

EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A ARSÉNICO DE LAS ESPORAS DE CUATRO ESPECIES DE HONGOS ARBUSCULARES

Sandra Navas¹, Jessica Duchicela¹, y Luis Cumbal¹

1.-Centro de Investigaciones Científicas, Escuela Politécnica del Ejército.
Av. El Progreso s/n, Sangolquí, Quito - Ecuador.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la tolerancia a arsénico en esporas de cuatro especies de hongos arbusculares. Se estudió la cinética de germinación y contenido de arsénico (As) en las cuatro especies. Las especies que se emplearon en el estudio fueron: *Glomus claroideum* DNM-1, *Glomus mosseae* BEG-25, provenientes de suelos no contaminados de México, *Glomus mosseae* BEG-132 proveniente de suelos contaminados con As y Cu de México, y *Pacispora* sp. aislada de suelo contaminado con As de Ecuador. Las esporas se sometieron a tres concentraciones de As para evaluar posibles diferencias en el porcentaje de germinación entre especies.

Glomus mosseae BEG-132, *Glomus mosseae* BEG-25 y *Pacispora* sp. fueron las especies que mejor respondieron a altas concentraciones de As, el porcentaje de germinación fue mayor en estas especies. Todas las especies fueron capaces de secuestrar As determinándose concentraciones entre 4 y 1200 µgAs/g de espора (en base a peso seco). En *Glomus mosseae* BEG-132, *Glomus mosseae* BEG-25 y *Pacispora* sp. se observó una mayor tolerancia a As, expresándose esta tolerancia como menor tiempo de germinación y mayor número de esporas germinadas.

De este estudio, se concluye que la respuesta de los hongos arbusculares evaluados depende de la especie y de la concentración de As a la que se expongan, estos resultados pueden servir de base para la selección de especies tolerantes que pueden ser empleadas en futuras investigaciones para analizar su funcionamiento simbiótico y su posible uso en programas de remediación.

Palabras clave: esporas, hongos arbusculares, arsénico, tolerancia

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la tolerancia al arsénico de las esporas de cuatro especies de hongos arbusculares, provenientes de ecosistemas contaminados y no contaminados de Ecuador y México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar, propagar en cultivo monospórico y caracterizar una morfoespecie de hongo arbuscular de suelo de la Laguna de Papallacta (área contaminada por arsénico).
2. Propagar tres especies de hongos micorrízicos provenientes de suelos contaminados y no contaminados de México.
3. Extraer esporas viables de cada especie de hongo arbuscular para exponerlas a tres concentraciones diferentes de arsénico.
4. Evaluar durante un mes la capacidad de germinación de las esporas de hongos arbusculares sometidas a tres concentraciones de arsénico.
5. Cuantificar la cantidad de arsénico absorbido por las esporas de la o las especies que se muestren tolerantes a arsénico.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

