

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

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

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA**

SANDRA ELIZABETH NAVAS GUERRERO

DIRECTOR: ING. JESSICA DUCHICELA

CODIRECTOR: DR. LUIS CUMBAL

Sangolquí, 2006-08

CERTIFICACIÓN DE LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO

El proyecto “EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A ARSÉNICO DE LAS ESPORAS DE CUATRO ESPECIES DE HONGOS ARBUSCULARES” fue realizado en su totalidad por Sandra Elizabeth Navas Guerrero, como requerimiento parcial para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

**Ing. Jéssica Duchicela
DIRECTOR**

**Dr. Luis Cumbal
CODIRECTOR**

Sangolquí, 2006-08-21

LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO

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

ELABORADO POR:

SANDRA ELIZABETH NAVAS GUERRERO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Msc. Mónica Jadán Guerrero
COORDINADORA DE CARRERA**

Sangolquí, 2006-08

DEDICATORIA

A mis padres por brindarme su amor y apoyo cada día de mi vida, por confiar y creer incondicionalmente en mí, y por ser los seres humanos tan maravillosos que son, por ser un ejemplo de vida, amor, lucha, honestidad y bondad.

A ti por darme razones de vida, por darme ánimo y fuerza cada vez que caía, a ti por estar siempre junto a mí sin pedir nada a cambio.

Y a mí por seguir.

Sandra Navas

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES CARLOS NAVAS Y NORMA GUERRERO por haber hecho posible el inicio y la culminación de esta carrera y por haberme dado tanto en la vida.

A DIOS, por existir, por estar ahí, por darme una mano cuando lo he necesitado, gracias.

AL CEINCI, por darme la oportunidad de realizar la tesis en sus instalaciones.

ING. JESSICA DUCHICELA, por la asesoría y dirección del trabajo de tesis; además por su apoyo y amistad estos últimos años.

DR. LUIS CUMBAL, por la asesoría y codirección del trabajo de tesis.

DRA. MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ CHÁVEZ, por la asesoría y donación de las especies de hongos arbusculares de México ya que sin ellas no hubiera sido posible la realización este trabajo.

DR. RICARDO HERRERA, por su ayuda en la identificación de la especie aislada en este trabajo.

FRITZ OELH, por facilitarme información de la nueva especie y ayudarme en la identificación de la especie aislada en este trabajo.

ALMA CUELLAR, por brindarme su amistad y transmitirme su conocimiento al inicio de este trabajo.

LCDA. VERÓNICA LUNA, por su ayuda al inicio de este trabajo.

ING. MARCO TAIPE, por su ayuda en el análisis estadístico del trabajo

BLANQUITA NARANJO, por brindarme su ayuda cuando lo requerí.

A mis compañeros de laboratorio CHARLES, RICKY, ANITA y a PATTY por estar ahí estos últimos días.

Sandra Navas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN DE LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO.....	ii
LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTADO DE TABLAS.....	ix
LISTADO DE FIGURAS.....	x
LISTADO DE ANEXOS.....	xiii
NOMENCLATURA UTILIZADA.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	6
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
CAPÍTULO I. MARCO TEORICO.....	7
1.1- Micorriza arbuscular (MA)	7
1.1.1- Definición y cambios históricos de denominación.....	7
1.1.2- Paleobotánica.....	8
1.1.3- Taxonomía.....	9
1.1.3.1- Micorriza arbuscular.....	9
1.1.4- Morfología.....	11
1.1.4.1- Micelio externo	13
1.1.4.2- Esporas.....	13
1.1.4.2.1- Germinación y crecimiento hifal	14
1.1.4.2.2- Pared de la espora	15
1.1.4.2.3- Estructuras de pregerminación	17
1.1.5- Especies estudiadas.....	17
1.1.5.1- <i>Glomus claroideum</i>	17
1.1.5.1.1- Pared de la espora	18

