



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS.
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL.
LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA.

**Efecto de las estrategias vegetales para la absorción de
hierro sobre la comunidad bacteriana rizosférica y sobre su
capacidad ferriredutora.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ROSENDA AGUILAR AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. EDUARDO VALENCIA CANTERO

Morelia, Michoacán. Septiembre del 2008

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE DESARROLLÓ
EN EL LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA BAJO
LA ASESORÍA DEL D.C. EDUARDO VALENCIA CANTERO.

AGRADEZCO EL FINANCIAMIENTO OTORGADO POR SEP-CONACYT
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS, A TRAVÉS DEL PROYECTO 42899.



PARA y POR
Ana, Salvador y mis Padres.

AGRADECIMIENTOS.

Los trabajos de investigación no son el resultado del esfuerzo de un solo individuo. A veces como cimiento, o como andamio, o como apuntalamiento, existen múltiples personas que participan con sus acciones en el trabajo de otros. Y en mi caso, debo reconocer que aunque esta investigación tenga como finalidad la obtención de mi grado, siento que el grado pertenece de cierta forma a cada una de las personas que participaron conmigo en el andar de este camino.

GRACIAS,

A mi Ana por todo su amor. A mi Salvador por compartir conmigo su vida. A mis padres por su paciencia, amor y dedicación. A Aura por las risas regaladas.

Al D.C. Eduardo Valencia por su valioso trabajo de asesoría. A la D.C. Mayra Gavito por sus conocimientos y sus certeros comentarios. A la D.C. Lourdes I. Macías por su apoyo técnico y sus contribuciones en la corrección de este documento. Al D.C. Gustavo Santoyo por sus atinadas observaciones y sugerencias en las presentaciones escrita y verbal de esta investigación. Al D.C. Rodolfo Farías por su apoyo en el equipo de laboratorio.

Por permitirme usar sus equipos y reactivos. Por sus sugerencias y sus conocimientos: D.C. José López Bucio, D.C. Carlos Cervantes Vega, D.C. Ernesto García Pineda, D.C. Homero Reyes de la Cruz, D.C. Carlos Sosa Aguirre, D.C. Juan Manuel Sánchez Yáñez, D.C. Rafael Salgado Garciglia, D.C. Alfredo Saavedra Molina, M.C. Martha Patricia Chávez, Biól. Lorena Carreto Montoya, M.C. Eréndira Vargas Zepeda. A mis compañeros de laboratorio Idolina, Nany y Crix.

A mis amigos por el entusiasmo compartido, Paola y Javier, Rosa y Laurent, Gina y Nacho, Carmelita y Jacinto, Judith y Carlos. A Raquel Espinosa por su solidaridad. A todos mis compañeros de generación.

RESUMEN.

Para las plantas, la alcalinidad en un suelo genera dificultades en la adquisición del hierro debido a la presencia de formas químicas insolubles de este micronutriente. Para enfrentar el problema, las plantas de la Familia *Poaceae* inducen un mecanismo de reducción de hierro intracelular (denominado Estrategia II), mientras que las dicotiledóneas y el resto de las monocotiledóneas inducen un mecanismo de reducción extracelular (conocido como Estrategia I). Aunque ambos mecanismos poseen componentes moleculares diferentes, los dos son expresados en las células de la raíz vegetal cuando existen condiciones de deficiencia nutricional por el hierro.

Por su parte, se sabe que los exudados de raíz de cualquier planta generan un ambiente rizosférico en donde se incrementan, por un lado la presencia de moléculas que representan una fuente nutricional microbiana, y por otro las poblaciones microbianas.

El presente estudio tuvo como finalidad determinar el efecto que la inducción de las estrategias vegetales para adquirir el hierro de un suelo alcalino, tenía sobre la diversidad de la Comunidad Bacteriana Rizosférica (CBR) y sobre la capacidad ferriredutora de ésta última. Las plantas Estrategia I estudiadas para tal fin fueron *Phaseolus vulgaris*, *Heliantus annuus* var. rayado mexicano y *Trifolium pratense*; las plantas Estrategia II analizadas fueron *Zea mays* blanco, *Triticum aestivum* y *Avena sativa* var. Chihuahua. A partir de muestras rizosféricas a los 46 días de crecimiento vegetal, se analizó la CBR mediante la extracción de los ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA), y la capacidad ferriredutora fue cuantificada sobre el suelo rizosférico empleando la Técnica de Número Más Probable.

Los resultados mostraron que si bien la Estrategia vegetal para adquisición de hierro no es un factor determinante en la diversidad de la CBR ni en su capacidad de ferrireducción, la especie vegetal sí lo es. En los resultados de la investigación se demuestra que *Avena sativa* propicia el establecimiento de una CBR altamente ferriredutora que se asocia con el incremento en el contenido de clorofila foliar.

Palabras clave: PLFA, Hierro, Estrategia I, Estrategia II, Comunidad Bacteriana Rizosférica, DIRB bacterias ferriredutoras desasimilatorias.

ABREVIATURAS.

- ACP: Análisis de Componente Principal
- AGSA: Ácidos grasos sin asociación bacteriana específica conocida
- AHA2: ATPasa expulsora de protones en raíces de *Arabidopsis thaliana*
- CBR: Comunidad Bacteriana Rizosférica
- CP1: Componente principal 1
- CP2: Componente principal 2
- cy: ciclo alojado en alguna parte de la cadena alifática de un ácido graso.
- DIRB: Nombre general para las bacterias ferriredutoras desasimilatorias (*dissimilatory iron reducing bacteria*)
- E I: Estrategia vegetal para adquisición de hierro en dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas.
- E II: Estrategia vegetal para adquisición de hierro en gramíneas.
- EDTA: Ácido etiléndiaminotetracético
- Eh: potencial redox del suelo
- FAME: Métil éster de ácido graso (*fatty acid methyl ester*)
- FDA: *Food and Drug Administration*
- Fe: Hierro
- FQR: Férrico quelato reductasa
- FRO2: Férrico quelato reductasa en raíces de *Arabidopsis thaliana*
- FS: fitosideróforo
- IRT1: Transportador membranal de hierro reducido en raíces de *Arabidopsis thaliana*
- Me: grupo metilo localizado en alguna posición de la cadena alifática de un ácido graso.
- NMP: Número Más Probable
- PGPR: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (*plant growth promoting rhizobacteria*)
- PLFA: Ácidos grasos de fosfolípidos (*phospholipid fatty acid*)
- UC: Unidad control
- UME: Unidad de muestra experimental
- YS1: Transportador membranal de FS-hierro oxidado en raíces de *Zea mays*

ÍNDICE GENERAL.

I. ANTECEDENTES.	1
1. El hierro en el suelo.	1
2. Reducción Desasimilatoria de hierro en bacterias.	5
3. El hierro como micronutriente vegetal.	8
4. Estrategias vegetales para la adquisición de hierro.	10
5. Las raíces, la Comunidad Bacteriana Rizosférica y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.	16
6. El estudio de la Comunidad Bacteriana Rizosférica.	19
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	23
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	25
1. Muestreo, caracterización y manejo del suelo.	25
2. Selección de especies vegetales.	28
3. Esterilización superficial de las semillas.	29
4. Unidad de muestra experimental.	30
5. Fertilización foliar con hierro.	31
6. Cultivo de plantas.	31
7. Obtención de muestras para analizar.	32
8. Evaluación de la capacidad vegetal para adquirir hierro en un medio alcalino y sin microorganismos.	33
9. Determinación de altura y peso seco de la parte aérea.	34
10. Determinación de clorofila foliar.	34
11. Cuantificación del Número Más Probable (NMP) de bacterias rizosféricas ferriredutoras desasimilatorias.	35
12. Extracción e identificación de metil ésteres de ácidos grasos de fosfolípidos y glucolípidos a partir de la rizósfera.	37
13. Nomenclatura de metil ésteres de ácidos grasos.	39
14. Análisis estadístico.	40

V. RESULTADOS.	41
1. Evaluación de la capacidad vegetal para adquirir hierro en un medio alcalino y sin microorganismos.	41
2. Análisis de componente principal de metil ésteres de ácidos grasos de bacterias rizosféricas.	45
3. Análisis por variable independiente de metil ésteres de ácidos grasos de bacterias rizosféricas.	49
4. Cuantificación de Número Más Probable (NMP) de bacterias rizosféricas ferriredutoras desasimilatorias.	52
5. Contenido de clorofila de la parte aérea de las unidades de muestra experimental.	54
VI. DISCUSIÓN.	56
VII. CONCLUSIONES.	60
BIBLIOGRAFÍA.	61

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

TABLA 1.	Concentración química media de los elementos químicos en la corteza terrestre hasta los 16 km.	1
TABLA 2.	Elementos esenciales en la mayoría de las plantas, formas de absorción y concentraciones que se consideran adecuadas.	9
TABLA 3.	Funciones de los diferentes componentes de los exudados vegetales en la rizósfera.	17
TABLA 4.	Características físicas y parámetros de fertilidad del suelo muestreado.	27
TABLA 5.	PLFA's totales reportados por el Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas.	39
TABLA 6.	PLFA bacterianos usados como biomarcadores en este trabajo.	40
TABLA 7.	Promedios de tres repeticiones de los microgramos de PLFA's extraídos por gramo de rizósfera. Los datos refieren plantas crecidas por 45 días en un suelo alcalino y sin haber recibido fertilización foliar con hierro.	48
FIGURA 1.	Influencia del pH del suelo sobre la solubilidad del hierro.	3
FIGURA 2.	Campos de estabilidad de diferentes condiciones de humedad respecto al pH y al Eh. 2B) Diagrama de Pourbaix simplificado para las especies del hierro que compara la estabilidad termodinámica de los diferentes estados de oxidación.	4
FIGURA 3.	Modelo de degradación de la materia orgánica acoplada a la reducción desasimilatoria de Fe ⁺³ en ambientes anóxicos.	7
FIGURA 4.	Reacción de Haber-Weiss, la reducción de Fe ⁺³ por un ión superóxido y la Reacción de Fenton.	8
FIGURA 5.	Diagrama explicativo del funcionamiento del mecanismo de adquisición de hierro por plantas Estrategia I.	11
FIGURA 6.	Diagrama explicativo del funcionamiento del mecanismo de adquisición de hierro por plantas Estrategia II.	14
FIGURA 7.	Representación esquemática de las partes de un glicerofosfolípido.	20
FIGURA 8.	Mapa que muestra la ubicación del sitio de recolección de suelo en el Municipio de Tarímbaro, Mich.	25
FIGURA 9.	Clasificación taxonómica de las especies vegetales empleadas en este estudio.	28
FIGURA 10.	Diagrama explicativo de las Unidades de Muestra Experimental y de las Unidades Control.	30
FIGURA 11.	Diagrama explicativo del origen de la muestra y los análisis realizados.	32

FIGURA 12.	Descripción gráfica de las diluciones seriadas que permitieron obtener el NMP de DIRB.	35
FIGURA 13.	Concentración de clorofila a y b por gramo de tejido foliar en plantas crecidas por 10 días en agar con sales Hoagland a pH 8.0 y sin microorganismos.	42
FIGURA 14.	Altura de plantas crecidas en agar con sales Hoagland a pH 8.0 y sin microorganismos a los 10 días.	44
FIGURA 15.	Peso seco de plantas crecidas en agar con sales Hoagland a pH 8.0 y sin microorganismos a los 10 días.	44
FIGURA 16.	Resultado del Análisis de Componente Principal. Agrupaciones vegetales.	46
FIGURA 17.	Resultado del Análisis de Componente Principal. PLFA's característicos por especie vegetal.	47
FIGURA 18.	Microgramos de metil éster del ácido graso 16:0 usado como biomarcador para biomasa.	49
FIGURA 19.	Microgramos de metil éster de ácidos grasos biomarcadores para grupos bacterianos específicos (bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, actinomicetos y PLFA sin asociación bacteriana específica reportada).	51
FIGURA 20.	Número Más Probable de DIRB por gramo de rizósfera de plantas crecidas en suelo alcalino y que no fueron fertilizadas foliarmente.	53
FIGURA 21.	Contenido de clorofila a y b a los 45 días, en plantas crecidas en suelo alcalino.	54
FIGURA 22.	Número Más Probable de DIRB por gramo de rizósfera de avena, girasol y trébol crecidas en suelo alcalino y que fueron fertilizadas foliarmente con citrato férrico.	55

I. ANTECEDENTES.

1. EL HIERRO EN EL SUELO.

La capa superficial de material no consolidado de la corteza terrestre se denomina suelo, y constituye un material heterogéneo formado por tres fases diferentes: la fase gaseosa o atmósfera del sistema, la fase líquida o solución del suelo, y la fase sólida integrada a su vez por material inorgánico, sustancias orgánicas y organismos vivos (Mengel, 2001). El suelo es una estructura compleja y dinámica que resulta de la continua interacción de procesos atmosféricos y biológicos sobre la roca madre (Atlas y Bartha, 2002).

Desde la perspectiva del material inorgánico, el hierro es el cuarto elemento químico en abundancia en peso en la corteza terrestre, solo antecedido por el oxígeno, el silicio y el aluminio (Tabla 1).

TABLA 1. Concentración química media de los elementos químicos en la corteza terrestre hasta los 16 km. Tomado de Mengel, 2001.

ELEMENTO	PESO (g/kg)	ELEMENTO	PESO (g/kg)
O	464.6	H	1.4
Si	276.1	P	1.2
Al	80.7	C	0.9
<i>Fe</i>	<i>50.6</i>	Mn	0.9
Ca	36.4	S	0.6
Na	27.5	Cl	0.5
K	25.8	Br	0.4
Mg	20.7	F	0.3
Ti	6.2	Otros elementos	5.2

Invariablemente este metal puede localizarse en todos los suelos en forma de oxihidróxidos tales como α -FeOOH goethita, α -Fe₂O₃ hematita y HFe₅O₈·4H₂O ferrihidrato, los cuáles son el resultado de la meteorización de los silicatos de ferromagnesio olivita, augita, hornblenda y biotita. En los suelos, la concentración de hierro puede variar desde 0.2% hasta 5.5% (*i.e.* 20,000 a 550,000 mg/kg de suelo) dependiendo de las características edafológicas y de la presencia de otras fuentes del metal (Mengel, 2001). Al interior del suelo, el hierro puede

localizarse en la fase líquida, en los precipitados metálicos, adsorbido en arcillas, o adherido a la materia orgánica (Nielsen *et al.*, 2002). Resulta importante recalcar que su presencia en tales sitios no es estática, sino resultado de un continuo intercambio entre las fases provocado por la acción de agentes físicos, químicos y biológicos.

Aunque el hierro dispuesto en la fase líquida es el de mejor disponibilidad biológica, su concentración en este compartimento suele ser extremadamente baja en comparación al hierro total en un suelo. Algunas de las formas inorgánicas solubles del hierro son Fe^{+3} , $\text{Fe}(\text{OH})^{+2}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^{+1}$ y Fe^{+2} , y algunas de las especies inorgánicas insolubles son $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ maghemita, $\gamma\text{-FeOOH}$ lepidocrita, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ hematita y $\alpha\text{-FeOOH}$ goetita; éstas últimas representan formas químicas de difícil acceso biológico (biodisponibilidad) debido a su baja solubilidad en la solución del suelo. Las deficiencias por hierro en las plantas, prevalecen en suelos alcalinos donde la solubilidad del hierro es disminuída por la formación de óxidos férricos insolubles (Lindsay y Schwab, 1982).

De forma resumida, la disponibilidad biológica del metal depende de la presencia de especies químicas solubles, las cuáles a su vez se encuentran en función de 3 factores: el pH, el potencial de reducción (Eh), y la actividad microbiana de óxido-reducción.

La Figura 1 relaciona la variación de pH respecto a la concentración de hierro soluble, y enfatiza la concentración de hierro necesaria en las plantas. Puede apreciarse que cuando se incrementa el pH, tanto el Fe^{+2} como el Fe^{+3} disminuyen su concentración, y el equilibrio en la siguiente ecuación favorece la formación de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ insoluble: $\text{Fe}^{+3} + 3\text{OH}^{-1} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3$. En el gráfico, la solubilidad alcanza un mínimo entre pH 7.4 y 8.5. Fox y Guerinot (1998) reporta que en un medio aireado a pH 7.0 el Fe^{+3} libre está limitado a una concentración de equilibrio de 10^{-17} M, el cual es un valor insuficiente para el óptimo crecimiento vegetal. Como referencia comparativa, el $\text{Fe}(\text{OH})_2$ presenta una constante del producto de solubilidad (K_{ps})¹ de 8×10^{-16} , mientras que el $\text{Fe}(\text{OH})_3$ de 4×10^{-38} (Brown *et al.*, 1998).

¹ Un valor pequeño de K_{ps} denota que solo se disuelve una pequeña cantidad del sólido en agua a 25°C (Brown *et al.*, 1998).

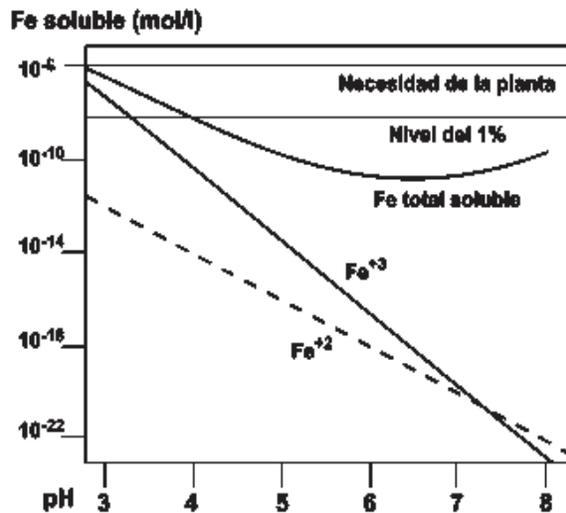


FIGURA 1. Influencia del pH del suelo sobre la solubilidad del hierro. Tomado de Mengel, 2001.

Por otro lado, el hierro es un elemento químico sensible a cambios de óxido-reducción; en la corteza terrestre ello se manifiesta con la presencia de dos formas químicas: la forma ferrosa o reducida Fe^{+2} y la férrica u oxidada Fe^{+3} .

Los ambientes oxidantes (*i.e.* aquellos con atmósfera de O_2 predominante), favorecen la forma oxidada de hierro Fe^{+3} , mientras que en los ambientes reductores (aquellos con condiciones hipóxicas, *e.g.* un suelo anegado o bien microambientes reductores de la raíz de las plantas), favorecen la reducción del metal. La explicación a lo anterior está dada por los valores de potencial redox² (Eh) para el par $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ (+0.771 V) y para el par $1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (+1.23 V)³ (Brown *et al.*, 1998); combinando las dos semireacciones redox se obtiene la ecuación química $2\text{H}^+ + \text{Fe}^{+2} + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{H}_2\text{O}$, en la cual se expresa que el O_2 al ser el oxidante más fuerte, oxidará al Fe^{+2} para producir Fe^{+3} y H_2O . En el caso de que no exista oxígeno en el medio y el agua sea abundante, se propiciará que la ecuación química se dirija en el sentido opuesto.

² El potencial redox es la fuerza que impulsa a que un donador electrónico se oxide reduciendo a su aceptor conjugado (Mathews *et al.*, 2002).

³ Cuanto mayor es el valor de Eh para una pareja redox, más fuerte es como oxidante el aceptor electrónico de esa pareja (Mathews *et al.*, 2002).

La Figura 2A muestra los campos de estabilidad del suelo en diferentes condiciones de humedad en base a valores de pH y potencial redox: los ambientes aireados son oxidantes ya que tienen un valor alto de Eh, mientras que los ambientes saturados de agua suelen ser reductores por su bajo valor de Eh. La Figura 2B relaciona la información de Eh con el pH y explica que a pH 7.0 los suelos bien aireados presentan predominantemente óxidos e hidróxidos de Fe^{+3} , mientras que en suelos anegados y al mismo pH, la forma ferrosa es cuantitativamente mayor (Nikolic, 1998).

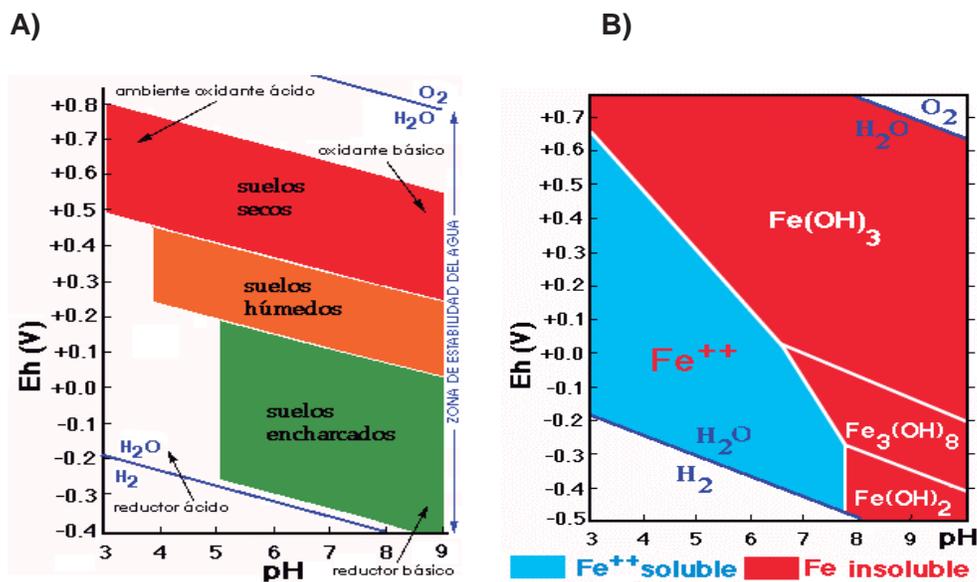


FIGURA 2. 2A) Campos de estabilidad de diferentes condiciones de humedad respecto al pH y al Eh. 2B) Diagrama de Pourbaix simplificado para las especies del hierro que compara la estabilidad termodinámica de los diferentes estados de oxidación. Tomado de <http://edafologia.ugr.es/hidro/concept.htm>.

Respecto al pH y al Eh, se puede establecer como regla general de la movilización y fijación del hierro, que las condiciones alcalinas y oxidantes promueven la precipitación de óxidos férricos Fe^{+3} debido a su insolubilidad, mientras que las condiciones ácidas y reductoras favorecen la presencia de los compuestos solubles, entre ellos el ión ferroso.

El tercer factor que afecta la especiación química del hierro es la capacidad biológica de óxido-reducción. Desde hace varios decenios se consideraba que la reducción de oxihidróxidos de Fe^{+3} en el suelo era resultado únicamente de reacciones abióticas; sin embargo no hay

evidencia de que el Fe^{+3} pueda ser reducido solamente por cambios en el potencial redox o en el pH (Lovley, 2000), y en contraste, si existen muchas evidencias de que los microorganismos de suelos, sedimentos y acuíferos son capaces de acoplar la oxidación de ácidos orgánicos, compuestos aromáticos y algunos aminoácidos a la reducción de oxihidróxidos de Fe^{+3} (Bonnevillie *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005a; Lovley, 1991). Este proceso será objeto de una descripción más detallada en el siguiente apartado.

