

TOLERANCIA ADAPTATIVA DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES AL CRECER EN SUSTRATOS CONTAMINADOS CON As Y Cu

Gabriela SÁNCHEZ-VIVEROS¹, Rogelio CARRILLO-GONZÁLEZ¹, Angel MARTÍNEZ-GARZA^{†2} y Ma. del Carmen GONZÁLEZ-CHÁVEZ¹

¹ Área de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, 56630, Montecillo, Edo. de México, México.

² Instituto de Estadística e Informática, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Montecillo, Edo. de México, México, correo electrónico: carmeng@colpos.mx

(Recibido octubre 2003, aceptado mayo, 2004)

Palabras clave: elementos potencialmente tóxicos, pared celular, quitina, hongos arbusculares, elementos traza

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue analizar los cambios fisiológicos y morfológicos en esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que se propagaron por ciclos continuos y discontinuos (de un año) en un sustrato contaminado con As y Cu. Se estudió la cinética de la germinación, el grosor de la pared y el contenido de quitina en tres HMA y adicionalmente, la capacidad de las esporas de un HMA para secuestrar Cu. Los hongos que se utilizaron fueron: *Glomus mosseae* BEG-132 (Nicolson y Gerdemann) y *G. caledonium* (Nicolson y Gerdemann) BEG-133, aislados de un suelo contaminado con As y Cu, y *G. claroideum* (Zac-19) (Schenck y Smith) aislado de un suelo no contaminado. La secuencia de los ciclos de propagación en los tratamientos que se establecieron fue: SC-SC, SC-C, C-SC y C-C (SC = sin contaminación y C = con contaminación en el sustrato). En la prueba de germinación se aplicaron cinco concentraciones de As y Cu para determinar la posible modificación en la tolerancia de las esporas después de su propagación en los cuatro tratamientos antes mencionados. En las cinco concentraciones de As y Cu que se probaron el porcentaje de germinación de BEG-132 y BEG-133 fue mayor que el de Zac-19. El nivel más alto de contaminación afectó negativamente la germinación de esporas de BEG-132. La propagación en sustrato contaminado en el segundo ciclo (SC-C; C-C) incrementó significativamente el porcentaje de germinación en esporas de BEG-132. En Zac-19 la exposición con el contaminante (SC-C) incrementó su tolerancia a la concentración más alta de As y Cu. Se observó mayor grosor de la pared en el tratamiento C-C en esporas de BEG-132 y BEG-133 y en SC-C en esporas de Zac-19. En este último hongo, el grosor de la pared se incrementó en 2 µm. Las esporas de Zac-19 presentaron mayor contenido de quitina, que las de los hongos aislados de suelos contaminados; sin embargo, la quitina en las esporas de este hongo no mostró diferencias significativas por su propagación en sustrato contaminado (SC-C). En los aislados BEG-132 y 133, el menor contenido de quitina se observó en esporas que se propagaron por dos ciclos continuos en sustrato no contaminado (SC-SC) y el máximo en esporas del tratamiento (SC-C). Las esporas de BEG-132 secuestraron entre 470 y 680 µg g⁻¹ de Cu (en base a peso seco). Se observó tolerancia a As y Cu en las tres especies de HMA, pero ésta se modificó por la presencia o no del contaminante durante la propagación de los hongos. Aparentemente esta respuesta dependió de variaciones entre las especies de los HMA.

Key words: potentially toxic elements, chitin, cell wall, arbuscular fungi, trace elements

ABSTRACT

The effect of one-year sequential and non-sequential fungal propagation, under polluted or non-polluted conditions, on As and Cu fungal tolerance were studied. Germination, cell wall thickness, chitin and Cu content of spores were determined. Two arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), isolated from As and Cu polluted soil, *Glomus mosseae* BEG-132 (Nicolson and Gerdemann), *G. caledonium* BEG-133 (Nicolson and Gerdemann), and one fungi from a non polluted soil *G. claroideum* Zac-19 (Schenck and Smith) were used in this research. The treatments were: 1) WP-WP; 2) WP-P; 3) P-WP and 4) P-P, where WP=without pollution and P=polluted soil in the propagation substrate. In order to determine tolerance changes due to As and Cu exposure, spores were established under five As and Cu concentrations. Spores of *G. mosseae* BEG-132 and *G. caledonium* BEG-133 had higher germination capacity than *G. claroideum* (Zac-19), under all the As and Cu concentrations. The most negative effect on spore germination in BEG-132 was related to the highest As and Cu concentration level tested. The propagation in polluted substrate in the second cycle (WP-P; P-P) significantly increased percentage of germination in spores of BEG-132. After pollution exposure, *Glomus claroideum* Zac-19 (WP-P) increased its tolerance to the highest As and Cu concentration. Additionally, with this fungus, it was observed negative chemotropism in the germination tubes when spores germinated in polluted substrate. Spore cell wall thickness increased after propagation in polluted substrate. This was observed with BEG-132 and BEG-133 in the P-P treatment; while in Zac-19 this occurred in WP-P. In Zac-19, spore thickness increased from 5.4 μm to 7.4 μm after one-year propagation in polluted substrate (WP-P); however, this increment was not related to spore chitin content. This fungus showed the higher spore chitin content in comparison to the chitin content in spores of the other two fungi. Spores of BEG-132 and 133 presented the highest chitin content in WP-P treatment. Spores BEG-132 sequestered Cu in a range from 470 to 680 $\mu\text{g g}^{-1}$ (spore dry weight). Higher Cu sequestration corresponded to spores from WP-P and P-P treatments. Summarizing, in response to presence or not of polluted conditions during fungal propagation, germination percentage, cell wall thickness and chitin contents were modified. These responses were fungi strain-dependent. In conclusion, it was observed that AMF modified their tolerance to As and Cu as result of differences in fungal culture conditions and it may depend of inter- and intraspecific fungal variations.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las investigaciones sobre la interacción de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y los elementos potencialmente tóxicos (EPT) comparan el comportamiento entre plantas micorrizadas y no micorrizadas a concentraciones altas de EPT. Sin embargo, los resultados de tales experimentos no son del todo claros y muchas veces son contradictorios. Se ha reportado que en algunos casos los HMA incrementan la absorción de EPT en sus plantas hospedadoras; pero en otros, que los hongos disminuyen su absorción e incrementan la tolerancia en las plantas a estos elementos. Esta discrepancia puede ser debida al tipo de hongo y planta utilizado y al desconocimiento de los mecanismos de tolerancia y adaptación de los HMA en condiciones contaminadas. Algunos autores informan que cepas fúngicas aisladas de suelos contaminados son más tolerantes que cepas de suelos no contaminados (Gildon y Tinker 1983, Weissenhorn *et al.* 1994, de Val *et al.* 1999). Sus estudios se basan en la colonización del hongo en las raíces de las plan-

tas a concentraciones altas de EPT en el suelo. Las respuestas son una combinación de la tolerancia de la planta y la del hongo. Aparentemente, las plantas presentan mayor tolerancia a los EPT que los HMA (Gildon y Tinker 1983, Weissenhorn y Leyval 1995 y Malcová *et al.* 2002), por lo que en estas investigaciones se enmascara la tolerancia directa que el hongo puede tener. Es necesario realizar más estudios de los mecanismos de tolerancia en el hongo, sin interferencia de la planta, para entender mejor el tipo de interacciones que se establecen con la planta y para su uso en las prácticas de recuperación de suelos contaminados. Este conocimiento es relevante porque estos hongos tienen un papel importante en el establecimiento, el crecimiento y la tolerancia de una diversidad muy amplia de plantas en diferentes ecosistemas (van der Heijden y Sanders 2002) y en suelos contaminados su presencia es común, sin embargo su papel ecológico no se entiende del todo.