1.1.5.1.2- Hifa sustentora.....	19
1.1.5.1.3- Germinación	19
1.1.5.2- <i>Glomus mosseae</i>	20
1.1.5.2.1- Pared de la espora	22
1.1.5.2.2- Hifa sustentora.....	23
1.1.5.2.3- Germinación	23
1.1.5.3- <i>Pacispora</i>	24
1.1.5.3.1- Pared de la espora y germinación	25
1.1.5.3.2- Hifa sustentora.....	26
1.1.6- Aspectos Fisiológicos de la Simbiosis Micorrízica	26
1.1.7- Tolerancia a Arsénico en hongos micorrízicos.....	27
1.1.7.1- Mecanismos de Tolerancia a Arsénico de HMA	29
1.1.8- Alternativas de empleo de la Asociación Micorrízica	31
1.2- Arsénico.....	32
1.2.1- Arsénico	32
1.2.2- Metabolismo del Arsénico.....	35
1.2.3- Arsénico en el suelo	38
1.2.4- Toxicidad del Arsénico	43
1.2.4.1- Humanos	13
1.2.4.2- Arsénico en plantas.....	48
CAPÍTULO II. MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	51
2.1- Materiales y Métodos	51
2.1.1- Ubicación geográfica	51
2.1.2- Especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA)	51
2.1.3- Métodos.....	51
2.1.3.1- Muestreo de Suelo	51
2.1.3.2- Extracción de esporas y cuantificación.....	52
2.1.3.3- Establecimiento de cultivos monospóricos y cultivos trampa	53
a. Acidificación de sustrato	53
b. Esterilización de sustrato	53
c. Cultivo trampa	53

d. Cultivo monospóricico	54
2.1.3.4- Identificación de especies	54
2.1.3.5- Germinación de esporas de hongos arbusculares	55
2.1.3.6- Determinación de Arsénico en suelo, sustrato y esporas.....	56
2.1.3.6.1- Espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros.....	56
2.1.3.6.2- Determinación de Arsénico en muestras de suelo	57
2.1.3.6.3- Determinación de Arsénico en esporas de HMA	57
2.1.3.6.4- Determinación de Arsénico retenido en el sustrato	58
2.2- Análisis Estadístico	58
2.2.1- Variables analizadas.....	58
2.2.2- Diseño Experimental.....	59
CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
3.1- Análisis y discusión de resultados.....	60
3.1.1- Contenido de As en suelo de la Laguna de Papallacta, sector suroeste.....	60
3.1.2- Población de HMA en suelo de la Laguna de Papallacta, sector suroeste....	61
3.1.3- Identificación de la especie de HMA aislada de suelo de la laguna de Papallacta.....	61
3.1.4- Germinación de esporas de HMA evaluados	62
3.1.5- Concentración de Arsénico en esporas de HMA evaluados	75
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES.....	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
GLOSARIO	94
ANEXOS.....	97

LISTADO DE TABLAS

Tabla1.1: Clasificación Taxonómica de los hongos arbusculares (Schüßler <i>et.al.</i> ,2001; Oehl & Sieverding, 2004)	11
Tabla1.2: Composición de la pared celular de los hongos. (Gonzalez & Raisman, 2004)	16
Tabla 3.1: Población de hongos micorrízicos en muestras de suelo de la Laguna de Papallacta (Condiciones Naturales- Noviembre 2005 y Marzo 2006), Reserva Cayambe – Coca, Ecuador.	61
Tabla 3.2: Análisis de Variancia del Estudio de Concentración de As y Especies de HMA en un diseño completamente al Azar.	62
Tabla 3.3: Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para especies de HMA	64
Tabla 3.4: Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para concentraciones	72
Tabla 3.5: Concentraciones de Arsénico evaluadas.....	74
Tabla 3.6: Análisis de Variancia del Estudio de la Concentración de As retenida en las esporas de las cuatro especies en un diseño completamente al Azar	75
Tabla 3.7: Concentración de Arsénico retenido en esporas de las cuatro especies evaluadas bajo cuatro concentraciones de As	76
Tabla 3.8: Correlación entre Porcentaje de germinación y Arsénico retenido en esporas de las cuatro especies evaluadas.....	77

