



**Análisis del perfil metabólico (CLPP) de las
comunidades bacterianas rizosféricas asociadas a
Medicago sativa en suelos contaminados con
mercurio (Distrito Minero de Almadén, Ciudad Real)**

Autor: Agustín Probanza Lobo

Institución: Universidad CEU San Pablo

Otros autores: Julia Zamarriego (Universidad CEU San Pablo); Agustín Probanza (Universidad CEU San Pablo); Pedro Jiménez Gómez (Universidad CEU San Pablo); Marina Robas Mora (Universidad CEU San Pablo)

Resumen

En el presente trabajo nos planteamos el estudio de las comunidades microbianas edáficas en el distrito minero de Almadén (Ciudad Real), analizando muestras de suelo libre y de la rizosfera de *Medicago sativa*, en zonas de alta y baja concentración de mercurio. Se ha realizado un análisis de las comunidades microbianas (bacterias y hongos) atendiendo a su perfil fisiológico (CLPP, Community Level Physiological Profile) mediante el uso de microplacas Biolog Eco® (bacterias) y Biolog FF® (hongos). Con los datos de Biolog Eco y FF se han procesado y obtenido resultados de diversidad metabólica, cinéticas en placa, y estructura de las comunidades (analizada esta última mediante Análisis de Componentes Principales, ACP).

Del estudio de las cinéticas en placa encontramos mayor actividad tanto en bacterias como hongos en las muestras rizosféricas, así mismo se detecta un efecto decelerador en la cinética de aquellas muestras con mayor concentración de Hg. La actividad global detectada es inferior en el caso de los hongos. Respecto a la diversidad metabólica, en el caso de las comunidades bacterianas encontramos diferencias entre suelo libre y suelo rizosférico, siendo mayor la diversidad en estas últimas. En el caso de los hongos la diversidad es muy homogénea, siendo estadísticamente inferior solo en el caso de suelo libre con mayor concentración de Hg. El ACP realizado con los datos de perfil metabólico bacteriano no solo discrimina muestras rizosféricas de suelo libre, sino que también detecta diferencias entre suelos de alta y baja contaminación. Respecto al ACP de las comunidades fúngicas se observan similitudes entre las muestras rizosféricas pero no en el caso de las muestras de suelo libre. Como en el caso anterior hay una sutil discriminación entre suelos de alta y baja contaminación.

De modo general nuestros resultados sugieren que la estructura de las comunidades microbianas de la rizosfera de *Medicago sativa* en el lugar de estudio depende más del efecto planta (rizosfera, exudatos radicales) que de la concentración de Hg, probablemente por una adaptación de microorganismos y plantas al estrés crónico por Hg así como al carácter de planta resistente al mismo que ha desarrollado *Medicago sativa*.

Palabras clave: Comunidades bacterianas; Rizosfera; *Medicago sativa*; Suelos contaminados; Mercurio

1. Introducción.

El distrito minero de Almadén, constituye la concentración natural de mercurio más grande del mundo y ha representado más del 30% de la producción total mundial. Para dimensionar el nivel de extracción/producción de esa zona basta indicar que junto a otras dos localizaciones en Italia y Eslovenia han producido la mitad del mercurio mundial (Millán et al., 2011). El distrito está constituido por series de depósitos de mercurio mineral predominantemente cinabrio (HgS), también está presente el mercurio elemental (Hg⁰), que en algunos depósitos es localmente abundante. Como resultado de la intensa extracción del cinabrio se ha ido produciendo una gran contaminación por mercurio en las capas más superficiales del suelo con intensidad variable. La extracción del mercurio en esta zona se ha llevado a cabo durante más de dos mil años, desde tiempos de los Romanos y su actividad cesó en Mayo de 2002. Debido al gran tamaño de este distrito minero, las emisiones del mercurio que se han ido produciendo y la dispersión por los ríos hace considerar este área como una de las más afectadas del mundo, tanto por el origen natural del mercurio, como por su contaminación antropogénica (Millán et al., 2007).

No son pocos los estudios que diferentes grupos han realizado en dicha zona, y con una focalización de los mismos muy heterogénea. Estos estudios, abarcan desde perspectivas que incluyen los efectos del contaminante sobre los componentes abióticos, (Millán et al. 2006), quienes describen las variaciones espaciales de las propiedades edáficas de la zona, o en la distribución del mercurio en ambientes acuáticos (Berzas et al. 2003), hasta los efectos sobre las comunidades vegetales (Higueras, 2004) o acerca de los mecanismos de adaptación han desarrollado las distintas especies vegetales. La interrelación entre ambos tipos de componentes (bióticos y abióticos) ha sido igualmente estudiada (Millán, 2006).

Por otra parte, se han realizado estudios de carácter eminentemente práctico, Sánchez et al. (2005) estudia el fraccionamiento del mercurio y otros elementos traza de los suelos de Almadén, mediante la aplicación secuencial de distintos procedimientos de extracción. Por su parte Gray (2004) investiga la especiación y transformación microbiana de los residuos mineros y otros sedimentos de la zona objeto de estudio.

Sin embargo no hay estudios que hayan abordado aspectos más globales y básicos de la ecología de la rizosfera de plantas capaces de crecer en esos suelos contaminados. Según la búsqueda bibliográfica realizada, no existen precedentes en la zona de estudio de trabajos que traten los aspectos básicos que se proponen en el presente trabajo.

En este trabajo se utilizaron placas Biolog Eco ® (con el fin de estudiar las actividades metabólicas de las comunidades bacterianas) y Biolog FF ® (para estudiar las actividades metabólicas de las comunidades fúngicas) en la parte rizosférica de una especie regular que crece en zonas con alta y baja contaminación de Almadén: *Medicago sativa*. El uso de las placas Biolog Eco y Biolog FF para el análisis de perfiles metabólicos de comunidades (también conocido como CCLP: *Community Level Physiological Profile*) es una herramienta robusta, sencilla y versátil, singularmente para estudios de comunidades microbianas rizosféricas (García-Villaraco et al., 2009;), o de suelo libre (Kenarova et al., 2014). A pesar de sus limitaciones la metodología ha sido usada ampliamente en el estudio de muestras sometidas a contaminación, (Müller et al., 2001; Nikliska et al., 2005; Kamitani et al., 2006; Sprocati et al., 2013; Kenarova et al., 2014).

La estructura y función de las comunidades microbianas tanto bacterianas como fúngicas es muy diferente en el suelo libre de raíces y la porción de suelo próxima a este, conocida como rizosfera (Lynch, 1990). Los microorganismos del suelo desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la calidad del suelo y pueden ser sensibles a alteraciones en el medioambientales (Kennedy et al. 1995) como la contaminación por metales pesados (Wenzel, 2009; Xie et al., 2011). Las comunidades microbianas edáficas pueden indicar cambios en la disponibilidad de nutrientes y la estructura del suelo y son elementos clave para entender el impacto de factores ambientales y antropogénicos (DeLong et al., 2001). La diversidad microbiana del suelo se relaciona con su capacidad para hacer frente a posibles perturbaciones (Kennedy, 1999), y ha sido propuesta como un indicador de la calidad del suelo (OECD, 2001). Por ello, el análisis de la diversidad de la microbiota edáfica (sea metabólica o estructural) es esencial cuando tratamos de estudiar influencias ambientales y antrópicas en la calidad del suelo (Hartmann y Widmer, 2006).