Aparentemente, los organismos se adaptan para sobrevivir en ambientes contaminados, lo cual se debe a múltiples mecanismos intrínsecos o de respuesta a

los contaminantes para controlar su disponibilidad, movilidad y toxicidad. Diversos estudios con hongos filamentosos y bacterias muestran que la tolerancia se obtiene por exposición secuencial o continua a EPT (Valix *et al.* 2001). Sin embargo, en HMA poco se conoce de la evolución y estabilidad de la tolerancia a EPT y de los posibles cambios fisiológicos o morfológicos que estos hongos pueden tener al subcultivarse en sustratos contaminados o libres de contaminación. Weissenhorn *et al.* (1994), utilizando la prueba de germinación, reportaron que las esporas de cultivos fúngicos aisladas de un suelo contaminado con Zn y Cd perdieron su alta tolerancia después de su propagación durante seis meses en un sustrato libre de contaminación. Recientemente, Malcová *et al.* (2003) describieron una reducción en la tolerancia a Mn en *Glomus* sp. BEG-140, aislado de suelos altamente contaminados con Mn, al ser subcultivado por dos años en un sustrato libre de contaminación. Sin embargo, estos autores no mostraron si la tolerancia en estos hongos puede recuperarse al cultivarlos nuevamente en un sustrato contaminado, ni tampoco los mecanismos involucrados en este proceso.

Se conoce que las propiedades estructurales de los microorganismos influyen su tolerancia a EPT. Mullen *et al.* (1992) y Gardea-Torresdey *et al.* (1997) sugirieron que los microorganismos en la presencia de EPT sufren cambios morfológicos en su pared celular y consecuentemente en su capacidad de bioabsorber estos elementos. Mullen *et al.* (1992) y Cano-Aguilera *et al.* (1996) demostraron que la quitina y sus derivados, en la pared de los hongos, funcionan como bioabsorbentes y son los responsables de secuestrar EPT. Se sabe que las hifas de los HMA participan en el secuestro de EPT, principalmente por biosorción (González-Chávez *et al.* 2002), uno de los mecanismos de tolerancia a estos elementos. En este proceso se involucra en parte a la glomalina (González-Chávez *et al.* 2004), una proteína que producen sólo las hifas de este tipo de hongos y que puede excretarse al suelo; sin embargo, se desconoce la capacidad de secuestro en otro tipo de estructuras fúngicas, como las esporas.

El objetivo del presente trabajo fue analizar los cambios fisiológicos y morfológicos de esporas de tres aislados fúngicos micorrízicos arbusculares, después de ciclos anuales de propagación continua y discontinua en sustratos contaminados con As y Cu. Se estudió la capacidad de germinación en esporas expuestas a cinco concentraciones crecientes de contaminación, las modificaciones morfológicas en la pared celular (grosor y contenido de quitina) y la eficiencia de esporas de *G. mosseae* BEG 132 para secuestrar cobre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies fúngicas y método de propagación

Las especies de HMA que se utilizaron fueron: *Glomus mosseae* BEG-132 y *G. caledonium* BEG-133, que se aislaron de un suelo contaminado con As y Cu (González-Chávez *et al.* 2002) y *G. claroideum* Zac-19 que se aisló de un suelo agrícola no contaminado. Los hongos, con origen inicial de cultivo monospórico, se propagaron por dos ciclos anuales en forma continua y discontinua en un sustrato contaminado. Este sustrato consistió en la mezcla de 1 kg de arena de río esterilizada y 15 g de suelo contaminado (130 mg kg⁻¹ y 97 mg kg⁻¹ de As y Cu disponible, respectivamente) y γ -irradiado a 10 kGy (irradiación parcial que elimina del suelo hongos, pero no bacterias). El sustrato sin contaminar fue arena de río esterilizada.

Los hongos se propagaron en sorgo (*Sorghum vulgare* L.) como planta hospedante. Las plantas crecieron en condiciones de invernadero (temperatura mínima/máxima 25/40 °C; fotoperiodo 12 h). La macetas se regaron tres veces a la semana con agua de la llave y semanalmente con la solución nutritiva Long Asthon (Hewitt 1966) pobre en fósforo.

Los hongos se propagaron asexualmente por un año en cada ciclo. Al finalizar el primer ciclo, la planta se cosechó y del sustrato donde los hongos se propagaron se separaron esporas, las que se utilizaron como inóculo para preparar el segundo cultivo fúngico (segundo ciclo). En el caso de ciclos continuos: C-C, SC-SC, se empleó la misma planta hospedera y el mismo tipo de sustrato que en el primer ciclo de cultivo. Esto es, la propagación del hongo se realizó en el mismo tipo de sustrato durante dos años. En el caso de ciclos discontinuos de crecimiento, el segundo ciclo se llevó a cabo en un tipo diferente de sustrato al que se empleó en la primera propagación. Esto es, si en el primer ciclo el sustrato no fue contaminado (SC), en el segundo, el sustrato fue contaminado (C). De igual manera, como se explicó con anterioridad, se separaron esporas que sirvieron para preparar el segundo cultivo que se mantuvo por un año de crecimiento adicional. De este procedimiento se generaron los tratamientos: SC-C y C-SC. Las plantas se mantuvieron en invernadero, bajo las mismas condiciones de crecimiento previamente descritas.

Germinación de esporas de hongos arbusculares

Después de los ciclos de propagación respectivos, las esporas se separaron por el método de Gerdeman y Nicolson (1963). El sustrato que se utilizó para realizar la prueba de germinación de las esporas, fue una mezcla de arena de río esterilizada y de suelo contaminado con As y Cu en proporciones de 1:0; 1:0.0075; 1:0.015; 1:0.0235 y 1:0.03 (kg de arena y suelo, res-

pectivamente). Esto dio como resultado cinco niveles de contaminación (0/0, 36/36, 41/44, 59/72, 82/51 mM de As y Cu disponibles, respectivamente). El sustrato testigo fue arena esterilizada. Las unidades experimentales consistieron en cajas de Petri con 50 g de las mezclas preparadas. En las cajas se colocaron membranas Millipore (0.45 μ m, 24 μ m diámetro) y se adicionaron 15 mL de agua destilada estéril para obtener 80 % de capacidad de campo. Sobre cada membrana se colocaron 10 esporas (similares en color y tamaño y con apariencia viable: llenas de citoplasma con gotas lipídicas y sin daño aparente) de cada una de las especies de los HMA a evaluar (método de filtro abierto, Brundrett y Saito 1995). Las cajas de Petri se sellaron con parafilm y se incubaron a 28 °C en la oscuridad. La germinación se cuantificó cada dos días con ayuda de un microscopio estereoscópico, previa adición de azul tripano diluido (0.01 %).

En cada caja de Petri, con los diferentes niveles de contaminación, se colocaron membranas con los tres distintos HMA probados. Los tratamientos se establecieron en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Cada repetición consistió de 10 esporas por membrana por caja. La unidad experimental fue cada espора. Se determinó el porcentaje de germinación en cada nivel de contaminación. Los datos de porcentaje de germinación se transformaron a intervalos, por ser una variable que no presenta distribución normal. Se realizó un análisis de varianza y posteriormente una prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$). Los datos se analizaron en el programa SAS versión 6.12.