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Estructura taxonómica generalizada basada en el análisis de las subunidades pequeñas (SSU) de ARNr de secuencias de genes. Se muestran los cuatro ordenes para Glomeromycota y en los óvalos se ubican las nuevas familias que se encuentran actualmente en estudio (Schüßler <i>et.al.</i> , 2001).	10
Figura 1.2: Ciclo de Vida de los hongos arbusculares (INVAM, 2006)	12
Figura 1.3: Pared de una espora de <i>Glomus</i> , representa la continuidad entre las capas de la pared hifal y la pared de la espora. En <i>Glomus</i> el vínculo entre la hifa y la pared de la espora es más evidente durante la formación de la espora porque las paredes de la hifa y la espora se diferencian juntas y al mismo tiempo (INVAM, 2006)	15
Figura 1.4: Estructura de la quitina formada por unidades repetidas de acetilglucosamina (2-acetamido-2-deoxiglucosa)	17
Figura 1.5: Esporas de <i>Glomus claroideum</i> (INVAM, 2006)	18
Figura 1.6: Espora joven de <i>Glomus claroideum</i> que solo presenta las dos primeras capas L1 y L2 (INVAM, 2006)	18
Figura 1.7: Pared de una espora de <i>Glomus claroideum</i> que ha desarrollado la tercera capa de la pared L3. L3 se desarrolla tanto en la pared de la espora como en la de la hifa sustentora (INVAM, 2006)	19
Figura 1.8: Germinación de una espora <i>Glomus claroideum</i> (INVAM, 2006)	20
Figura 1.9: Esporas jóvenes de <i>Glomus mosseae</i> (INVAM, 2006)	21
Figura 1.10: Esporas maduras de <i>Glomus mosseae</i> con peridium (INVAM, 2006)	21
Figura 1.11: Formación de la primera capa L1 en una espora de <i>Glomus mosseae</i> (INVAM, 2006)	22
Figura 1.12: Espora que presenta sus tres capas de la pared formadas L1,L2 y L3 (INVAM, 2006)	22
Figura 1.13: Espora diferenciada en proceso de germinación (INVAM, 2006)	23
Figura 1.14: Germinación de una espora de <i>Glomus mosseae</i> , en esta se puede apreciar el desarrollo del tubo de germinación a partir del septo (INVAM, 2006) .	24

Figura 1.15: Espora de <i>Pacispora</i> de color hialino y con ornamentación de proyecciones cortas en la pared	25
Figura 1.16: Espora de <i>Pacispora</i> germinada	26
Figura 1.17: Los OH de los alcoholes primarios -CH ₂ OH que forman parte de la estructura de la quitina son altamente reactivos, por ello se puede producir la liberación del grupo OH ⁻ y dejar al CH ₂ ⁺ como un carbocatión, este carbocatión mediante atracción electrostática con el anión H ₂ AsO ₄ ⁻ (especie predominante a pH inferiores a 6.9) forma un enlace, produciéndose la liberación del OH ⁻ , que puede mantenerse como ion en el medio.....	30
Figura 1.18: Especies de Arsénico (V) en función del pH	34
Figura 1.19: Especies de Arsénico (III) en función del pH	34
Figura 1.20: Modelo de disociación anfótera.....	40
Figura 1.21: Interacción entre hidróxidos de Hierro y arsenato.....	41
Figura 1.22: Modelo a pH < zpc y si la acidez es suficiente.....	41
Figura 1.23: Modelo a pH > zpc y si la basicidad es suficiente en la disolución y predomina el HAsO ₄ ²⁻ sobre el H ₂ AsO ₄ ⁻	42
Figura 3.1: Cinética de germinación de esporas de <i>Glomus claroideum</i> DNM 1 durante 34 días expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3= 17412 mgAs/L	64
Figura 3.2: Cinética de germinación de esporas de <i>Glomus mosseae</i> BEG 25 durante 34 días expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L c2 = 5398 mgAs/L c3= 17412 mgAs/L	65
Figura 3.3: Cinética de germinación de esporas de <i>Glomus mosseae</i> BEG 132 durante 34 días expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3= 17412 mgAs/L.....	65
Figura 3.4: Cinética de germinación de esporas de <i>Pacispora</i> sp. durante 34 días expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3= 17412 mgAs/L	66