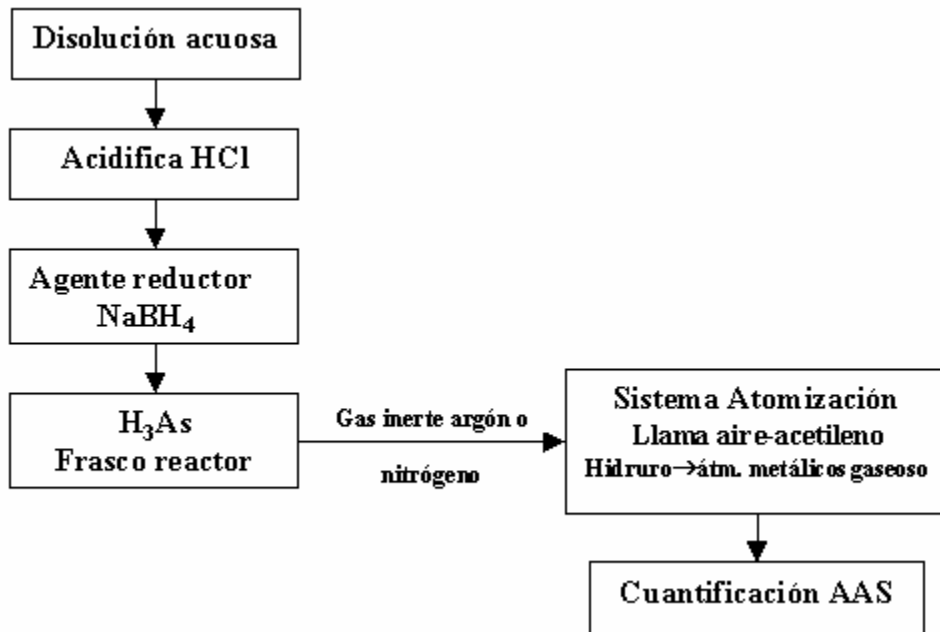
Se muestreó el suelo aledaño a la Laguna de Papallacta, se analizaron los componentes micorrízicos (1) y se aisló y propagó una morfoespecie utilizando plantas trampa.

Se identificó la especie aislada de Papallacta, mediante montaje de esporas en placas (2), se observaron las placas en el microscopio óptico en el lente 100x y se estudiaron las microfotografías.

Las esporas se sometieron a sustratos con diferentes concentraciones de arsénico, las soluciones correspondieron a las siguientes concentraciones: $c_0 = 0$ mgAs/L, $c_1 = 25$ mgAs/L, $c_2 = 5398$ mgAs/L, $c_3 = 17412$ mgAs/L, se evaluó el porcentaje de germinación cada tres días con la ayuda de un estereomicroscopio durante un mes (3). Para facilitar la observación se adicionó azul de tripano (0.01%), en algunos casos.

Se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros H-AAS (Esquema 1) el contenido de As en sustrato y esporas.

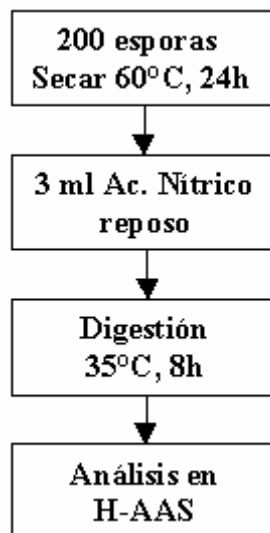
Esquema 1: Espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros (H-AAS)



Determinación de As en esporas

En el esquema 2 se detalla el procedimiento seguido para la determinación de As en esporas. Este procedimiento es una modificación de Bradford et al (1975) (4).

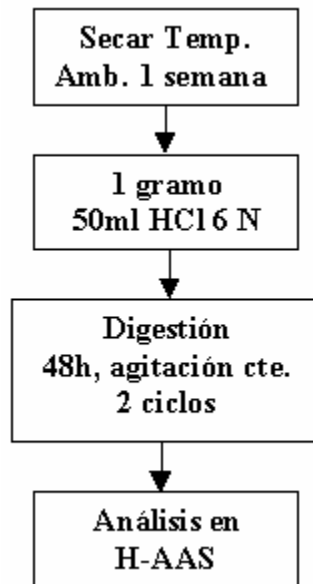
Esquema 2: Determinación de As en esporas.



Determinación de As en sustrato

En el esquema 3 se detalla el procedimiento seguido para la determinación de As en esporas, el cual es una modificación de Romero *et al* (2003) (5).

Esquema 3: Determinación de As en sustrato.



Se aplicó un factorial AxB para Especie (A) y Concentración (B), en un diseño completamente al azar (DCA), con 16 tratamientos y 3 repeticiones, se empleó un análisis de varianza (ADEVA) y la prueba de Tukey al 5%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especie aislada del suelo de la Laguna de Papallacta se la identificó como *Pacispora* sp., ésta fue la especie dominante en muestra de suelo y cultivo trampa. Ésta especie pertenece al nuevo género descrito para los Glomeromycetes, y son apenas siete las especies descritas dentro de éste género, y solo una se ha descrito a nivel de Sudamérica.