Los exudados radicales son los principales moduladores de las comunidades rizosféricas junto a los fenómenos de competencia entre microorganismos (Badri et al., 2009; Ruiz Palomino et al., 2005). Los exudados radicales son un heterogéneo conjunto de sustancias que las plantas liberan al suelo a través de sus raíces, bien de forma activa o pasiva. La naturaleza química de los exudados radicales es muy diversa: se pueden encontrar azúcares sencillos, polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, flavonoides, vitaminas, entre muchos otros. Se sabe que no todas las plantas liberan ni la misma cantidad ni la misma tipología química de exudados radicales, y que una misma especie de planta exuda compuestos diferentes dependiendo de un gran número de factores: especie, edad, las características nutricionales del suelo, presencia de metales pesados, disponibilidad de agua, el pH, la temperatura, la intensidad de luz y los microorganismos rizosféricos, entre otros (Bardi y Vivanco, 2009).

El cierre de la actividad minera en Almadén ha causado problemas socioeconómicos que requieren de nuevos enfoques en el uso del terreno, como puede ser el agrícola o ganadero. Para que estos cambios puedan efectuarse los suelos, deberán tratarse para paliar la contaminación por mercurio. En este contexto se plantea el presente trabajo, con un pretensión exploratoria orientada a comparar comunidades bacterianas rizosféricas de plantas *Medicago sativa* sometidas a presión por contaminación de Hg, tanto crecidas en suelos no contaminados como menos contaminados.

El objetivo de este trabajo se focaliza en el estudio de comunidades bacterianas rizosféricas de *Medicago sativa* asociadas a plantas como acumuladoras o resistentes al estrés (Moreno-Jiménez et al., 2006) en distintas condiciones y que crecen de forma natural en Almadén mediante el análisis de CLPP por placas Biolog ECO y Biolog FF.

2. Materiales y métodos.

2.1 Zona de Estudio.

El estudio se ha realizado en el distrito minero de Almadén, Ciudad Real (España). Para ello se han considerado parcelas experimentales seleccionadas atendiendo a dos criterios: tener un diferente grado de impacto de las actividades mineras y la composición de la flora y el suelo de las mismas. Estas parcelas ya han sido usadas por otros autores en estudios previos (Millán et al., 2007) y seguimos su nomenclatura.

Las características de las parcelas seleccionadas para nuestro experimento son las siguientes:

Parcela 6: (alto contenido en Hg) Almadén, mina de mercurio, ladera S Cerro Buitrones. Laderas de fuerte pendiente dominadas por la especie *Rumex induratus* que ejerce un efecto de estabilización del suelo mediante la fijación por medio de su sistema radicular evitando la erosión. Solamente en zonas con sustrato más fijo se asientan especies sericícolas como *Cistus crispus* y *Cistus scoparius*. Sin embargo, en aquellas zonas con suelo más erosionable, solo aparecen terófitos como *Rumex bucephalophorus*. El terreno está sometido a fuerte presión ganadera.

La concentración de Hg en esta parcela es de :1710mg/kg Hg total, 0,609mg/Kg Hg soluble, 7,3mg/Kg Hg intercambiable (Millán et al., 2007).

Parcela 7: (bajo contenido en Hg) Almadén, Sierra de Cordoneros, dehesa de Castilseras. Pastizales sometidos a pastoreo en dehesa de encinar muy aclarado con presencia de *Retama sphaerocarpa*, dominados por terófitos y hemicriptófitos de bajo porte, de carácter heliófilo, como *Spergularia rubra*, *Plantago lagopus*, *Chamaemelum mixtum*, *Diplotaxis católica*, *Anacyclus clavatus*.

La concentración de Hg en esta parcela es de: 5,53mg/kg Hg total, 0,0453mg/Kg Hg Soluble, 0,182mg/Kg Hg intercambiable (Millán et al., 2007).

2.2 Obtención de las muestras.

Se recogieron muestras de *Medicago sativa* para obtener suelo rizosférico (RF) y muestras libre de raíces (SL) en las zonas descritas anteriormente, el día 03/01/2014.

Para la obtención de muestras edáficas y de plantas se siguió el procedimiento descrito en Ruiz-Palomino et al. (2005). Para ello, las plantas se extrajeron del suelo empleando un azada asepticada, retirando la planta completa con sus raíces y el suelo adherido a las mismas. Cada planta se introdujo en una bolsa de plástico nueva. Por cada planta se recogieron 15 ejemplares. En los mismos lugares y localizando zonas libre de raíces, se tomaron muestras de suelo libre. Todas las muestras se trasladaron al laboratorio a 4°C.

2.3 Obtención del suelo rizosférico.

Una vez en el laboratorio, se procedió como sigue: para la obtención de muestras de suelo rizosférico, la raíz de cada ejemplar de planta se agito suavemente con objeto de eliminar fracciones de suelo que no estuviesen íntimamente pegadas a la raíz. Seguidamente, se separo cuidadosamente la parte del suelo adherido a la raíz hasta completar 2 g por planta. Por cada zona se reunió y homogenizó el suelo rizosférico de 5

ejemplares para constituir una réplica, por lo que el total de réplicas fue de 3 por zona de muestreo.

2.4 Extracción de las comunidades bacterianas rizosféricas y del suelo libre.

Para esta actividad se siguió el procedimiento descrito en García-Villaraco et al. (2010) modificado. Para ello, 2 g de suelo se suspendieron en 20 ml de solución salina (NaCl 0,45%) estéril y se procedió a su homogenización a 16.000 r.p.m. durante 2 minutos. Seguidamente, se centrifugo a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos.

2.5 Determinación de la dilución para siembra en placa Biolog Eco® y Biolog FF®.

A partir de la suspensión de 10^{-1} de la muestra, se hicieron diluciones hasta la 10^{-5} .

Estas diluciones se sembraron en agar sangre, agar McConkey, agar Sabouraud y también en un Uritest®, leyéndose el crecimiento a las 24 y 48 horas tras incubación a 37°C.

2.6 Siembra de las muestras (Biolog Eco y Biolog FF).

Los dos tipos de placas empleados en este estudio (Biolog Eco® y Biolog FF®, en adelante Eco y FF) constan de 96 pocillos que contienen diferentes fuentes de carbono y nitrógeno liofilizadas así como un indicador redox cuya intensidad de viraje indica el consumo (oxidación) de dicha fuente. En el caso de las placas Biolog Eco son sales de tetrazolio, que viran a violeta (más intensidad de color cuanto más sustrato se consume) y a color rojo en medio Biolog FF. En las placas Eco existen tres bloques repetidos de 31 sustratos (y un blanco) y en las FF los 96 pocillos son diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno (95 sustratos y un pocillo blanco).

A partir de la suspensión microbiana obtenida (y descrita en la actividad 2.4) y diluciones seleccionadas, establecidas por los resultados obtenidos para 2.5, se cargaron las placas Biolog ECO y Biolog FF con 135 µl por pocillo.

Las placas se incubaron durante 94 horas, a 25°C y se midió su absorbancia a 590 nm (Biolog ECO) y a 492 nm y 750 nm (Biolog FF), cada 12 horas (ECO) y cada 24 horas (FF). La doble medida en FF se hace para sustraer a la medida de absorbancia por viraje del tetrazolio (492 nm) la derivada de crecimiento de micelio (a 750 nm).