Figura 3.5: Respuesta de germinación de esporas de <i>Glomus claroideum</i> DNM 1, <i>Glomus mosseae</i> BEG 25, <i>Glomus mosseae</i> BEG 132 y <i>Pacispora</i> sp. expuestas a la más alta concentración de Arsénico(c3) evaluada en este estudio	66
Figura 3.6: Porcentaje de germinación final (34 días) en las cuatro especies expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3= 17412 mgAs/L.....	67
Figura 3.7: Esquema de mecanismo de captura de Arsénico.....	69
Figura 3.8: Esquema de mecanismo de retención de arsenato en la superficie de los polisacáridos.....	70
Figura 3.9: Variaciones de carga en la cadena peptídica para las Glicoproteínas.....	71
Figura 3.10: Variaciones de carga para el Quitosano	71
Figura 3.11: Isoterma de adsorción de arsenato en sustrato (arena de río estéril)	74

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1: Informe Comisión Ecuatoriana De Energía Atómica	97
ANEXO 2: Población de HMA en suelo de la Laguna de Papallacta, sector suroeste ...	98
ANEXO 3: Identificación de la especie de HMA aislada de suelo de la laguna de Papallacta	99
ANEXO 4: Análisis de Varianza - ADEVA.....	100
ANEXO 5: Prueba de Tukey Factor Especie.....	101
ANEXO 6: Prueba de Tukey Factor Concentración	102
ANEXO 7: Datos empleados en la elaboración de la isoterma	103

NOMENCLATURA UTILIZADA

AAS: espectrofotometría de absorción atómica

An: anión

ATP: Trifosfato de adenosina

BAS: estructuras básicas de absorción

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EPTs: Elementos potencialmente tóxicos

H-AAS: espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros

HMA: hongos micorrízico arbusculares

MA: Micorriza arbuscular

PCs: fitoquelatinas

pi: punto isoelectrico

Pi: fósforo inorgánico

ROS: especies reactivas de oxígeno

SOD: superóxido dismutasa

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 $\mu\text{gAs/g}$ 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

ABSTRACT

The aim of this work was to assess the arsenic tolerance in spores from four species of arbuscular fungi. It was studied the germination kinetics and the content of arsenic (As) of the four species. The treated species were *Glomus claroideum* DNM-1, *Glomus mosseae* BEG-25, obtained from non-polluted soil from Mexico, *Glomus mosseae* BEG-132, obtained from As and Cu polluted soil from Mexico and *Pacispora* sp. isolated from As polluted soil from Ecuador. The spores were subjected to three As concentrations in order to asses possible differences between the percentages of germination per species.

Glomus mosseae BEG-132, *Glomus mosseae* BEG-25 and *Pacispora* sp. were the species that responded the best to the high As concentrations, the percentage of germination was the highest in these species. Every one of the species was able of sequestering As in a range from 4 to 1200 µgAs/g (spore dry weight). Spores *Glomus mosseae* BEG-132, *Glomus mosseae* BEG-25 and *Pacispora* sp. presented higher tolerances to As, this tolerance expressed itself like less germination time and higher number of germinated spores.

From this study, it is concluded that the response of the evaluated arbuscular fungi depends on the species and the As concentration they were exposed to. These results could be used as basis for the selection of tolerant species that could be employed in future investigations for studying its symbiotic behavior and use in remediation programs.