Al analizar el ensayo de germinación, la prueba de Tukey para el factor especie generó dos rangos de significación.

Las especies *Glomus mosseae* BEG-132, *Glomus mosseae* BEG-25 y *Pacispora* sp. se ubicaron dentro del grupo (a), éstas se las puede considerar con tolerantes a As, expresándose tolerancia como menor tiempo de germinación y mayor número de esporas germinadas, *Glomus claroideum* DNM 1 se ubicó dentro del grupo (b), ya que su porcentajes de germinación se vio significativamente afectado por altas concentraciones de As. (Figura 1).

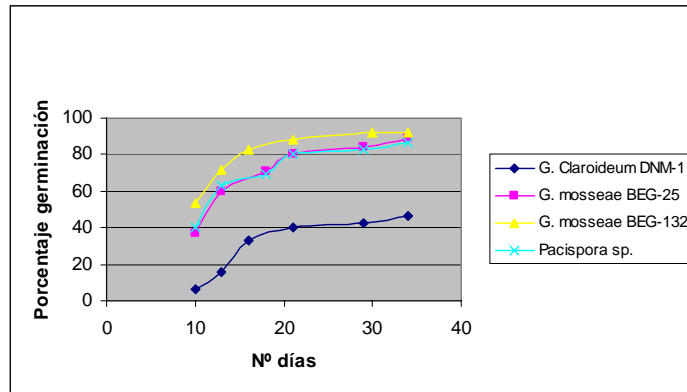


Figura 1: Porcentaje de germinación de esporas de 4 especies de hongos arbusculares en sustrato a 17412 mgAs/L

La respuesta de los hongos evaluados puede estar relacionada a su origen, *Glomus claroideum* DNM 1 proveniente de suelo no contaminado, presentó los menores porcentajes de germinación, mientras que *Glomus mosseae* BEG-132 y *Pacispora* sp. provenientes de suelos contaminados con As respondieron mejor al ensayo.

Además la respuesta podría estar influenciada por las características morfológicas de las especies, así *Glomus mosseae* BEG 25, que proviene de suelo no contaminado respondió mejor que *G. claroideum* DNM 1, ya que presenta una pared más gruesa, característica que puede estar relacionada con un mayor contenido de quitina, mayor número de grupos funcionales y una mayor retención a nivel de pared, evitando de esta manera el ingreso del contaminante al interior de la espora.

La tolerancia de las esporas podría estar relacionada a la composición química de la pared, que generalmente está constituida por quitina, quitosano, polisacáridos, lípidos, proteínas y otros. En este trabajo se plantean posibles mecanismos de captura de As por parte de los componentes de la pared de la espora. Los mecanismos propuestos en este trabajo son:

Polisacáridos:

- Enlace entre el carbocatión CH_2^+ y el anión H_2AsO_4^-
- Reemplazo de los grupos OH^- por los aniones arsenato en la superficie de los polisacáridos.

Quitosano y Glicoproteínas:

- Atracción electrostática entre el amino protonado NH_3^+ y el anión H_2AsO_4^- .

Polisacáridos:

Los grupos funcionales de los alcoholes primarios ($-\text{CH}_2\text{OH}$) de los polisacáridos como: la Quitina, Quitosano, $\beta(1-3)$ glucanos, galactosamina, glucosamina, y otros polisacáridos constituyentes de la pared de las esporas de los HMA, son los que pueden participar en la captura de los iones arsenato, ya que los grupos hidroxilos (OH) de los alcoholes primarios son altamente reactivos, por lo cual se puede producir la liberación del grupo OH^- y dejar al CH_2^+ como un carbocatión que mediante atracción electrostática forma un enlace con el anión H_2AsO_4^- , produciéndose la liberación del OH^- por parte del alcohol. Este mecanismo de quimiadsorción se lo representa en la Figura 2.