2. REDUCCIÓN DESASIMILATORIA DE HIERRO EN LAS BACTERIAS.

Microbiológicamente una concentración de $1\mu\text{M}$ de hierro en el medio representa el nivel umbral para sostener la vida (Schröder *et al.*, 2003). Las bacterias usan el hierro para llevar a cabo procesos tales como la fotosíntesis, la fijación de nitrógeno, la metanogénesis, la producción y consumo de H_2 , la respiración, el transporte de O_2 , la regulación genética y la biosíntesis de DNA. Específicamente la función biológica del hierro consiste en la incorporación del metal a proteínas Hierro-Azufre y a proteínas que posean un grupo Hemo (Andrews *et al.*, 2003). Cualquier mecanismo que las bacterias desarrollen para adquirir el hierro con el propósito de una incorporación intracelular a proteínas, recibe el nombre de Reducción Asimilatoria; algunos de los mecanismos para efectuar la adquisición del hierro por la Vía de Reducción Asimilatoria incluyen la disminución del pH externo para hacer al ión férrico más soluble, o la reducción enzimática del ión férrico a la forma ferrosa, o la expulsión de quelantes del ión férrico o sideróforos que actúen como agentes solubilizadores (Andrews *et al.*, 2003). Hay que recalcar que, en términos generales, todas las bacterias llevan a cabo este tipo de reducción.

En contraste, la **Reducción Desasimilatoria de hierro**, consiste en reducir extracelularmente el Fe^{+3} sin incorporarlo a la biomasa. La utilización extracelular del Fe^{+3} como aceptor electrónico de la cadena respiratoria membranal es conocida como respiración de hierro y representa un proceso importante en ambientes anóxicos ya que permite a las bacterias acoplar

la reducción a procesos tales como la generación de una fuerza protón motriz para producir ATP, o para activar el transporte de nutrientes o para dirigir la motilidad celular, y conlleva a que en el suelo quede disponible la especie química Fe^{+2} . La reducción extracelular de Fe^{+3} sin que éste sea el aceptor final de electrones, constituye un proceso fermentativo que no ha sido considerado como vital para las bacterias, ya que menos del 5% de los equivalentes reductores son transferidos a Fe^{+3} (Luu y Ramsay, 2003)

Inicialmente la reducción desasimilatoria de hierro fue descrita en procesos fermentativos bacterianos (Lovley y Phillips, 1996) y se considera que las bacterias que lo llevan a cabo son comunes en suelos agrícolas debido a que viven asociadas a las zonas radiculares (Valencia-Cantero *et al.*, 2007).

Estudios posteriores con microorganismos tales como *Shewanella putrefaciens* sugirieron una reducción férrica acoplada a la cadena de transportadores electrónicos membranales, involucrando a citocromos y a otros acarreadores electrónicos. El hallazgo de que algunas bacterias podrían oxidar completamente compuestos orgánicos hasta CO_2 empleando al Fe^{+3} como único aceptor final de electrones, permitió explicar cómo la respiración férrica bacteriana era la responsable de la reducción de Fe^{+3} en sedimentos (Lovley, 2000). Se comprobó que cepas como GS-15 *Geobacter metallireducens* eran capaces de reducir al Fe^{+3} oxidando acetato y teniendo como productos de reacción Fe^{+2} y bicarbonato. Este sugirió que productos de fermentación de determinadas bacterias que llevan a cabo reducción desasimilatoria de hierro de forma fermentativa, podrían ser oxidados de forma cooperativa hasta CO_2 por bacterias respiradoras de hierro. La Figura 3 muestra un modelo que sugiere como la materia orgánica puede ser oxidada hasta dióxido de carbono por actividad conjunta de microorganismos fermentativos y microorganismos respiradores de hierro.

A las bacterias que llevan a cabo la reducción desasimilatoria se les denomina DIRB (*Dissimilatory Iron Reducing Bacteria* por sus siglas en inglés) y se cree que este tipo de reducción fue uno de los procesos microbianos primitivos para generar energía y que se originó hace cerca de 3.5 billones de años (Schröder *et al.*, 2003; Lovley, 1991). La reducción microbiana de Fe^{+3} a Fe^{+2} ha sido estudiada no solamente por su influencia en la geoquímica del hierro sino también porque el Fe^{+3} es uno de los aceptores de electrones potenciales más abundantes para la descomposición de la materia orgánica en ambientes sedimentarios (Hernández-Calderón, 2006).

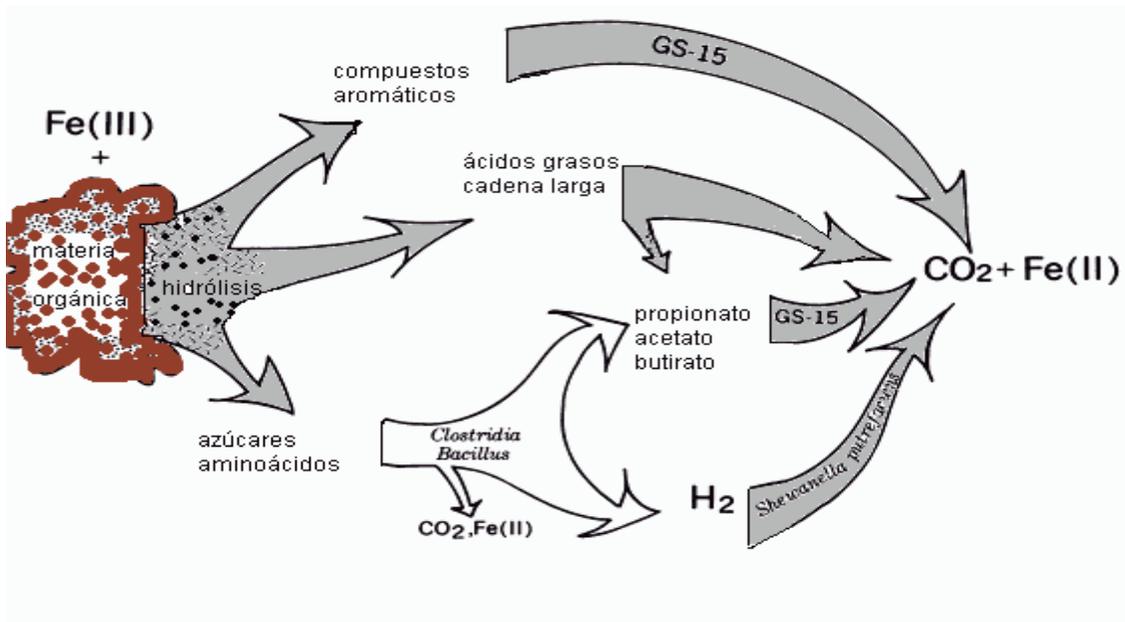


FIGURA 3. Modelo de degradación de la materia orgánica acoplada a la reducción desasimilatoria de Fe⁺³ fermentativa (flechas blancas) y respiratoria (flechas grises) en ambientes anóxicos. Tomado de Lovley, 1993.

De acuerdo a Nielsen *et al.* (2002), las DIRB sólo se encuentran en los Dominios *Archaea* y *Bacteria*, pero acerca de su abundancia y origen filogenético se tiene poca información. Algunas de ellas se han aislado y han sido descritas como miembros de la subclase delta de las *Proteobacteria* incluyendo géneros como *Geobacter*, *Desulfuromonas* y *Pelobacter*. A su vez *Shewanella*, *Geovibro* y *Flexistipes* han sido clasificadas en el grupo gamma. Algunas bacterias grampositivas también han sido reconocidas. La mayoría de las DIRB aisladas hasta el día de hoy son anaerobias obligadas con la excepción de *Shewanella spp.*, *Ferrimonas balearica* y *Thermus sp.* (Kieft *et al.*, 1999; Beliaev y Saffarini, 1998). Lu *et al.* (2002) detectaron a *Pseudomonas spp.* como especie predominante del gremio de DIRB en arrozales. En general se conocen tres mecanismos de Reducción Desasimilatoria de las DIRB: a) la reducción de hierro insoluble (Fe⁺³) vía lanzadera de electrones; b) la secreción de quelantes de la forma férrica; y c) la respiración de contacto directo con el hierro insoluble.

3. EL HIERRO COMO MICRONUTRIENTE VEGETAL.

El hierro es un micronutriente para la mayoría de los organismos vivos, y es incorporado desde el suelo a la Biósfera a través de las plantas (Theil y Briat, 2004). En el suelo, la cantidad de hierro puede llegar a ser de hasta 10,000 veces mayor al de la vegetación que crece en él (Graham y Stangoulis, 2003).

En los organismos vivos, existen dos limitantes en la obtención de este recurso (Guerinot y Yi, 1994): a) aunque existe una gran cantidad del metal en el suelo, sus formas químicas biodisponibles son escasas y biológicamente muy disputadas; este problema en la obtención se agudiza cuando las condiciones del medio se hacen más alcalinas y más oxidantes; b) un exceso en la toma del nutriente y tanto el Fe^{+2} como el Fe^{+3} pueden actuar catalíticamente para generar especies reactivas de oxígeno (Figura 4) y producir toxicidad celular. Por lo anterior, la homeostasis del hierro en un sistema biológico debe estar muy bien regulada.

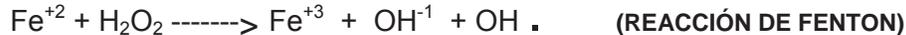


FIGURA 4. La Reacción de Haber-Weiss es la suma de la reducción de Fe^{+3} por un ión superóxido y la bien conocida Reacción de Fenton. Tomado de Guerinot y Yi, 1994.

Los diecisiete nutrientes esenciales para un vegetal se enlistan en la Tabla 2. Catorce de ellos son obtenidos principalmente de la solución del suelo. Estos incluyen 6 macronutrientes (N, K, P, S, Mg Y Ca) y 8 micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn) con concentraciones inferiores al 0.1% (menos de $3 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco). Debe resaltarse que en la planta, el hierro se encuentra en una concentración promedio en peso seco de 100 mg/kg ⁴ lo cual equivale a una concentración intracelular de 10^{-6} M (Guerinot y Yi, 1994) y que el 60% de esa

⁴ Esto es $1.79 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco, o bien, 1.077×10^{18} átomos de Hierro por cada gramo de planta seca.

cantidad es concentrado en los cloroplastos. Tanto el hierro, manganeso, zinc, cobre y níquel son absorbidos por la planta como cationes divalentes (Azcón-Bieto, 2003).

TABLA 2. Elementos esenciales en la mayoría de las plantas, formas de absorción y concentraciones que se consideran adecuadas. Tomado de Azcón-Bieto, 2003.

Elemento	Símbolo químico	Formas de absorción	Peso atómico	Concentración en peso seco			No. relativo átomos respecto al Mo
				$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ppm)	%	
Molibdeno	Mo	MoO_4^{2-}	95.95	0.001	0.1	-	1
Níquel	Ni	Ni^{2+}	58.70	aprox. 0.001	aprox. 0.1	-	1
Cobre	Cu	$\text{Cu}^+, \text{Cu}^{2+}$	63.54	0.10	6	-	100
Cinc	Zn	Zn^{2+}	65.38	0.30	20	-	300
Manganeso	Mn	Mn^{2+}	54.94	1.0	50	-	1000
Hierro	Fe	$\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}$	55.85	2.0	100	-	2000
Boro	B	H_3BO_3	10.82	2.0	20	-	2000
Cloro	Cl	Cl^-	35.46	3.0	100	-	3000
Azufre	S	SO_4^{2-}	32.07	30	-	0.1	30000
Fósforo	P	$\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}, \text{HPO}_4^{2-}$	30.98	60	-	0.2	60 000
Magnesio	Mg	Mg^{2+}	24.32	80	-	0.2	80000
Calcio	Ca	Ca^{2+}	40.08	125	-	0.5	125000
Potasio	K	K^+	39.10	250	-	1.0	250 000
Nitrógeno	N	$\text{NO}_3^{1-}, \text{NH}_4^{1+}$	14.0]	1000	-	1.5	1 000000
Oxígeno	O	$\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}$	16.00	30000	-	45	30000000
Carbono	C	CO_2	12.01	40 000	-	45	40000000
Hidrógeno	H	H_2O	1.01	60 000	-	6	60 000 000

La importancia del hierro en la planta radica en las siguientes funciones: a) forma parte del grupo hierro-porfirina que como núcleo prostético usan muchas enzimas redox, tales como los citocromos, las catalasas y las peroxidases; b) se encuentra unido a grupos tiólicos de la cisteína en sulfo-ferro proteínas, como por ejemplo la ferredoxina, la nitrito reductasa, la nitrogenasa y la sulfito reductasa; c) lleva a cabo un papel importante en la biosíntesis de la molécula de clorofila, ya que regula la actividad del sistema enzimático encargado de la formación del ácido δ -aminolevulínico (ALA), precursor de las porfirinas, y el paso de protoporfirina-Mg a protoclorofilida (Azcón-Bieto, 2003; Hall y Williams, 2003).

4. ESTRATEGIAS VEGETALES PARA LA ADQUISICIÓN DE HIERRO.

Las Estrategias usadas por las plantas para adquirir hierro del suelo, han permitido dividir al phylum *Plantae* en 2 grupos conocidos como plantas Estrategia I (EI) y plantas Estrategia II (EII). El primero hace referencia a todas las dicotiledóneas y a las monocotiledóneas exceptuando las gramíneas, mientras que el segundo se refiere solo a la familia *Poaceae* (gramíneas del grupo de las monocotiledóneas) (Römheld, 1987; Graham y Stangoulis, 2003; Fox y Guerinot, 1998). De acuerdo a Curie y Briat (2003), la Estrategia II (mecanismo de quelación) es más eficiente que la Estrategia I (mecanismo de reducción extracelular) de tal forma que las especies gramíneas pueden sobrevivir a condiciones de deficiencia de hierro más drásticas.

Cuando una planta (cualquiera que sea su Estrategia) se desarrolla en un suelo con suficiencia de hierro, la adquisición del metal estará a cargo de un sistema constitutivo cuya caracterización molecular es desconocida (Curie y Briat, 2003). Graham (2003) estableció que dicho sistema consiste probablemente en una férrico reductasa membranal unida a un transportador de iones o a un canal dirigido por una bomba expulsora de protones dependiente de ATP.

Por otra parte, cuando las plantas enfrentan condiciones de escasez de hierro en el suelo, se inducen mecanismos vegetales o Estrategias para restablecer el nivel adecuado del metal. En cualquiera de las Estrategias, las respuestas se manifiestan en la zona apical de las raíces y se pueden inhibir después de 1 día de restablecerse un nivel suficiente de hierro en el medio (Bauer y Bereczky, 2003). Independientemente de la Estrategia vegetal de adquisición de hierro, cuando la biodisponibilidad del metal es muy baja se puede generar clorosis férrica, un estado que se inicia con el amarillamiento intervenal de las hojas jóvenes seguida en ocasiones por un color amarillo a la totalidad de la hoja; en casos extremos la hoja puede llegar a ponerse casi blanca como a veces sucede en los cítricos (Azcón-Bieto, 2003); en otros casos el amarillamiento es acompañado por una persistencia del color verde en las nervaduras (Chen y Barak, 1982). A nivel molecular la clorosis férrica es causada por una reducción en la cantidad de clorofila sintetizada con la consecuente acumulación de los precursores protoporfirina-Mg IX y protoporfirina-Mg IX (Green y Rogers, 2004). Se ha reportado que las plantas sometidas a estrés nutricional por hierro, acumulan ácidos orgánicos en gran parte de sus tejidos y exportan

carbono a las hojas vía xilema para facilitar la sobrevivencia de la planta mientras las raíces tratan de adquirir Fe del suelo (Abadía *et al.*, 2002).

Cuando un suelo representa un medio deficiente en hierro (por ejemplo un suelo con pH alcalino), las **plantas Estrategia I** (Figura 5) responden a las señales de bajo hierro intracelular induciendo una expulsión de protones que acidifica el microambiente inmediato y permite dirigir al Fe^{+3} a la solución del suelo; a continuación se lleva a cabo la reducción de Fe^{+3} en la superficie de la raíz (por medio de una proteína membranal con función de férrico quelato reductasa) y posteriormente se lleva a cabo el transporte de la forma ferrosa a través de la membrana celular de las células epidérmicas (empleando un transportador específico) (Connolly *et al.*, 2003; Nikolic, 1998). Las respuestas fisiológicas radiculares de las plantas Estrategia I en un medio deficiente en hierro pueden ser: a) formación de células con paredes típicas de las células de transferencia; b) incremento en la formación de pelos radiculares e hinchamiento de la punta radicular subapical (Schmidt, 2003).

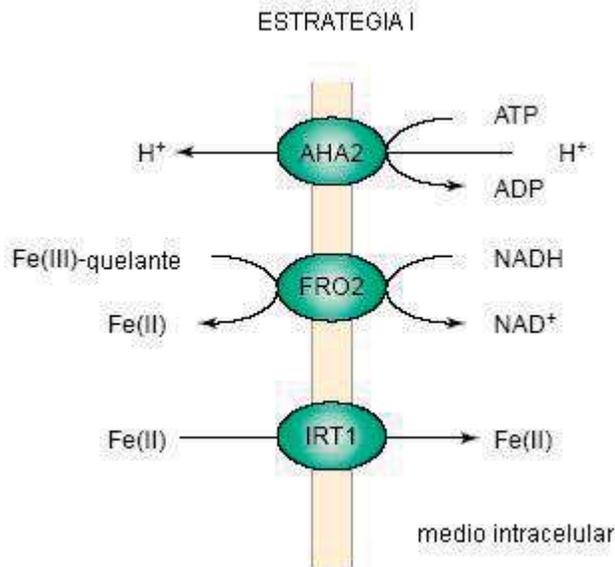


FIGURA 5. ESTRATEGIA I. En plantas Estrategia I (e.g. *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* y *Lycopersium esculentum*) la reducción del hierro es extracelular por medio de la férrico quelato reductasa FRO2 y su posterior incorporación celular por medio del transportador IRT1. AHA2 es una ATPasa tipo P. Tomado de Schmidt, 2003.

El mecanismo de adquisición Estrategia I posee al menos los siguientes cuatro componentes:

- A. Una férrico quelato reductasa membranal (FQR) denominada FRO2 en *Arabidopsis thaliana* y que efectúa la reducción extracelular del hierro en la superficie de la raíz vegetal. Respecto a esta enzima, Connolly *et al.* (2003) reportaron la siguiente información: a) es codificada por el gen *FRO2* en *Arabidopsis* y es inducible por condiciones limitantes de hierro; se sabe que la deficiencia de hierro induce la actividad de esta proteína de cinco a diez veces (Cohen *et al.*, 1998); b) su funcionamiento es dependiente del pH (pH óptimo de aproximadamente 5.5) por ello Römheld (1987) estableció que las plantas Estrategia I exhiben clorosis férrica cuando crecen en suelos alcalinos o calcáreos; c) constituye un polipéptido de 725 aminoácidos con sitios conservados de unión a NADPH y a FAD y posee seis dominios hidrofóbicos en su región amino terminal y dos dominios también hidrofóbicos en su terminación carboxilica; d) su RNAm es detectado en las raíces de plantas de *Arabidopsis* después de tres días de crecimiento en condiciones de escasez, y al transferir a la planta a condiciones de suficiencia, el nivel del transcrito disminuye en 24 h; e) el gen *FRO2* pertenece a una familia de ocho miembros en *Arabidopsis* (Wu *et al.*, 2005) (Mukherjee *et al.*, 2005) y aunque la función del resto no ha sido dilucidada claramente, Waters (2002) identificó la proteína homóloga FRO1 en las hojas de *Pisum sativum*.
- B. Un transportador membranal de de alta afinidad para Fe^{+2} (identificado como IRT1) y que interioriza el metal al citoplasma. Respecto a este transportador se ha establecido que (Connolly *et al.* 2003; Hall y Williams, 2003): a) su expresión es inducida en condiciones de deficiencia de hierro y reprimida cuando el hierro recupera su concentración intracelular; b) su RNAm es detectable en raíces 24 h después de que la planta se transfiere a escasez de hierro, y si se cambia nuevamente a condiciones de suficiencia, el nivel de transcrito disminuye en 24 h; c) IRT1 de *Arabidopsis* es un miembro de la familia de transportadores metálicos ZIP⁵ y está involucrado en el transporte de Fe^{+2} en plantas superiores pero además es capaz de transportar Mn, Cd y Zn (Rogers *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 1998); d) se predice que IRT1 es una proteína con ocho dominios transmembranales, con aproximadamente 337 residuos, y cuyos extremos amino y carboxilo son extracelulares; e) el gen *IRT2* es un homólogo cercano a *IRT1* de la familia ZIP que codifica a un transportador de alta afinidad por hierro

⁵ IRT1 es uno de los 3 miembros fundadores de la familia ZIP los cuáles son transportadores de metales en diversos organismos: bacterias, levaduras, humanos y plantas (Connolly y Guerinot, 2002).

denominado IRT2. Ambos se expresan en raíz cuando se induce a la planta por ausencia del metal en el medio y probablemente los dos son componentes de la respuesta a deficiencia por hierro en raíces de *Arabidopsis*. De los dos, el IRT1 es el responsable mayor de la toma de hierro cuando hay deficiencia y hay que recalcar que ambos tienen el mismo sitio de expresión⁶ (Vert *et al.*, 2002); f) FRO2 e IRT1 están regulados coordinadamente a nivel transcripcional y postranscripcional, es decir su expresión es exactamente paralela.

- C. Un aumento en la expulsión de protones por una H⁺-ATPasa membranal de la familia AHA (potencialmente codificada por el gen *AHA2*), que origina la acidificación del microambiente en el lado apoplástico y que controla la carga en la superficie membranal. Ha sido propuesto que dicho bombeo de protones hacia el exterior mejora la solubilidad del hierro y genera la fuerza protón motriz requerida para la incorporación del metal (Vert *et al.*, 2002). Adicionalmente, esta actividad mantendría un ambiente de bajo pH requerido por la FQR (Dell'Orto *et al.*, 2000).
- D. Un incremento en la liberación de sustancias quelantes y/o reductoras (principalmente fenoles) capaces de solubilizar el hierro (Jin *et al.*, 2006). La excreción de ligandos no sideróforos constituye una forma de movilizar hierro a la raíz. Por ejemplo, los agrupamientos radiculares de plantas como *Lupinus albus* liberan citrato y acidifican la rizósfera aún en suelos calcáreos. Otros compuestos que también promueven la disolución del hierro son lactato, succinato, fumarato, malato, acetato y aminoácidos (Abadía *et al.*, 2002; Ric de Vos *et al.*, 1986). Se sabe que las plantas de tomate exudan ácido caféico para solubilizar Fe a partir de fuentes insolubles (Dakora y Phillips, 2002).