Key words: spores, arbuscular fungi, arsenic, tolerance

INTRODUCCIÓN

El arsénico es el vigésimo elemento químico más abundante, ampliamente distribuido en la corteza terrestre, su contenido en ésta varía entre 1.5 y 2 mg/kg. Es un metaloide presente en cantidades ínfimas en rocas, suelos, agua y aire. Los principales estados de oxidación en que se presenta en la naturaleza son -3, +3 y +5, tanto en forma orgánica como inorgánica (Carbonell-Barrachina, *et al.*, 1995). Las formas que predominan en aguas naturales son las inorgánicas: arsenato (As V) y arsenito (As III) (Leonard & Lauwerys, 1980), éstas son también las formas de arsénico fitodisponibles en la fase líquida del suelo (Turpeinen *et al.*, 1999). El arsénico además está presente en numerosos compuestos de carácter orgánico. Como consecuencia de la actividad biológica se producen diversos compuestos de arsénico metilados como son la di y trimetilarsina, especies que tras una oxidación se transforman en los ácidos metilarsónico y dimetilarsónico, compuestos que forman sales solubles con los metales alcalinos. También se han encontrado en organismos marinos compuestos como la arsenobetaína y la arsenocolina (Carbonell-Barrachina, *et al.*, 1995).

En el suelo bajo condiciones reductoras, están presentes iones complejos de sulfuros y arsénico, el arsenito es probablemente la forma predominante, el arsénico elemental y la arsina también pueden existir en medios fuertemente reductores. En medio oxigenados, el arsenato es el estado de oxidación predominante o más estable, con el H_2AsO_4^- predominando bajo condiciones ácidas y el AsO_4^{3-} predominando bajo condiciones alcalinas. La persistencia del arsénico en el medio ambiente está controlada por la capacidad de adsorción del suelo y por las pérdidas que se puedan producir por lavado, lixiviación o por volatilización (Carbonell-Barrachina, *et al.*, 1995).

En las raíces de las plantas todos los aniones son fuertemente adsorbidos a la superficie de la membrana, transferidos selectivamente al simplasto y por último transportados a la parte superior de la planta (Meharg & Macnair, 1990), en particular la adsorción del arsenito y del arsenato en la superficie radicular externa es bastante rápida e intensa. En los tejidos de las plantas se han encontrado especies orgánicas e inorgánicas de arsénico, predominando las inorgánicas, pequeñas cantidades de compuestos de arsénico orgánicos como arsenobetaína y arsenoazúcares también están presentes en los tejidos vegetales, no se sabe con claridad si éstos son producto de la transformación en las plantas o son tomadas del suelo (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002)

El arsénico se encuentra presente en los alimentos, ya que cantidades mínimas del mismo se incorporan por contaminación en la cadena de producción, preparación y procesado. Los alimentos de origen vegetal y animal presentan contenidos de As relativamente bajos, los alimentos de origen marino muestran contenidos de As más altos que el resto, de forma que la cantidad total de arsénico ingerida por el hombre depende de la cantidad de dichos alimentos en su dieta (Carbonell-Barrachina, *et al.*, 1995).

La contaminación por arsénico en zonas mineras y agrícolas ha sido generada por el procesamiento de minerales que contienen arsénico y el uso de arsenicales inorgánicos y orgánicos como herbicidas e insecticidas en huertos frutales y cultivos de arroz, orquídeas, algodón entre otros (Woolson *et al.*, 1971; Murphy & Aucott, 1998). La existencia de arsénico en minerales de zinc-plomo, cobre y su presencia en muchas piritas son causa de contaminación en el entorno de los sitios de fundición y tratamiento de los minerales, debido a la volatilización de algunos compuestos durante el proceso de fundición (Crecelius *et al.*, 1974; Ragaini *et al.*, 1977). En suelos de viejos huertos que han recibido arsenato de plomo durante muchos años el contenido de arsénico llega a más de 2500 mgAs/kg

(Woolson *et al.*, 1971), siendo estos suelos fitotóxicos para varios cultivos; dependiendo el grado de toxicidad del pH, de las concentraciones de fosfato, hierro y aluminio, de la cantidad de materia orgánica, y de la sensibilidad del cultivo.

Una de las zonas donde se encuentran con frecuencia altas concentraciones de As, son las áreas de actividad geotérmica (Lancaster *et al.*, 1971; Reay, 1972; Fowler, 1977), así como los suelos procedentes de roca madre de origen volcánico (Ferguson & Gavis, 1972). Las concentraciones del contaminante en fangos geotérmicos, gases de fumarolas, aguas y suelos de los alrededores de estas fuentes son tan elevadas que la salud de los animales de pastoreo de la zona es afectada (Lepp, 1981).