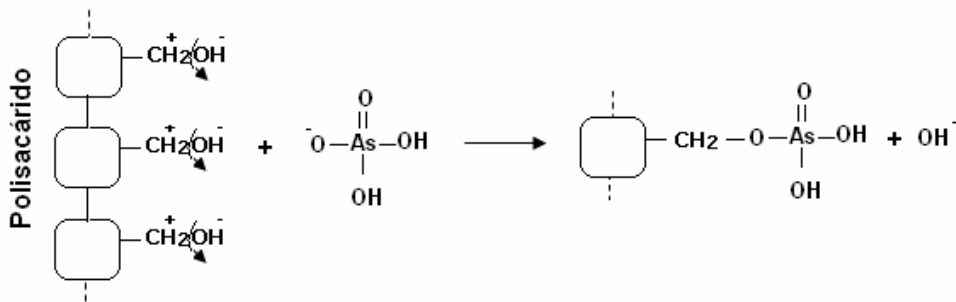


Figura 2: Esquema de mecanismo de captura de Arsénico

Los polisacáridos constituyentes de la pared de las esporas, presentan en su estructura grupos funcionales hidroxilos, a través de los cuales se puede dar otro mecanismo de retención, mediante el reemplazo de los grupos OH^- por los aniones arsenato en la superficie de los polisacáridos. Este mecanismo se lo representa en la Figura 3.

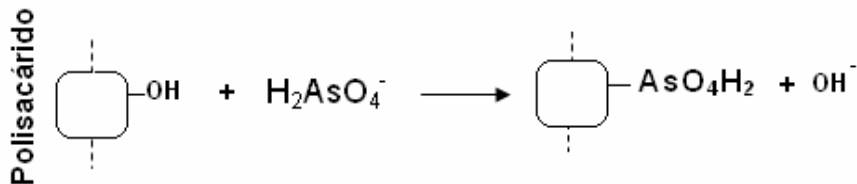


Figura 3: Esquema de mecanismo de retención de arsenato en la superficie de los polisacáridos

Quitosano y Glicoproteínas:

El quitosano y algunas glicoproteínas como el colágeno y elastina, que forman parte de la pared celular, son moléculas que pueden variar su carga dependiendo del pH del medio y de su punto isoeléctrico, así: el Quitosano presenta un punto isoeléctrico entre pH 6 y 6.5, el colágeno pH 5.2 aproximadamente y la elastina pH 6.45 aproximadamente. El pH al cual se llevó a cabo este ensayo varió entre 5-6, por lo cual los grupos funcionales amino de las moléculas de quitosano, elastina y colágeno (si $\text{pH} < 5.2$) están protonados, NH_3^+ , y éstos mediante un mecanismo de fisisorción como la atracción electrostática retienen a los iones arsenato que se encuentran como aniones. La variación de carga para las glicoproteínas se muestra en la Figura 4, y para el quitosano en la Figura 5.