Las **plantas Estrategia II** (Figura 6) inducen un mecanismo basado en la síntesis y excreción de fitosideróforos y de acuerdo a Römheld y Marschner (1986) la liberación de estas moléculas no es afectada por el pH externo. Por medio de un transportador altamente específico (no presente en plantas Estrategia I) el complejo fitosideróforo-Fe⁺³ atraviesa la membrana y una vez en el interior celular el hierro es reducido.

⁶La pregunta realizada por Vert *et al.* (2002) es el porqué la redundancia. Se hipotetiza que quizá IRT2 actúa como un relevo de IRT1 para evitar acumulación excesiva del metal en el citoplasma.

Es típica de las plantas pertenecientes a la Familia *Poaceae* y representa el medio más importante de entrada de hierro a la Biosfera a partir de la Litósfera. Un punto interesante es que la expulsión de fitosideróforos en la raíz de una planta, constituye una actividad diurna con un pico mayor unas horas después de la salida del sol (Graham y Stangoulis, 2003).

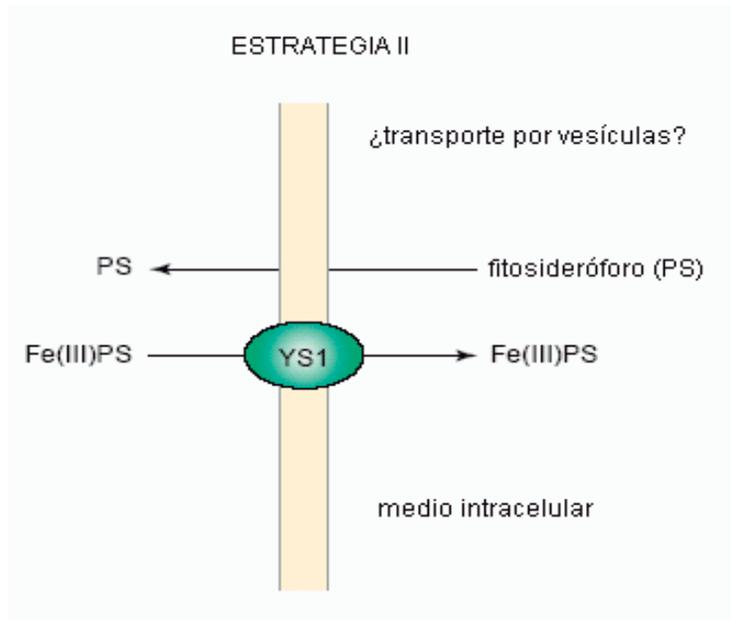


FIGURA 6. ESTRATEGIA II. Las plantas Estrategia II (e.g. *Hordeum vulgare*, *Zea mays* y *Oryza sativa*) excretan sideróforos capaces de solubilizar externamente Fe^{+3} y después transportar el complejo sideróforo- Fe^{+3} al interior celular. YS1 es el transportador de ingreso del complejo. Tomado de Schmidt, 2003.

El mecanismo de adquisición de hierro por plantas Estrategia II presenta los siguientes componentes:

- A. Un mecanismo expulsor de sideróforos. De acuerdo a Connolly y Guerinot (2002), se hipotetiza que la excreción de fitosideróforos podría ser a través de vesículas debido a que durante la síntesis de sideróforos, también se expresan enzimas participantes en el transporte vesicular.
- B. Fitosideróforos. Se definen como moléculas de aminoácidos no proteogénicos biosintetizados a partir de metionina por la actividad de la Nicotianamina Sintasa y la Nicotianamina Aminotransferasa, y cuya función especializada es la de quelar Fe^{+3} (Shojima *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1995). Estudios fisiológicos han mostrado que el complejo fitosideróforo- Fe^{+3} es transportado al interior de las células vegetales sin ser

afectado por la presencia de quelantes fuertes de Fe^{+2} como el BPDS (ácido batofenantrolina sulfónico), por lo que se ha concluido que en la membrana existe un reconocimiento altamente específico para estas moléculas. Se sabe también que la producción de fitosideróforos puede ser inducida por la carencia de Fe o por la de Zn (Schaaf *et al.* , 2004) y que existen diferencias importantes en la cantidad de ácidos mugénicos excretados por las plantas *Poales* (Tolay *et al.*, 2001).

- C. Un mecanismo que ingresa el complejo fitosideróforo- Fe^{+3} , del cual se pueden acotar las siguientes características: a) consiste en una proteína membranal que interioriza el hierro oxidado, y a la cual se le ha denominado YS1 (yellow stripe 1) (Curie *et al.*, 2001); b) de acuerdo a Römheld (1987), es altamente selectiva, ya que no reconoce ni sideróforos quelados sintéticos o microbianos; c) fue identificada primero en maíz y clasificada como miembro de la familia de transportadores de oligopéptidos; d) la presencia de genes YS1 no se restringe a plantas estrategias II ya que se han localizado ocho genes YS1 en *Arabidopsis*, cuyo rol no ha sido identificado (Schmidt, 2003).

5. LAS RAÍCES, LA COMUNIDAD BACTERIANA RIZOSFÉRICA Y LAS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

El suelo es un ecosistema altamente complejo que contiene una gran cantidad de poblaciones microbianas fundamentales para su funcionamiento (Barea *et al.*, 2005); en un suelo sin plantas la actividad biológica está concentrada en una sección que varía en profundidad desde algunos centímetros hasta 30 cm. Aunque los componentes biológicos de dicho sitio representan una fracción muy pequeña del total del volumen de suelo (<0.5%), funcionalmente tienen un impacto alto debido a su participación en el ciclo del nitrógeno, el ciclo del azufre, el ciclo del fósforo, en la descomposición de residuos orgánicos y en el mantenimiento de los agregados del suelo a través de la excreción de polisacáridos (Nielsen Winding, 2002). Sin embargo, como se detallará más adelante, en un suelo con plantas la distribución de los microorganismos se modifica respecto al suelo abierto (o suelo sin planta) y de igual manera, las funciones de la microbiota se ven redirigidas.

Se sabe que las raíces vegetales invariablemente llevan a cabo funciones como la de proveer soporte mecánico y la de permitir la toma de nutrientes y agua del suelo. De forma simultánea en el tejido radicular también se llevan a cabo procesos especializados de síntesis, acumulación y secreción de una diversidad de compuestos; por ejemplo se ha estimado que del total del carbono fijado fotosintéticamente, del 5 al 21% puede ser transferido a las raíces para formar parte de las sustancias excretadas o exudados de raíz (Walker *et al.*, 2003). Lo anterior sirve para subrayar que las raíces no son órganos vegetales pasivos en el suelo.

La delgada zona de suelo que rodea inmediatamente a la raíz se conoce como rizósfera y microbiológicamente representa un área densamente poblada en la cual existe mucha competencia biológica por espacio, nutrientes minerales, materia orgánica y agua (Cardon y Gage, 2006). En esta vecindad inmediata, además de competir por nutrientes, las raíces ejercen efectos sobre el suelo a través de los exudados, ya sea generando simbiosis benéficas, o cambiando las propiedades físicas y químicas del mismo o inhibiendo el desarrollo de patógenos. Los compuestos exudados se clasifican de acuerdo a su peso molecular en de bajo peso (caso de los azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles y otros metabolitos secundarios) y en de alto peso como el mucílago, otros polisacáridos y proteínas (Walker *et al.*, 2003). Debido a que los exudados representan abundancia nutricional, el número de

microorganismos en la rizósfera puede ser de 19 a 32 veces mayor que la de un suelo abierto (Kuzyakov, 2006). En la Tabla 3 se describen las posibles funciones generales de algunos componentes de los exudados que han sido estudiados.

TABLA 3. Funciones de los diferentes componentes de los exudados vegetales en la rizósfera. Tomado de Dakora y Phillips, 2002.

COMPONENTE	FUNCIÓN EN LA RIZÓSFERA
Fenoles	Fuente nutritiva Señales quimiotácticas a microbios Promotores de crecimiento microbiano Inductores de gene <i>nod</i> en <i>Rhizobium</i> Inhibidores de gene <i>nod</i> en <i>Rhizobium</i> Quelantes de minerales poco solubles Destoxificadores de Al Fitoalexinas contra patógenos de suelo
Ácidos orgánicos	Fuente nutritiva Señales quimiotácticas a microbios Quelantes de minerales poco solubles Acidificantes del suelo Destoxificadores de Al Inductores de gene <i>nod</i>
Aminoácidos y fitosideróforos	Fuente nutritiva Quelantes de minerales poco solubles Señales quimiotácticas a microbios
Vitaminas	Fuente nutritiva Promotores de crecimiento vegetal y microbiano
Purinas	Fuente nutritiva
Enzimas	Catalizadores para separar P de moléculas orgánicas biocatalizadores para las transformaciones de la materia orgánica
Células del borde la raíz	Producen señales que controlan la mitosis Producen señales que controlan la expresión de genes Estimulación del crecimiento microbiano Excreción de moléculas quimiotácticas Síntesis de moléculas de defensa Excreción de mucílago y proteínas

Los exudados ejercen efectos diversos sobre su entorno y particularmente sobre los microorganismos ahí alojados. Brant *et al.* (2006) han demostrado que las moléculas que se

exudan a través de la raíz ejercen un control importante en la composición de las comunidades microbianas estudiadas en ecosistemas boscosos.

De forma simultánea, las actividades metabólicas de los microorganismos también ejercen efectos sobre la planta. Por ello no es de sorprender que existan una serie de asociaciones planta-microbio en donde se busque eficientar la adquisición biológica de diversos nutrientes, ejemplo de ello son las micorrizas y las bacterias fijadoras de nitrógeno (Morgan *et al.*, 2005).

El término rizobacteria es usado para definir a las bacterias capaces de colonizar el ambiente que rodea a las raíces. Desde una perspectiva ecológica el conjunto de estas bacterias que comparten una identidad biológica dá origen a poblaciones, y a su vez el conjunto de varias poblaciones origina la Comunidad Bacteriana Rizosférica (CBR). Ésta última puede ser descrita a partir de tres elementos: a) la composición, que se refiere al tipo de bacterias presentes, b) la riqueza, que se refiere a la cantidad celular en el tipo de bacterias presentes, y c) la estructura, que hace referencia a la distribución de frecuencias o abundancia relativa de los tipos. En conjunto, a tres elementos anteriores se le denomina diversidad (Dunbar *et al.*, 1999; Dunbar *et al.*, 2000).

Algunos autores han identificado a determinadas rizobacterias como benéficas para el crecimiento de las plantas y por ello las han denominado bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR *plant growth promoting rhizobacteria* por sus siglas en inglés) (Van Veen *et al.*, 1997). Debido a su relevancia en el presente trabajo, las PGPR serán descritas con mayor detalle.

Para ser consideradas como PGPR las bacterias deben reunir tres características: a) tener la capacidad de colonizar la raíz, b) sobrevivir y multiplicarse en microhábitats asociados a la superficie de la raíz en competencia con otra microbiota al menos por el tiempo necesario para expresar actividades de promoción o protección a la planta, c) deben promover el crecimiento de la planta (Ryu *et al.*, 2005).

Por el efecto que ejerzan sobre la planta, las PGPR han sido clasificadas en dos grupos: aquellas involucradas en el ciclo de algún nutriente o regulador vegetal, y aquellas involucradas en el control de patógenos; ejemplos del primer grupo son las bacterias no simbióticas fijadoras de nitrógeno, las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, las bacterias que tienen una

actividad significativa en la producción de fitohormonas (Ryu *et al.*, 2005; Patten y Glick, 2002), las bacterias cuyos sideróforos representan una buena fuente de abastecimiento de hierro para las plantas (Mashalha *et al.*, 2000; Yehuda *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2006), las bacterias ferrirreductoras que participan en el suministro de hierro a una planta (Velázquez-Becerra, 2007), y aquellas responsables del incremento en la disponibilidad de fosfato y otros nutrientes del medio. Un ejemplo del segundo grupo son las bacterias que pueden ayudar a controlar patógenos vegetales por medio de la producción de metabolitos como el acetilfluoroglucinol (antifúngico producido por *Pseudomonas sp.*) o la fenazina (antibiótico producido por *Pseudomonas fluorescense* que tiene actividad específica contra *Gaeumannomyces graminis* en trigo) (Barea *et al.*, 2005).

6. EL ESTUDIO DE LA COMUNIDAD BACTERIANA RIZOSFÉRICA.

Pese a que los suelos tienen una inmensa variedad bacteriana, el carácter no cultivable de muchos microorganismos (del 90 al 99.9%) ha limitado su estudio y por ello los métodos microbiológicos tradicionales resultan herramientas que generan información poco representativa (Escalante-Lozada *et al.*, 2004). Por tal motivo es importante referir que en los últimos tiempos, el análisis de este tipo de comunidades ha sido ampliamente explorada por técnicas moleculares. De acuerdo a Cardon y Gage (2006), los métodos más comúnmente utilizados para analizar la diversidad microbiana rizosférica son aquellos basados en PCR (TGGE, DGGE, T-RFLP, RISA), aquellos que utilizan la hibridación fluorescente in situ o FISH, aquellos que evalúan las capacidades metabólicas de la comunidad (e.g. Biolog) y aquellos que basan su caracterización en el análisis de ácidos grasos de lípidos microbianos.

Ésta última herramienta metodológica se basa en la extracción e identificación de las moléculas de ácidos grasos presentes en las membranas de las bacterias con el objetivo de relacionar la presencia de ciertos ácidos grasos con un grupo bacteriano. El análisis parte de dos consideraciones: a) los ácidos grasos son ubicuos a las membranas de todos los organismos, y

b) diferentes taxa microbianos poseen ácidos grasos característicos que permiten su identificación (Zelles, 1999; Piotrowska-Seget y Mroziak, 2003).

Particularmente, el Análisis de Ácidos Grasos de Fosfolípidos (PLFA *phospholipid acid fatty acids* por sus siglas en inglés) se ha empleado de forma importante para estimar la biomasa microbiana total de una CBR, para identificar y cuantificar la diversidad de la misma, o para proporcionar información sobre los cambios que un efector produce (contaminación, tratamientos al suelo, prácticas agrícolas, temperatura, humedad, etc.). En este tipo de análisis los ácidos grasos pertenecientes a los glicerofosfolípidos bacterianos (Figura 7), son extraídos, identificados y cuantificados. En el estudio de las comunidades rizosféricas, existe también el análisis MIDI-FAME (*Microbial Identification-Fatty Acid Methyl Ester*) (Schutter y Dick, 2000; Ramsey *et al.*, 2006) en el cual se extraen todos los ácidos grasos presentes en la comunidad rizosférica sin que exista una separación inicial por el tipo de lípido; el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas permite llegar a una identificación microbiana por la comparación con las bases de datos MIDI del programa.

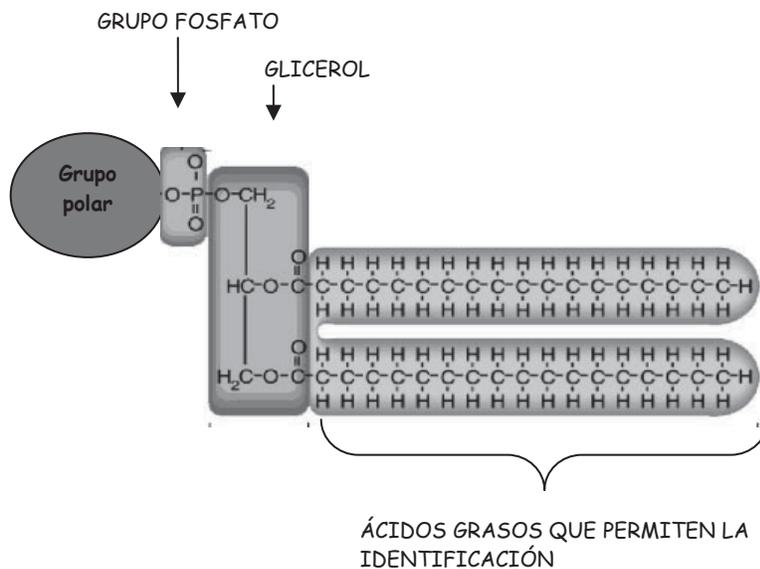


FIGURA 7. Representación esquemática de las partes de un glicerofosfolípido. Adaptado de Nelson y Cox, 2005.

Las Comunidades Bacterianas Rizosféricas pueden sufrir variaciones de acuerdo a: la etapa fenológica vegetal, las especies vegetales, las diferentes zonas de la raíz, los factores ambientales (humedad, temperatura), las enfermedades vegetales, los sistema de cultivos, el tamaño de la partícula de suelo, la estación del año, el estado nutricional de la planta por hierro, el estrés, entre otras. Debido a que el estudio de la CBR es parte central de la presente investigación, es importante destacar algunas investigaciones realizadas sobre el efecto de factores bióticos y abióticos sobre comunidades bacterianas.

Sharma *et al.* (2005b) mostraron que las raíces de *Vicia faba*, *Pisum sativum* y *Lupinus albus*, contribuyeron al desarrollo de comunidades bacterianas rizosféricas propias y diferentes y que este efecto es dependiente de la especie vegetal. Previamente Kremer *et al.* (1990) ya habían descrito que la abundancia y composición de rizobacterias variaban entre diferentes especies de plantas herbáceas, y Miethling *et al.* (2003) habían corroborado diferencias en las CBR como resultado de la actividad de exudados vegetales de trébol, frijol y alfalfa (todas de la familia botánica *Papilionaceae*) en un mismo estadio vegetal. Nichols *et al.* (1997) reportaron que la contaminación por compuestos orgánicos en un suelo provocó que *Medicago sativa* y *Poa alpina* tuvieran una mayor cantidad de poblaciones degradadoras de compuestos orgánicos respecto a plantas crecidas en suelos no contaminados. Alvey *et al.* (2003) trabajando con *Zea mays*, *Pennisetum glaucum*, *Sorghum bicolor*, *Vigna unguiculata* y *Arachis hypogea*, mostraron que el sistema de rotación de cultivos generó mayor variabilidad en la comunidad microbiana. Smalla *et al.* (2001) puntualizaron que los cambios de estación climática generan un cambio en las comunidades existentes de cultivos de fresa, papa y colza. Y Smit *et al.* (2001) encontraron que en muestras de suelo tomadas en las diferentes estaciones del año en un suelo sembrado todo el año con trigo, se localizan diferencias en las comunidades bacterianas. En el mismo sentido, Escalante-Lozada *et al.* (2004) publicó que hay una baja diversidad bacteriana en un suelo muestreado en temporada invernal respecto al de verano debido al aporte de nutrientes al suelo por la fertilización de primavera. En el 2006 Waldrop y Firestone establecieron que el clima era una variable que afectaba a la comunidad microbiana del suelo de árboles del género *Quercus*. Por otro lado McSpadden y Weller (2001) acotaron que varias poblaciones bacterianas eran más abundantes en plantas de trigo infectadas por *Take-all disease* respecto a plantas saludables. Wieland *et al.* (2001) concluyeron en sus estudios con *Trifolium pratense*, *Phaseolus vulgaris* y *Medicago sativa*, que la influencia del tipo de suelo sobre la comunidad microbiana, disminuye en un gradiente a partir del suelo hacia el rizoplano, y que simultáneamente, en esa misma dirección se incrementa la influencia de la especie vegetal;

además demostraron que los cambios más pronunciados en la comunidad microbiana suelen ocurrir durante los primeros días después de que emerge la raíz de la semilla. Girvan *et al.* (2003) establecieron que el tipo de suelo es un factor determinante en la composición de la comunidad bacteriana en suelos arables. De-Ridder-Duine *et al.* (2005) demostraron que la comunidad bacteriana rizosférica en *Carex arenaria* está determinada por la composición bacteriana del suelo donde se siembra la planta.

En relación al estado nutricional de la planta, Yang y Crowley (2000) sugirieron que las comunidades bacterianas en la rizósfera son sustancialmente diferentes en diferentes zonas de la raíz, y que además dicha comunidad puede ser alterada por cambios en la composición de los exudados de raíz causados por un estado nutricional de hierro en la planta. Este hallazgo permitió visualizar que si la adquisición de hierro tiene dos mecanismos en los vegetales (la reducción de Fe^{+3} intracelular o la extracelular), entonces posiblemente el efecto de estos exudados permitiría ejercer un efecto de selección de bacterias rizosféricas de plantas Estrategia I y aquellas de plantas Estrategia II. Un estudio previo en el laboratorio realizado por Duarte-Sotelo en el 2004, indicó que en plantas de limón (planta Estrategia I) existía una estimulación de bacterias con mayor actividad ferriredutora desasimilatoria respecto de las de plantas de maíz (planta Estrategia II). Ello sentó el precedente de una posible relación entre la estrategia vegetal para obtener el hierro y las capacidades de ferrireducción desasimilatoria de las comunidades rizosféricas, en el sentido de que las plantas podrían favorecer el crecimiento de bacterias que generaran Fe^{+2} en la rizósfera y de esta manera ayudaran en la nutrición vegetal.

Sobre esta base se desprendió la pregunta de esta investigación:

¿Será determinante el tipo de estrategia vegetal de adquisición de hierro en la variación de la comunidad rizobacteriana y en su capacidad ferriredutora desasimilatoria?

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

HIPÓTESIS.

La Estrategia vegetal de adquisición de hierro, tiene un efecto determinante en la diversidad de la Comunidad Bacteriana Rizosférica y en la capacidad ferriredutora desasimilatoria de la misma.

OBJETIVO GENERAL.