El arsénico en sus diferentes formas induce distintos tipos de daño celular, causa varios problemas ambientales y de salud a los organismos expuestos a éste, por lo cual en los últimos años se ha dado importancia a la remediación de lugares con alto contenido de arsénico tanto en agua como en suelo. Se han reportado accidentes como el Bangladesh y la India en el que una población de sobre los 30 millones fue expuesta a niveles tóxicos de arsénico debido a los altos niveles de arsénico natural encontrado en el agua de consumo (Mukherjee & Bhattacharya, 2001); otro caso es la crisis en el Sur-este de Asia (Oeste de Bengal, Bangladesh y Vietman), donde 10 millones de personas han sido expuestas a altos niveles de arsénico en aguas subterráneas empleadas como la principal fuente de agua de consumo y para la irrigación de cultivos de alimentación básica como arroz (Nickson *et al.*, 1998; Berget *et al.*, 2001; Christen, 2001; Abedin *et al.*, 2002).

En nuestro país, en la Provincia de Napo, sector de la laguna de Papallacta y en las aguas termales de la región interandina, se han medido altas concentraciones de este elemento. Luego del derrame de petróleo que cubrió casi la mitad de la superficie de la laguna de Papallacta, ocurrido en el 2003, algunas entidades públicas y privadas realizaron

análisis de elementos tóxicos en la zona para llevar a cabo la remediación del lugar, en los análisis de agua en general encontraron valores de contenido de arsénico mayores al valor máximo permitido por la norma que es 0.05mg/L. El Departamento de Metalurgia Extractiva de la Escuela Politécnica Nacional, realizó un estudio de aguas superficiales y sedimentos de la cuenca de los ríos Sucus, Tambo y Papallacta, en este estudio se determinó concentraciones de arsénico muy altas (5mg/L) en aguas termales del río Tambo, en el suelo alejado de la laguna se encontró un contenido de arsénico de 74mg/kg, que supera el valor señalado por normas internacionales y por la norma ambiental nacional (TULAS, 2003).

Tomando en cuenta la toxicidad del arsénico, el riesgo de la población expuesta a este elemento y los efectos adversos que causa en el ambiente, es de vital importancia investigar las posibles alternativas de remediación. Existen varias tecnologías para remover arsénico del agua y suelos; sin embargo, estas técnicas transfieren el contaminante de una fase a otra fase. Por el contrario, la biorremediación elimina el arsénico, siendo consecuentemente una metodología muy atractiva para descontaminar aguas y suelos.

En este contexto, algunos microorganismos tienen la habilidad de desarrollarse en ambientes extremadamente contaminados y pueden ser capaces de alterar el estado químico y forma de distribución en el suelo. Esta propiedad ofrece la posibilidad de que sean involucrados en los diferentes procesos de biorremediación de áreas contaminadas.

Dentro de los microorganismos del suelo que pueden participar funcionalmente en procesos de remediación de áreas contaminadas, destacan los hongos arbusculares, cuya simbiosis se lleva a cabo bajo condiciones aerobias. Se ha demostrado que éstos desempeñan un papel importante en la dinámica del arsénico en el sistema suelo-planta, ya que ejercen una fuerte influencia en la captura y resistencia al arsenato, esta influencia esta