2.7 Procesado de datos de Biolog Eco y FF.

Con los resultados brutos obtenidos de las medidas de absorbancia se corrigió cada valor de restándole el blanco (absorbancia corregida). Seguidamente se calculó la media de absorbancia corregida de todos los pocillos como la media de los 31 (Biolog Eco) y 95 (Biolog FF) valores de absorbancia corregidos para cada réplica.

Se representó el valor de AWCD (*Average Well Color Development*) frente al tiempo de incubación para obtener las **curvas de crecimiento de la comunidad microbiana** en los pocillos de la placa. En estas curvas se eligió el momento de incubación en el que el crecimiento de los microorganismos estaba iniciando la fase estacionaria, para los posteriores análisis multivariantes (apartado 2.8).

Adicionalmente, con los valores de absorbancia corregidos del momento de incubación escogido como AWDC se calculó la diversidad metabólica de cada muestra utilizando el **índice de diversidad** de Shannon-Weaver.

$$H(m) = -\sum q_i \log_2 q_i$$

Donde $q_i = n/N$ siendo n la absorbancia corregida (AWCD) de cada pocillo y N la absorbancia total de todos los pocillos.

2.8 Análisis estadístico de los datos.

El análisis de los resultados se hizo mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando el programa estadístico SPSS v.19.0 (SPSS Inc.). Se usaron estos análisis multivariantes como técnica exploratoria de tendencias y para discriminar diferencias entre los tratamientos (SL, SR con alta cantidad de mercurio Z6 y con baja cantidad de mercurio Z7)

Para las curvas de crecimiento (cinéticas) y diversidad se realizó un ANOVA unidireccional para establecer diferencias entre tratamientos, con el mismo programa estadístico. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) se aplicó el test de Duncan.

3. Resultados.

3.1 Recuento de microorganismos en placas.

Los resultados de las siembras en placas y Uritest® de las muestras aparecen en la **Tabla I**

Se observa mayor número de bacterias en la zona RF que en la zona de SL, tanto de bacterias totales (agar Sangre) como de bacterias gram negativas (agar Mkonkey). Los niveles de hongos como vemos en el agar Sabouraud son nulos en la zona 6 y residuales en la zona 7.

A la vista de los resultados se emplearon las diluciones 10^{-2} para suelos libres y 10^{-3} para las muestras de rizosfera de cara al estudio con placas Biolog.

Tabla I: Resultados de crecimiento en placa de las muestras (filas) en los diferentes medios de cultivo. *Unidades Ufc/g de suelo, todos los valores van multiplicados por 10^3 (excepto conteo por Urintest®)*

	agar McConkey	agar Sabouraud	agar Sangre	Uritest®
Rizosfera Zona 6	102	nc	132	Cled: 10 ⁵ Mc 10 ⁴
Suelo Libre Zona 6	0,02	nc	4,8	Cled 10 ³ Mc -nc
Rizosfera Zona 7	1,26	0,13	1,44	Cled 10 ⁴ Mc 10 ³
Suelo libre Zona 7	1	0,08	0,9	Cled 10 ³ Mc 10 ³

3.2 Cinéticas en placas Biolog ECO y Biolog FF.

En la **figura 1** se representa el valor de AWCD obtenido en las placas Biolog Eco, frente al tiempo de incubación de cada uno de los tratamientos estudiados. Esta representación gráfica nos da idea de la dinámica temporal de las comunidades bacterianas sometidas a los diferentes tratamientos al crecer en placa, y de su *funcionalidad* metabólica.

Detectamos un gradiente en la celeridad de consumo de las distintas fuentes de carbono y nitrógeno por parte de las respectivas comunidades bacterianas entre las muestras analizadas. Al inicio de la incubación (las dos primeras mediciones a 12 y 24 horas) no hay diferencias significativas entre las diferentes muestras. Comienzan a detectarse diferencias a partir de las 40 horas de incubación y desde las 64 horas los tratamientos de suelo libre (SL) difieren significativamente de los rizosféricos (RF), que no muestran diferencias significativas entre sí.

Así pues, la cinética encontrada sigue la siguiente gradación 7RF > 6RF > 7SL > 6SL, es decir la mayor *funcionalidad* metabólica se encuentra en muestras rizosféricas (mayor en las muestras de suelo con baja contaminación) y menor en las muestras de suelo libre (inferior en el suelo con alta contaminación).

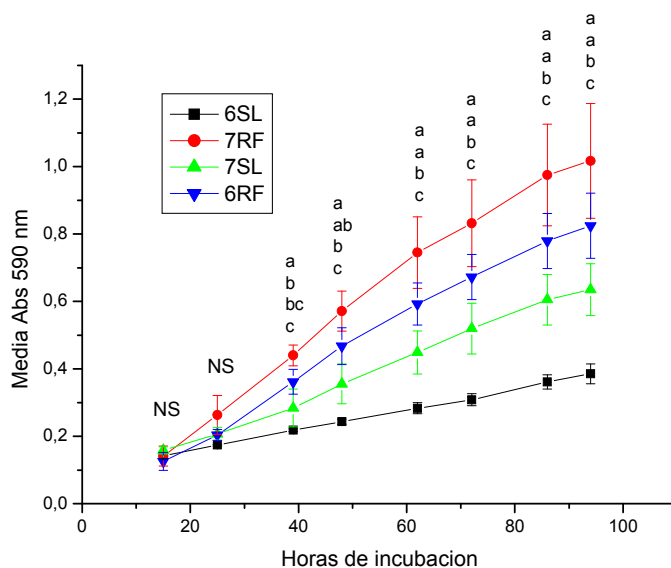


Figura 1. Valor de AWCD obtenido en las placas Biolog Eco, frente al tiempo de incubación de cada uno de las muestras estudiadas. En ordenadas se representa la absorbancia promedio de las tres repeticiones de cada réplica (n=3) y las barras de error estándar. Las letras a, b y c indican diferencias entre los manejos ($p < 0.05$), para cada tiempo de medición. NS, no hay diferencias significativas.

Como se puede observar en la **figura 2** correspondiente a las cinéticas en placas Biolog FF, los hongos muestran un metabolismo más activo en las muestras rizosféricas que en el suelo libre. Considerando la concentración de mercurio, se detecta mayor actividad en las muestras de menor nivel de contaminación. En periodos cortos de incubación no se detectan diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo desde las 50 horas, las muestras 7RF, 7SL y 6SL difieren estadísticamente entre sí, presentando valores intermedios la muestra 6RF entre 7RF y 7SL. Finalmente destacamos que los valores de absorbancia en Biolog FF son la mitad que los encontrados en Biolog Eco.

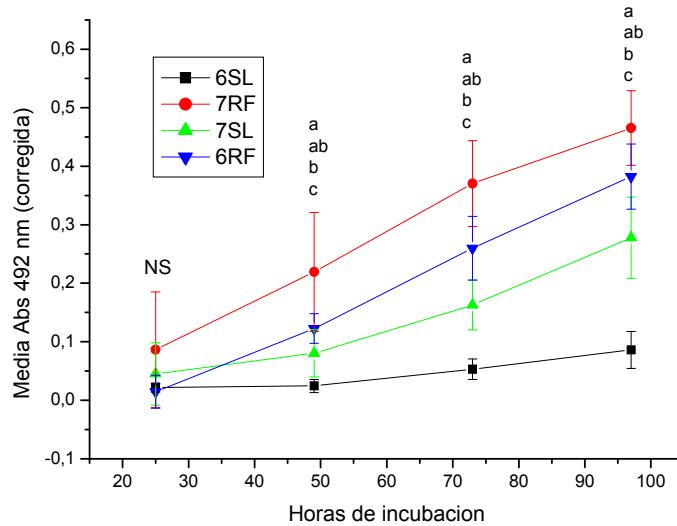


Figura 2. Valor de AWCD obtenido en las placas Biolog FF, frente al tiempo de incubación de cada uno de las muestras estudiadas. En ordenadas se representa la absorbancia promedio de las tres repeticiones de cada réplica (n=3) y las barras de error estándar. Las letras a, b y c indican diferencias entre los manejos ($p < 0.05$), para cada tiempo de medición. NS, no hay diferencias significativas.