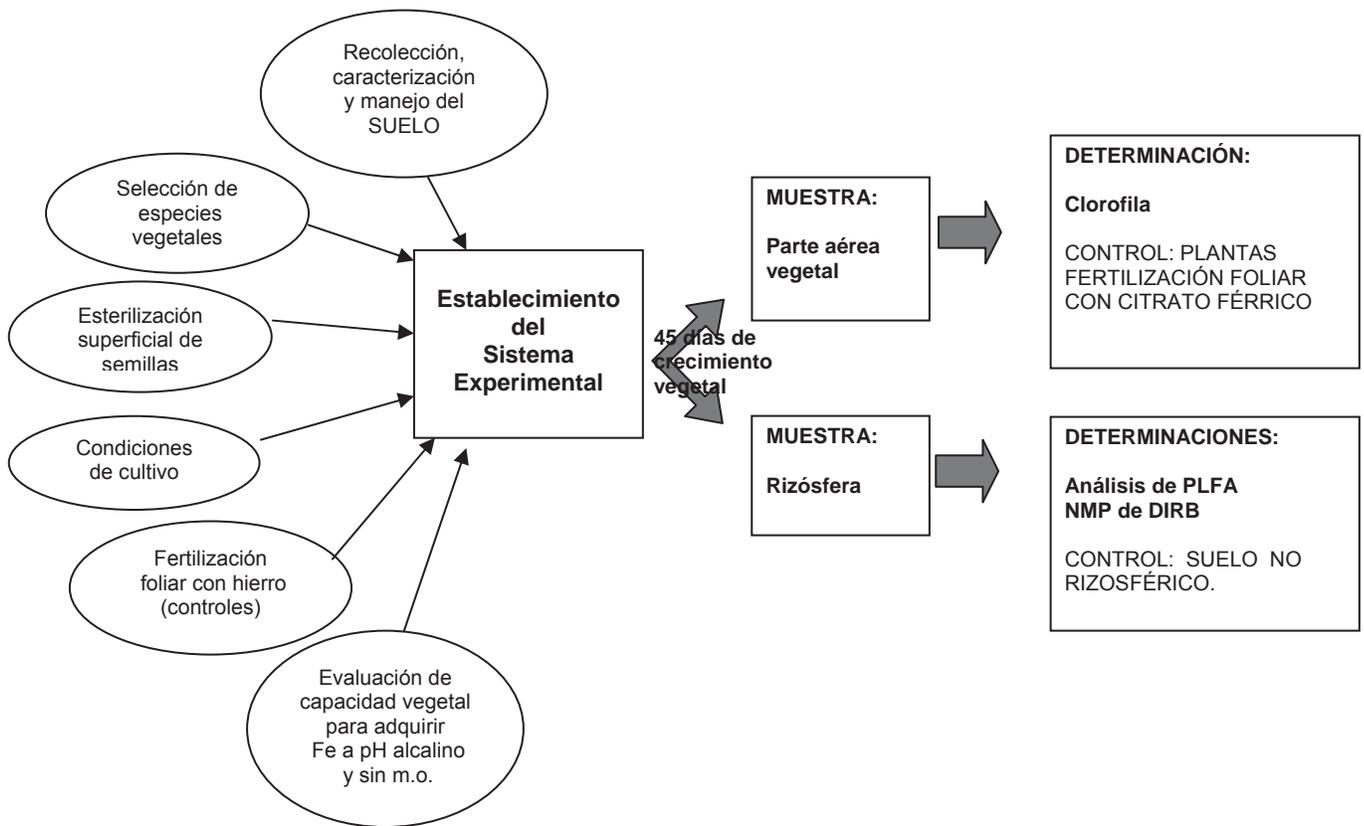
Caracterizar los cambios en la diversidad de la Comunidad Rizobacteriana y su capacidad ferriredutora, en función del tipo de Estrategia que despliegan las plantas para adquirir hierro en un suelo alcalino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Establecer un Sistema Experimental que permita comparar el efecto de las Estrategias Vegetales EI y EII sobre la Comunidad Bacteriana Rizosférica.
2. Describir por análisis de componente principal el efecto que las Estrategias Vegetales para la absorción de Fe tuvieron sobre la composición de ácidos grasos de fosfolípidos bacterianos rizosféricos de un suelo alcalino.
3. Cuantificar la diversidad de la Comunidad Bacteriana Rizosférica en especies vegetales EI y EII crecidas en un suelo alcalino, con la información de tipos bacterianos presentes (composición), cantidad celular (riqueza) y abundancia relativa de los tipos (estructura) obtenidas del análisis de ácidos grasos de fosfolípidos bacterianos.
4. Evaluar la capacidad ferriredutora rizosférica mediante la cuantificación del número de bacterias ferriredutoras desasimilatorias que se desarrollan en las rizósferas de las plantas EI y EII crecidas en suelo alcalino.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

La estrategia experimental puede resumirse en dos partes: a) el establecimiento del sistema experimental; y b) el análisis de las fracciones vegetales (foliar y rizósfera) para la determinación de clorofila, obtención del perfil de lípidos rizobacterianos y determinación de NMP de DIRB.



IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

Lo descrito en los apartados 1 al 7 de Materiales y Métodos refiere el establecimiento del sistema vegetal experimental. El resto de los apartados describen los procedimientos que permitieron obtener directamente los resultados que sustenta esta investigación.

1. RECOLECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y MANEJO DEL SUELO.

El suelo utilizado en esta investigación, fue recolectado en Enero del 2007 en la zona agrícola denominada “El Lometón”, perteneciente al Municipio de Tarímbaro, Michoacán, como lo muestra el mapa de la Figura 8 (coordenadas de ubicación $101^{\circ} 8'$, $19^{\circ} 42'$). Se eliminaron 5 cm de la capa superficial de suelo y se obtuvo suelo a una profundidad de hasta 20 cm. El suelo recolectado se tamizó con malla de 2 mm y se secó durante 72 horas en condiciones ambientales naturales en un sitio cubierto y limpio.

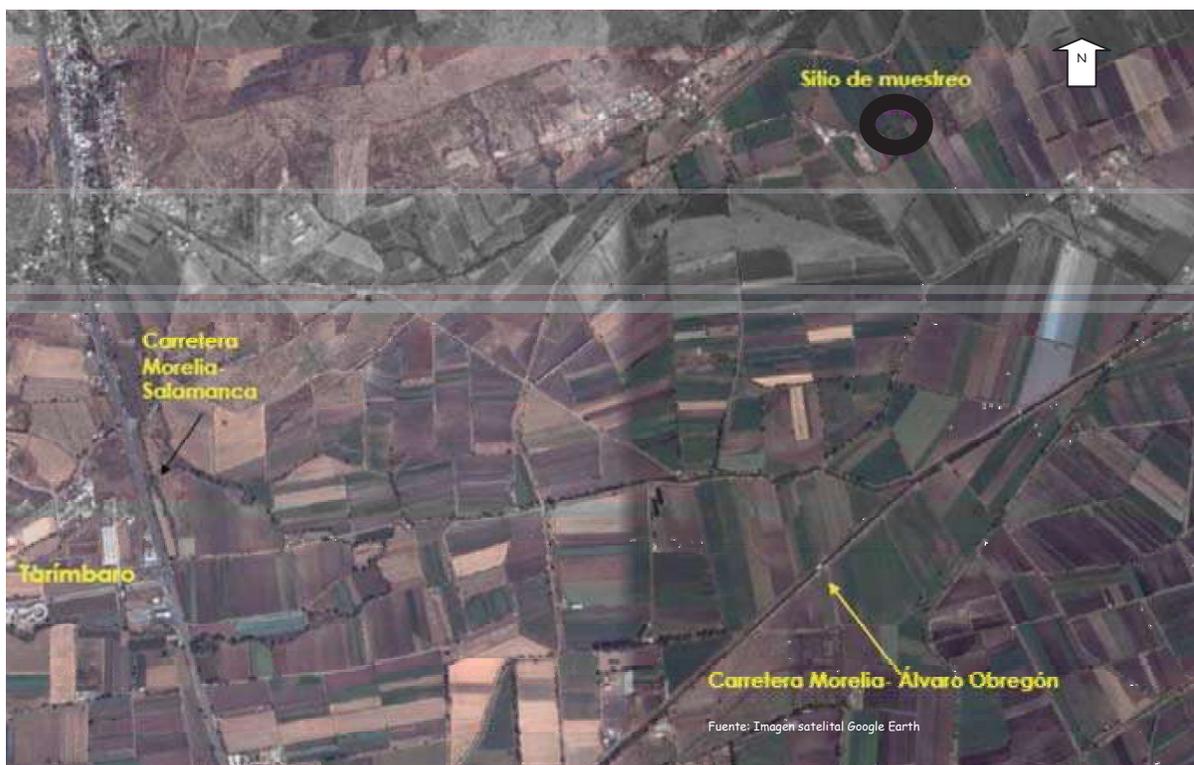


FIGURA 8. Mapa que muestra la ubicación del sitio de recolección de suelo en el Municipio de Tarímbaro Mich. Coordenadas de ubicación $101^{\circ} 8'$, $19^{\circ} 42'$.

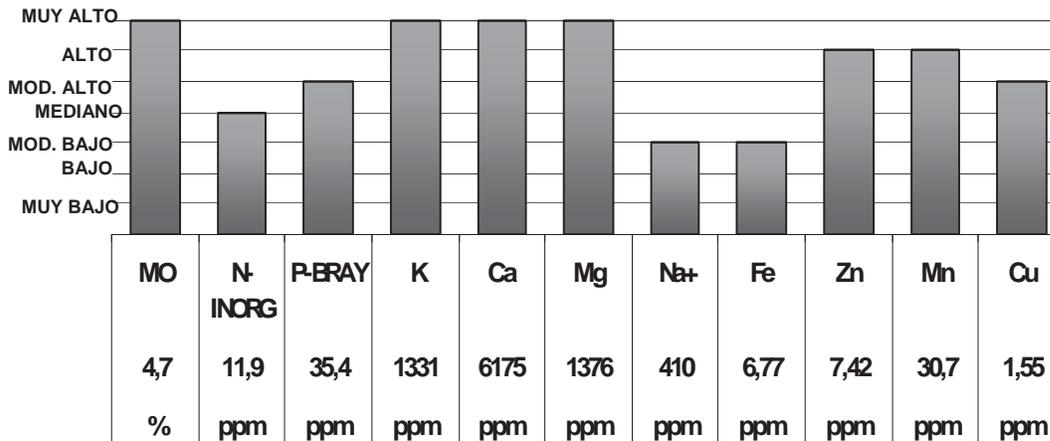
Al término, se colocaron 170 g de suelo en vasos de polipropileno a efecto de generar el sustrato de cada unidad de muestra experimental. Posteriormente se llevó a cabo un tratamiento antifúngico con Captán a una concentración de 0.752 mg por cada g de suelo, en dos ocasiones a las 96 y 120 h de haberlo recolectado. A las 24 h posteriores a la aplicación, el suelo fue removido y sembrado con las plántulas de cada especie vegetal en estudio.

La caracterización física y química del suelo seco se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del INIFAP Unidad Celaya. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 4. El pH alcalino y la cantidad moderadamente alta de carbonatos totales resalta las características de suelo que requiere este estudio ya que son condiciones que favorecen la inducción de las Estrategias vegetales para adquisición de hierro. Hay que acotar también que dentro de los parámetros de fertilidad, los 6.77 ppm de hierro son indicativos de una concentración moderadamente baja para el requerimiento vegetal, ello suma otro factor que favorece la inducción de las Estrategias mencionadas.

TABLA 4. Características físicas y parámetros de fertilidad del suelo muestreado. Los análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del INIFAP Unidad Celaya.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL SUELO	
Arena: 45.84% Arcilla: 12.52% Limo: 41.64%	
Tipo de suelo: Franco	
Punto de saturación: 79% muy alto	
Capacidad de campo: 59.2%	
Punto March. Perm.: 31.1	
Densidad aparente: 1.28 g/cm ³	
REACCIÓN DEL SUELO	
pH (1:2 agua) : 7.89 mod. alcalino	
Carbonatos totales: 7.13 % mod. alto	

PARÁMETROS DE FERTILIDAD



2. SELECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES.

Las semillas empleadas en el trabajo experimental fueron adquiridas en comercializadoras agrícolas ubicadas en la ciudad de Morelia, Michoacán. A efecto de seleccionar las especies vegetales que se utilizaron en la fase experimental se llevó a cabo un primer experimento de 45 días de siembra y cosecha (Julio del 2006), en el cual se evaluó: a) la facilidad de esterilización superficial de las semillas, b) el tiempo de germinación, c) la facilidad de adquisición comercial de las semillas, d) la superficie foliar a los 45 días y e) la cantidad de raíz obtenida a los 45 días de cosecha. Del análisis anterior se seleccionaron seis especies vegetales: tres Estrategia I (*Helianthus annuus* var. rayado mexicano, *Phaseolus vulgaris* var. Flor de Junio y *Trifolium pratense*) y tres Estrategia II (*Zea mays* blanco, *Triticum aestivum* y *Avena sativa* var. Chihuahua). En la Figura 9 se muestra la clasificación taxonómica de cada una.

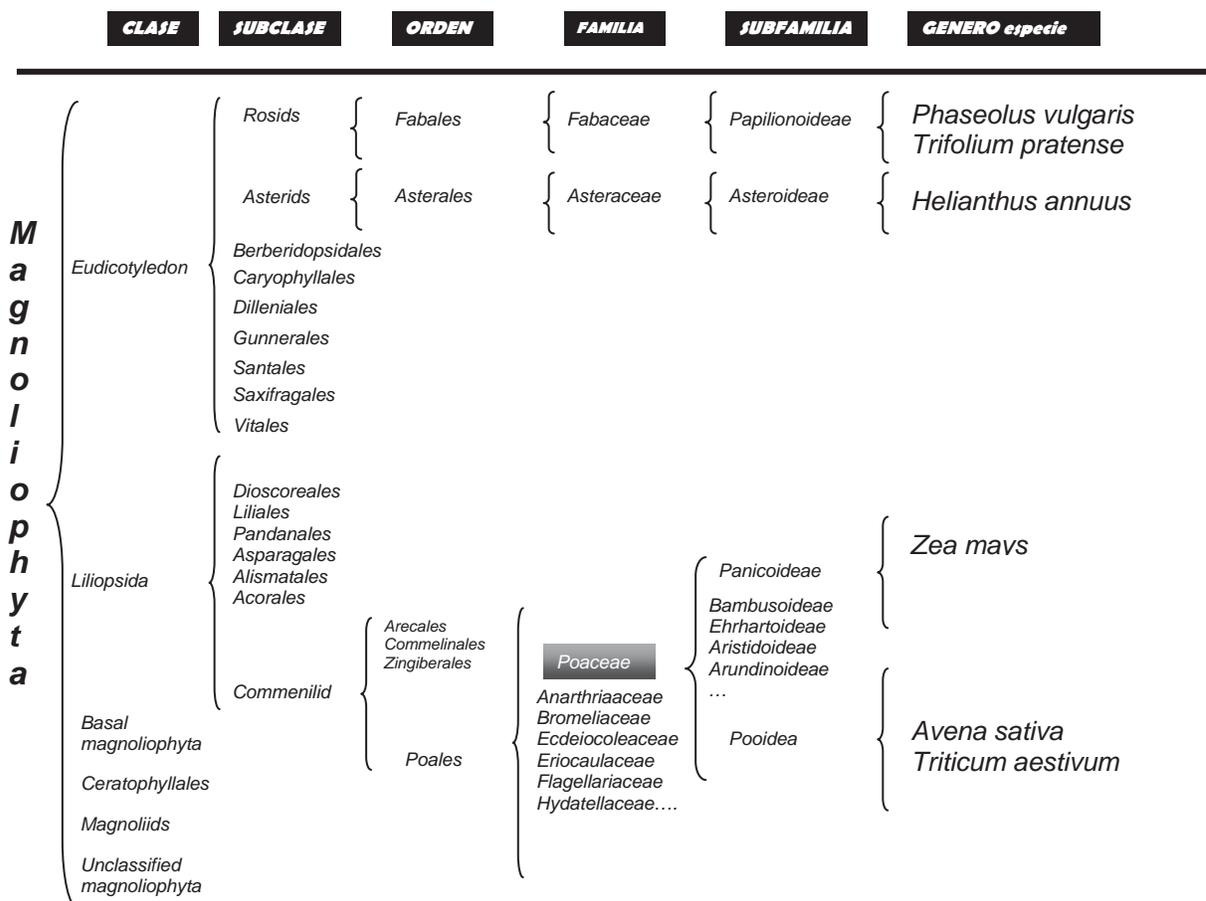


FIGURA 9. Clasificación taxonómica de las especies vegetales empleadas en este estudio. Tomado de NCBI Taxonomy Browser.

3. ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE LAS SEMILLAS.

El procedimiento de esterilización superficial de todas las semillas empleadas en el experimento se describe a continuación. En un tubo estéril se vaciaron de 10 a 20 semillas, y se les adicionó 20 ml de una solución de hipoclorito de sodio (cloralex) al 20% durante 15 minutos en agitación constante. Se desechó la solución y se realizó el primer enjuague con agua estéril durante 15 minutos en agitación constante. Se eliminó el agua de lavado y se agregaron 20 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 11% por 15 minutos en agitación constante. Se realizaron 3 enjuagues más con agua estéril que al final volvieron a desecharse. Las semillas se esparcieron en placas de agar nutritivo estéril, las cuáles fueron selladas con parafilm y colocadas en la oscuridad y a temperatura ambiente para permitir su germinación. Después de 2-4 días se seleccionaron las plántulas que presentaban condiciones de esterilidad y se colocaron en los vasos de polipropileno que contenían el suelo preparado, o bien en el agar con sales Hoagland para los experimentos *in vitro*.

4. UNIDAD DE MUESTRA EXPERIMENTAL.

Se le denominó UNIDAD DE MUESTRA EXPERIMENTAL (UME) a cada vaso de polipropileno que contenía el suelo preparado y en el que se sembró la plántula de cualquiera de la especies vegetales en estudio. Se prepararon 48 UME's (Figura 10), 8 para cada una de las 6 especies vegetales en estudio. Se les denominó UNIDAD CONTROL (UC) a 4 vasos de polipropileno que contenían el suelo preparado pero que no fueron sembrados con ninguna planta. Con objeto de conseguir suficiente suelo rizosférico, en las unidades del girasol y maíz se colocó una sola plántula, en la del trébol se colocaron aproximadamente 10 plántulas y para las restantes especies vegetales se utilizaron dos plántulas.

De las 8 UME de cada especie vegetal, 4 de ellas fueron fertilizadas foliarmente con hierro a efecto de que representaran el sistema control en las mediciones de clorofila para los experimentos realizados en suelo. Las otras 4 UME de cada especie vegetal que no fueron fertilizadas constituyeron el sistema en estudio.

Unidad Muestra Exp	TRATAMIENTO CON HIERRO repeticiones				TRATAMIENTO SIN HIERRO repeticiones			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>H. annuus</i>								
<i>P. vulgaris</i>								
<i>T. pratense</i>								
<i>Z. mays</i>								
<i>T. aestivum</i>								
<i>A. sativa</i>								
Unidad Control								

FIGURA 10. Diagrama explicativo de las Unidades de Muestra Experimental y de las Unidades Control.

5. FERTILIZACIÓN FOLIAR CON HIERRO.

Se ha indicado ya que se realizó una primera siembra por 45 días para seleccionar las especies vegetales del estudio. Para poder decidir qué compuesto químico funcionaría mejor en la fertilización foliar, se llevó a cabo un segundo experimento de 45 días de siembra y cosecha (Septiembre del 2006). Se comparó la aplicación de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ respecto a una fertilización orgánica con citrato férrico. El objetivo de este procedimiento fue obtener una serie de 4 UME que al ser fertilizadas foliarmente estuvieran en un estado de suficiencia de hierro, de tal forma que representaran el control en la medición de clorofila. Los resultados en contenido de clorofila, altura y peso seco de este segundo experimento, permitieron seleccionar a la fertilización orgánica como la opción para comparar el estado nutricional.

La fertilización orgánica consistió en la aspersion foliar de una solución estéril pH 6.0 con la siguiente composición: citrato férrico 0.23mM (0.058 g/L); ácido cítrico (2.5 g/L); ácido málico (2.5 g/L) y sorbitol (8 g/L) (Rombolá *et al.*, 2002). En cada aplicación, la maceta era cubierta con plástico permitiendo solo la exposición de la parte aérea vegetal. En el caso de la fertilización inorgánica la única modificación al procedimiento anterior fue el empleo de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM pH 5.0 en sustitución de los compuestos orgánicos (Godsey *et al.*, 2003).

6. CULTIVO DE PLANTAS.

Una vez realizados los ensayos anteriores, se realizó el tercer experimento de siembra y cosecha en Marzo del 2007 del cual se obtuvieron los resultados que se presentan en este trabajo. Cada UME fue colocada en una cámara de cultivo Percival Intellus Environmental Controller en condiciones constantes de 22°C, humedad del 70%, 16/8 horas luz/oscuridad respectivamente. Las Unidades permanecieron en las condiciones descritas por 45 días y fueron regadas sucesivamente bajo el esquema descrito a continuación. Riego por 3 días con 20 ml de agua desionizada estéril, y al cuarto día, riego con 20 ml de solución Hoagland sin Hierro pH 5.3 con la siguiente composición: KNO_3 (0.0049 M); $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.0049 M); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0019 M); NH_4NO_3 (0.00099M); KH_2PO_4 (0.00049 M); H_3BO_3 (46.2 μM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (9.1 μM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.76 μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2 μM); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.49 μM). La fertilización foliar se llevó a cabo los días 14, 21, 27, 34 y 40 de la permanencia de las unidades en la cámara de cultivo, y fue aplicada sólo en 4 UME por especie vegetal.

7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS A ANALIZAR.

De las 4 UME de cada tratamiento, tres de ellas sirvieron para proveer tres muestras de rizósfera (cada una corresponde a una repetición) que fueron utilizadas para determinar los Ácidos Grasos de Fosfolípidos (PLFA); de las mismas tres UME se analizó la concentración de clorofila, la altura, y el peso seco de la parte aérea. La cuarta unidad fue empleada para cuantificar el Número más Probable de bacterias ferrireductoras (Figura 11). Debe subrayarse que en las UC solo se realizaron los análisis de PLFA y NMP.

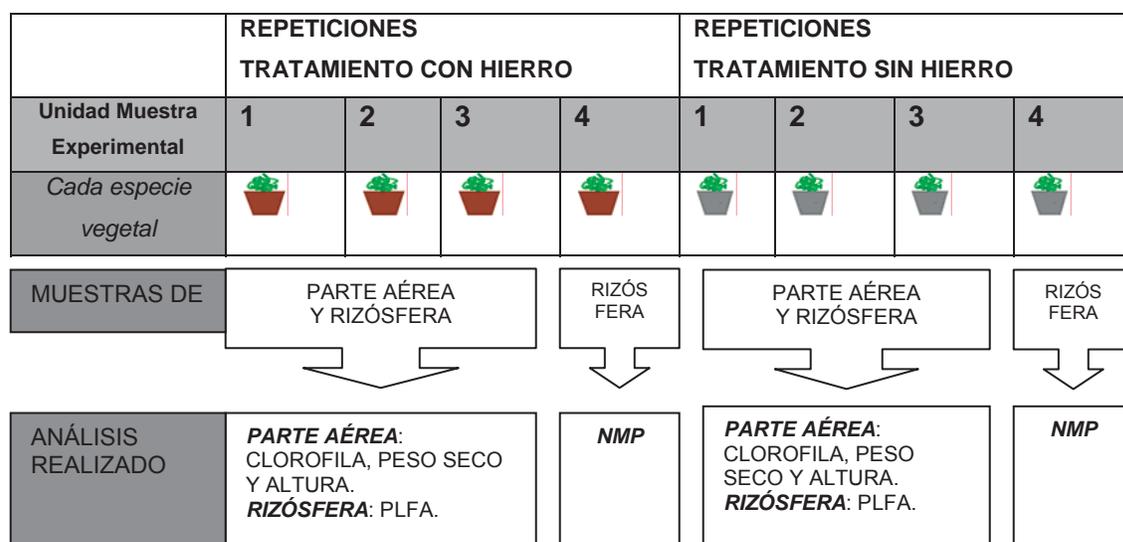


FIGURA 11. Diagrama explicativo del origen de la muestra y los análisis realizados.

La **rizósfera** correspondiente a cada UME se obtuvo de la forma descrita a continuación. Previa ruptura del vaso de polipropileno, se sacudió vigorosamente la planta para eliminar la mayor cantidad de suelo adyacente a las raíces. Mediante un corte se separaron la parte aérea vegetal de las raíces. Estas últimas se sacudieron y limpiaron manualmente con guante estéril para eliminar agregados de suelo grandes no adyacentes al tejido radicular.

Las raíces se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5 cm de longitud y se colocaron en 40 ml de solución salina estéril al 0.85% con agitación vigorosa durante 10 min a temperatura

ambiente. La suspensión obtenida se vació a un tubo Nalgene de capacidad 50 ml y se centrifugó a 8000 rpm por 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y al sedimento obtenido se le consideró el **suelo rizosférico** congelándose a -20°C hasta su análisis. En el caso de la determinación del Número Más Probable de Bacterias Ferriredutoras, el suelo rizosférico no fue congelado y se empleó inmediatamente.

La **parte aérea** de la planta quedó a disposición inmediata para los análisis de altura, peso seco y clorofila foliar.

8. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD VEGETAL PARA ADQUIRIR HIERRO EN UN MEDIO ALCALINO Y SIN MICROORGANISMOS.

Con objeto de determinar la susceptibilidad vegetal a la escasez de hierro en el ambiente radicular, se crecieron las plántulas de las especies vegetales en estudio en agar Hoagland en condiciones de esterilidad. La ausencia de microorganismos permitió comparar la respuesta vegetal en dos condiciones: a) estado de insuficiencia del micronutriente consistente en hacer crecer las plantas en un medio que no contuvo hierro; y b) condición de suficiencia de hierro, obtenida creciendo las plantas en un medio con 45µM Fe(III)-EDTA (Ranieri *et al.*, 2001).

Cada especie vegetal se cultivó por triplicado en frascos con 250 ml de medio Hoagland pH 8.0, constituido por agar bacteriológico al 1%, sales de Hoagland en la concentración descrita en el apartado 5 de Materiales y Métodos, indicador azul de bromotimol al 0.8% y Fe(III)-EDTA 45 µM en los casos de suficiencia del metal.

Las especies se cultivaron durante diez días en la Cámara de Cultivo Percival Intellus Environmental Controller en condiciones constantes de 22°C, humedad del 70%, 16/8 horas luz/oscuridad respectivamente. Al término de ese tiempo, se determinaron las longitudes de las partes aéreas, los pesos secos y las concentraciones de clorofila.

9. DETERMINACIÓN DE ALTURA Y PESO SECO DE LA PARTE AÉREA.

La altura del tejido aéreo se consideró como la distancia en centímetros desde la base del corte de la raíz hasta el extremo apical más lejano.

El peso fresco del mismo material foliar fue determinado hasta obtener peso constante en condiciones de secado de 55°C en estufa; el tiempo aproximado de secado fue de 48 h.

10. DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA FOLIAR.

Se determinó por triplicado la **concentración** de clorofila a y b del tejido foliar de acuerdo al procedimiento descrito por Steubing *et al.* (2002). Brevemente, se pesaron 0.125 g de material foliar de la segunda hoja bajo la hoja bandera. El tejido obtenido se molió con acetona al 80%, se filtró con papel Whatman 4 y el filtrado se aforó a 10 ml con acetona al 80%. La absorbencia de esa solución se midió a 663 nm y a 646 nm en un Espectrofotómetro Beckman D4-530 Life Science UV/VIS.

Simultáneamente, de la misma hoja se obtuvieron por triplicado índices de clorofila empleando el equipo CCI-200. Los resultados fueron correlacionados linealmente con los datos de concentración del análisis con acetona y la ecuación obtenida fue $y=50.902x + 326.2$ con un $R^2=0.9009$.

En el caso de reportar **contenido** de clorofila, se está considerando la cantidad de clorofila encontrada en el total de peso seco de la muestra.

11. CUANTIFICACIÓN DE NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS FERRIREDUCTORAS DESASIMILATORIAS (DIRB).

La determinación del NMP de bacterias se realizó en base a lo descrito por Steubing *et al.* (2002), Weiss *et al.* (2003) y empleando las tablas de enumeración propuestas por *Food and Drug Administration* para 5 repeticiones de diluciones seriadas en 8 tubos. Se empleó la cuarta UME de la siembra hecha en Marzo del 2007, y con la finalidad de tener 2 réplicas, excepcionalmente se incluyó también la cuarta UME de la siembra hecha en Septiembre del 2006.

A partir de 1 g de suelo se realizó la dilución 10^{-1} haciendo el vaciado en 10 ml de agua deionizada estéril. Se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} y se vació en 9 ml de agua deionizada estéril para obtener la dilución 10^{-2} . A partir de ahí se realizaron diluciones seriadas con 0.1 ml que consecutivamente se agregaron a cada uno de los 8 tubos eppendorf de la serie de diluciones, generando así las concentraciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} . Cada tubo eppendorf contenía 0.9 ml de medio nutritivo estéril compuesto por extracto de carne (3 g/L), peptona de caseína (5 g/L) y citrato férrico (0.16 g/L). Por cada gramo de suelo analizado se hicieron 5 series de diluciones (Figura 12).

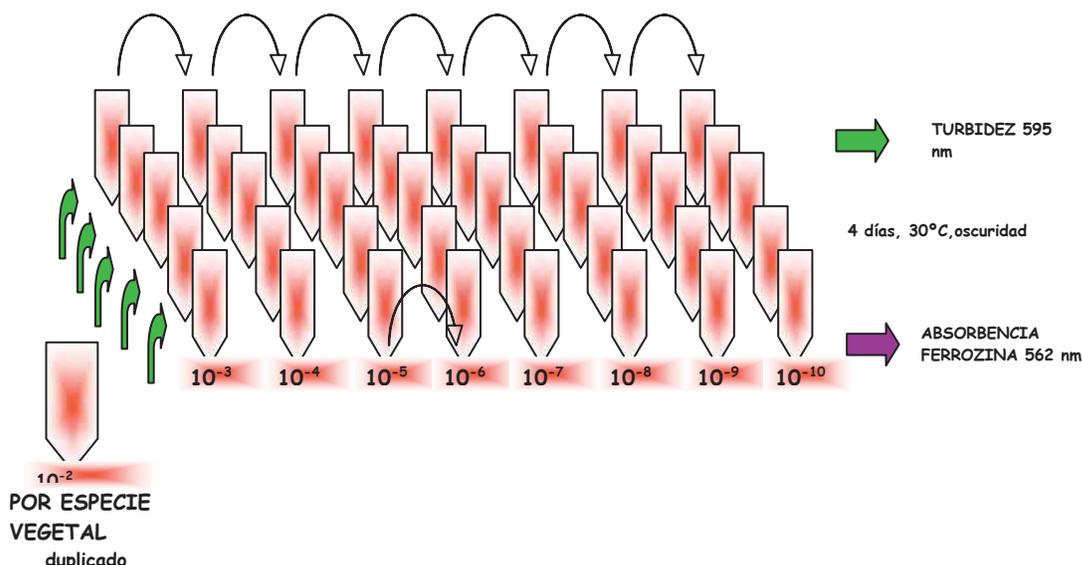


FIGURA 12. Descripción gráfica de las diluciones seriadas que permitieron obtener el NMP de bacterias ferrireductoras desasimilatorias. En cada caso se realizó todo el procedimiento por duplicado.

Los tubos se incubaron por 4 días a 30°C en la oscuridad, y al término del plazo, se realizaron lecturas en el Espectrofotómetro Beckman D4-530 Life Science UV/VIS a 595 nm para leer la turbidez de 0.9 ml del contenido de cada tubo, y a 562 nm para leer la absorbancia a ferrozina del 0.1 ml restante de cada tubo eppendorf. Éste último análisis consistió en colocar en la celda de lectura del espectro, 0.1 ml del medio de cultivo y adicionarle 0.9 ml de solución de ferrozina pH 7.0, preparada previamente con 1 g de ferrozina en 1 L de solución de HEPES al 0.1M. Los controles de lectura espectrofotométrica para la longitud de onda de 595 nm fué el medio de cultivo descrito, mientras que para 562 nm se utilizó 0.1 ml del mismo medio de cultivo estéril disuelto en 0.9 ml de solución de ferrozina.

El Número Más Probable de Bacterias Ferrireductoras se obtuvo con el cociente micromoles de Fe^{+2} en el medio/ Absorbancia $\lambda: 595$, y la posterior aplicación de la Tabla *For eighth tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula* publicada por U.S. Food and Drug Administration en Bacteriological Analytical Manual On Line. Se consideró positivo el tubo que presentó una ferrireducción mayor a 50 micromoles de Fe^{+2} /Absorbancia a 595 nm⁷. A partir de los tubos positivos se obtuvo el NMP de DIRB/g de rizósfera (Duarte-Sotelo, 2004).

Por su parte, los micromoles de Fe^{+2} en el medio de cultivo se obtuvieron empleando la ecuación $micromoles Fe^{+2}=(6 \times 10^{-5})(Absorbancia_{\lambda:562})-(6 \times 10^{-7})$ obtenida de una curva de calibración con soluciones ferrosas concentración conocida.

Este análisis no permitió determinar con certeza si las DIRB cuantificadas eran del tipo respiratorio o fermentativo. Se sabe que las condiciones de cultivo facilitarían el desarrollo de las DIRB fermentativas pero no se puede descartar la posibilidad de presencia de DIRB respiratorias de hierro. Por ello en lo sucesivo solamente se hará referencia al término DIRB.

⁷ obtenido del punto de inflexión resultado de ordenar todos los datos.

12. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS DE FOSFOLÍPIDOS Y GLUCOLÍPIDOS A PARTIR DE LA RIZÓSFERA.

Para efectuar este análisis todo el material fue lavado dos veces de acuerdo a la siguiente secuencia: con agua corriente y detergente libre de fosfatos (Hyclin), enjuagado con agua de garrafón, posteriormente con agua desionizada y al final con una solución de etanol al 80%.

El material de cristalería fue quemado en flama directamente con un mechero bunsen, mientras que el material plástico se dejó secar al ambiente.

De forma condensada, la extracción de los metil ésteres de ácidos grasos (FAME *fatty acids methyl ester* por sus siglas en inglés) consistió en los siguientes pasos: a) obtención de un extracto crudo de lípidos a partir del suelo; b) separación de fosfolípidos de los glucolípidos y los lípidos neutros; y c) transesterificación alcalina. Una vez obtenida la muestra purificada se llevó a cabo la inyección en el Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (CG-EM).

La extracción de FAME de Fosfolípidos de la rizósfera congelada se llevó a cabo de acuerdo al protocolo establecido por Keinänen *et al.* (2003) y de manera específica consistió en lo siguiente. Primeramente, la rizósfera se mezcló por 20 horas con el buffer de extracción (Cloroformo, Metanol, Buffer de Citrato 0.15 M pH 4.0 preparada en proporción 1: 2: 0.8 v/v/v). Posteriormente se sonicó por 20 minutos, se centrifugó a 8,000 rpm por 10 min y se apartó el sobrenadante en un tubo limpio que se mantuvo en refrigeración y oscuridad. El precipitado de suelo se mezcló nuevamente con buffer de extracción por dos h, y al término se volvió a sonicar y centrifugar; el nuevo sobrenadante se juntó con el anterior. Las partículas de suelo suspendidas en el sobrenadante se eliminaron por filtración con papel Whatman 40, y el filtrado se evaporó en rotavapor casi a sequedad. Se redisolvió con solución 2:1 metanol/cloroformo para posteriormente hacerse pasar por una columna de ácido silícico previamente activado a 120°C. En este orden se adicionaron, cloroformo para eluir los lípidos neutros, acetona para eluir los glucolípidos y metanol para obtener los fosfolípidos.

Las fracciones eluidas de fosfolípidos y glucolípidos se evaporaron con N₂(g) grado cromatográfico. La obtención de FAME's se efectuó con diclorometano y KOH metanólico a 90°C por diez min; a la par se adicionaron 50 microlitros de una solución 1.279 mM del estándar

metil nonadecanoato en hexano. Se enfriaron las muestras y se les adicionó 1 ml de tricloruro de boro en metanol por diez minutos a 90°C. La extracción de FAME's se realizó en dos pasos, el primero consistió en adicionar una mezcla de agua y hexano a la muestra, y el segundo en separar la fase orgánica anterior por medio de una pipeta pasteur, para después filtrarla en una columna de Na₂SO₄ y eliminar así el agua remanente. Las muestras se evaporaron con N₂(g) y se refrigeraron hasta su análisis. Para efectuar éste último, se redisolvió la muestra en 25 microlitros de isooctano y se inyectaron 2 microlitros al CG-EM. Las características de la columna fueron 30 m de longitud, 320 micrómetros de diámetro y espesor de fase 0.25 micrómetros. El inyector funcionó a 200°C, presión 11.99 psi, flujo total de 19.9 mL/min, condición split 15 ml/min, flujo de columna 1.50 ml/min. En el horno permaneció la muestra 25.66 min en total a temperatura inicial de 150°C por 4 min, con rampa de 3°C/min hasta llegar a 200°C para permanecer ahí cinco min más. La columna tuvo un flujo de 1.5 ml/min y el detector permaneció a 250°C. Las condiciones de postcorrida fueron 230°C por tres min.

Se obtuvo una muestra de Fosfolípidos y una de Glucolípidos por cada UME. En total se inyectaron doce muestras por cada especie vegetal pertenecientes a: tres repeticiones de fosfolípidos y tres repeticiones de glucolípidos de las plantas tratamiento sin hierro; e igual número de repeticiones para las plantas del tratamiento con hierro.

En el momento de comparar los resultados obtenidos entre metil ésteres de ácidos grasos de fosfolípidos y de glucolípidos, se encontró que existían una gran cantidad de ácidos grasos en común y se decidió sumarlos en vez de analizarlos por separado, por lo tanto en lo sucesivo cuando se haga referencia a PLFA se referirá a la suma de estas dos variables.

13. NOMENCLATURA DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS.

Los PLFA (*phospholipid fatty acid*) son identificados en este trabajo bajo la siguiente nomenclatura: primero se indica (si lo hay) la posición del grupo metil o la presencia de un ciclo, con las abreviaturas X-Me y cy respectivamente, donde X corresponde a la posición del grupo metil; posteriormente se indica con número la cantidad de átomos de carbono separados por dos puntos (:) del número que indique la cantidad de dobles enlaces. Enseguida se anota la letra ω y después la posición de la primera insaturación a partir de la posición omega o de carbono alifático. La columna utilizada en el Cromatógrafo de Gases permitió identificar la isomería trans o cis en los dobles enlaces, la cual se representa con las letras *t* o *c*.

En total, el CG-EM generó una base de datos de 88 PLFA's, la cual fue depurada eliminando picos de metil ésteres mal definidos en el cromatograma y excluyendo metil ésteres que únicamente estuvieron presentes en una de las tres repeticiones. En la Tabla 5 se indican los 36 PLFA's con los que se continuó trabajando.

TABLA 5. PLFA's totales reportados por el Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas.

cy-17:0	18:2 ω 6cc	10-Me-17:0	12-Me-14:0
cy-19:0	18:2 ω 3cc	14-Me-16:0	18:1 ω 7
12:0	17:0	18:2 ω 6t	16:1 ω 5
16:1 ω 7c	18:1 ω 9t	18:3 ω 3ccc	15-Me-16:1 ω 5
20:0	23:0	10-Me-11:0	25:0
16:0	24:0	12-Me-13:0	18:2 ω 4
18:0	18:2 ω 6	14-Me-15:0	18:2 ω 5
18:1 ω 9c	14-Me-17:0	16-Me-17:0	18:2 ω 7
16:1 ω 9	21:0	15:0	22:0

De ellos sólo 18 fueron utilizados como biomarcadores bacterianos rizosféricos (Tabla 6), y la eliminación de los 18 restantes fue debida a que su presencia es indicativa de células eucariotas. Los biomarcadores utilizados refieren a los grupos de: bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, actinomicetos y AGSA ó ácidos grasos sin asociación bacteriana específica reportada. El ácido graso 16:0 representa la biomasa microbiana, ya que se parte del

supuesto de que la adición de fungicida en las UME, disminuyó la población de hongos y por consiguiente la cuantificación de este ácido graso puede ser considerada como propia de la población bacteriana.

TABLA 6. PLFA bacterianos usados como biomarcadores en este trabajo.

biomarcador BIOMASA TOTAL ^a	biomarcador GRAMNEGATIVOS ^b	biomarcador GRAMPOSITIVOS ^c	biomarcador ACTINOMICETOS ^d	biomarcador AGSA ^e
16:0	16:1 ω 7c cy 17:0 cy 19:0 18:1 ω 7t	14-Me-17:0 12-Me-13:0 14-Me-15:0 16-Me-17:0 14-Me-16:0 12-Me-14:0 18:1 ω 9t	10-Me-17:0 10-Me-11:0	15:0 17:0 15-Me-16:1 ω 5t 16:1 ω 9c

a Kidd Haack *et al.*, 1994; Zelles, 1999.
b Keinänen *et al.*, 2003 a; Keinänen *et al.*, 2003 b; Piotrowska-Seget y Mrozik, 2003; Butler *et al.*, 2003; Dierksen *et al.*, 2002; Kidd Haack *et al.*, 1994.
c Keinänen *et al.*, 2003 a; Keinänen *et al.*, 2003 b; Piotrowska-Seget y Mrozik, 2003; Butler *et al.*, 2003; ; Keinänen *et al.*, 2002; Dierksen *et al.*, 2002.
d Piotrowska-Seget y Mrozik, 2003.
e Ácido graso sin asociación bacteriana específica reportada

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico entre dos diferentes tratamientos se realizaron pruebas t de Student con nivel de significancia estadística de 0.05. Para el análisis estadístico entre tres o más tratamientos se llevó a cabo un análisis de varianza con Prueba de Tukey y un nivel de significancia de 0.05 mediante el programa Statistica.

El Análisis de Componente Principal se llevó a cabo empleando el Programa JMP 6.0.0. Consiste en una aproximación estadística que analiza interrelaciones entre un gran número de variables en términos de sus dimensiones subyacentes comunes (Hair *et al.*, 1999).

En el caso del número más probable las barras representan los límites de los intervalos de confianza establecidos por las Tablas FDA.

V. RESULTADOS.

1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD VEGETAL PARA ADQUIRIR HIERRO EN UN MEDIO ALCALINO Y SIN MICROORGANISMOS.

Para obtener información solamente de la actividad vegetal fue necesario excluir la actividad microbiana; para ello y como parte del establecimiento del sistema experimental, se compararon las respuestas vegetales de especies Estrategia I y II para adquirir hierro de un medio alcalino y sin microorganismos. El experimento *in vitro* se efectuó con plantas control crecidas en agar sin hierro (0 μM de Fe(III)-EDTA) y plantas colocadas en agar con suficiencia del metal (representada por 45 μM de Fe(III)-EDTA). A los diez días de crecimiento, se compararon las siguientes respuestas vegetales a ambos tratamientos: concentración de clorofila, altura de la parte aérea vegetal y peso seco aéreo. Particularmente debe recordarse que debido a que la perturbación de la homeostasis vegetal de hierro puede causar una disminución en la biosíntesis de la clorofila (clorosis férrica) (Norman, 1980) y una inhibición del crecimiento (Bauer y Berezky, 2003; Azcón-Bieto, 2003), el contenido de clorofila fue considerado como un parámetro de la suficiencia o insuficiencia en la absorción de hierro.

Los resultados de concentración de clorofila a y b por gramo foliar son mostrados en la Figura 13. En ella se observa que las especies Estrategia II maíz y trigo crecidas en suficiencia de hierro, muestran un aumento estadísticamente significativo en la concentración de clorofila foliar respecto a la condición de insuficiencia. Esto es, dichas plantas produjeron más clorofila en un medio con suficiente hierro donde ni la ausencia de microorganismos ni el pH alcalino resultó ser un impedimento para la adquisición del metal. Cabe recordar que la Estrategia II de adquisición del hierro involucra la liberación extracelular de sideróforos y que este mecanismo no es dependiente de pH, lo cual es coincidente con los resultados. De lo anterior se puede inferir que ni el trigo ni el maíz requirieron de microorganismos rizosféricos para adquirir el hierro del medio a los 10 días de crecimiento vegetal.

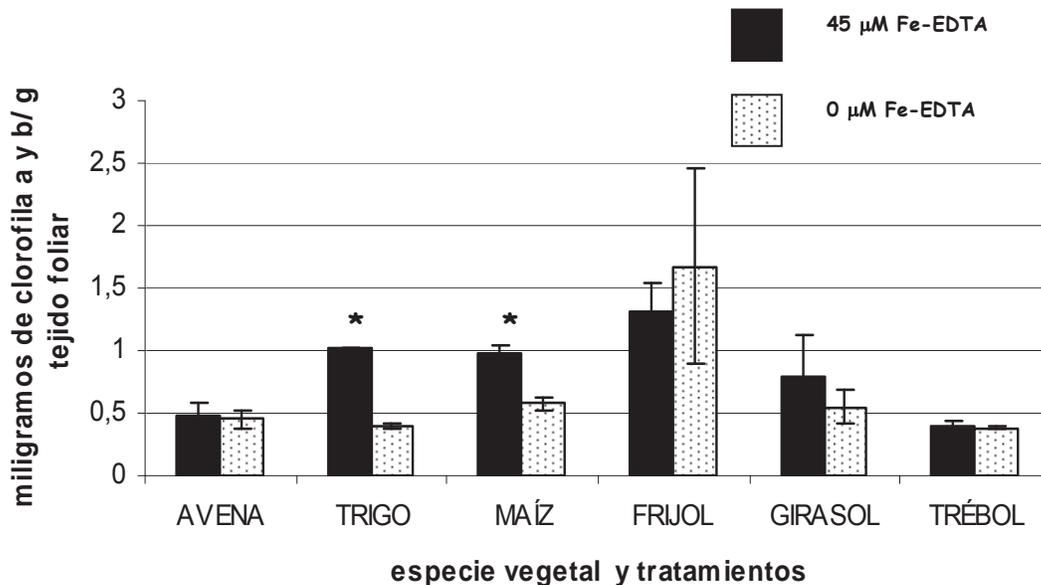


FIGURA 13. Concentración de clorofila a y b por gramo de tejido foliar en plantas crecidas por 10 días en agar con sales Hoagland a pH 8.0 y sin microorganismos. Las barras representan la desviación estándar de 3 repeticiones y los asteriscos las diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, obtenidas por t de Student y un nivel de significancia de 0.05.

En otro sentido, la concentración foliar de clorofila en avena (planta Estrategia II), frijol, trébol y girasol (plantas Estrategia I) fue estadísticamente igual en ambos tratamientos; es decir, sin importar la cantidad de hierro presente en el agar, las plantas produjeron clorofila de forma deficiente. Esa deficiencia en la absorción podría estar relacionada o bien con la ausencia de microorganismos rizosféricos facilitadores de la absorción vegetal del hierro, o con el pH alcalino del medio (recordando que el mecanismo de las plantas Estrategia I funciona de forma óptima a un pH cercano a 5.5 y que se inhibe en pH alcalino) (Connolly *et al.*, 2003), o bien, con una abundante reserva de hierro en la semilla que no propicia la adquisición del hierro proveniente del entorno.

La medición de la altura y el peso seco vegetales permitió tener más información respecto a dichas posibilidades (Figuras 14 y 15, respectivamente). El maíz, el trigo y la avena muestran

un aumento estadísticamente significativo en su altura y peso seco respecto a la condición de insuficiencia, lo cual es indicativo de que sin microorganismos y a pH alcalino las raíces absorbieron los nutrientes del medio para generar mayor biomasa vegetal. En estas mediciones, los resultados para avena son similares a los de el maíz y el trigo, lo cual descarta que el pH alcalino haya sido un impedimento ambiental para absorber nutrientes y crecer; también descarta que la semilla haya sido la única fuente nutricional. Sin embargo, con base en las mediciones de clorofila, parece factible que la ausencia de microorganismos rizosféricos en la avena sea la causa por la cual la planta no adquirió eficientemente el hierro del medio. Ello significaría que para esta especie vegetal los microorganismos rizosféricos participan de alguna forma en la absorción del metal.

Respecto a las plantas Estrategia I frijol, girasol y trébol, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en altura y peso seco entre los dos tratamientos. Una razón para esa respuesta es que el pH alcalino afectó la absorción del metal. La posibilidad de que exista una fuente de hierro muy abundante en las semillas⁸ de plantas Estrategia I y que por esa razón las plantas no hayan adquirido el metal del entorno tampoco puede descartarse con los experimentos realizados. De igual manera no es posible determinar hasta este punto, si los microorganismos rizosféricos favorecen la absorción de hierro en girasol, trébol y frijol.

La hipótesis del presente trabajo se basa en respuestas vegetales dependientes de la Estrategia vegetal para adquirir el hierro. Los resultados de este primer experimento mostraron que las respuestas vegetales son distintivas entre las dos Estrategias y por ello se consideró viable el proseguir con la siguiente fase experimental.

⁸ Moraghan *et al.* (2002) reportó una concentración de hierro en semilla de frijol de entre 70 a 100 ppm en peso seco. Longnecker y Welch (1990) reportó para la semilla de girasol un promedio de 36 ppm de hierro en peso seco. Mengel (2001) reportó para la semilla de avena un promedio de 53 ppm de hierro en peso seco.

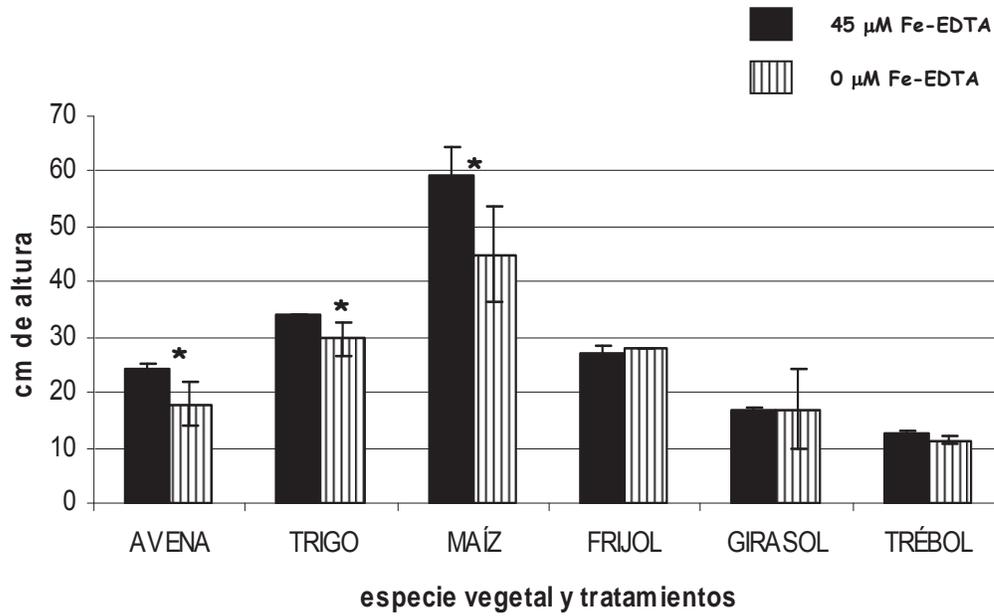


FIGURA 14. Altura de plantas crecidas en agar con sales Hoagland a pH 8.0 y sin microorganismos a los 10 días. Las barras representan la desviación estándar de 3 repeticiones y los asteriscos las diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, obtenidas por t de Student y un nivel de significancia de 0.05.

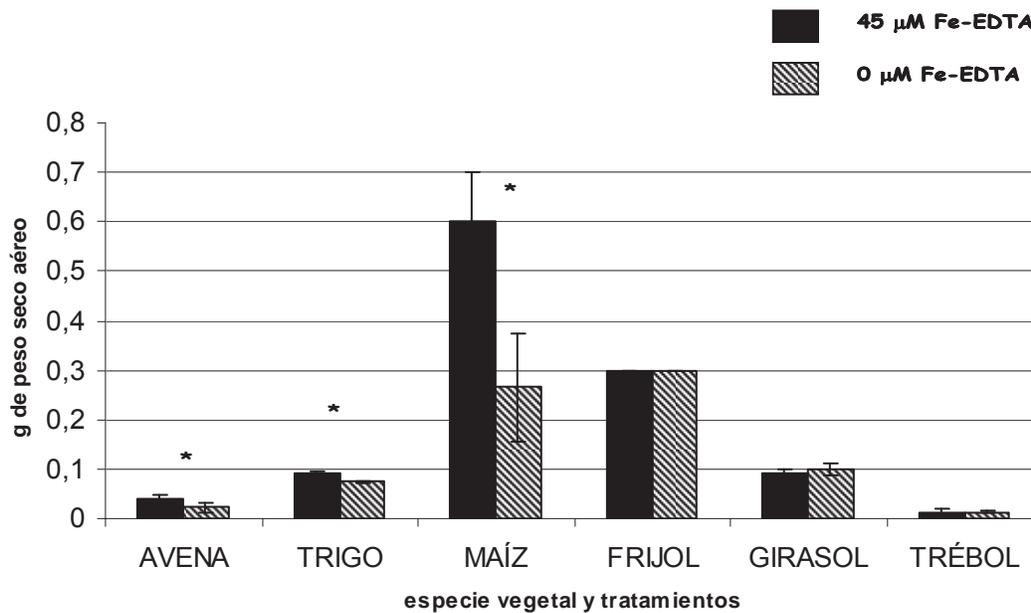


FIGURA 15. Peso seco de plantas crecidas en agar con sales Hoagland a pH 8.0 y sin microorganismos a los 10 días. Las barras representan la desviación estándar de 3 repeticiones y los asteriscos las diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, obtenidas por t de Student y un nivel de significancia de 0.05.

2. ANÁLISIS DE COMPONENTE PRINCIPAL DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS.

Un análisis de componente principal (ACP) permite obtener una representación espacial de numerosos datos agrupándolos bajo nuevas variables llamadas componentes principales; éstas últimas subrayan las similitudes y las diferencias entre los datos. Con la finalidad de comparar el perfil lipídico de las rizobacterias entre las diferentes especies vegetales estudiadas y con ello distinguir diferencias por Estrategias vegetales, se procedió a la aplicación de un ACP. Éste último permitió visualizar estadísticamente a todas las variables con el fin de discernir de forma global la presencia de agrupaciones. Las variables en este caso fueron las 3 repeticiones de todos los PLFA bacterianos reportados en la Tabla 7.

La Figura 16 muestra el resultado del ACP obtenido con el programa JMP 6.0.0. donde el porcentaje de variación explicable por el Componente Principal 1 fue de 38.64%, por el Componente Principal 2 fue de 19.04% y por el Componente Principal 3 de 16.11%. En dicha Figura se observa que en los casos del trébol, el frijol y el maíz, existe una cercanía espacial entre los puntos que representan a las tres repeticiones, lo cual es indicativo de un perfil de PLFA muy homogéneo entre repeticiones. Para esas mismas plantas fue notoria la proximidad al control o suelo no rizosférico, con lo que podría establecerse que el efecto de los exudados de raíz del trébol, el frijol y el maíz, no modificó de forma importante el tipo y cantidad de PLFA bacterianos rizosféricos. Para la avena, el girasol y el trigo es evidente una heterogeneidad entre las repeticiones; lo cual es indicativo de un efecto vegetal sobre la CBR diferente entre las repeticiones. Asimismo se observa que: a) la cantidad y tipo de PLFA son diferentes a los del suelo no rizosférico o control (lejanía entre los puntos); y b) la cantidad y tipo de PLFA de estas tres especies vegetales permite distinguirlas muy bien entre ellas mismas (la agrupación es marcada por un óvalo en la Figura 16). Puede entonces decirse que la respuesta vegetal de la avena, el trigo y el girasol fue notoria y es caracterizada en cada caso por la presencia de los PLFA siguientes: avena = 15:0, 15-Me-16:1 ω 5 (el primero característico de Eubacteria y el segundo de AGSA); trigo = 17:0, cy-17:0 (el primero característico de Eubacteria y el segundo de bacterias gramnegativas); girasol= cy-19:0, 16:1 ω 9c, 14-Me-17:0 (el primero característico de gramnegativas, el segundo de AGSA y el tercero de grampositivas). Los ácidos grasos anteriores fueron señalados por el programa tanto de forma gráfica (Figura 17) como por sus porcentajes en cada componente principal.

Con los resultados anteriores puede establecerse que en base al ACP, la Estrategia vegetal para adquisición de hierro no es un factor determinante en el perfil de PLFA bacterianos rizosféricos.

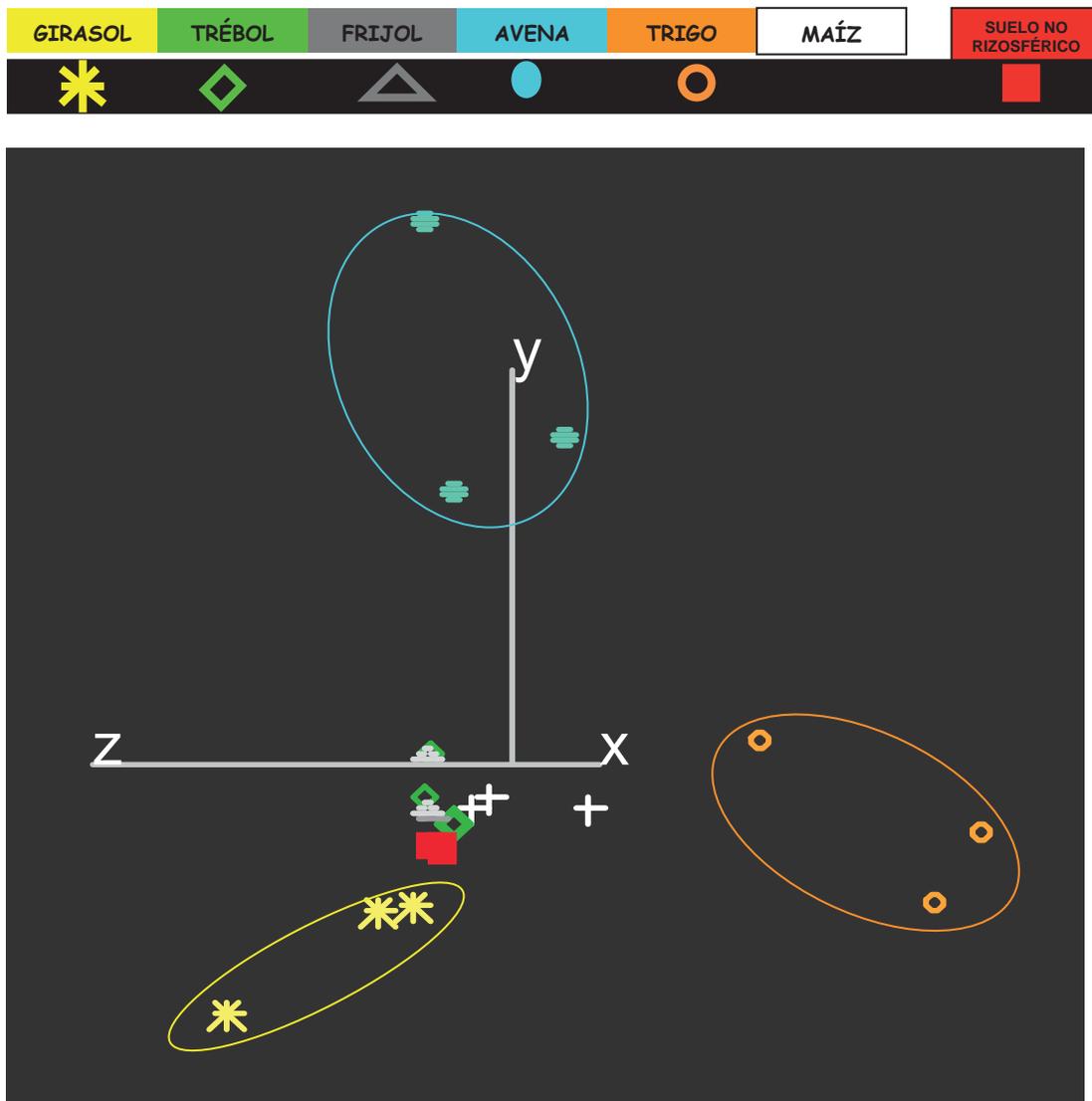


FIGURA 16. Resultado del Análisis de Componente Principal efectuado con las repeticiones de los promedios indicados en la Tabla 7. Agrupaciones características por especie vegetal. Los óvalos muestran el agrupamiento distintivo para girasol, avena y trigo. Las estrellas representan al girasol, los círculos vacíos al trigo, los círculos llenos a la avena, los triángulos al frijol, las cruces al maíz, los rombos al trébol y los cuadrados al control. CP1: 38.64%; CP2: 19.04% y CP3: 16.11%.

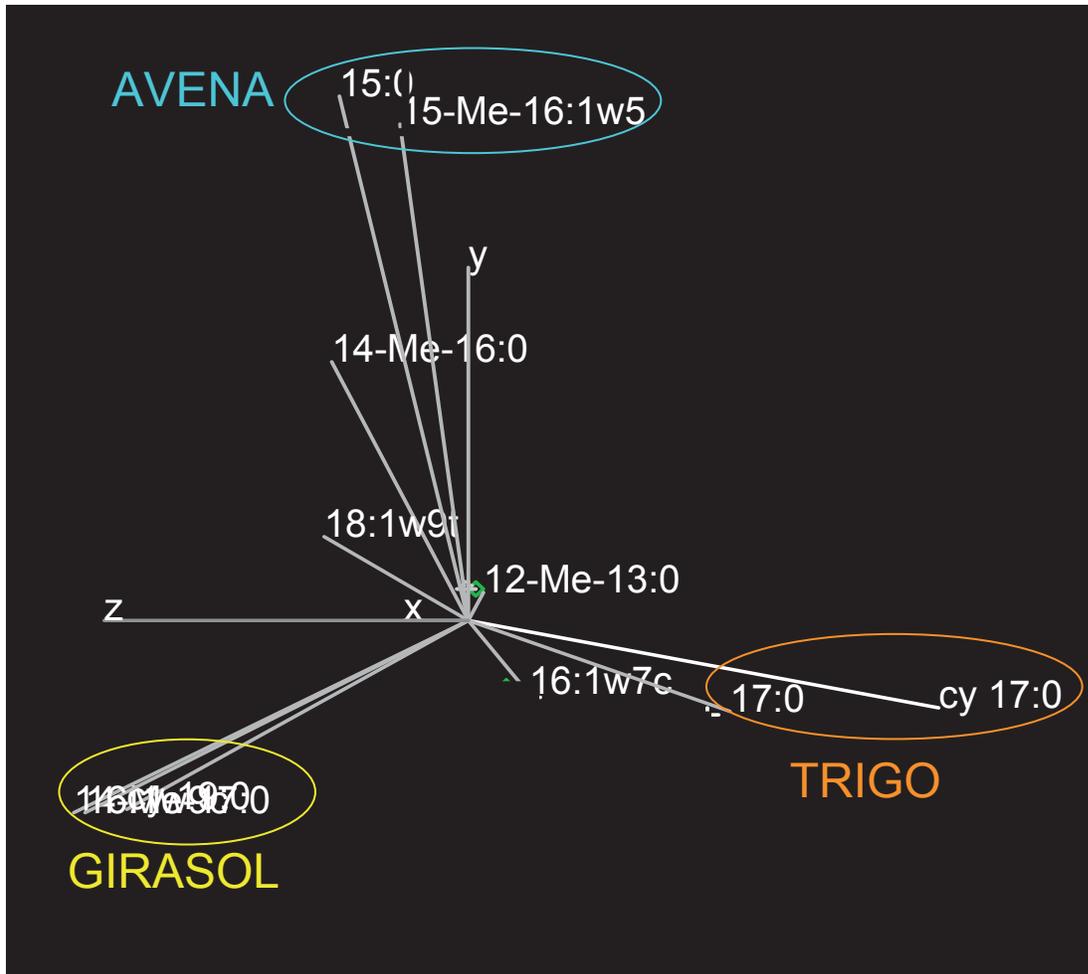


FIGURA 17. Resultado del Análisis de Componente Principal efectuado con las repeticiones de los promedios indicados en la Tabla 7. PLFA's característicos por especie vegetal. Se remarca la distribución de los metil ésteres de los ácidos grasos para avena, girasol y trigo. CP1: 38.64%; CP2: 19.04% y CP3: 16.11%.

TABLA 7. Promedios de tres repeticiones de los microgramos de PLFA`s extraídos por gramo de rizósfera. Los datos refieren plantas crecidas por 45 días en un suelo alcalino y sin haber recibido fertilización foliar con hierro; el control corresponde a suelo no rizosférico. Entre paréntesis se reporta la desviación estándar para cada caso.

PLFA	PROMEDIO (desv. estándar.)	TRIGO	MAÍZ	GIRASOL	TRÉBOL	FRIJOL	CONTROL
	PROMEDIO (desv. estándar.)						
CY-17:0	0	0,1583 (0.02)	0	0	0	0	0
CY-19:0	0	0	0	0,2532 (0.19)	0	0	0
16:1 ω 7c	0,1530 (0.04)	0,3651 (0.06)	0,0723 (0.06)	0,3283 (0.10)	0,0649 (0.05)	0	0,0039 (0.003)
18:1 ω 7t	0	0	0	0	0	0	0
14-Me-17:0	0	0	0	0,180 (0.02)	0	0	0
14-Me-16:0	0,2154 (0.19)	0,2307 (0.17)	0,1547 (0.11)	0,2589 (0.02)	0,0532 (0.02)	0,0893 (0.07)	0,0068 (0.006)
12-Me-13:0	0,1829 (0.12)	0,3564 (0.07)	0	0,2999 (0.05)	0	0,0318 (0.02)	0,0040 (0.003)
14-Me-15:0	0,0878 (0.06)	0	0,3325 (0.48)	0,0612 (0.05)	0	0,4823 (0.44)	0
16-Me-17:0	0	0	0	0	0	0,1010 (0.08)	0
12-Me-14:0	0	0	0	0	0	0	0
18:1 ω 9t	0,9837 (0.53)	1,2506 (0.38)	0,9041 (0.79)	1,4980 (0.28)	0,3266 (0.09)	0,2082 (0.02)	0,0743 (0.03)
10-Me-17:0	0	0	0	0	0	0	0
10-Me-11:0	0	0	0	0,620 (0.07)	0,0947 (0.02)	0	0
17:00	0,0471 (0.05)	0,1086 (0.09)	0,0835 (0.06)	0,0568 (0.02)	0	0	0,0031 (0.001)
15:00	0,0855 (0.10)	0	0	0	0,0220 (0.02)	0,0144 (0.01)	0
15-Me-16:1 ω 5	0,0538 (0.05)	0	0	0	0	0	0
16:1 ω 9c	0	0	0	0,0535 (0.04)	0	0	0
16:00	1,1572 (0.59)	1,4498 (0.34)	1,3922 (0.78)	1,8221 (0.69)	0,4186 (0.22)	0,2096 (0.36)	0,0639 (0.01)

3. ANÁLISIS POR VARIABLE INDEPENDIENTE DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS.

Los exudados de raíz de las plantas modifican la composición de la comunidad bacteriana rizosférica (Cardon y Gage, 2006; Dakora y Phillips, 2002; Barea *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005). Por ello se infiere que el perfil bacteriano rizosférico obtenido por el análisis de los ácidos grasos PLFA será el reflejo de la actividad vegetal. Los ácidos grasos permitieron evaluar las siguientes variables independientes: biomasa, bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, actinomicetos y AGSA.

La extracción de los PLFA se llevó a cabo a los 45 días de crecimiento vegetal, y las moléculas empleadas como biomarcadores bacterianos para describir las variables independientes mencionadas, son listadas en la Tabla 6 de Materiales y Métodos. La biomasa fue reportada como los microgramos de metil éster de ácido graso 16:0 presente en cada gramo de rizósfera y el comparativo entre rizósferas es mostrado en la Figura 18.

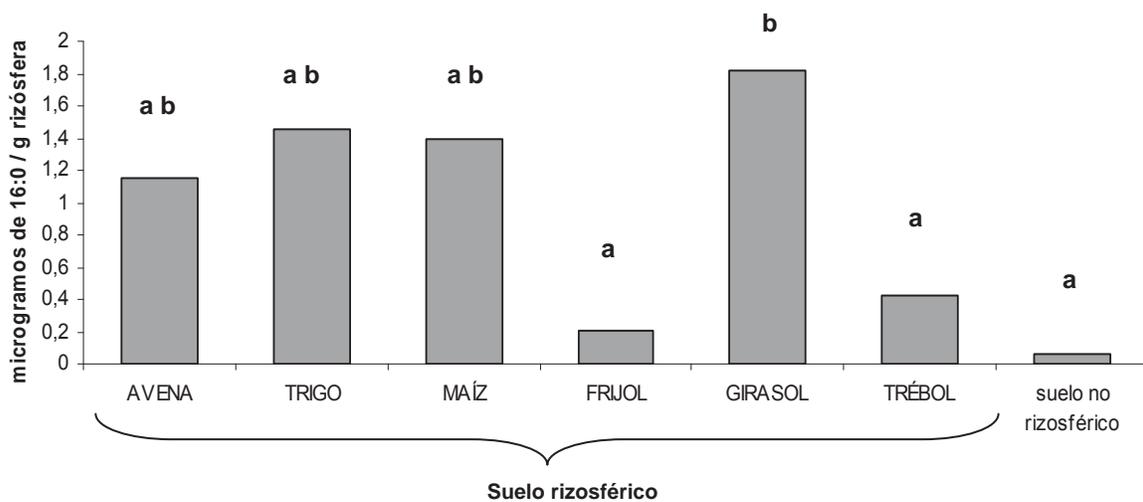


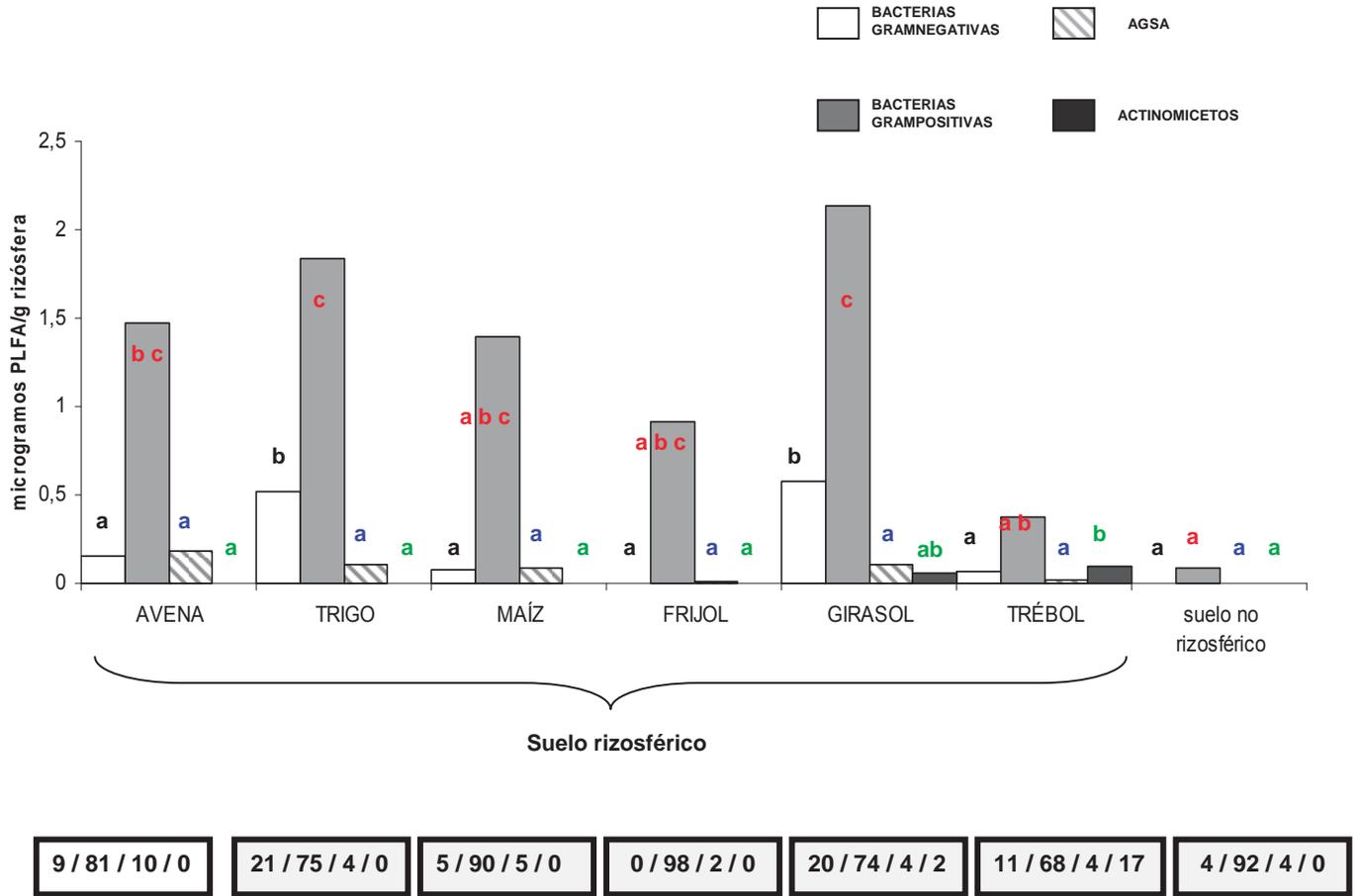
FIGURA 18. Microgramos de metil éster del ácido graso 16:0 usado como biomarcador para biomasa. Las letras representan las diferencias estadísticas significativas del comparativo de medias realizado por ANOVA y Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

Se puede apreciar que respecto al suelo no rizosférico representado por el control, las rizósferas de avena, trigo, maíz y girasol tuvieron un incremento en biomasa bacteriana; aunque solo en el caso del girasol fue estadísticamente significativa.

Las especies Estrategia II tuvieron una biomasa similar entre ellas, del orden de 1.3 $\mu\text{g/g}$ rizósfera, mientras que en las plantas Estrategia I, el girasol superó en biomasa bacteriana en más de cuatro veces al trébol y nueve veces al frijol.

Otro comparativo entre variables independientes es resumido en la Figura 19 y permite visualizar un perfil de la **composición** bacteriana rizosférica (bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, actinomicetos y AGSA) para cada especie vegetal en estudio. En todos los casos las bacterias grampositivas son las más abundantes. Respecto a la **riqueza** bacteriana rizosférica, en el trigo y el girasol hubo un incremento estadísticamente significativo de bacterias gramnegativas (barras blancas); y en avena, trigo y girasol hubo un incremento estadísticamente significativo de bacterias grampositivas (barras grises). La sumatoria de los AGSA no fue en ningún caso diferente a la del control, no obstante de manera separada los PLFA 17:0, 15:0, 15-Me-16:1 ω 5 y 16:1 ω 9c son característicos de determinadas rizósferas estudiadas como se hizo notar con el ACP. Los actinomicetos sólo fueron detectados en las rizósferas de girasol y trébol, y sólo en la última especie vegetal existió un incremento estadísticamente significativo respecto al control. En lo concerniente a la **estructura** de la CBR, en la parte inferior de la Figura 19 se muestran los recuadros que indican las proporciones comparativas entre las variables independientes. Cada número corresponde al porcentaje con que esa variable participa en el total de PLFA's extraídos en esa especie vegetal.

El comparativo de los perfiles de composición bacteriana o de las proporciones, no muestran las similitudes y diferencias esperadas entre plantas Estrategia I y plantas Estrategia II. En otras palabras, la Estrategia en la adquisición del metal no parece ser determinante en el perfil lipídico que compone la CBR.



ESTRUCTURA DE LA CBR (abundancia relativa %)

FIGURA 19. Microgramos de metil éster de ácidos grasos biomarcadores para grupos bacterianos específicos (bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, actinomicetos y PLFA sin asociación bacteriana reportada). Las letras representan las diferencias estadísticas significativas del comparativo de medias realizado por ANOVA y Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. En la parte inferior se reportan las abundancias relativas en % respecto al total de PLFA's rizosféricos para esa especie vegetal.

4. CUANTIFICACIÓN DE NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS FERRIREDUCTORAS DESASIMILATORIAS (DIRB).

Diferentes técnicas para enumerar y aislar las DIRB han sido desarrollados; el método más comúnmente empleado es la enumeración por NMP ya que su aplicación no es obstruida por la insolubilidad del Fe^{+3} (Nielsen *et al.*, 2002).

El análisis del NMP de rizobacterias ferriredutoras desasimilatorias tuvo como finalidad distinguir la capacidad bacteriana de ferrireducir Fe^{+3} a Fe^{+2} en las rizósferas de plantas cultivadas por 45 días. Se partió de la consideración de que la existencia de una mayor capacidad ferriredutora en las rizósferas estudiadas, permitiría incrementar la concentración de Fe^{+2} en el medio y por lo tanto favorecer la disponibilidad del metal hacia el vegetal. De esta forma, una rizósfera con mayor número de DIRB se vería favorecida por la mayor disponibilidad de hierro reducido.

Transcurridos los 45 días de cultivo de las especies vegetales bajo el esquema descrito en Materiales y Métodos, se llevó a cabo la obtención de muestras rizosféricas para este análisis. En la Figura 20, el suelo no rizosférico o control representa la cantidad de DIRB localizadas en el suelo sin actividad vegetal. A partir de ese nivel (identificado por la línea punteada), las rizósferas de avena, girasol y trébol mostraron un incremento estadísticamente significativo que revela que la actividad vegetal radicular convivió con una CBR en donde las DIRB estaban en concentración mayor. Esto es, la cantidad de rizobacterias ferriredutoras desasimilatorias en esas rizósferas sería capaz de permitir una disposición importante de Fe^{+2} a la planta y con ello favorecer la absorción del micronutriente. Este resultado coincide con los mostrados en la Figura 13, en donde se observa que la avena tuvo una concentración de clorofila baja, aún estando en agar con suficiente hierro disponible pero sin presencia de microorganismos rizosféricos. La asociación de estos dos resultados permite suponer que en el caso de la avena, la participación de las DIRB fue importante para el desarrollo vegetal.

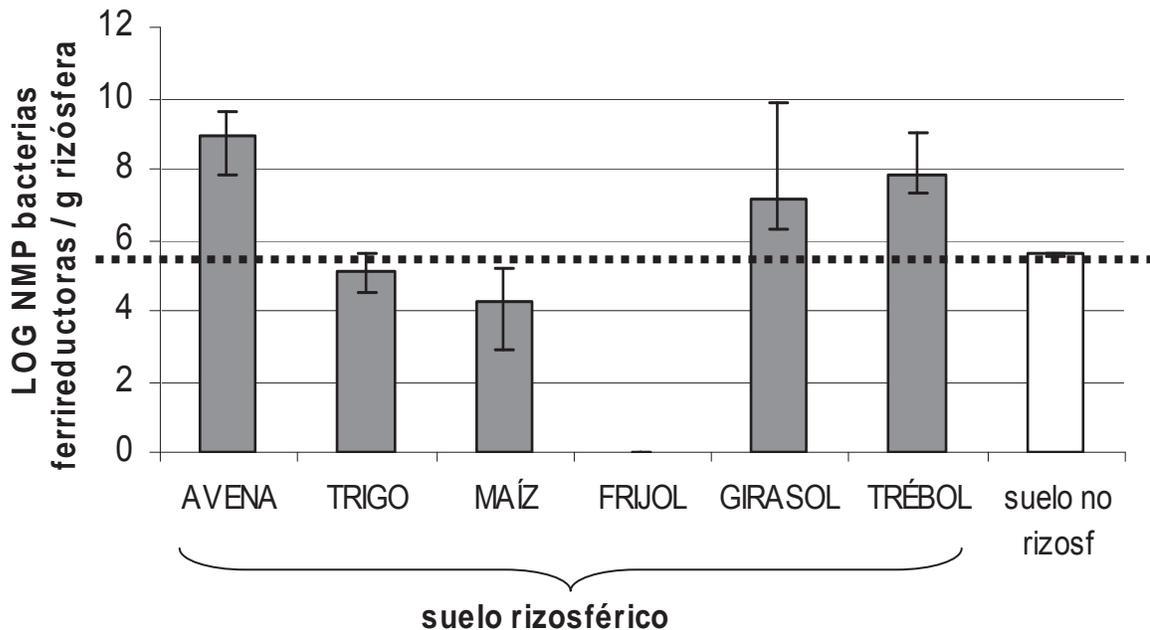


FIGURA 20. Número Más Probable de las DIRB por gramo de rizósfera de plantas crecidas en suelo alcalino y que no fueron fertilizadas foliarmente. Las barras representan los límites de los intervalos de confianza del 95% establecidos por la FDA. La línea punteada horizontal representa el nivel de IRB encontrado en el suelo no rizosférico.

En los casos del maíz y el trigo parecería que las rizobacterias ferriredutoras desasimilatorias no desarrollaron un papel importante en lo que respecta a la promoción del crecimiento vegetal debido a el NMP de DIRB es muy similar al del suelo control. Estos resultados coinciden también con los mostrados en la Figura 13. Para el caso del frijol, la posibilidad de que la planta aún se haya encontrado disponiendo mayormente del hierro de la semilla sin hacer uso de forma importante de el hierro que se localiza en el medio, supone una buena explicación. De forma notoria, para el girasol y el trébol se observó un incremento de la actividad de DIRB, lo cual es indicativo que este tipo de bacterias podrían estar favoreciendo la absorción de hierro en esas plantas. Puede resumirse que la estrategia vegetal para adquirir hierro no representa un factor determinante entre las especies vegetales, ya que avena, maíz y trigo (Estrategia II) no comparten entre sí el mismo resultado. De manera similar ocurre lo mismo entre las plantas Estrategia I.

5. CONTENIDO DE CLOROFILA DE LA PARTE AÉREA DE LAS UME.

Con la finalidad de reforzar los resultados previos, se cuantificó el contenido de clorofila de las partes aéreas correspondientes a las mismas UME crecidas en el suelo alcalino. Los resultados se observan en las barras rayadas de la Figura 21, y son comparados con las barras sólidas que representan al control de suficiencia de hierro o plantas fertilizadas foliarmente con citrato férrico. Coincidentemente en los casos de avena, girasol y trébol, cuando la planta llevó a cabo la adquisición natural de hierro, existió un incremento estadísticamente significativo en el contenido de clorofila que permite suponer que las rizobacterias ferrireductoras desasimilatorias si facilitaron la absorción de hierro por el vegetal (casos señalados con una flecha diagonal en la Figura 21). Para el trigo y el maíz, aunque existe también una diferencia estadística significativa, pero ésta se dirige en sentido inverso, es decir durante la adquisición natural existió una concentración menor de clorofila, que coincide con una baja actividad de las DIRB mostrada anteriormente en la Figura 20.

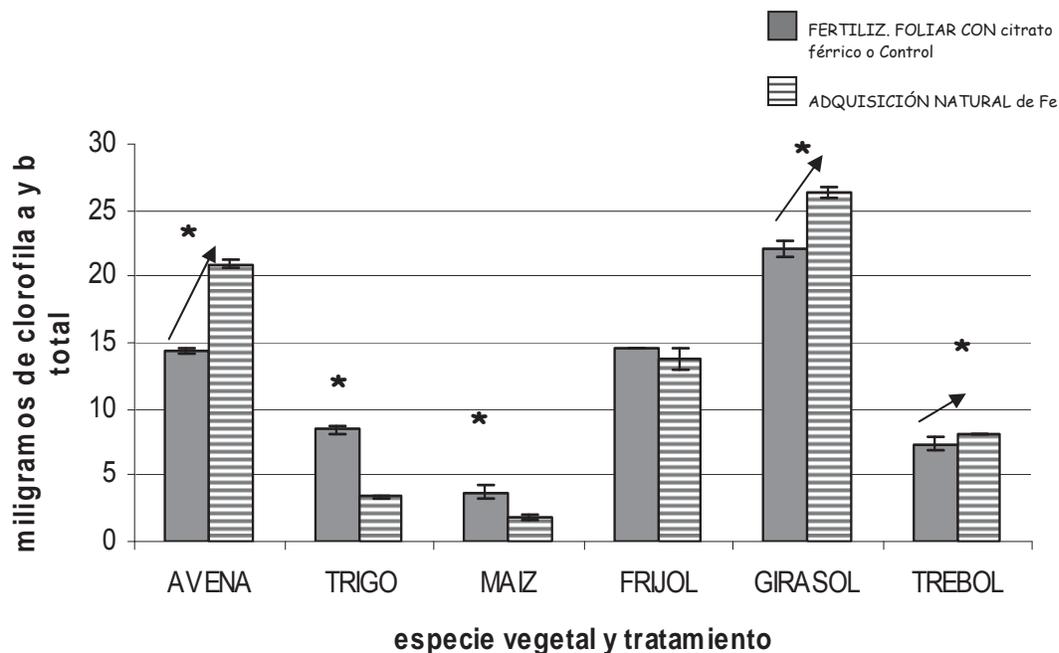


FIGURA 21. Contenido de clorofila a y b a los 45 días, en plantas crecidas en suelo alcalino. Las barras representan la desviación estándar de 3 repeticiones y los asteriscos las diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento de fertilización foliar y el no fertilizado, obtenidas por t de Student y un nivel de significancia de 0.05.

Hasta este momento se podría hacer el siguiente planteamiento: si en avena, girasol y trébol el incremento en la concentración de clorofila está asociada al aumento en el NMP de DIRB de las rizósferas, entonces una adquisición artificial de hierro a través de las hojas tendría que disminuir el efecto vegetal de adquisición de hierro del suelo y por lo tanto cambiar a la CBR disminuyendo su capacidad de ferrireducción.

La Figura 22 muestra el comparativo entre los resultados de NMP de rizobacterias ferrireductoras desasimilatorias para avena, girasol y trébol, cuando las plantas fueron fertilizadas foliarmente con hierro y cuando la planta adquirió el hierro del suelo. Solamente en el caso de la avena fertilizada foliarmente con hierro (diferencia estadística significativa), se disminuyó también el NMP de DIRB; probablemente al haber suficiencia de hierro en la parte aérea vegetal, no se estimuló un cambio en la CBR para aumentar el número de rizobacterias ferrireductoras desasimilatorias. En la misma Figura 22 se observa que en los casos de girasol y de trébol fertilizados foliarmente, no hubo diferencia estadísticamente significativa en el NMP de DIRB.

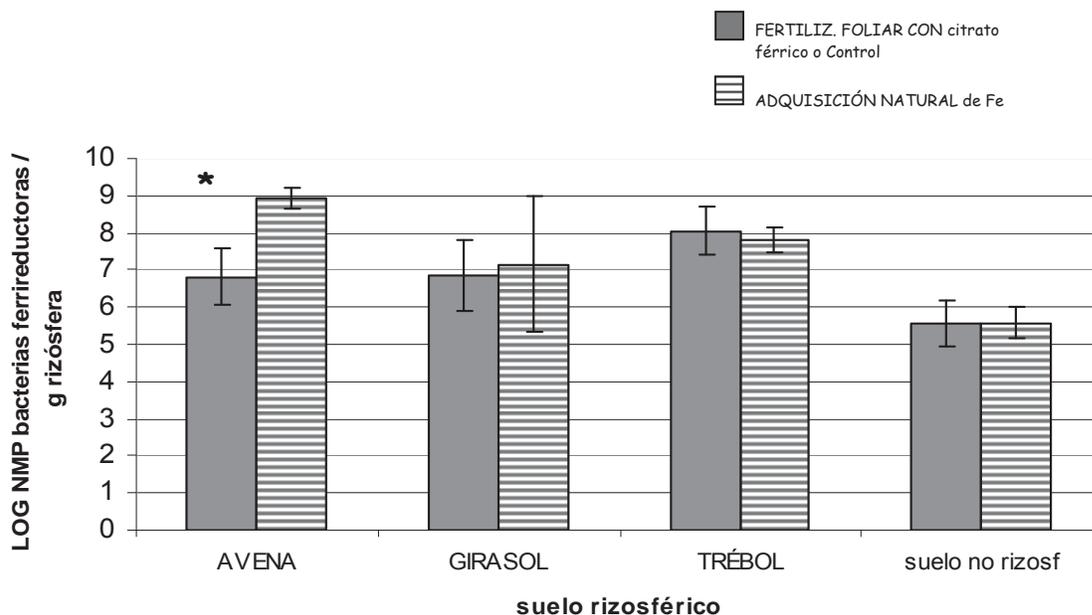


FIGURA 22. Número Más Probable de DIRB por gramo de rizósfera de avena, girasol y trébol crecidas en suelo alcalino y que fueron fertilizadas foliarmente con citrato férrico. Las barras representan los límites de los intervalos de confianza del 95% establecidos por la FDA. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento de fertilización y el que no fue fertilizado, obtenidas por t de Student y un nivel de significancia de 0.05.

VI. DISCUSIÓN.

Una planta que detecta una condición de deficiencia de hierro en el medio, induce eventos fisiológicos que permiten su adquisición. Ésta última puede estar basada en la reducción extracelular del metal (plantas Estrategia I, dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas) o en la quelación de hierro seguido por reducción intracelular (plantas Estrategia II, pertenecientes a Familia *Poaceae*) (Bauer y Bereczky, 2003; Connolly y Guerinot, 2002). Cualquiera de los 2 tipos de Estrategia mencionados conllevan la excreción de moléculas a la zona rizosférica, que en algún sentido impactarán a la comunidad microbiana que ahí se localice, ya que los microorganismos en la rizósfera reaccionan a los muchos metabolitos excretados por las plantas (Morgan *et al.*, 2005; Barea *et al.*, 2005).

A partir de la idea de que los requerimientos nutricionales de la planta determinan la composición de los exudados de raíz, y de que éstos últimos a su vez inciden de forma importante en la diversidad de microorganismos rizosféricos (Dakora y Phillips, 2002), la presente investigación examina el impacto sobre la CBR y su capacidad ferriredutora debido a la activación⁹ de las Estrategias vegetales I y II a los 45 días de desarrollo de la planta. Se evaluó el impacto vegetal sobre la CBR: a) comparando los cambios en la composición, riqueza y estructura respecto a la CBR de suelo abierto, y b) midiendo la capacidad de ferrireducción de la CBR en el entendido de que un incremento en el número de rizobacterias ferriredutoras en el suelo permitiría a la planta abastecerse con más facilidad de formas solubles.

En primer término, de los experimentos *in vitro* se obtuvo la información de que la Estrategia I si se distingue de la Estrategia II, ya que en altura y peso seco las plantas estudiadas mostraron respuestas claramente diferenciadas. Ello solamente a los 10 días de crecimiento vegetal. Respecto a la concentración de clorofila, ambas estrategias parecieran ser distintas a excepción de la avena, la cual muestra una deficiente cantidad del pigmento que puede relacionarse con una deficiente adquisición de hierro. Se conoce que algunos cultivares de avena son deficientes en interiorizar el hierro quelado a los fitosideróforos (Jolley y Brown, 1991) lo que los vuelve cultivares deficientes para la toma de hierro. Los datos obtenidos muestran que el cultivar Chihuahua empleado en este trabajo se comportó como deficiente en la toma del micronutriente.

⁹ Se consideró que un suelo con un pH de 7.89 y con una concentración moderadamente baja de hierro (Tabla 4) generarían estrés nutricional por el micronutriente.

Acerca de la CBR se ha reportado extensamente que las especies vegetales tienen un impacto diferencial entre ellas (Miethling *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2005; Kremer *et al.*, 1990). Por ejemplo, Wieland *et al.* (2001) comparando las variaciones en las comunidades microbianas rizosféricas en trébol, frijol y alfalfa, estableció que el tipo de especie vegetal tiene un efecto mayor que el tipo de suelo donde se sembraron. Los resultados en la presente investigación coinciden con lo anterior; el maíz, el trigo, la avena, el trébol, el girasol y el frijol crecidos en un suelo alcalino (*i.e.* un medio con deficiente concentración de hierro biodisponible; Guerinot y Yi, 1994) generan cambios a la CBR en función de la especie vegetal. Además, una de las aportaciones de este trabajo es la descripción de dichos cambios en términos de grupos bacterianos (composición), cantidad celular (riqueza), distribución de frecuencias entre los grupos bacterianos (estructura) y número de rizobacterias ferriredutoras (Figuras 19 y 20). Dos plantas Estrategia I (girasol y trébol) y dos Estrategia II (avena y trigo) modificaron la diversidad de las CBR respecto al suelo abierto de forma estadísticamente significativa. En la avena y en el trigo hay un incremento en la riqueza de las bacterias grampositivas, no obstante los FAME's característicos para cada una de ellas son diferentes (15-Me-16:1 ω 5¹⁰ y cy-17:0, respectivamente); en el girasol aumentan cuantitativamente las bacterias grampositivas y gramnegativas (éstas últimas caracterizadas por el biomarcador lipídico cy-19:0, abundante en girasol); y en el trébol es mayor el número de actinomicetos respecto a cualquier otra especie vegetal. **De forma clara, la diversidad de la CBR es modificada por la actividad rizosférica de cada especie vegetal, pero no en función de la Estrategia vegetal para adquirir hierro.**

El grupo bacteriano con mayor abundancia en todas las especies vegetales estudiadas fue el de las bacterias grampositivas, lo cual es coincidente con lo establecido por Smalla *et al.* (2001), Duineveld *et al.* (2001), Smit *et al.* (2001), Waldrop y Firestone (2006) y Escalante-Lozada (2004).

En este trabajo, los ácidos grasos 15:0 y 17:0 fueron considerados como "sin asociación bacteriana específica conocida", de forma concordante con lo reportado por Carpenter (1998) quien establece que dichos ácidos grasos identifican a *Eubacteria*; por esa razón, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el comparativo de FAME's rizosféricos.

¹⁰ Piotrowska-Seget y Mroziak (2003) han reportado biomarcadores lipídicos para grupos microbianos con la forma química de ácido graso monoinsaturado ramificado, *e.g.* 16-Me-17:1 ω 7c para *Desulfovibrio*.

Por su parte, se esperaba que alguna de las Estrategias vegetales de adquisición de hierro produjera un resultado notorio en la capacidad ferriredutora rizosférica. Previamente el estudio realizado por Duarte-Sotelo en el 2004, indicaba que en plantas de limón (planta Estrategia I) existía una estimulación de bacterias con mayor actividad ferriredutora desasimilatoria respecto de las de plantas de maíz (planta Estrategia II). No obstante, los resultados de esta investigación muestran que una especie vegetal Estrategia II (avena) y dos especies vegetales Estrategia I (girasol y trébol) son las que incrementan el número de rizobacterias ferriredutoras. De lo anterior pudo establecerse que no es la Estrategia vegetal sino la especie vegetal la que determinan el cambio en la CBR y que la comparación entre solamente dos especies vegetales otorgaba un sesgo a la conclusión de Duarte-Sotelo.

En los casos de avena, girasol y trébol, el aumento en NMP de DIRB se correlacionó positivamente con un incremento en el contenido de clorofila, lo cual es indicativo que durante la adquisición natural del hierro la actividad rizobacteriana tuvo un papel importante. Ello coincide con lo establecido por Velázquez-Becerra (2007) respecto a participación de las bacterias ferriredutoras en el suministro de hierro a plantas de *Medicago sativa*. En los casos en que las plantas fueron fertilizadas foliarmente con citrato férrico (*i.e.* adquisición artificial del micronutriente), se esperaba que disminuyera el NMP de DIRB, lo cual fue solamente comprobable en la avena (Figura 22). El hecho de que para girasol y trébol, la reducción en el contenido de clorofila no se relacione con un cambio en el NMP de DIRB puede deberse a que la fertilización foliar en las plantas crecidas en el suelo alcalino, no tuvo el efecto nutricional esperado. Fernández y Ebert (2005) y Wójcik (2004) han establecido que para que la fertilización foliar con compuestos de hierro sea exitosa existen muchos factores ambientales y genéticos que deben considerarse.

Por otro lado, el relacionar la alta capacidad ferriredutora de la avena con la característica de ser una especie vegetal Estrategia II deficiente, permite discutir que la posible deficiencia en la toma del FS-Fe⁺³ es suplida por una alta capacidad bacteriana ferriredutora. De forma contraria se encontró que la Estrategia II eficiente del maíz y el trigo no es acompañada por ferrireducción bacteriana sobresaliente.

Jin *et al.* (2006) y Jin *et al.* (2007) demostraron que los compuestos fenólicos excretados por las raíces de *Trifolium pratense* alteraban al comunidad microbiana del suelo favoreciendo la adquisición de hierro vegetal a través de la producción de moléculas microbianas tales como

sideróforos y auxinas. En el presente trabajo el trébol mostró un NMP de DIRB abundante que pudiera estar relacionado con la adquisición de hierro por la planta, no obstante hacen falta más experimentos para determinar si son las DIRB o los sideróforos los que favorecen la adquisición vegetal de hierro.

Mashalha *et al.* (2000) demostraron una importante actividad microbiana en la adquisición de hierro por *Helianthus annuus* por medio de la excreción de sideróforos. El NMP de DIRB en la rizósfera de dicha planta podría también relacionarse con la adquisición vegetal. No obstante se requieren más experimentos para diferenciar entre ambas actividades microbianas.

VII. CONCLUSIONES.

De forma concluyente respecto a la Hipótesis planteada por esta investigación se puede decir que la estrategia vegetal para adquisición de hierro no es un factor determinante en la diversidad, ni en la capacidad ferriredutora de la comunidad bacteriana rizosférica de las plantas estudiadas.

Otras conclusiones que esta investigación aporta son:

- Es ya sabido que las plantas modifican su microambiente radicular a través de la excreción de exudados, y que la especie vegetal es un factor determinante en la diversidad de la CBR. La capacidad ferriredutora de ésta última está determinada también por la especie vegetal.
- El ACP permitió visualizar que el impacto de los exudados de raíz sobre la CBR tiene diferentes magnitudes. Es decir, dicho impacto puede cuantificarse en función de PLFA`s.
- En la respuesta vegetal de la avena, el trigo y el girasol sobre la composición de ácidos grasos de fosfolípidos bacterianos rizosféricos de un suelo alcalino, resalta el perfil de los PLFA siguientes: avena = 15:0, 15-Me-16:1 ω 5; trigo = 17:0 y cy-17:0; girasol= cy-19:0, 16:1 ω 9c, 14-Me-17:0. El ácido graso 15-Me-16:1 ω 5 podría caracterizar a bacterias DIRB. Estudios más profundos permitirían definir su posible utilidad como biomarcador lipídico.
- Así como existen múltiples reportes de adquisición vegetal de hierro a través de sideróforos bacterianos, la presente investigación concluye sobre la existencia de una posible nueva forma de adquisición vegetal de hierro por medio de rizobacterias ferriredutoras desasimilatorias en el caso de *Avena sativa* con Estrategia II deficiente.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abadía J.**, López-Millán A.F., Rombolà A. y A. Abadía. 2002. Organics acids and Fe deficiency: a review. *Plant and Soil*, 241: 75-86.
- Alvey S.**, Yang C.H., Buerkert A. y D.E. Crowley. 2003. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west african soils. *Biol. Fertil. Soils*, 37: 73-82.
- Andrews S.C.**, Robinson A.K. y F. Rodríguez-Quñones. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 215-237.
- Atlas R.M.**, y R. Bartha. 2002. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Pearson Educación S.A. Madrid ISBN: 84-7829-039-7.
- Azcón-Bieto J.** y M. Talón. 2003. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Tercera reimpresión. McGrawHill-Interamericana.
- Barea J.M.**, Pozo M.J., Azcón R. y C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56 (417): 1761-1778.
- Bauer P.** y Z. Bereczky. 2003. Gene networks involved in iron acquisition strategies in plants. *Agronomie*, 23: 447-454.
- Beliaev A.S.** y D.A. Saffarini. 1998. *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn (IV) reduction. *Journal of Bacteriology*, 180 (23): 6292-6297.
- Bonneville S.**, Capellen P.V. y T. Behrends. 2004. Microbial reduction of iron (II) oxyhydroxides: effects of mineral solubility and availability. *Chemical Geology*, 212: 255-268.
- Brant J.B.**, Myrold D.D. y E.W. Sulzman. 2006. Root controls on soil microbial community structure in forest soils. *Oecologia*, 148: 650-659.

- Brown** T.L., Le May H.E. y B. E. Bursten. 1998. Química la Ciencia Central. Séptima edición. Prentice Hall.
- Butler** J. L., Williams M.A., Bottmley P. J. y D.D. Myrold. 2003. Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (11): 6793-6800.
- Cardon** Z.G. y D. J. Gage. 2006. Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37: 459-88.
- Carpenter-Boggs** L., Kennedy A.C. y J.P. Reganould. 1998. Use of phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10): 4062-4064.
- Cohen** C.K., Fox T.C., Garvin D.F. y L.V. Kochian. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.*, 116: 1063-1072.
- Connolly** E. y M.L. Guerinot. 2002. Iron stress in plants. *Genome Biology*, 3 (8): reviews 1024.1-1024.4.
- Connolly** E.L., N.H. Campbell, N. Grotz, C.L. Prichard y M.L. Guerinot. 2003. Overexpression of the FRO2 Ferric Chelate Reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol.*, 133: 1102-1110.
- Curie** C. y J. F. Briat. 2003. Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 183-206.
- Curie** C., Dellaporta S., Briat J.F. y E.L. Walker. 2001. *Maize yellow stripe 1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, 409: 346-349.
- Chen** Y. y P. Barak. 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*, 35: 217-240.

- Dakora** F.D. y D. A. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environment. *Plant and Soil*, 245: 35-47.
- Dell'Orto** M., Santi S., De Nisi P., Cesco S., Varanini Z., Zocchi G. y R. Pinton. 2000. Development of Fe-deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: involvement of plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345): 695-701.
- De-Ridder-Duine** A., Kowalchuk G.A., Klein Gunnewiek P.J.A., Smant W., Van Veen J.A. y W. de Boer. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 349-357.
- Dierksen** K. P., Gerald W. Whittaker, Gary M. Banowetz, Mark D. Azevedo, Ann C. Kennedy, Jeffrey J. Steiner y Stephen M. Griffith. 2002. High resolution characterization of soil biological communities by nucleic acid and fatty acid analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1853-1860.
- Duarte-Sotelo** C., Farías-Rodríguez R., Salgado-Garciglia R. y E. Valencia-Cantero. 2004. Estudio preeliminar de la capacidad de reducción del Fe en aislados bacterianos rizosféricos de plantas con estrategias I y II para la obtención de Fe. *Ciencia Nicolaita*, 39: 109-118.
- Duinevelt** B.M., Kowalchuk A., Keijzer A., van Elsas J.D. y J. A. van Veen. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 172-178.
- Dunbar** J., Takala S., Barns S.M., Davis J.A. y C.R. Kuske. 1999. Levels of bacterial diversity in four arid soils compared by cultivation and 16 rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (4): 1662-1669.
- Dunbar** J., Ticknor L. O. y C.R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (7): 2943-2950.

- Escalante-Lozada A.**, Gosset-Legarda G., Martínez-Jiménez A. y F. Bolívar Zapata. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*, 38: 583-592.
- Feng M.J.**, Shinada T., Matsuda C. y K. Nomoto. 1995. Biosynthesis of phyto siderophores, mugineic acids, associated with methionine cycling. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (28): 16549-16554.
- Fernández V.** y G. Ebert. 2005. Foliar fertilization: a critical review. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 2113-2124.
- Fox T.C** y M.L. Guerinot. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 669-96.
- Girvan M.S.**, Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M. y A.S. Ball. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3): 1800-1809.
- Godsey C. B.**, Schmidt J.P., Schlegel A.J., Taylor R.K., Thompson C.R. y R.J. Gehl. 2003. Correcting iron deficiency in corn with seed row-applied iron sulfate. *Agron. J.*, 95: 160-166.
- Graham R.D.** y J. C. R. Stangoulis. 2003. Trace element uptake and distribution in plants. *J. Nutr.*, 133: 1502S-1505S.
- Green L.S.** y E.E. Rogers. 2004. FRD3 controls iron localization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 136: 2523-2531.
- Guerinot M.L.** y Y. Yi. 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.*, 104: 815-820.
- Hair J.F.**, Anderson R.E., Tatham R.L. y W. Black. 1999. *Análisis Multivariante*. Quinta edición. Pearson Prentice Hall. Madrid.

- Hall** J.L. y L.E. Williams. 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 54 (393): 2601-2613.
- Hernández-Calderón** E. 2006. Influencia de las rizobacterias ferriredutoras en la disponibilidad de hierro en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.V. Flor de Mayo Bajío). Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Jin** C-W, He Y-F, Tang C-X, Wu P. y S.J. Zheng. 2006. Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant, Cell and Environment.*, 29: 888-897.
- Jin** C-W, You G-Y, He Y-F, Tang C-X, Wu P. y S.J. Zheng. 2007. Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiol.*, 144: 278-285.
- Jolley** V.D. y J.C. Brown. 1991. Differential response of Fe-efficient corn and Fe-inefficient corn and oat to phytosiderophore released by Fe-efficient Coker 227 oat. *Journal of Plant Nutrition*, 14: 45-58.
- Keinänen** M.M., Leena K. Korhonen, Markku J. Lehtola, Ilkka t. Miettinen, Pertti J. Martikainen, Terttu Vartiainen y Merja H. Suutari. 2002. The microbial community structure of drinking water biofilms can be affected by phosphorus availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (1): 434-439.
- Keinänen** M.M., Korhonen L.K., Martikainen P.J., Vartiainen T., Miettinen I.T., Lehtola M.J., Nenonen K., Pajunen H. y M.H. Kontro. 2003a. Gas chromatographic-mass spectrometric detection of 2- and 3-hydroxy fatty acids as methyl esters from soil, sediment and biofilm. *Journal of Chromatography B*, 783: 443-451.
- Keinänen** M.M., Martikainen P.J., Korhonen L.K. y M.H. Suutari. 2003b. Microbial community structure in biofilms and water of a drinking water distribution system determined by lipid biomarkers. *Water Science and Technology*, 47 (5): 143-147.

- Kidd Haack** S., Garchow H., Odelson D.A., Forney L.J. y M. J. Klug. 1994. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7): 2483-2493.
- Kieft** T.L., Fredrickson J.K., Onstott T.C., Gorby Y.A., Kostandarithes H.M., Bailey T.j., Kennedy D.W., Li S.W., Plymale A.E., Spadoni C.M. y M.S. Gray. 1999. Dissimilatory reduction of Fe (III) and other electron acceptors by a *Thermus* Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3): 1214-1221.
- Kremer** R.J., Begonia M.F.T., Stanley L. y E.T. Lanham. 1990. Characterization of rhizobacteria associated with weed seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, No. 6, p. 1649-1655.
- Kuzyakov** Y. 2006. Interactions between rhizosphere microorganisms and soil organic matter decomposition. Institute of Soil Science and Land Evaluation. University of Hohenheim Stuttgart. Germany.
- Lindsay** W.L y A.P. Shwab. 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *Journal of Plant Nutrition*, 5(4-7): 821-840.
- Lonergan** D.J., Jenter H.L., Coates J.D., Phillips E.J.P., Schmidt T.M. y D. L. Lovley. 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178 (8): 2402-2408.
- Longnecker** N. y R.M. Welch. 1990. Accumulation of apoplastic iron in plant roots. *Plant Physiol.*, 92: 17-22.
- Lovley** D.R. y E.J.P. Phillips. 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (4): 683-689.
- Lovley** D.R. 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:263-90.
- Lovley** D.R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 55, (2): 259-287.

- Lovley** D.R. 2000. Fe(III) and Mn(IV) reduction. Environmental Microbe-Metal Interactions. Chapter 1. ASM Press. Washington, D.C.
- Lu** W-L., Wang H-T., Huang C-Y. y W. Reichardt. 2002. Communities of iron(III)-reducing bacteria in irrigated tropical rice fields. *Microbes and Environments*, 17 (4): 170-178.
- Luu** Y. y J. A. Ramsay. 2003. Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19: 215-225.
- Madigan** M. T., Martinko J.M. y J. Parker. 2004. *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Pearson-Prentice Hall.
- Mashalha** J., Kosegarten H., Elmaci Ö. y K. Mengel. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol. Fertil. Soils*, 30: 433-439.
- Mathews** C.K., Van Holde K.E., y K.G. Ahern. 2002. *Bioquímica*. Tercera edición. Pearson Educación S.A. Madrid.
- McSpadden** B.B. y D. M. Weller. 2001. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with Take-All disease of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4414-4425.
- Mengel** Konrad. 2001. *Principles of Plant Nutrition*. 5th. Edition. Kluwer Academic Publishers.
- Miethling** R., Ahrends K. y C.C. Tebbe. 2003. Structural differences in the rizhosphere communities of legumes are not equally in community-level physiological profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1405-1410.
- Moraghan** J.T., Padilla J., Etchvers J.D., Grafton K. y J.A. Acosta Gallegos. 2002. Iron accumulation in seed of common bean. *Plant and Soil*, 246: 175-183.
- Morgan** J.A.W., Bending G.D. y P.J. White. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56 (417): 1729-1739.

- Mukherjee I.**, Campbell N.H., Ash J.S. y E. Connolly. 2005. Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta*, 223: 1178-1190.
- NCBI** National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> fecha de consulta julio del 2008.
- Nelson D.L.** y M.M. Cox. 2005. Principles of Biochemistry Lehninger. Fourth edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Nichols T.D.**, Wolf D.C., Rogers H.B., Beyrouthy C.A. y C.M. Reynolds. 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 95: 165-178.
- Nielsen J.L.**, Juretschko S., Wagner M. y P.H. Nielsen. 2002. Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9): 4629-4636.
- Nielsen M.N.** y A. Winding. 2002. Microorganisms as Indicators of soil health. National Environmental Research Institute. Denmark. Technical Report No. 388.
- Nikolic M.** 1998. The role of the redox systems in uptake and translocation of iron by higher plants. *Iugoslav Physiol. Pharmacol. Acta*, 34 (2): 479-489.
- Norman T.** 1990. Limiting factors in photosynthesis. *Plant Physiol.*, 65: 114-120.
- Patten C.L.** y B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8): 3795-3801.
- Piotrowska-Seget Z.** y A. Mrozik. 2003. Signature lipid biomarker (SLB) analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12 (6): 669-675.

- Ramsey P.W.**, Rilling M.C., Feris K.P., Holben W.E. y J.E. Gannon. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia*, 50: 275-280.
- Ranieri A.**, Castagna A., Baldan B. y G.F. Slodatini. 2001. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, 52 (354): 25-35.
- Ric de Vos C.**, Lubberding H.J. y H.F. Bienfait. 1986. Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants. *Plant Physiol.*, 81: 842-846.
- Rogers E.**, Eide D.J. y M.L. Guerinot. 2000. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *PNAS*, 97 (22): 12356-12360.
- Rombolà A.D.**, Dallari S., Quartieri M., Ammari T. y M. Tagliavini. 2002. Effect of foliar-applied Fe sources, organic acids and sorbitol on the re-greening of kiwifruit leaves affected by lime-induced iron chlorosis. *Proc. IS on Foliar Nutrition. Acta Hort.*, 594.
- Römheld V.** 1987. Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Plant*, 70: 231-234.
- Römheld V.** y H. Marschner. 1986. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol.*, 80: 175-180.
- Ryu C-M**, Hu C-H, Locy R.D. y J.W. Kloepper. 2005. Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*, 268: 285-292.
- Schaaf G.**, Ludewig U., Erenoglu B.E., Mori S., Kitahara T. y N. von Wirén. 2004. ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (10): 9091-9096.
- Schmidt W.** 2003. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *TRENDS in Plant Science*, 8 (4): 188-192.

- Schröder I.**, Johnson E. y S. de Vries. 2003. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 427-447.
- Schutter M.E.** y R.P. Dick. 2000. Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for characterizing microbial communities. *Soil Sci. Soc. Am.J.*, 64: 1659-1668.
- Sharma K.S.**, Petrushevski B. y J.C. Schippers. 2005a. Biological iron removal from groundwater: a review. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA/54.4*.
- Sharma S.**, Aneja M.K., Mayer J., Munch J.C. y M. Schloter. 2005b. Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microbial Ecology*, 49: 407-415.
- Shojima S.**, Nishizawa N-K., Fushiya S., Nozoe S., Irifune T. y S. Mori. 1990. Biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol.*, 93: 1497-1503.
- Smalla K.**, Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskov N., Heuer H. y G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studies by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependant enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4742-4751.
- Smit E.**, Leeflang P., Gommans S., Van der Broek J., Van Mil S. y K. Wernars. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (5): 2284-2291.
- Steubing L.**, Godoy R. y M. Alberdi. 2002. *Métodos de Ecología Vegetal*. Primera edición. Editorial Universitaria de la Universidad Austral de Chile. Chile.
- Theil E. C.** y J.F. Briat. 2004. Plant ferritin and non-heme iron nutrition in humans. *Harvest plus 1*. Technical Monograph Series, 293.
- Tolay I.**, Erenoglu B., Römheld V., Braun H.J. y I. Cakmak. 2001. Phytosiderophore release in *Aegilops tauschii* and *Triticum* species under zinc and iron deficiencies. *Journal of Experimental Botany*, 52 (358): 1093-1099.

Universidad de Granada, España. Departamento de Edafología. Unidad docente e investigadora de la Facultad de Ciencias. <http://edafología.ugr.es/hidro/concept.htm>

Valencia-Cantero E., Hernández-Calderón E., Velázquez-Becerra C., López-Meza J.E., Alfaro-Cuevas R. y J. López Bucio. 2007. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris*) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil*, 291: 263-273.

Van Veen J.A., Van Overbeek L.S. y J.D. Van Elsas. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (2): 121-135.

Velázquez-Becerra C. 2007. Participación de las bacterias ferriredutoras en el suministro de hierro a plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) en sus primeros estadios de crecimiento. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., Gaymard F., Guerinot M.L., Briat J.F. y C. Curie. 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell*, 14: 1223-1233.

Waldrop M.P. y M. K. Firestone. 2006. Seasonal dynamics of microbial community composition and function in oak canopy and open grassland soils. *Microbial Ecology*, 52: 470-479.

Walker S.T., Pal Bais H., Grotewold E. y J.M. Vivanco. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.*, 132: 44-51.

Waters B. M., D.G. Blevins y D. J. Eide. 2002. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.*, 129: 85-94.

Wei Jin C., Feng He Y., Tang C.X., Wu P. y S.J. Zheng. 2006. Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (*Trifolium pratense L.*). *Plant, Cell and Environment*, 29: 888-897.

- Weiss** J.V., Emerson D., Backer S.M. y J.P. Megonigal. 2003. Enumeration of Fe(II)-oxidizing and Fe(III)-reducing bacteria in the root zone of wetland plants: Implications for a rhizosphere iron cycle. *Biogeochemistry*, 64: 77-96.
- Wieland** G., Neumann R. y H. Backhaus. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12): 5849-5854.
- Wójcik** P. 2004. Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization (review). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 12: 201:218.
- Wu** H., Li L., Du J., Yuan Y., Cheng X. y H-Q Ling. 2005. Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 46(9): 1505-1514.
- Yang** C-H y D. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 345-351.
- Yehuda** Z., Moshe S., Romheld V., Marschner H., Hadar Y. y Y. Chen. 1996. The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiol.*, 112: 1273-1280.
- Zelles** L. 1999. Fatty acids patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils*, 29: 111-129.