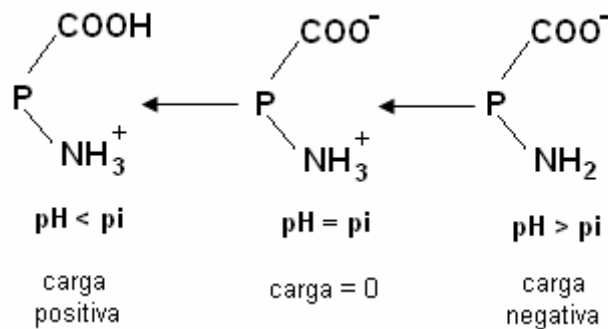


Figura 4: Variaciones de carga en la cadena peptídica para las Glicoproteínas

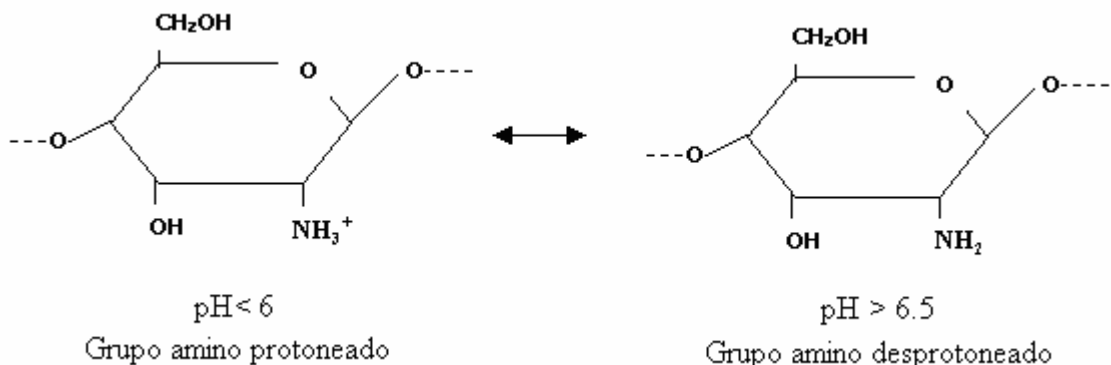


Figura 5: Variaciones de carga para el Quitosano

La adsorción depende de la diferencia de carga entre las moléculas de arsenato y las moléculas de quitosano y glicoproteínas, el anión arsenato se puede unir mediante fuerzas electrostáticas al grupo amino protonado del quitosano y de las glicoproteínas. Este mecanismo se muestra en la Figura 6.

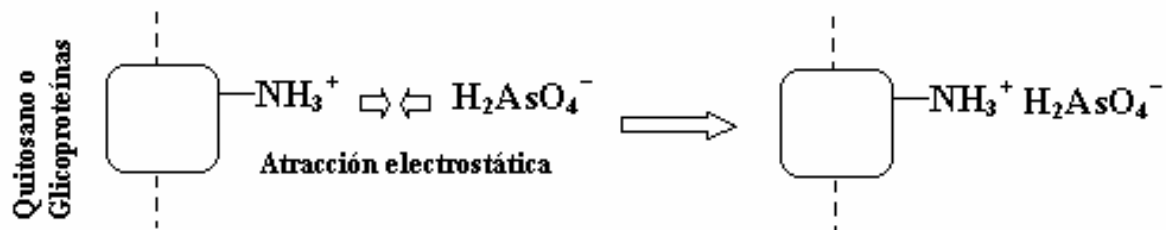


Figura 6: Esquema de interacción electrostática entre el grupo amino y el ion arsenato

Para el factor concentración (c) se obtuvieron dos rangos de significación, c0 se ubicó en el grupo (a) lo cual indica que fue la que menos afecto a la germinación de las esporas, c1 y c2 se ubicaron en el grupo (a) y (b) lo cual indica que afectan por igual a la germinación y c3 se ubicó en el grupo (b) ya que fue la que más afecto a la germinación de las esporas.

Se realizó una isoterma de adsorción de As para el sustrato y se obtuvo un valor de capacidad máxima de adsorción del sustrato (q_{max}) de 10.53mg/g, éste valor se encuentra dentro del rango de valores de q_{max} para alúmina por lo que se puede inducir que este sustrato presenta una mayor fracción de compuestos de aluminio.

En cuanto al contenido de arsénico en esporas, todas las especies fueron capaces de secuestrar As bajo las diferentes concentraciones evaluadas, determinándose concentraciones entre 4 y 1200 $\mu\text{gAs/g}$ de espора (en base a peso seco). Se encontró un mayor contenido de As en esporas conforme incrementaba la concentración de As a la que fueron expuestas, siendo mayor el contenido de As en las esporas expuestas a la concentración más alta de este elemento, ya que a ésta concentración la cantidad de arsénico disponible es mayor y por ello hay una mayor cantidad del contaminante que puede ser retenido en la pared de las esporas (Tabla 1).