Grosor de la pared de las esporas de hongos micorrízicos arbusculares

En un portaobjetos se colocó una gota de alcohol polivinil-lactoglicerol (PVLG) y 10 esporas de los HMA provenientes de cada tratamiento de propagación. Las muestras se cubrieron con un cubreobjetos y se aplicó una ligera presión para romper la pared de las esporas y así facilitar la medición de las mismas (Schenck y Perez 1990). Las laminillas se dejaron horizontalmente en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente. La medición del grosor de la pared de las esporas se realizó en un microscopio óptico (Leica Microstar IV, Reichert, NY, EUA) con ayuda de un ocular micrométrico a un aumento de 100X. Cada espора se dividió en tres segmentos imaginarios y en cada segmento se realizaron tres mediciones, lo que resultó en nueve mediciones por espора. Se midieron diez esporas por cada tratamiento, obteniendo un total de 90 observaciones por tratamiento. La unidad experimental fue cada medición del grosor de la pared. Las medidas del grosor de la pared de las esporas se transformaron a intervalos, por ser una variable que

no presentó un comportamiento normal. Se realizó un análisis estadístico y al encontrar diferencias significativas entre tratamientos se procedió a un comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$). Los datos se analizaron en el programa SAS versión 6.12.

Contenido de quitina en esporas de hongos micorrízicos arbusculares

El contenido de quitina en la pared de las esporas de las tres especies de HMA se determinó por colorimetría. Se cuantificó la concentración de hexosaminas (Dische 1962) y se estableció su relación con el contenido de azúcares neutros totales. Las determinaciones se hicieron por triplicado en 250 esporas de cada especie de HMA y se consideraron los distintos tratamientos de propagación. El aislamiento de las paredes celulares se realizó después del congelamiento de las esporas en nitrógeno líquido y su trituración en un mortero. Las paredes se separaron por centrifugación a 2,500 rpm y por enjuague repetido con NaCl 2M y agua destilada. Las paredes se liofilizaron y el concentrado resultante se hidrolizó con HCl (6M) por 30 min, posteriormente, el ácido se evaporó a temperatura ambiente. El contenido de glucosamina se cuantificó por el método de Elson-Morgan, descrito por Dische (1962). La determinación de azúcares neutros totales se realizó después de que la pared celular se hidrolizó con HCl (2M), por el método de Dimler (1952). Se realizó un análisis estadístico y al encontrar diferencias significativas entre tratamientos se hizo una comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Contenido de cobre en esporas de *G. mosseae* BEG-132

En triplicado, 500 esporas de *G. mosseae* BEG-132 de cada uno de los tratamientos de propagación se secaron en una estufa a 60 °C por 4 h y se colocaron en 3 mL de ácido nítrico concentrado durante toda la noche (pre-digestión) y se digirieron por 4 h a 80 °C (Bradford *et al.* 1975). El producto de la digestión se analizó en un espectrómetro de absorción atómica, Perkin Elmer 3110, Normall. Se realizó un análisis estadístico y al encontrar diferencias significativas entre tratamientos se compararon las medias (Tukey, $\alpha = 0.05$). Los datos se analizaron en el programa SAS versión 6.12.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de esporas de hongos arbusculares

Se observó que la propagación en sustratos contaminados modificó significativamente el porcentaje de germinación de las esporas de las tres especies de

hongos estudiados (Figs. 1-3). Los resultados sugieren diferencias de adaptación en las especies micorrízicas por la presencia o no del contaminante en su etapa de propagación. En los cuatro tratamientos de propagación, los porcentajes más bajos de germinación de esporas de *G. mosseae* BEG-132 se presentaron en la concentración más alta (nivel 4) de As y Cu (Fig. 1a-d). El tratamiento C-C seleccionó descendencia más tolerante, lo que se expresó en un tiempo menor para que las esporas germinaran y en mayor grado (Fig. 1d). En el tratamiento C-SC la germinación de esporas en los niveles 3 y 4 de As y Cu se retrasó e inició hasta el día 23 de establecido el experimento, mientras que en los otros tratamientos, esto se observó desde antes del día 17.

En *G. caledonium* BEG-133 no se observó una tendencia clara en el porcentaje de germinación de las esporas de los tratamientos SC-SC y C-SC (Fig. 2a, b), sin embargo, en el tratamiento continuo de contaminación (C-C) se encontraron porcentajes de germinación muy cercanos entre las diversas concen-

traciones de As y Cu (Fig. 2c). En el tratamiento C-SC en el nivel 2 de As y Cu se encontró el mayor porcentaje de germinación a través del tiempo en comparación con las otras concentraciones. Aparentemente, la ausencia del contaminante en forma continua modificó significativamente la germinación de sus esporas y esta respuesta dependió de la concentración de As y Cu. El tiempo para inicio de la germinación fue similar en las esporas de los tres tratamientos estudiados.

La figura 3 muestra los porcentajes de germinación que se presentaron en los distintos tratamientos en *G. claroideum* Zac-19. Los resultados muestran que este hongo fue muy sensible a las diferentes concentraciones de As y Cu estudiadas (Fig. 3a, b) y que la exposición previa a los contaminantes en la etapa de propagación (SC-C) no incrementó su tolerancia, excepto en el nivel 4 de As y Cu (Fig. 3b).

Al final del experimento (25 días), en los niveles 1 y 2 se observaron los mayores porcentajes de germinación en esporas de *G. mosseae* BEG-132 que tuvieron propagación continua en presencia del con-