relacionada a su funcionalidad, ya que en las plantas estos hongos inducen un incremento en la adquisición de fosfato (Smith & Read, 1997), pero en condiciones de contaminación suprimen la alta afinidad del transporte de fosfato que es el mismo mecanismo por el cual se transporta el arsenato, proveyendo de esta manera a la planta hospedera resistencia a condiciones de toxicidad por arsénico (Sharples *et al.*, 2000). Adicionalmente, varios estudios reportan la capacidad de los hongos arbusculares de absorber, secuestrar y acumular metales pesados en esporas, micelio externo y micelio intraradical, modificando la disponibilidad de los contaminantes en el suelo, estabilizándolo *in situ*, y simultáneamente reestableciendo la vegetación del área.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la tolerancia a arsénico de cuatro especies de HMA, provenientes de ecosistemas contaminados y no contaminados de México y Ecuador, el ensayo pretende acercarse en lo posible al escenario presente en condiciones naturales; en este contexto se estudió la adsorción del arsénico contenido en el suelo por parte de las esporas. Gran parte de la fase biótica del suelo se desarrolla en condiciones aerobias donde la forma dominante de arsénico es arsenato (As V). Varios estudios reportan la interacción de la micorriza a nivel de simbiosis con arsenato (Meharg & Macnair, 1992; Fitter *et al.*, 1998; Gonzáles Chávez, 2000b; Sharples *et al.*, 2000; Gonzáles Chávez *et al.*, 2002a) por ello se emplea al arsénico en su forma oxidada As (V). No se estudia el As (III) ya que éste predomina bajo condiciones reducidas (anaerobia) como arsenito.

Los efectos de la exposición a arsénico en la funcionalidad presimbiótica (germinación de esporas) son cuantificados para el estudio del comportamiento del hongo frente a condiciones de estrés por contaminación, esta información es base de selección de especies que pueden utilizarse potencialmente para programas de remediación.

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.

CAPÍTULO I. MARCO TEORICO

1.1- Micorriza arbuscular (MA)

1.1.1- Definición y cambios históricos de denominación

Frank en 1885 propuso el término micorriza, a la peculiar asociación que observó entre las raíces de los árboles y hongos ectomicorrízicos (formadores de estructuras externas), basándose en dos términos latinos, rhiza-raíz y mykes-hongo (Sieverding, 1991). La denominación de la misma ha cambiando a través de los años. La simbiosis que se observó forma estructuras a nivel de cortex radical, en el principio fue frecuentemente llamada “endomicorriza phycomycetos” para referirse a la simbiosis formada entre los miembros de Ericaceae u Orchidaceae y hongos superiores. Sin embargo el nombre “phycomyceto” no representó ninguna significancia sistemática. Previamente, Janse (1897) llamó a las esporas intramatriaciales “vesículas” y Gallaud (1905) llamó a las otras estructuras intracelulares comúnmente observadas “arbúsculos”. Así el término “micorriza vesículo arbuscular” fue establecido y persistió hasta recientemente.

El reconocimiento de que no todos los hongos forman vesículas llevo a la propuesta de que la simbiosis debería ser renombrada como “micorriza arbuscular” (MA), este cambio es ahora ampliamente aceptado (Smith & Smith, 1997; Klironomos, 2003).

La simbiosis MA es la más ampliamente difundida en el reino vegetal, formada entre hongos simbioses obligados del orden Glomerales, llamados Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), los cuales son microorganismos que forman parte de la rizosfera natural del suelo en ecosistemas naturales y colonizan más tejidos vegetales que las ectomicorrizas, ectoendomicorrizas y micorrizas ericoides en conjunto (Wilcox, 1990). Una amplia variedad de plantas hospederas son susceptibles de ser micorrizadas, incluyendo

angiospermas, gimnospermas y pteridophytas las cuales tienen raíces verdaderas, así como también los gametofitos de algunos musgos, licopodios, psilotales que no tienen raíces verdaderas. Esto sugiere que los hongos tienen sus orígenes entre 353 y 462 millones de años y que la simbiosis es similarmente antigua por lo que probablemente desempeñó un rol importante en la colonización de plantas en la tierra (Smith & Read, 1997; Stubblefield *et al.*, 1987; Simon *et al.*, 1993; LePage *et al.*, 1997).

Las micorrizas fueron descubiertas desde hace unos 100 años, pero fue hasta 1953-1955 que se iniciaron las investigaciones, gracias al aporte de B. Mosse en Inglaterra y J.W. Gerdeman en Estados Unidos, quienes, en base al estudio de las esporas, desarrollaron una metodología para reproducirlos, con la utilización de plantas vivas cultivadas en macetas (Kelly, 1990; