schippers B** (1995) Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Can J Microbiol* 41: 126-135.
- 82. Richardson D J** (2000) Bacterial respiration: a flexible process for changing environment. *Microbiology* 146: 551-571.
- 83. Roberts J L** (1947) Reduction of ferric hydroxide by strains of *Bacillus polymyxa*. *Soil Sci* 63: 135-140.

- 84. Robinson N J, Procter C M, Connolly E L, Guerinot M L** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soil. *Nature* 397: 694-697.
- 85. Rogel M A, Hernández-Lucas I, Kuykendall L D, Balkwill D L, Martínez-Romero E** (2002) Nitrogen-fixing nodules with ensifer adherens harboring *Rhizobium tropici* *Appl Environ Microbiol* 7: 3264-3268.
- 86. Rogers E E, Eide D J, Guerinot J L** (2000) Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91: 12356-12360.
- 87. Römheld V** (1991) The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: an ecological approach. *Plant Soil* 130: 127-134
- 88. Römheld V** (1987) Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol Plantarum* 70: 231-234.
- 89. Römheld V** (1987) Existence of two different strategies for the acquisition of iron in higher plants. In G Winkelmann, D van de Helm, JB Neilands, eds, *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals* VCH. Weinheim, Germany, pp 353-374.
- 90. SAGARPA** (2006) http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeagr.
- 91. Sato K, Jiang J Y** (1996) Gram-negative bacterial flora on the root surface of wheat grown under different soil conditions. *Biol Fertil Soil* 23: 273-281.
- 92. Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu B E, Mori S, Kitahara T, von Wirén N** (2004) ZmYSI functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem* 279: 9091-9096.

- 93. Schilling G, Gransee A, Deubel A, Lezovic G, Ruppel S (1998)** Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. *Pflanzener Bodenk* 161: 465-478.
- 94. Schikora A, Schmidt W (2001)** Iron stress-induced changes in root epidermal cell fate are regulated independently from physiological responses to low iron availability. *Plant Physiol* 125: 1679-1687.
- 95. Schmidt W (2003)** Iron solutions acquisition strategies and signaling pathway in plants. *Trends Plant Sci* 188-193.
- 96. Schröder I, Johnson E, de Vries S (2003)** Microbial ferric iron reductases *FEMS Microbiol Rev* 27: 427-447.
- 97. Shannon C E (1948)** A mathematical theory of communication. *Bell Syst Technol* 27: 379-423.
- 98. Sparla F, Bagnaresi P, Scagliarini S, Trost P (1997)** NADH:Fe(III)-chelate reductase of maize roots is an active cytochrome *b*₅ reductase. *FEBS Letters* 414: 571-575.
- 99. Solbrig O T (1991)** From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity. IUBS-SCOPE-UNESCO, Cambridge UK 124 pp.
- 100. Sorensen J (1982)** Reduction of ferric iron in anaerobic, marine sediment and interaction with reduction of nitrate and sulfate. *Appl Environ Microbiol* 43: 319-324.
- 101. Stephan U W, Scholz G (1993)** Nicotianamine: a mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiol Plant* 88: 522-529.
- 102. Tagliavini M, Rombolá D A (2001)** Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Europ J Agronomy* 15: 71-92.