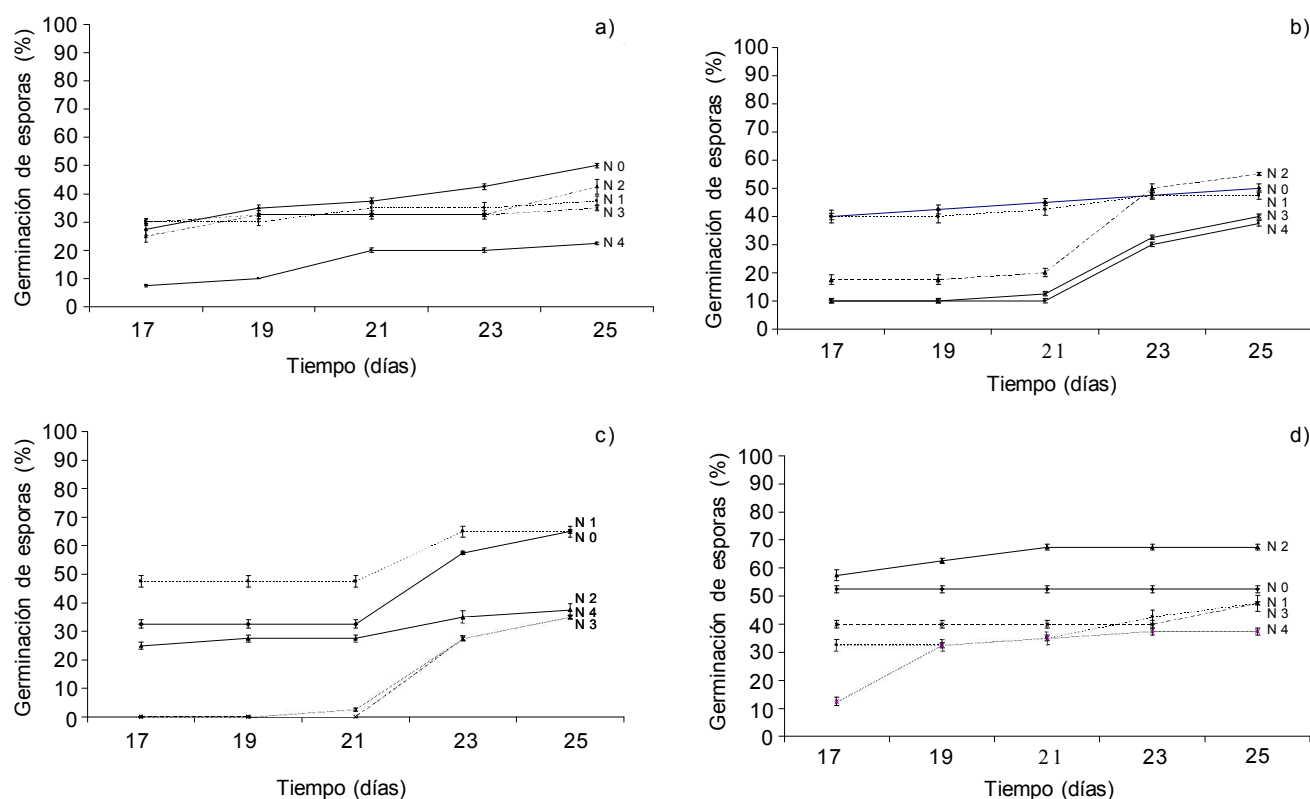


Fig. 1. Cinética de germinación de esporas de *Glomus mosseae* BEG-132 expuestas a cinco concentraciones de As y Cu bajo diferentes tratamientos de ciclos anuales de propagación en sustrato contaminado (C) o no (SC). Nivel 0 (sin As y sin Cu); nivel 1 (36/36 μM de As y Cu); nivel 2 (41/44 μM de As y Cu); nivel 3 (59/72 μM de As y Cu) y nivel 4 (82/51 μM de As y Cu). Tratamientos: SC-SC = Sin contaminación en ambos ciclos de propagación; a) SC-SC = Sin contaminación en ambos ciclos de propagación; b) C-SC = Con contaminación el primer ciclo y sin contaminación en el segundo; c) SC-C = Sin contaminación en el primer ciclo y con contaminación en el segundo; d) C-C = Con contaminación en ambos ciclos de propagación.

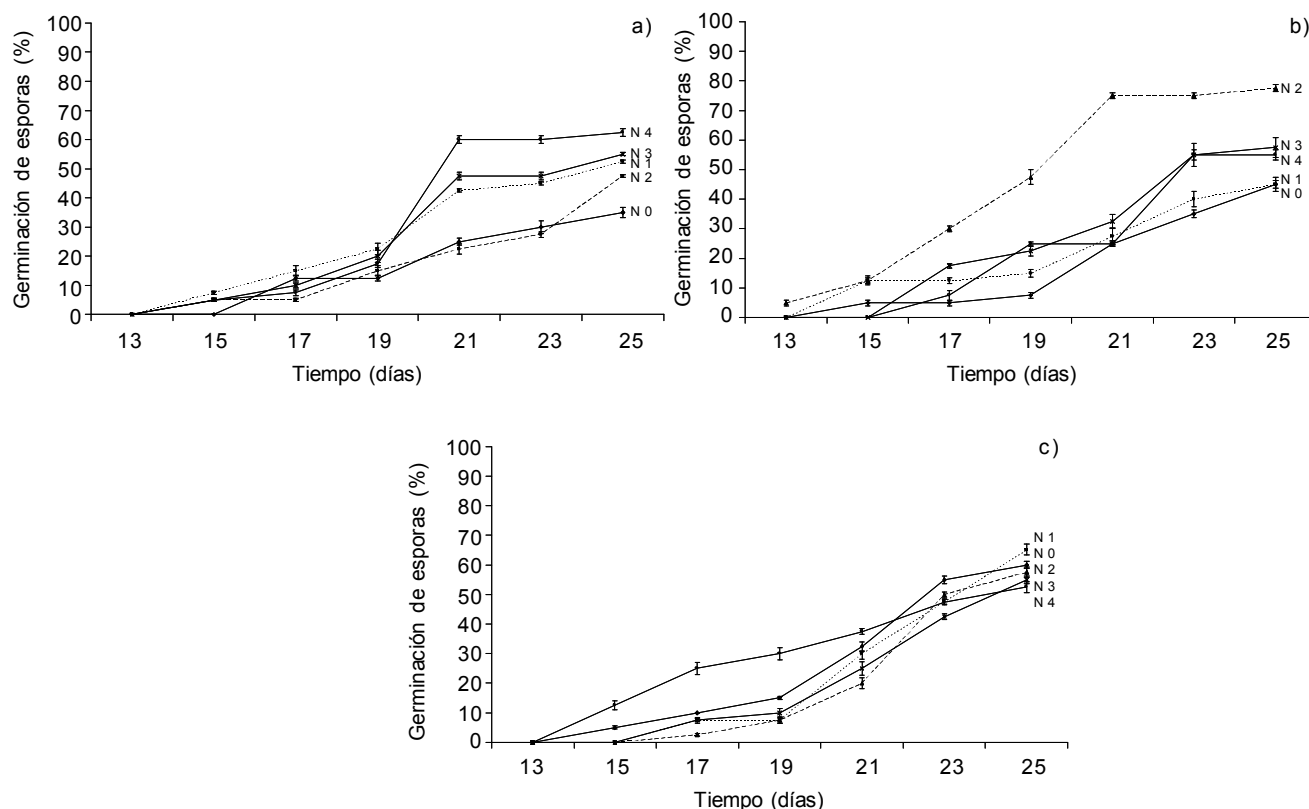
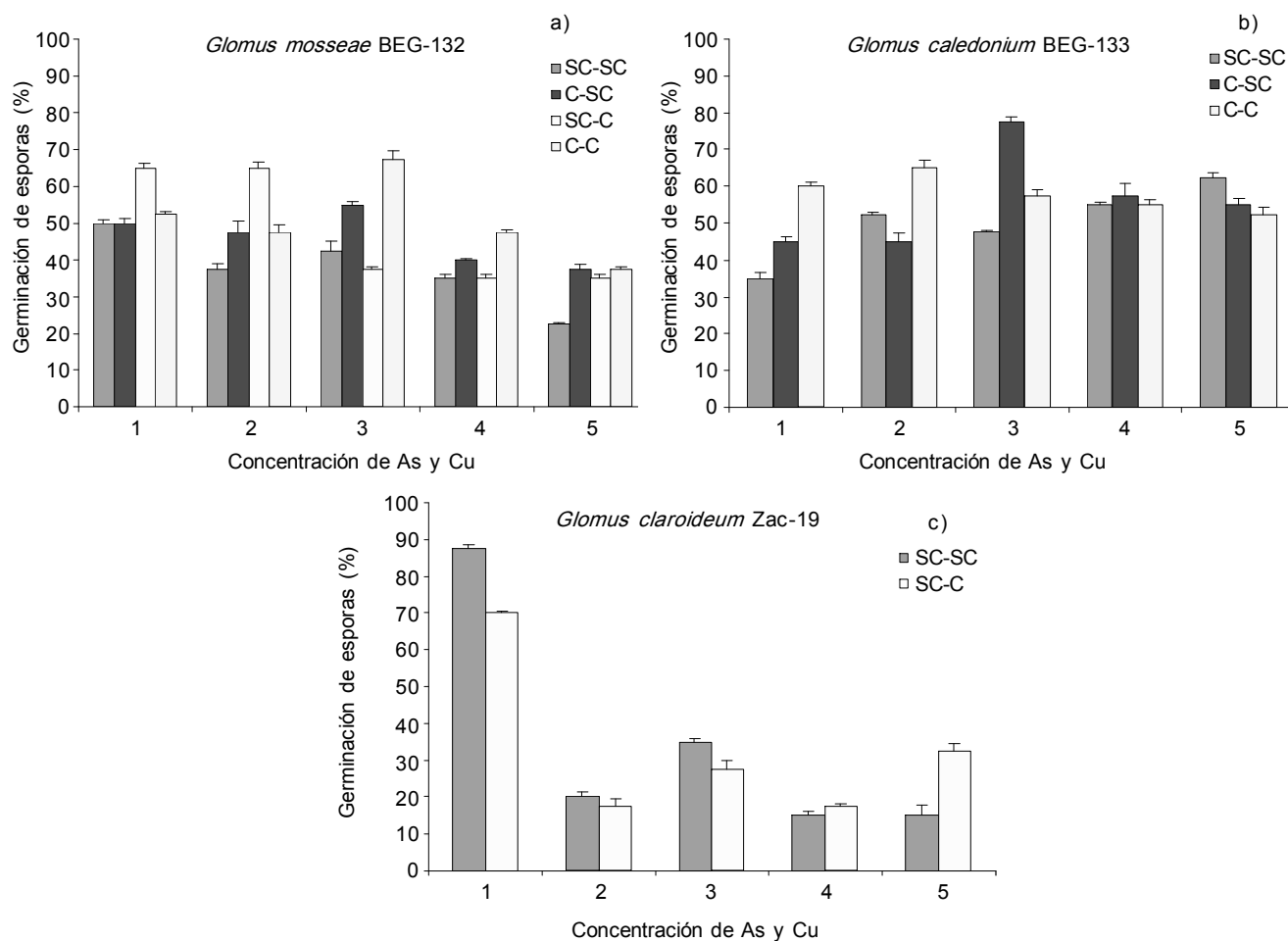
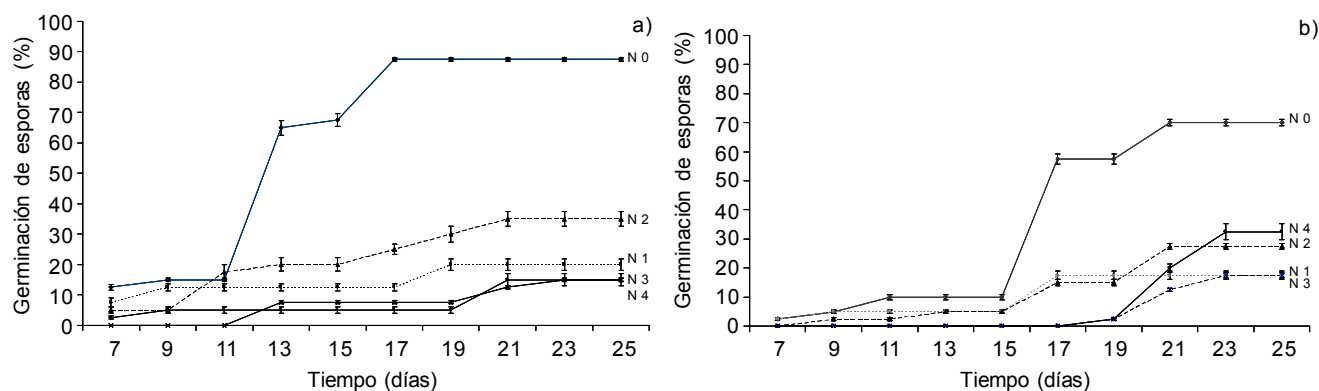


Fig. 2. Cinética de germinación de esporas de *Glomus caledonium* BEG-133 expuestas a cinco concentraciones de As y Cu bajo diferentes tratamientos de ciclos anuales de propagación en sustrato contaminado (C) o no (SC). Nivel 0 (sin As y sin Cu); nivel 1 (36/36 μM de As y Cu); nivel 2 (41/44 μM de As y Cu); nivel 3 (59/72 μM de As y Cu) y nivel 4 (82/51 μM de As y Cu). Tratamientos: a) SC-SC = Sin contaminación en ambos ciclos de propagación; b) C-SC = Con contaminación en el primer ciclo y sin contaminación en el segundo; c) C-C = Con contaminación en ambos ciclos de propagación.

taminante (C-C) (**Fig. 4a**), en comparación con los porcentajes observados en las esporas de los otros tratamientos. También se notó que los niveles 3 y 4 fueron los que más disminuyeron el porcentaje de germinación de las esporas de este hongo. En el caso de *G. caledonium* BEG-133, con el incremento en la concentración de As y Cu al que las esporas fueron expuestas, el porcentaje final de germinación no se afectó negativamente en los diversos tratamientos de propagación (**Fig. 4b**). Esto sugiere que este hongo presenta una tolerancia más estable y puede ser independiente del tiempo (al menos en los dos años estudiados) en el cual el hongo no está en contacto con el contaminante. Se observó que en *G. claroideum* Zac-19, aislado de suelo no contaminado, los porcentajes finales de germinación en el nivel 0 fueron de casi 90% en esporas que se propagaron en sustrato no contaminado (SC-SC) y de 70 % en sustrato contaminado (SC-C). Mientras que a los diferentes niveles de As y Cu, el porcentaje de germinación no excedió al 40 % (**Fig. 4c**). En los niveles 3 y 4 las esporas que tuvieron una propagación continua en presencia del conta-

minante se observaron porcentajes mayores de germinación (C-C) (**Fig. 4a**), en comparación con los porcentajes observados en las esporas de los otros tratamientos. Es probable que este hongo, en ambientes con niveles comparables de contaminación, sea capaz de colonizar especies vegetales después de una baja pero exitosa germinación de sus esporas, lo cual puede asegurar su supervivencia en estos ambientes. *G. claroideum* es una especie fúngica ampliamente distribuida en diversos sistemas terrestres y con alto potencial de adaptación a diversas condiciones edafoclimáticas (De-Val *et al.* 2000, Dodd *et al.* 2001). La capacidad de este hongo para germinar en suelos contaminados puede ser el resultado de la amplia plasticidad fenotípica que presenta esta especie micorrízica, como lo sugieren Meharg y Cairney (2000) y Weissenhorn *et al.* (1994).

Se observó que el tubo de germinación de las esporas de *G. claroideum* Zac-19 manifestó quimiotropismo negativo y mayor bifurcación de las hifas de germinación, probablemente como respuesta a la toxicidad del contaminante en el sustrato. La magni-



tud del quimiotropismo se incrementó con el aumento en la concentración de As y Cu, y fue más evidente en el nivel mayor de contaminación (nivel 4); sin embargo, no se presentó en el nivel cero (arena sin adición de suelo contaminado), ni con los otros HMA (BEG-132 y BEG-133) en ninguna de las cinco concentraciones de As y Cu que se probaron. El quimiotropismo negativo, uno de los procesos de tolerancia a EPT conocidos en otros microorganismos (Gadd 1993), requiere mayor investigación para entender mejor las respuestas que los HMA pueden presentar para evadir la presencia de la contaminación. En futuras investigaciones resultaría interesante además de evaluar el porcentaje de germinación, medir la longitud y la ramificación del tubo de germinación para verificar también su vitalidad. La respuesta quimiotrópica negativa se ha observado en especies de *Geotrichum candidum*, *Gliocladium roseum*, *Humicola grisea*, *Trichoderma viride* y *Phytium aplanidermatum* con relación a diferentes concentraciones entre 2 y 5 mM de Cu y Cd (Fomina *et al.* 2000); sin embargo este fenómeno se tiene poco documentado en HMA.

El comportamiento de los tres HMA fue diferente al exponerse a los niveles de As y Cu en el sustrato. Las esporas de los hongos (*G. mosseae* BEG-132 y *G. caledonium* BEG-133) que provienen de suelos contaminados presentaron mayor capacidad de germinación en los distintos niveles de contaminación al comparla con la de *G. claroideum* Zac-19, aislado de un suelo agrícola. Esto refleja diferencias intra-específicas en los hongos, lo que les permite tener distintas posibilidades de colonizar raíces cuando comparten el mismo hábitat. Este fenómeno de variación entre especies está de acuerdo con reportes que muestran diferencias en susceptibilidad entre ecotipos de HMA aislados de suelos contaminado con EPT y ecotipos de ambientes no contaminados (Weissenhorn *et al.* 1994, DeVal *et al.* 1999).

Gardea-Torresdey *et al.* (1997) concluyeron que los EPT generalmente ejercen una presión sobre los hongos filamentosos y saprobios que resulta en selección de especies con mayor tolerancia a estos elementos. A pesar que los HMA no son de este tipo, algunos autores (Weissenhorn *et al.* 1994, DeVal *et al.* 1999) también reportaron el efecto de selección a EPT en los hongos arbusculares. Este efecto tiene importancia especialmente en la etapa asimbiótica, como lo es la germinación de esporas que puede ocurrir en ausencia de un hospedante. En este caso la capacidad del hongo para germinar dependerá directamente de su tolerancia a los EPT y no a la tolerancia de su hospedante. Como resultado, la fuerte disminución de la capacidad de germinación de las esporas de estos hongos en ambientes contaminados podría limitar su supervivencia (Solís 2002).

Los efectos de la presencia o ausencia de As y Cu en la propagación de los hongos expresados en el porcentaje de germinación muestran que la ausencia de la condición contaminante modifica su expresión fenotípica y es probable que influya indirectamente el efecto del hongo en las plantas micorrizadas. Esta puede ser una de las razones por las cuales los diferentes estudios de la relación HMA-EPT-planta muestran resultados contradictorios.

Cervantes *et al.* (1999) observaron que cuando una cepa microbiana posee tolerancia a altas concentraciones de EPT, es conveniente realizar una selección del cultivo. Para tal propósito, la cepa se propaga en un medio de cultivo determinado en el que se incrementa paulatinamente la concentración de un EPT. Esto usualmente produce cepas microbianas con mayor capacidad de tolerancia a un ión específico. Reguar y Vogel (2000) propusieron que existe una selección natural en los ecotipos micorrízicos que conduce a una variación genotípica para tolerar altas concentraciones de EPT en el suelo.

Weissenhorn *et al.* (1994), reportaron que HMA aislados de suelos contaminados perdieron su tolerancia a Zn y Cd al subcultivarse en un medio libre de estos elementos, contrario a lo que ocurrió con BEG-132 o BEG-133 que no perdieron su tolerancia después de su propagación por dos años en sustrato no contaminado. Estos resultados contradictorios demandan mayor investigación, considerando la estabilidad de la tolerancia en experimentos conducidos por períodos mayores. Con base en los resultados y para evitar cambios drásticos en su tolerancia, se recomienda que los HMA se propaguen en presencia del contaminante.

Grosor de la pared de las esporas

Se observaron diferencias significativas en el grosor de la pared de las esporas de los HMA entre los tratamientos analizados (Tabla I). En los hongos aislados de áreas contaminadas, *G. mosseae* BEG-132 y *G. caledonium* BEG-133, los valores máximos de grosor de la pared se notaron en esporas que se propagaron por dos ciclos continuos en sustrato contaminado (C-C). En esporas de *G. mosseae* BEG-132, en todos los tratamientos se mostraron diferencias significativas. Mientras que en *G. caledonium* BEG-133, la propagación discontinua en sustrato contaminado no modificó significativamente el grosor de la pared de las esporas (3.9 μm en promedio); sin embargo las esporas que se propagaron en el ciclo C-C presentaron una pared más gruesa (6.0 μm). La propagación de *G. claroideum* Zac-19 durante un ciclo único en sustrato contaminado incrementó también de manera importante el grosor de la pared (2 μm), con respecto a esporas que se propagaron en sustrato no contaminado.

TABLA I. GROSOR DE LA PARED Y LA QUITINA (HEXOSAMINA/AZÚCAR NEUTRO) EN ESPORAS DE TRES HONGOS ARBUSCULARES QUE SE PROPAGARON EN SUSTRATOS CONTAMINADO (C) Y NO CONTAMINADO (SC) CON As Y Cu DURANTE CICLOS CONTINUOS Y DISCONTINUOS DE UN AÑO

Tratamiento	Grosor de la pared de las esporas ^x (µm)			Hexosamina/azúcar neutro ^y
	Media	Mínimo	Máximo	
<i>G. mosseae</i> BEG-132				
SC-SC	5.4b ^z	4.3b	6.6b	0.19 c ^z
C-SC	5.1c	4.1c	6.1d	0.23 b
SC-C	4.7d	3.6d	6.3c	0.25 a
C-C	5.9a	4.4a	7.3a	0.20 c
<i>G. caledonium</i> BEG-133				
SC-SC	3.9b ^z	3.2b	4.8b	0.16 c
C-SC	3.9b	3.1b	4.7c	0.21 b
SC-C	4.0b	3.2b	4.6c	0.23 a
C-C	6.0a	5.2a	6.8a	0.21 b
<i>G. claroideum</i> Zac-19				
SC-SC	5.4a	4.5a	6.4b	0.26 a
SC-C	7.4b	6.0b	8.2a	0.24 a

Tratamiento en el primero y segundo ciclos (SC = Sin contaminación, C = Con contaminación).

^xCada número es el promedio de 90 observaciones.

^yLos datos representan el promedio de tres repeticiones

^zMedias con la misma letra, dentro de las columnas en relación a cada hongo arbuscular, son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que las esporas de los tres HMA engrosaron su pared al crecer en sustratos contaminados, lo cual sugiere que estos hongos se adaptan a las condiciones del medio. El aumento en la pared celular podría considerarse como mecanismo físico de protección a un medio contaminado y posiblemente repercute en diversos aspectos fisiológicos como la germinación, mayor resistencia a condiciones adversas independientes de la concentración de EPT en el medio, disminución en la entrada de iones tóxicos o mayor retención de éstos a nivel de pared.

Al igual que para hongos filamentosos, en HMA la pared de las esporas es el primer sitio de contacto con los EPT (Mullen *et al.* 1992, Gardea-Torresdey 1997) y ésta desarrollará un papel importante para la supervivencia del microorganismo. Un efecto similar al reportado en este trabajo en esporas de HMA, se observó en hifas de *Mucor rouxii* al exponerse a concentraciones crecientes de Cu (Cano-Aguilera *et al.* 1996). Los ecotipos de *M. rouxii* tolerantes a Cu, presentaron un desarrollo anormal que consistió en hifas bulbosas con paredes gruesas cuando el hongo creció en concentraciones de 3.2 mM de Cu. Estos autores sugirieron que cambios morfológicos como éste forman parte de un mecanismo de tolerancia a Cu. Aun-

que estos hongos, los arbusculares y los filamentosos como *M. rouxii*, son diferentes fisiológica y morfológicamente, la comparación permite sugerir que los mecanismos de tolerancia a EPT pueden ser similares entre organismos distintos.

Contenido de quitina en esporas

El contenido de quitina en las esporas de los HMA en respuesta a la presencia del contaminante en el sustrato no mostró la misma tendencia en los tres HMA que se estudiaron (Tabla I). En *G. mosseae* BEG-132, la propagación discontinua incrementó significativamente el contenido de quitina en la pared de sus esporas, en comparación con la cantidad de quitina en esporas que se propagaron en forma continua en sustrato contaminado (C-C) ó no (SC-SC). Aparentemente en este hongo la secuencia de propagación produjo una modificación fisiológica significativa, que se reflejó en el grosor de la pared de sus esporas y en el contenido de quitina. En esporas de *G. caledonium* BEG-133, la propagación continua en ausencia de contaminante (SC-SC), resultó en esporas con el menor contenido de quitina y las esporas del tratamiento SC-C presentaron el mayor contenido de quitina. Las esporas de *G. claroideum* Zac-19 mostraron el mayor contenido de quitina de los tres hongos que se estudiaron (Tabla I). El contenido de quitina en este hongo fue menor en esporas que se propagaron en suelo contaminado (SC-C) que en SC-SC. No hubo correlación entre el grosor de la pared y el contenido de quitina en los tres hongos que se estudiaron. Así, el incremento en el grosor de la pared de estas esporas no se relacionó con un incremento en su contenido de quitina.

Gardea-Torresdey *et al.* (1997) atribuyeron el incremento de grosor de la pared de las células, al aumento en el contenido de quitina presente en la pared de *M. rouxii* creciendo en presencia de contaminación. Estos autores mencionan que el aumento en el grosor de pared podría estar relacionado con una elevación en el número de grupos funcionales presentes en la pared celular y que éstos capturan Cu en la superficie de las células e inhiben el transporte del metal al interior de la misma (Volesky 1990). En el presente trabajo, se desconoce el significado del incremento en el grosor de la pared y del contenido de quitina en las esporas de HMA, pero podría estar relacionado con la capacidad de secuestro de Cu y As contenidos en el sustrato contaminado. En otros microorganismos y HMA existe poca información de la relación entre grosor de pared, contenido de quitina y capacidad de secuestro de EPT.

Cano-Aguilera *et al.* (1996) observaron un comportamiento diferencial en esporas de *M. rouxii* tolerantes y no tolerantes a EPT. Cuando las esporas se

expusieron a diversos EPT (La^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} y Cd^{2+}), ambos ecotipos secuestraron estos elementos a nivel de la pared celular (bioabsorción); sin embargo, la capacidad entre los ecotipos fue distinto. Estos autores argumentaron que la diferencia entre las especies fúngicas, con respecto a la capacidad de secuestrar EPT, se debió a las diferencias en la composición química de su pared celular, así como a la existencia en ésta de grupos funcionales (sulfuros y grupos carboxílicos), que también participan en el secuestro de los iones.

Carro (1999) y Roncero *et al.* (2001) sugieren que la síntesis de la quitina puede relacionarse estrechamente con la tolerancia adquirida, en la cual distintas vías de transducción de señales actúan en la arquitectura de la pared de la espóra y en su integridad. Sin embargo, las características constitutivas de la pared de las esporas de HMA varían dependiendo de la especie que se trate (Franco 2002), de ahí la gran variación de respuesta entre especies de HMA. *G. claroideum* Zac-19 al poseer alto contenido de quitina en la pared de sus esporas tiene posibilidades para secuestrar elementos a este nivel celular y posiblemente esta sea la característica de su tolerancia. Sin embargo, la presencia de los contaminantes afectó la germinación y remarcablemente el grosor de sus paredes, pero contrariamente a lo que se observó en las otras especies de hongos, el contenido de quitina disminuyó.

En los hongos *G. mosseae* BEG-132 y *G. caledonum* BEG-133 se observó que el contenido de quitina en sus esporas incrementó ante la presencia del contaminante en el cultivo de propagación. El contenido de quitina en la pared de esporas de HMA puede participar en su supervivencia al ayudar a inmovilizar el As y Cu en la superficie de éstas, y de esta forma, prevenir el ingreso de contaminantes en el interior de las mismas.

Los resultados muestran que existe variabilidad entre las especies fúngicas estudiadas con relación a su tolerancia y respuesta a As y Cu contenido en el sustrato de propagación. La pared de las esporas de los HMA es químicamente compleja y característica de cada género, además puede diferir entre especies del mismo género (Franco 2002) y probablemente aún entre ecotipos de la misma especie.

La existencia de una diversidad de sistemas de tolerancia en los HMA se sugiere al comparar los patrones de respuesta y adaptación en cada ciclo de propagación por cada una de las especies aisladas. Darwin (1962) explicó que las pequeñas variaciones heredables entre los individuos de una especie, constituyen la base de las grandes diferencias entre especies. Formas diversas sobreviven y se reproducen a un ritmo distinto, de acuerdo con su ambiente, tal re-

producción diferencial da lugar a un cambio lento en una población durante un cierto tiempo, lo cual origina finalmente la sustitución de una forma común, por otra. Los resultados obtenidos en este trabajo son relevantes, porque muestran que los tres HMA modifican su tolerancia a EPT si se propagan en sustrato no contaminado.

Meharg y Cairney (2000) sugirieron que los genes que codifican para la tolerancia a EPT pueden ser rápidamente transferidos a las nuevas generaciones cuando exista una presión de selección. Sin embargo, cuando esta presión cesa, estos genes se pierden rápidamente y su frecuencia disminuye. Por su parte, Weissenhorn *et al.* (1994), al observar incremento en tolerancia a Cd en una población fúngica expuesta por sólo un año a 40 mg Cd kg^{-1} (CdNO_3), sugirieron que el fenómeno fue resultado de la plasticidad fenotípica, mas que la selección de genotipos tolerantes. Su hipótesis se sustentó en el largo tiempo relativo de generación (3.5 a 6 meses) y al gran número de núcleos (hasta 3000) en las esporas de los HMA. Los estudios que consideren la evolución y la estabilidad de la tolerancia en los HMA requieren mayor atención, especialmente con relación al tiempo.

Contenido de cobre en esporas de *G. mosseae* BEG-132

El contenido de cobre se incrementó significativamente en esporas de *G. mosseae* BEG-132 expuestas a suelo contaminado en el segundo ciclo de propagación. En el tratamiento C-C y SC-C, el contenido de Cu fue 629 y $677 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (en relación a peso seco), respectivamente. Se presentó menor contenido de Cu en las esporas de los tratamientos C-SC y SC-SC (555 y $472 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente). Los datos sugieren que la quitina podría estar involucrada en el secuestro de Cu en las esporas, debido a que a mayor secuestro de Cu corresponde un mayor contenido de quitina. Sin embargo, otros compuestos a nivel de superficie u otras estructuras también pueden estar involucrados.

La cantidad de cobre en esporas es menor que la que secuestra la glomalina (González-Chávez *et al.* 2004) o el micelio externo (González-Chávez *et al.* 2002). González-Chávez *et al.* (2004) mostraron que la glomalina que se extrae de las hifas puede secuestrar entre 1130 a $1630 \text{ } \mu\text{g}$ de Cu/g, mientras que el secuestro de Cu por la glomalina extraída de suelo contaminado varió entre 1550 y $4290 \text{ } \mu\text{g}$ de Cu/g. González-Chávez *et al.* (2002) reportaron el secuestro entre 3000 a $14\,000 \text{ } \mu\text{g}$ de Cu/g de micelio. La capacidad de las esporas para secuestrar Cu no se había reportado con anterioridad. Este resultado demuestra que las esporas son una estructura fúngica más de los HMA que participa en la estabilización de

Cu en el suelo. El secuestro de Cu por las esporas significa una cantidad de este elemento no disponible y que representa menor riesgo de toxicidad para las plantas.

A partir de esta información se propone que las diferentes estructuras fúngicas y componentes de los HMA (esporas, hifas extrarradicales y glomalina) participan en el secuestro de Cu y posiblemente de otros EPT, lo que sugiere que estos hongos deberían considerarse dentro de las alternativas de bioestabilización en las prácticas de recuperación de suelos contaminados. Resulta interesante mencionar que los hongos filamentosos como *Mucor rouxii*, *Rhizopus arrhizus* y *Trichoderma viride* se usan como bioabsorbentes comerciales de EPT (Mullen *et al.* 1992, Morley y Gadd 1995 y Kapoor y Virarghavan 1995) y tienen capacidades similares a las reportadas para los HMA.

CONCLUSIONES

Los hongos micorrízicos arbusculares que se desarrollan durante ciclos continuos o discontinuos en sustrato contaminado con As y Cu presentaron modificaciones fisiológicas y morfológicas en sus esporas, lo que pudiera tener repercusión con relación a su supervivencia, con su planta hospedera y con su función en suelos contaminados. La capacidad de germinación de las esporas en sustratos contaminados, las alteraciones observadas en el grosor de la pared de las esporas y su contenido de quitina dependieron de la concentración de estos elementos, de la especie micorrízica y de los ciclos de cultivo. Los HMA aislados de áreas contaminadas (*G. mosseae* BEG-132 y *G. caledonium* BEG-133) presentaron mayor tolerancia a As y Cu que *G. claroideum* Zac-19. La propagación continua en sustrato contaminado (C-C) selecciona ecotipos fúngicos más tolerantes a As y Cu, lo que es expresado por mayor porcentaje de germinación a concentraciones más altas de estos elementos, mayor grosor de pared de la espora, pero no mayor contenido de quitina. Las esporas de *G. mosseae* BEG-132 tienen la capacidad para secuestrar cobre, especialmente si se encuentran creciendo en sustrato contaminado. Los resultados demuestran que las esporas pueden participar en la disminución de biodisponibilidad y estabilización de este Cu en el suelo, además de las hifas y sus compuestos como la glomalina. Los resultados muestran que los HMA son componentes microbianos que influyen la biodisponibilidad de los EPT y son afectados por estos, por lo que es importante que se consideren dentro de los estudios de tolerancia de plantas y en las prácticas de recuperación biológica de suelos contaminados por EPT, después de una selección de especies adaptadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto CONACyT-SEMARNAT 2002-CO1-739: "Biorrecuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y sus microorganismos simbióticos". Los autores expresan su más sincero reconocimiento a la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares por las facilidades brindadas para la determinación de quitina y a los M. en C. Alejandro Alarcón y Ma. Encarnación Lara Hernández por su ayuda en el análisis estadístico y sus comentarios críticos al trabajo.

REFERENCIAS

- Bradford G., Page A., Lund L. y Olmstead W. (1975). Trace element concentrations of sewage treatment plant effluents and sludge: Their interactions with soil and uptake by plants. *J. Environ. Qual.* 4, 123-127.
- Brundrett M.C. y Saito J. (1995). Non-destructive assessment of spore germination of VAM fungi and production of pot cultures from single spores. *Soil Biochem.* 27, 85-91.
- Cano-Aguilera I., Gardea-Torresdey J.L., Pingitore N.E. y Webb R. (1996). Electron microprobe and x-ray microfluorescence analyses of copper binding to active and inactivated cells of *Mucor rouxii*. *Proceedings of the 12th Annual conference on hazardous waste research: Building partnership for innovative technologies* (L.E. Erickson, M. M. Rankin, S. C. Grant y J. P. McDonald, Eds.) Kansas State University, Manhattan, KS, pp. 464-471.
- Carro B.A. (1999). Efecto de los metales pesados en las actividades metabólicas de la microflora del suelo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 295 pp.
- Cervantes C., Ramírez M.I., Álvarez A.H. y Vargas E. (1999). Interacciones bacterianas con metales y metaloides tóxicos. En: *Bioteología de minerales*. (R. H. Medrano y W. L. Galván, Eds.), CONACyT, COCYTED, Durango, México, p. 25.
- Darwin C. (1962). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. Penguin Classics, Londres.
- DeVal C., Barea J.M. y Azcón-Aguilar C. (1999). Assessing the tolerance to heavy metal of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 11, 261-269.
- DeVal C., Guralchuk F., Campos E., Azcón-Aguilar C. y Barea J.M. (2000). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal contaminated soil and its implications for bioremediation. *Intercost workshop on Bioremediation*. Sorrento, Italia, pp. 45-47.
- Dische Z. (1962). General color reactions. *Methods Carbohydrate Chem.* 1, 478-492.

- Dimler R.J. (1952). 1-6 Anhydrohexofuranoses. A new class of hexosans. *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* 7, 37-52.
- Dodd J.C., Dougall T., Clapp J.P. y Jeffries P. (2001). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant community establishment at Samphire Hoe, Kent, UK-the reclamation platform created during the building of the Channel tunnel between France and the UK. *Biodiv. Conserv.* 11, 39-58.
- Fomina M., Ritz K. y Gadd G.M. (2000). Negative fungal chemotropism to toxic metals. *FEMS Microbiol. Letters* 193, 207-211.
- Franco R.A. (2002). Estudio taxonómico de hongos micorrízico arbusculares en dos localidades productoras de *Annona muricata* L. (guanábana) de México. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 70 p.
- Gadd G. M. (1993). Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124, 25-60.
- Gardea-Torresdey J.L., Cano-Aguilera I., Webb H. y Gutiérrez-Corona F. (1997). Enhanced copper absorption and morphological alterations of cell of copper stressed *Mucor rouxii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 435-441.
- Gerdermann J.W. y Nicolson T.H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Trans. British Mycol. Soc.* 46, 235-244.
- Gildon A. y Tinker P.B. (1983). Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 95, 247-261.
- González-Chávez C., D'Haen J., Vangronsveld J. y Dodd J.C. (2002). Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* 240, 287-297.
- González-Chávez M.C., Carrillo-González R., Wright S.F. y Nichols K. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Poll.* 130, 317-323.
- Hewitt E.J. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Common Wealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops. Technical Communication. No. 22.
- Kapoor A. y Virarghavan T. (1995). Fungal biosorption-an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. *Bioresource Tech.* 53, 195-206.
- Malcová R., Gryndler M. y Vosátka M. (2002). Magnesium ions alleviate the negative effect of manganese on *Glomus claroideum* BEG-23. *Mycorrhiza* 12, 125-129.
- Malcová R., Rydovaa J. y Vosátka M. (2003). Metal-free cultivation of *Glomus* sp. BEG-140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. *Mycorrhiza* 13, 151-157.
- Meharg A.A. y Cairney J.W.G. (2000). Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. *Adv. Ecol. Res.* 30, 69-112.
- Morley G.F. y Gadd G. M. (1995). Sorption of toxic metals by fungi and clay minerals. *Mycol. Res.* 99, 1429-1438.
- Mullen M.D., Wolf D.C., Beveridge T.J. y Bailey G.W. (1992). Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. *Soil Biol. Biochem.* 24, 129-135.
- Reguar M. y Vogel K. (2000). Mycorrhiza as a bioindicator of the polluted sites. Intercost Workshop on Bioremediation. Sorrento, Italia, pp. 50-52 p.
- Roncero C., García-Rodríguez L.J., Sanz M., Castrejón F., Trilla J.A. y Durán A. (2001). The control of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Chitin Enzimology*. (R.A.A. Muzzarelli, Ed.), Atec, Italy. 456-468.
- Schenck N.C. y Perez Y. (1990). *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*. 3rd ed. Synergistic Publications, Florida, EUA, 26 p.
- Solis A.F. (2002). Cultivo monoxénico de las especies del consorcio *Gl.* Zac-19. Tesis de Maestría en Ciencias. Programa Edafología. IRENAT Colegio de Postgraduados. Montecillo, México, 69 p.
- Valix M., Tang J.Y. y Cheung W.H. (2001). The effects of mineralogy on the biological leaching of nickel laterite ores. *Minerals Engineering* 14, 1629-1635.
- Van der Heijden M. G. A. y Sanders I. R. (2002). *Mycorrhizal ecology*. Ecological studies 157, Springer, Londres, 469 p.
- Volesky B. (1990). Biosorption by fungal biomass. En: *Biosorption of heavy metals*. (B. Volesky, Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 140-171.
- Weissenhorn I. y Leyval C. (1995). Root colonization of maize by a Cd-sensitive and Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant Soil* 175, 233-238.
- Weissenhorn I., Glashoff A., Leyval C. y Berthelin J. (1994). Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant Soil* 167, 189-196.