Tabla 1: Contenido de As en esporas de 4 especies de hongos arbusculares a 17412mgAs/L.

Especie HMA	As retenido en esporas a c3 µg As/g espora
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1	802.8
<i>Glomus mosseae</i> BEG-25	1246.806
<i>Glomus mosseae</i> BEG-132	612.813
<i>Pacispora</i> sp.	422.258

CONCLUSIONES

- Se aisló, cultivó e identificó exitosamente una especie proveniente de suelo contaminado con As de la laguna de Papallacta y se propagaron en cultivos trampa las tres especies provenientes de México. La especie ecuatoriana se identificó como *Pacispora* sp. y respondió favorablemente a las condiciones de evaluación al igual que dos de las especies de México.
- La capacidad de germinación de las esporas depende de la especie y de la concentración de As a la que son expuestas. Las especies estudiadas se ubicaron en dos grupos, el de especies que se pueden considerar tolerantes y el de no tolerantes a As; *Glomus mosseae* BEG 25, *Glomus mosseae* BEG 132 y *Pacispora* sp. se encuentran dentro del primer grupo ya que germinan por igual bajo altas concentraciones de As, expresándose la tolerancia como menor tiempo necesario para la germinación y mayor número de esporas germinadas, *Glomus claroideum* DNM 1 fue la única especie que se ubicó en el segundo grupo ya que presentó los porcentajes de germinación más bajos. Las especies *Glomus mosseae* BEG 132 y *Pacispora* sp. aisladas de suelos contaminados presentaron una mayor tolerancia a As que *Glomus claroideum* DNM 1 proveniente de suelos no contaminados.
- Las esporas de las cuatro especies evaluadas presentaron capacidad para secuestrar arsénico bajo las diferentes concentraciones estudiadas, siendo mayor el contenido de As en las esporas expuestas a la concentración más alta de este elemento, ya que a ésta concentración la cantidad de arsénico disponible es decir en la fase líquida de sustrato es mayor y por ende hay mayor cantidad del contaminante que puede ser retenido en la pared de las esporas.

- La cuantificación del efecto de la exposición a arsénico de los HMA en su funcionamiento presimbiótico puede ser usado potencialmente para predecir el funcionamiento de la simbiosis micorrízica arbuscular bajo condiciones de estrés producidas por la presencia de altas concentraciones de este metaloide. El uso de los HMA en la biorremediación de suelos contaminados es una posibilidad para estabilizar el contaminante *in situ*, así como de reestablecer la vegetación del área simultáneamente. Se observó diferencias individuales en el comportamiento de los HMA estudiados, bajo condiciones naturales, la suma de estas diferencias individuales pueden conducir a que la simbiosis lidere cambios globales en el ecosistema, por lo que su manejo debe ser considerado con fines de reestablecimiento ecológico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gerdemann, J.W.& Nicolson, H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transnational British Mycological Society*, 46, 235-244.
2. INVAM. (2006). Mycorrhiza Information Exchange Web Site clearinghouse for information on research, teaching, business of mycorrhizal symbiosis.
3. Brundett, M.C. & 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.
4. Bradford, G., Page A., Lund, L., 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.
5. Romero, L., Alonso, H., Campano, P., Fanfani, L., Cidu, R., Dadea, C., Keegan, T., Thornton, I., Farago, M. (2003). Arsenic enrichment in waters and sediments of the Rio Loa (Second Region, Chile). *Applied Geochemistry*, 18, 1399-1416.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Centro de Investigaciones Científicas CEINCI de la Escuela Politécnica del Ejército por el auspicio al presente trabajo, a la Dra. Ma. Del Carmen Gonzáles Chávez, Microbiología Ambiental, Colegio de Posgraduados por la dotación del material biológico utilizado.