- 103. Tagliavini M, Abadía U, Rombolá A D, Tsipouridis C, Marangoni B** (2000) Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees. *J Plan Nutr* 23: 2007-2022.
- 104. Takagi S I** (1976) Naturally occurring iron-chelating compounds in oat-root and rice-root washings.1. Activity measurement and preliminary characterization. *Soil Sci Plant Nutr* 22: 423-433
- 105. Takahashi M, Yamaguchi H, Nakanishi H, Shiori T, Nishizawa N K, Mori S** (1999) Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (Strategy II) in graminaceous plants. *Plant Physiol* 12: 947-956.
- 106. Tanimoto M, Roberts K, Dolan L** (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8: 943-948.
- 107. Thomine S, Wrang R, Ward J M, Crawford N M, Schroeder J I** (2000) Cadmium and iron transport by member of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 97:4991-4996.
- 108. Tilman D** (2000) Causes, consequences and ethics of biodiversity. *Nature* 405:208-211.
- 109. Toulon V, Sentenae H, Thibaud J B, Soler A, Clarkson D, Grignon C** (1989) Effect of HCO_3^- concentration in the absorption solution on the energetic coupling of H^+ . *Planta* 179: 325-241
- 110. UNEP** (1992) Convention on biological diversity. United Nations Environmental Program, Environmental Law and Institutions Program Activity Centre. Nairobi.

- 111. Valencia-Cantero E, Martínez-Romero E, Peña-Cabriales J J** (2003) The corrosion effects of sulfate and ferric-reducing bacterial consortia on steel. *Geomicrobiol J* 20: 157-170.
- 112. Valencia-Cantero E, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, López-Meza J E, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J** (2007) Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil* DOI 10.1007/s11104-007-9191.
- 113. Vargas M, Kashof K, Blunt-Harts B L, Lovley D R** (1998) Microbial evidence for Fe(III) reduction on early earth. *Nature* 395: 65-67.
- 114. Velásquez-Becerra C** (2004) Contribución de las bacterias ferrirreductoras al suministro de hierro en plantas de maíz (*Zea mays*) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología. UMSNH México. 58 pp.
- 115. Vert G, Grotz N, Dedadechamp F, Gaymard F, Guerinot M L, Briat J F, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14: 1223-1233.
- 116. von Wirén N, Khodr H, Hider R C** (2000) *Plant Physiol* 124: 1149-1157.
- 117. Weisburg W, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J** (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
- 118. Weiss J V, Emerson D, Backer S M, Megonigal J P** (2003) Enumeration of Fe(II)-oxidizing and Fe(III)-reducing bacteria in the root zone

of wetland plants: Implications for a rhizosphere iron cycle. *Biogeochem* 64: 77-96

119. Whittaker R H (1972) Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21: 2-3.

120. Winkelmann G (1992) Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complex type iron binding ligands. *Mycol Rev* 96: 529-534.

121. World Health Organization (<http://www.who.int/nut/malnutrice-worldwide>)

122. Yang Ch-H, Crowley D S (2000) Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol* 1: 345-351.

123. Yehuda Z, Shenker M, Römheld V, Marschner H, Hadar Y, Chen Y (1996) The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiol* 112: 1273-1280.

124. Zaharieva T, Römheld V (2001) Specific Fe²⁺ uptake system in Strategy I plants inducible under Fe deficiency. *J. Plant Nutr* 23: 1733-1744.

11. APENDICES.

11.1. Medios de cultivo

11.1.1. Extracto de suelo sólido. (Modificado de Olsen y Bakken, 1987)

Solución de reserva:

En un vaso de precipitado de 2 litros, colocar 1000 ml de agua destilada y 300 g de suelo seco y tamizado. Mezclar utilizando una varilla de vidrio, esterilizar durante 1 hora a 120 libras de presión.

Filtrar la solución y decantar durante 24 h, posteriormente esterilizar 1 h a 120 libras de presión. Decantar la solución nuevamente y esterilizar otra hora. Mantener en refrigeración a 4°C.

Preparación del medio (1l).

Solución de reserva 100 ml, aforar a 1000 ml en agua destilada, 16 g de agar bacteriológico (Bioxon) y 0.1 g de extracto de levadura (Bioxon).

Esterilizar durante 20 min. a 120 libras de presión.

11.1.2. Extracto de suelo líquido para evaluar actividad de ferrirreducción (250 ml)

Reactivos:

NTA (ácido nitrilotriáceitoco)	2 ml
Ferrozina	12.5 ml
Medio extracto de suelo (Sol. Reserva)	235.5 ml
Extracto de levadura	0.0235 g

Se esterilizan juntos NTA y extracto de suelo, por separado se esteriliza la ferrozina.