3.3 Diversidad Metabólica

En la **figura 3** se muestran los resultados de diversidad metabólica encontrados en las placas Biolog ECO. La mayor diversidad biológica la encontramos en las muestras rizosféricas, que no difieren estadísticamente. Las muestras de suelo libre no difieren estadísticamente entre sí, pero si respecto a las rizosféricas.

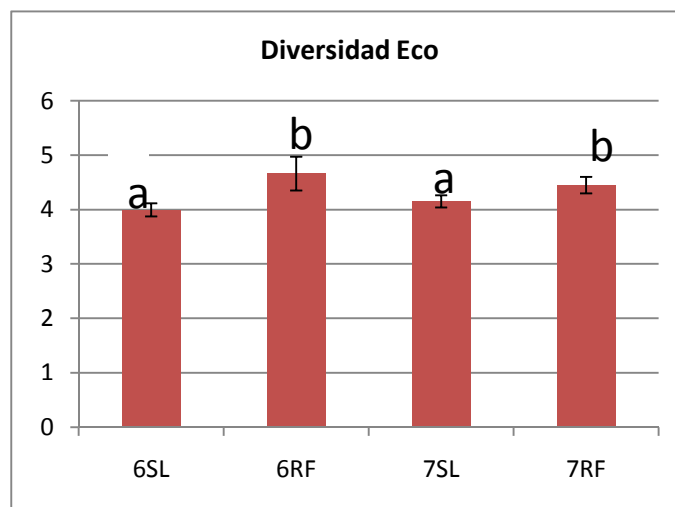


Figura 3. Valores de la diversidad metabólica [H(m)] obtenido a partir de los valores de absorbancia a 94 horas en las placas Biolog Eco, promedio de las tres repeticiones de cada réplica (n=3) y las barras de error estándar. Las letras a y b indican diferencias entre los manejos (p<0.05). Unidades de ordenadas, bits.

En la **figura 4** se han graficado los valores de diversidad metabólica de hongos (plagas Biolog FF). A diferencia del caso anterior (diversidad metabólica bacteriana) en el caso de los hongos los resultados son más homogéneos entre todas las muestras exceptuando la muestra 6SL, que exhibe una diversidad metabólica estadísticamente inferior al resto.

Destacamos que en el caso de diversidad para hongos, el valor supera los 5 bits en la mayor parte de los casos. Sin embargo en la diversidad metabólica bacteriana ninguna alcanza los 5 bits.

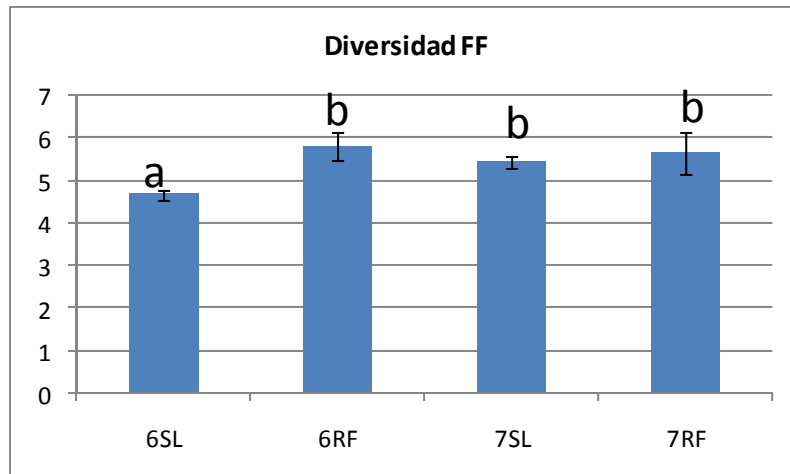


Figura 4. Valores de la diversidad metabólica [H(m)] obtenido a partir de los valores de absorbancia a 97 horas en las placas Biolog FF, promedio de las tres réplicas (n=3) y las barras de error estándar. Las letras a y b indican diferencias entre los manejos (p<0.05). Unidades de ordenadas, bits.

3.4 Diferencias en el CLPP de las comunidades (ACP).

En la **Figura 5** se muestra la proyección sobre los dos componentes principales del ACP realizado con los resultados de Biolog Eco (valores de absorbancia a las 94 horas). Estos dos primeros ejes explican un total del 63,5 % de la varianza (componente 1 46,1% y componente 2 17,4%). En la gráfica se puede observar una clara discriminación entre muestras de suelo libre y de suelo rizosférico especialmente evidente respecto al componente 1: las muestras RF se sitúan hacia los valores positivos de dicho componente mientras que las muestras SL lo hacen en valores negativos.

Atendiendo al componente 2 observamos que las muestras procedentes de la zona 6 (mayor concentración de Hg) están vinculadas a valores más altos en dicho eje.

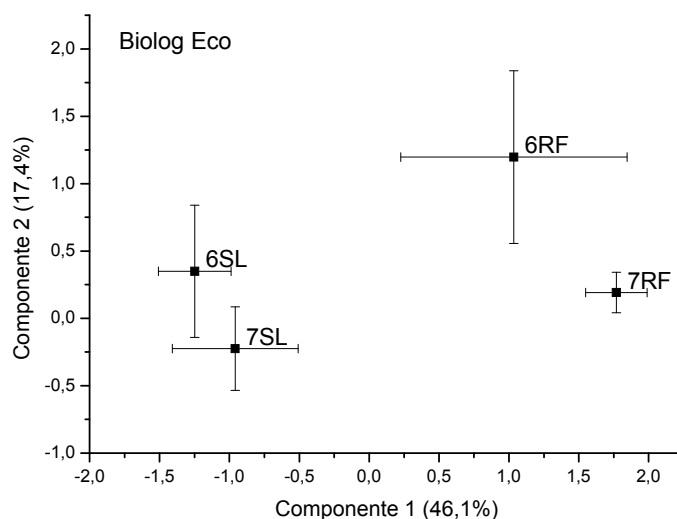


Figura 5. Representación del ACP de las muestras de Biolog Eco (CLPP en las diferentes muestras) proyectados en los dos primeros componentes; $n=3$, y barras de error estándar.

La **Figura 6** muestra los factores de carga del ACP mostrado en la figura 5. Como se puede observar, si proyectamos los factores de carga sobre el componente 1, las muestras de suelo libre están más vinculadas a azúcares (como celobiosa, manitol, glicógeno, eritrol...) mientras que las muestras rizosféricas lo están a aminoácidos (L-asparagina, L-arginina) y ácidos orgánicos (D-glucosamínico, Ac. pirúvico).

Si atendemos al componente 2 se observa que hacia los valores más altos están vinculados ácidos orgánicos y aminoácidos (correspondiente en el ACP con muestras de la zona 6) y los azúcares se localizan hacia valores más bajos de este eje (correspondiente en el ACP con las muestras de la zona 7, menos contaminada).

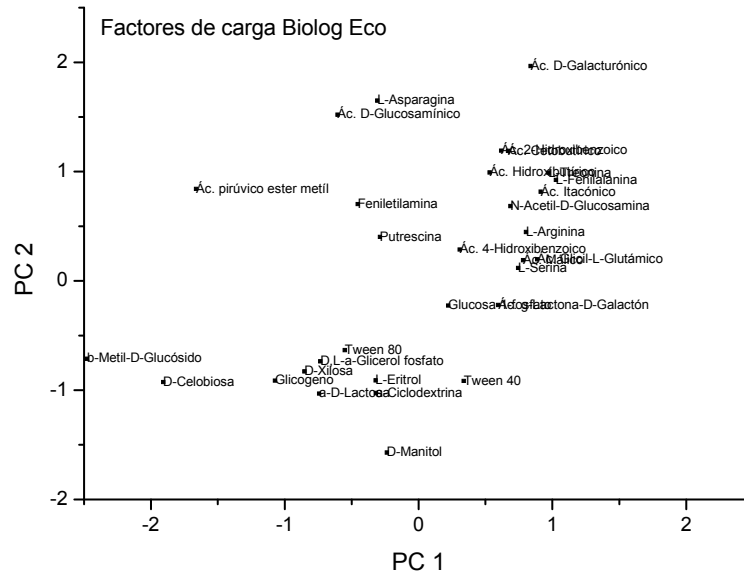


Figura 6. Representación de los factores de carga del ACP de las muestras de Biolog Eco (CLPP en las diferentes muestras).

La **Figura 7** muestra la proyección sobre los dos componentes principales del ACP realizado con los resultados de Biolog FF (valores de absorbancia a las 97 horas). El primer componente explica un 46,3% de la varianza total mientras que el componente 2 lo hace de un 30,7%, así los dos primeros ejes absorben un 77,0% de la varianza total. Las muestras rizosféricas aparecen próximas entre sí y se localizan hacia los valores más negativos de ambos componentes.

Las muestras de suelo libre aparecen distantes entre sí, encontrándose la de baja contaminación (7SL) hacia los valores altos del componente 2, y las muestras procedentes de la zona 6SL hacia los valores más bajos de dicho componente.

Si atendemos al componente 2, al proyectar sobre este las muestras, aquellas de alta contaminación (zona 6) presentan coordenadas más bajas y las de baja contaminación (zona 7) las presentan altas.

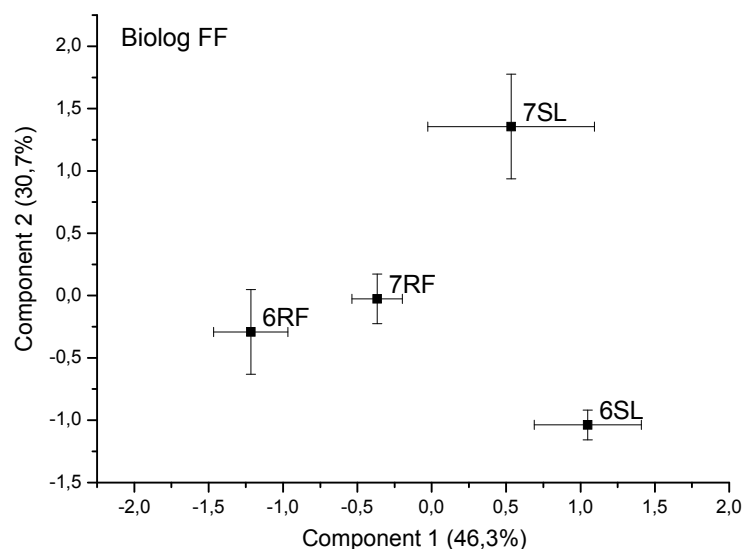


Figura 7. Representación del ACP de las muestras de Biolog FF (CLPP en las diferentes muestras) proyectados en los dos primeros componentes; $n=3$, y barras de error estándar.

La **figura 8** muestra los factores de carga del ACP representado en la figura 7. La mayor densidad de los 95 factores de carga se localiza próxima al origen de coordenadas, mientras que unos 30 factores de carga se localizan dispersos hacia los valores positivos de ambos ejes. Considerando esto junto a la disposición de muestras (figura 7) resulta evidente que son numerosas las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas por las comunidades fúngicas de RF (próximas al origen de coordenadas), mientras que son menores las utilizadas por las comunidades de SL (vinculadas a valores altos del componente 1). A diferencia de lo encontrado en los factores de carga del ACP con Biolog Eco, no se observan familias de compuestos (ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos) que formen agrupaciones definidas, y que carguen de forma prioritaria sobre la disposición de las muestras.

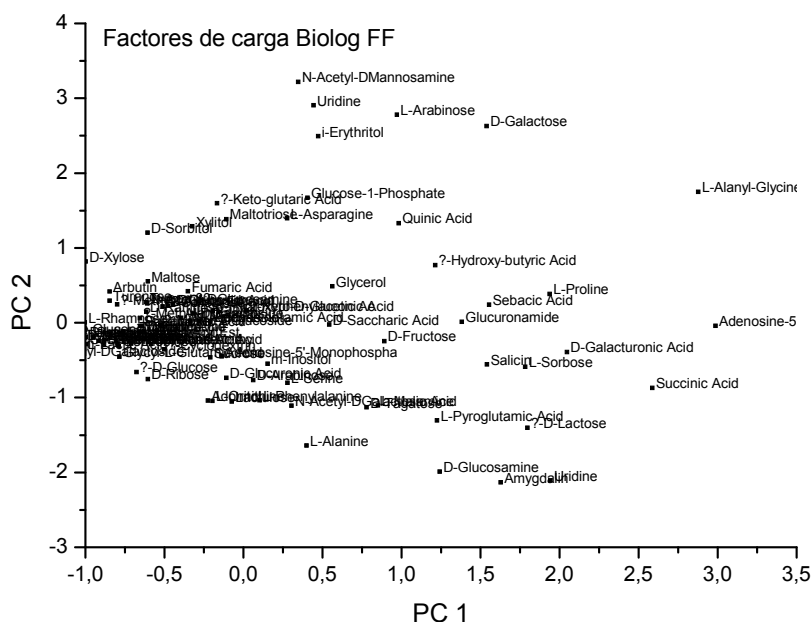


Figura 8. Representación de los factores de carga del ACP de las muestras de Biolog FF (CLPP en las diferentes muestras).

4. Discusión

En el presente trabajo se ha analizado por primera vez la estructura metabólica mediante CLPP de las comunidades microbianas tanto fúngicas como bacterianas en suelos del Distrito Minero de Almadén. El estudio se ha centrado en zonas previamente estudiadas por otros investigadores y con otros fines (Millán et al. 2007) si bien desde un punto de vista novedoso: nos hemos centrado no solo en el suelo libre sino también en la rizosfera de *Medicago sativa*. El trabajo se ha enfocado en esta especie al ser parte exploratoria, de un proyecto mayor, orientado a la rizoremediación. En este sentido, hay interesantes estudios en la literatura orientados tanto al conocimiento de mecanismos de resistencia de la planta como de su endosimbionte (Rai et al., 2004; Ruiz-Diez et al, 2012). No obstante cualquier proceso de rizoremediación debe contar con información de las comunidades microbianas autóctonas y de la planta que vaya a utilizarse. En este sentido se integra el presente trabajo.

La metodología de análisis de comunidades microbianas que hemos seguido es la conocida como CLPP (*Community Level Physiological Profile*) iniciada en los años 80 del pasado siglo como aplicación con fines taxonómicos para aislados bacterianos. Más adelante esta metodología fue adaptada por limnólogos para el estudio de comunidades bacterianas en aguas epicontinentales. Finalmente en los 90 comienzan a utilizarse para el estudio de comunidades microbianas edáficas (Garland y Mills, 1991). Las microplacas Biolog contienen diferentes fuentes de carbono y un colorante violeta redox de sales de tetrazolio que se convierte en azul si el microorganismo inoculado utiliza alguna de esas

fuentes. Al comparar los sustratos de carbono que han sido utilizados por el microorganismo con una base de datos, es posible la identificación de la cepa bacteriana.

Las microplacas Biolog Eco proporcionan un gran número de datos difíciles de interpretar, ya que no solo tiene en cuenta las bacterias sino que también la muestra del suelo y el pre tratamiento. También el procedimiento Biolog puede ser considerado un método en el que las comunidades originariamente inoculadas están alteradas y que eso de lugar a color en la microplaca porque estas interaccionen entre ellas. Aun así, este complejo set de datos obtenidos prueba que es un método relevante para la discriminación de comunidades bacterianas en base a su actividad catabólica (Muñiz et al., 2014).

Analizando nuestros resultados un primer aspecto llamativo es que las tasas metabólicas de las comunidades fúngicas son inferiores al de las comunidades bacterianas, tanto en rizosfera como fuera de ella y con independencia de la concentración de mercurio presente. Esto se puede deber a varias causas. La primera es que la tasa intrínseca metabólica de los hongos edáficos es inferior a la de las bacterias (de Boer et al., 2005). También podría deberse a que haya menos contingente de hongos que de bacterias. Sin descartar la primera causa, hay que considerar la segunda en base a los resultados obtenidos en el recuento en placa (tabla I) en la que solo hay crecimiento fúngico en la zona de baja concentración de Hg. Sin embargo como demuestran nuestros resultados de Biolog FF, cuando el periodo de incubación es más largo los hongos evidencian su presencia. Estos resultados son consistentes con el hecho de que los hongos tengan tasas de crecimiento más lentas que las bacterias en medios de cultivo.

En lo que se refiere a la cinética metabólica de las comunidades bacterianas (figura 1) y fúngicas (figura 2) se detecta la misma tendencia: a tiempos de incubación largos (94 o 97 horas) encontramos que las muestras rizosféricas tienen tasas metabólicas más altas que el suelo libre, y secundariamente que la alta concentración de Hg ralentiza la actividad metabólica, singularmente en suelo no rizosférico. Estos resultados indican que el status metabólico de los microorganismos procedentes de rizosfera es mayor que los de suelo libre, probablemente por estar activados su metabolismo para utilizar los compuestos orgánicos liberados por exudación (Bais et al., 2006). Si adicionalmente consideramos la concentración de mercurio en ambos suelos, vemos que en el caso con mayor concentración el metabolismo microbiológico se ve ralentizado, de modo que no se ve compensada esta actividad por la acción de la rizosfera.

Zeng et al. (2008) encuentra que en la rizosfera de plantas que crecen en suelos contaminados se da un incremento de la exudación de materia orgánica, singularmente ácidos orgánicos. Nuestros datos no son aparentemente consistentes con los del citado autor, probablemente porque aquellos analizan otra especie de planta (arroz) y otro metal pesado (Cr). Se sabe que entre los factores que modulan la exudación radical destacan la especie de planta y los estreses ambientales (Bais et al., 2006), consecuentemente deducimos que en el caso de alfalfa y mercurio no se promueve un nivel de exudación como el que refieren Zeng et al. (2008).

Jinga et al. (2007) estudiaron los efectos del pH, los ácidos orgánicos, y cationes competitivos en la desorción de Hg^{2+} de suelos, encontrando que los ácidos orgánicos (singularmente cítrico, oxálico) son capaces de sustraer Hg^{2+} adsorbido por arcillas y materia orgánica del suelo. Es conocido que las plantas exudan ácidos orgánicos, tanto

en condiciones normales (Badni y Vivanco, 2009) como bajo el efecto de materiales pesados (Zeng et al., 2008). Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos cuestionan si la disponibilidad para las bacterias de los exudados liberados por las plantas se ve alterada por la unión al mercurio del suelo de los ácidos orgánicos. Vemos que en los suelos rizosféricos la tasa metabólica de los microorganismos es mayor que aquella en suelo libre. Puede deberse a que el Hg^{2+} es captado por los ácidos orgánicos liberados por la planta, favoreciendo la actividad microbiológica. Sin embargo en los suelos con alta concentración de Hg^{2+} suponemos que las plantas son capaces no solo de exudar la cantidad suficiente de ácidos orgánicos que acomplejen al mercurio, sino que también liberen suficiente cantidad de los mismos como para que las bacterias continúen con su actividad metabólica aunque en menor cantidad que en suelos con menor concentración.

Los índices de diversidad metabólica (figura 3 y 4) no reflejan necesariamente la composición de las comunidades bacterianas. Así dos comunidades pueden tener distinta composición pero valores similares de diversidad metabólica, por ejemplo consumiendo distintas fuentes de carbono o nitrógeno pero con la misma intensidad (Sofo et al., 2014). En nuestro caso hemos asociado el análisis global de las comunidades mediante ACP para poder discriminar diferencias entre comunidades, aun en el caso en que los valores de diversidad sean iguales. Los resultados de diversidad metabólica encontrados en las comunidades bacterianas (Biolog Eco) son consistentes con los hallados en las cinéticas de población. El efecto del mercurio no se detecta, pero si el efecto rizosférico difiriendo significativamente las muestras de suelo libre y rizosférico (figura 3). En el caso de los hongos la diversidad más baja la encontramos en el suelo libre con mayor concentración de Hg, difiriendo significativamente del resto. Podemos suponer que esto se debe a que la concentración de mercurio y la ausencia de fuentes de carbono procedentes de la rizosfera dificulten las condiciones de desarrollo de los hongos.

Un aspecto a destacar es el rango de diversidades metabólicas encontradas en bacterias respecto al encontrado en hongos. En las primeras los valores oscilan entre 4 y 4,6 bits, mientras que en los hongos fluctúan entre el 4,5 y casi 6 bits. Se podría pensar que las comunidades fúngicas son más diversas que las bacterianas. De hecho se sabe que los hongos son más tolerantes a la presencia de metales pesados que las bacterias (Forstegård et al., 1993). Sin embargo no podemos descartar que esta observación se deba a un artefacto matemático del algoritmo de diversidad: el número de pocillos en las placas Biolog FF es de 95 mientras que en Biolog Eco es de 31 pocillos. Así una comunidad fúngica que utilizase la mitad de las fuentes de carbono sería aparentemente más diversa que una comunidad bacteriana que utilizase el 100% de las fuentes de carbono.

Es conocido que la diversidad en la rizosfera es menor que en suelo libre como se sabe desde hace años (Marilley et al., 1998), por efecto de la selección de microorganismos por la planta a través de los exudados, circunstancia que no sucede en el suelo libre. Nuestros resultados en el caso de la diversidad fúngica podrían responder a este modelo (figura 4), mientras que no lo hace en ningún caso en la diversidad bacteriana (figura 3). En este último caso encontramos justo lo contrario. Tenemos que tener en cuenta que la selección de bacterias por la planta es en base a la diversidad taxonómica, y en nuestro estudio nos hemos basado en la diversidad metabólica.

También debemos suponer que la presencia de mercurio afecta por tanto a esta selección, ya que la unión del mercurio a los ácidos orgánicos de los exudados de la planta favorecen la actividad metabólica bacteriana, y ello a su vez favorece su diversidad metabólica. En suelos libres, sin embargo, al no existir la presencia rizosférica y el aporte de materia orgánica en forma de los exudados, se reduce la diversidad. Adicionalmente, en el suelo libre no se produce una amortiguación del efecto tóxico del Hg sobre las bacterias derivada de la desorción del metal pesado por los ácidos orgánicos.

El análisis global de los CLPP tanto de las comunidades fúngicas como bacterianas (figuras 5 y 7) mediante ACP nos aportan más información que los análisis de diversidad o de cinéticas, descubriendo diferencias que no se evidenciaban a través de las otras aproximaciones.

La discriminación de las cuatro muestras obtenidas por Biolog Eco mediante el ACP es clara y permite diferenciar el efecto rizosfera (proyección sobre el componente 1) y el efecto Hg (proyección sobre el componente 2). Esto nos permite indicar que existe una jerarquía de los factores determinantes de la estructura de las comunidades bacterianas en la que el efecto raíz es superior.

La localización de las muestras en el ACP (figura 5) viene determinada por los factores de carga (figura 6), que son las fuentes de carbono y nitrógeno más activamente utilizadas por las bacterias. Los factores de carga que más peso tienen en suelo rizosférico son aminoácidos y ácidos orgánicos. Podemos inferir que son compuestos de ese tipo los que en el momento de extraer las bacterias del suelo son su sustrato prioritario, y consecuentemente se correspondería con la composición química de los exudados. Este razonamiento es compatible con lo encontrado por Johansson et al. (2008). Estos autores analizando químicamente los exudados de plantas sometidas a metales pesados encuentran que la presencia de estos estimula la producción de aminoácidos y ácidos orgánicos.

En lo que respecta a los factores de carga de las muestras de suelo libre son fundamentalmente azúcares. Las bacterias procedentes de muestras rizosféricas están metabólicamente activas en el momento de hacer la extracción (al estar utilizando los sustratos liberados por exudación). Sin embargo las bacterias procedentes de suelo libre están (muy probablemente) en estado latente o de baja actividad metabólica (consistente con los resultados cinéticos). Al ser inoculadas en los pocillos de las placas Biolog, es muy probable que consuman más activamente sustratos fácilmente asimilables (como es el caso de los azúcares).

Respecto al ACP realizado con los resultados de CLPP de Biolog FF (figura 7) se observan tendencias análogas pero no iguales a las obtenidas para bacterias: discriminación por el primer componente de rizosfera vs suelo libre, y separación por el componente 2 de alta contaminación vs baja contaminación.

Observamos que las comunidades fúngicas se ven más afectadas por la presencia del mercurio cuando no están favorecidas por el efecto rizosfera que las comunidades bacterianas. Los hongos encontrados en la zona de suelo libre con mayor concentración de mercurio se ven ampliamente desplazados de los encontrados en las otras muestras, y estos resultados coinciden con los obtenidos en los análisis de diversidad metabólica.

Los factores de carga del ACP (figura 8) nos muestran como las comunidades fúngicas encontradas en suelo libre tienen un uso mucho más restringido de fuentes de carbono que aquellas encontradas en suelo rizosférico. Estos resultados son consistentes con los resultados hallados tanto en la diversidad metabólica como en la cinética de las comunidades. A diferencia del caso anterior, no nos es posible inferir qué tipo de moléculas están presentes en los exudados a partir de las fuentes de carbono y nitrógeno que son utilizadas por los hongos. Sin embargo es notoria la diferenciación que hay de factores de carga entre suelo libre y suelo rizosférico, ya que en suelo libre la cantidad de sustratos es mínima, mientras que en suelo rizosférico es muy amplia (figura 9).

En síntesis, nuestro estudio demuestra que el factor principal que conforma el perfil metabólico de las comunidades microbianas (tanto fúngicas como bacterianas) en suelos con alta o baja contaminación de Hg es el efecto rizosfera de la planta estudiada, *Medicago sativa*. Así tanto la diversidad metabólica, las cinéticas, como el CLPP mediante (ACPs) indican una amortiguación del efecto tóxico del mercurio sobre las comunidades microbianas por la planta muy probablemente a través de los exudados. En el caso de las comunidades bacterianas hemos detectado efecto de ácidos orgánicos y aminoácidos, pero en el caso de las comunidades fúngicas no hay ningún grupo bioquímico de compuestos que tenga un papel relevante. Estos resultados permiten especular que *Medicago sativa* en combinación con microorganismos edáficos podría ser una buena candidata para la biorremediación del suelo del distrito minero de Almadén.

5. Conclusiones

A partir de los resultados descritos y discutidos anteriormente y considerando los objetivos del presente trabajo, exponemos a continuación las siguientes conclusiones:

- 1- Las tasas metabólicas de las comunidades fúngicas de suelo libre y de suelo rizosférico de *Medicago sativa* son inferiores a las encontradas al analizar las comunidades bacterianas, con independencia de la concentración de mercurio del suelo. Esto se puede deber, bien a la inferior tasa intrínseca metabólica de los hongos o bien a que el número (tamaño de la comunidad) fuese inferior al de bacterias.
- 2- El análisis de la cinética metabólica de las comunidades bacterianas indica que las muestras rizosféricas tienen tasas superiores a las de suelo libre y, secundariamente, el efecto del metal pesado ralentiza la actividad metabólica (de forma más obvia en el suelo rizosférico). Nuestros resultados sugieren que las bacterias procedentes de rizosfera están más activas, probablemente por sustentar su metabolismo mediante compuestos orgánicos liberados por exudación radical.
- 3- En cuanto a la diversidad metabólica de las comunidades bacterianas, no detectamos efecto del mercurio, pero sí el efecto de la planta (rizosfera). En el caso de la diversidad metabólica en hongos, los valores más bajos aparecen en el suelo libre con mayor concentración de mercurio.
- 4- El análisis de componentes principales realizado con el CLPP de Biolog Eco (comunidades bacterianas) discrimina claramente el efecto raíz (asociado al componente principal 1) y el efecto del mercurio (asociado al segundo componente

principal). Esta jerarquía no se detectaba ni en el estudio de cinéticas ni en el de diversidad metabólica. Los factores de carga indican que las bacterias procedentes de rizosfera consumen básicamente ácidos orgánicos y aminoácidos, por lo que inferimos que están adaptadas a la metabolización de estos compuestos y consecuentemente deben estar presentes en los exudados.

- 5- El análisis de componentes principales realizado con el CLPP de Biolog FF (comunidades fúngicas) discrimina también de forma jerárquica el efecto de la rizosfera y nivel de contaminación por mercurio. No es posible detectar si hay grupos de compuestos (fuentes de carbono y nitrógeno, factores de carga) que de una forma prioritaria sean utilizados por los hongos de rizosfera o de suelo libre. Sin embargo los factores de carga si exhiben una mayor heterogeneidad metabólica de las muestras rizosfericas, lo que sería consistente con la presencia de exudados en estas.
- 6- Considerando las conclusiones anteriores, el presente estudio demuestra que el factor principal que determina el perfil metabólico de las comunidades microbianas (bacterianas y fúngicas) en el suelo estudiado (distrito minero de Almadén) es el efecto rizosfera de la planta estudiada: *Medicago sativa*. La rizosfera (a la luz de nuestros resultados) tampona el efecto deletéreo del mercurio, muy probablemente mediante ácidos orgánicos de los exudados.

6. Bibliografía

Badri DV, Weir TL, Van der Lelie D, Vivanco JM. (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol.*20(6):642-650.

Badri, DV, Vivanco JM. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell and Environ.* 32:666-681

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology* 57: 233-266.

Berzas JJ, García Bermejo LF, Rodríguez, Martín-Doimeadios, RC. (2003) Distribution of Mercury in the aquatic environment at Almadén, Spain. *Environ. Pollut.* 122: 261-271.

De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L (2005). Living in a fungal world: impact of fungi in soil bacteria niche development. *FEMS microbiology reviews* 29: 795-881

Frostegård A, Tunlid A, Bååth E, (1993). Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Environ Microbiol* 59(11):3605-3617

García-Villarco Velasco A, Probanza A, Gutierrez Mañero JR, Ramos B, Lucas García J A. (2009). Functional diversity of rhizosphere microorganisms from different genotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Community Ecology* 10(1):111-119

Garland, JL, Mills AL.(1991). Basis of Patterns of Community-Level Heterotrophic Microbial Communities on the Classification and characterization of Sole-Carbon-Source Utilization Appl. *Environ. Microbiol.*57(8):2351.

Hartmann A, Widmer F. (2006). Community Structure Analyses Are More Sensitive to differences in Soil Bacterial Communities than Anonymous Diversity Indices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(12):7804-7812

Higueras P, Molina JA, Oyarzun R, Lillo J, Esbrí JM.(2004). Identification of the plant-communities and hyperaccumulators in Mercury contaminated sectors of the Almadén district, Spain. *RMZ Mater Geoenviron* 51:103-7.

Higueras P, Oyarzun R, Biester H, Lillo J and Lorenzo S.(2003). A first insight into mercury distribution and speciation in soils from the Almadén mining district, Spain. *J. Geochem. Explorat* 80:95-104.

Jinga YD, Hea ZL, Yanga XE. (2007) Effects of pH, organic acids, and competitive cations on mercury desorption in soils. *Chemosphere* 69 (10):1662-1669

Johansson EM, Fransson PMA, Finlay RD, Van Hees PAW. (2008) Quantitative Analysis of root and ectomycorrhizal exudates as a response to Pb, Cd and As stress. *Plant and Soil* 313 (1,2):39-54

Kamitani T, Oba H, Kaneko N. (2006) Microbial biomass and tolerance of microbial community on an aged heavy metal polluted floodplain in Japan. *Water Air Soil Pollution* 172:185-200

- Kenarova A, Radeva G, Traykov I, Boteva S.** (2014). Community level physiological profiles of bacterial communities inhabiting uranium mining impacted sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100:226–232
- Kennedy AC, Smith KL.** (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In: *The significance and regulation of soil diversity* (H.P. Collins et al., Eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 75-86.
- Lynch, JM** (1990). *The Rhizosphere.* (J.M. Lynch, Ed). John Wiley & Sons, Chichester. 458 pp.
- Millan R, Carpena R.O, Schmid T, Sierra M.J., Moreno E., Peñalosa J., Gamarra R., Esteban E.** (2007). Rehabilitacion de suelos contaminados con mercurio: estrategias aplicables en el área de Almadén. *Ecosistemas* 16(2):56-66.
- Millán R, Schmid MJ, Carrasco-Gil S, Villadóniga M, Rico C, Sánchez Ledesma DM, Díaz Puente FJ.** (2011). Spatial variation of biological and pedological properties in an area affected by a metallurgical Mercury plant: Almadenejos (Spain). *Appl. Geochem.* 26 :174-181
- Millan R, Gamarra R, Schmid R, Sierra T, Quejido MJ, Sanchez A et al.** (2006) Mercury content in vegetation and soils of the Almaden mining area (Spain). *Sci. Total Environ.* 368:79-87
- Moreno-Jiménez E, Gamarra R, Carpena-Ruiz RO, Millán R, Peñalosa JM, Esteban E.** (2006). Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almadén area. *Chemosphere* 63:1969–1973
- Müller AK, Rasmussen LD, Sorensen JS.** (2001) Adaptation of the bacterial community to mercury contamination. *FEMS Microbiol Lett* 204:49–53.
- Muñiz S, Lacarta J, Pata MP, Jimenez JJ, Navarro E.** (2014). Analysis of the Diversity of substrate utilisation of soil bacteria exposed to Cd and earthworm activity using generalised additive methods. *PLoS ONE* 9(1): e85057. doi: 10.1371/journal.pone.0085057
- Niklińska M, Chodak M, Laskowski R** (2005) Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area. *Soil Biol Biochem* 37: 2185–2194.
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development.** (2001). Environmental indicators for agriculture, vol. 3. OECD Publication Service, Paris, France.
- Rai UN, Pandey K, Sinha S, Singh A, Saxena R, Gupta DK.** (2004). Revegetating fly ash landfills with *Prosopis juliflora* L.: impact of different amendments and Rhizobium inoculation. *Environment International* 30:293-300.
- Ruiz Palomino M, Lucas García JA, Ramos B, Gutierrez Mañero FJ, Probanza A.** (2005). Seasonal diversity changes in alder (*alnus glutinosa*) culturable rhizobacterial communities throughout a phenological cycle. *Applied Soil Ecology.* 29: 215-224
- Ruiz-Díez B, Quiñones MA, Fajardo S, López MA, Higuera P, Fernández-Pascual M.** (2012.) Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:543–554

- Smith E, Wolters A and Jan Elsas JD** (1998). Self-transmissible Mercury resistance plasmids with gene-mobilizing capacity in soil bacteria populations: influence of wheat roots and mercury addition. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4):1210-1219
- Söderberg KH, Probanza A, Jumpponen A, Baath E.** (2004). The microbial community in the rhizosphere determined by community-level physiological profiles (CLPP) and direct soil- and cfu-PLFA techniques. *Applied Soil Ecology* 25:135-145
- Sofo A, Ciarfaglia A, Scopa A, Camele I, Curci M, Crecchio C, Xiloyannes C.** (2014) Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. *Soil Use and Management* 30:160-167
- Sprocati AR, Alisi C, Tasso F, Fiore A, Marconi P, Langella F, Haferburg G, Nicoara A, Neagoe A, Kothe E.** (2013) Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils. *Environ Sci Pollut Res Int* 21(11): 6824-6835
- Walker J.D and Colwell R.R.** (1973) Mercury resistant bacteria and petroleum degradation. *Applied Microbiology* 27:285-287
- Wenzel WW** (2009) Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321:385-408
- Xie X, Liao M, Ma A, Zhang H** (2011). Effects of contamination of single and combined cadmium and mercury on the soil microbial community structural diversity and functional diversity. *Chinese Journal of Geochemistry* 30 (3):366-374
- Zeng F., Chen S., Miao Y., Wu F.** (2008). Changes in organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. *Environmental Pollution* 155 (2):284-289.