Se colocan 950 ul de medio en el vial, se inocula, se deja incubando 5-10 días, se ponen 50 ul de ferrozina por vial.

Se colocan el contenido del vial en celdas para espectrofotómetro, se mide absorbancia a 562 nm.

11.1.3. Medio MS (Modificado de Murashige y Skoog 1962)

Soluciones de reserva:

Solución 1

CaCl₂ 25 g

Aforar a 50 ml

Tomar 1 ml/l

Solución 2

MgSO₄-7H₂O 9.25 g

KH₂PO₄ 4.25 g

Aforar a 250 ml

Tomar 10 ml/l

Solución 3

MnSO₄-H₂O 1.69 g

ZnSO₄-7H₂O 1.059 g

H₃BO₃ 0.62 g

KI 0.083 g

Na₂MoO₄-2H₂O 0.025 g

CaSO₄-5H₂O 0.0025 g

CoCl₂-6H₂O 0.0025 g

Aforar a 100 ml

Tomar 1 ml/l

Solución 4

Glicina 0.050 g

Piridoxina.Hcl 0.0125 g

Ac. Nicotínico 0.0125 g

Tiamina 0.0025 g

Mgo-Inositol 2.5 g

Aforar a 250 ml

Tomar 10 ml/l

Solución 5

NH₄NO₃ 4.1 g

KNO₃ 4.7 g

Aforar a 250 ml

Tomar 10 ml/l

Agar bacteriológico 8 g/l.Esterilizar.

11.2. Soluciones amortiguadoras

11.2.1. Ferrozina al 0.1% (g/l)

Amortiguador HEPES 50mM 11.9 g

Ajustar pH a 7. Utilizar NaOH

A 100 ml de amortiguador agregar 0.1 g de ferrozina

11.2.2. Amortiguador fosfato de sodio.

Reactivos:	(g/l)
NaCl 0.13 M	7.597
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 3M	0.411
Na ₂ HPO ₄ 7mM	0.993
Ajustar pH a 7	

11.2.3. Amortiguador SET

Reactivos	(g/l)
NaCl 75mM	2.19
EDTA 0.025mM	4.65
Tris 0.20 mM	1.21

11.2.4. Amortiguador TAE (Tris-acetato)

(Solución concentrada 10x)

Reactivos:

Tris base	48.4 g
Ácido acético glacial	11.4 ml
EDTA 0.5 M (pH 8)	20.0 ml
Agua destilada c.b.p.	1l

11.2.5. Sulfato ferroso amoniacal (400 µM)

Reactivos: (g/l)

Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O. (JT Baker) 0.1568

11.3. Determinación de actividad reductora

La actividad ferrirreductora específica de los aislados bacterianos se determinó como el cociente de la concentración del ion ferrosos del medio de cultivo inoculado e incubado con un aislado bacteriano, entre la densidad bacteriana del cultivo medida como absorbancia a 590 nm y el número de día de incubación. Actividad reductora $Fe^{3+} = Fe^{2+} A_{560} \text{ día}^{-1}$

11.4. Estadística

El contraste de Kruskal-Wallis es la alternativa no paramétrica del método ANOVA, la única exigencia versa sobre la aleatoriedad en la extracción de las muestras. La hipótesis a contrastar es:

H_0 = Las k muestras provienen de la misma población.

H_1 = Alguna proviene de una población con mediana diferente a las demás.

Esta prueba compara el rango medio alcanzado en cada subgrupo con los demás y determina si estas diferencias son suficientemente significativas como para rechazar la hipótesis nula. Con la tabla resultante se realiza una prueba de X^2 -cuadrada, si es significativo se da el test de K-W como significativo y se acepta que hay diferencias entre los grupos, se rechaza la hipótesis nula.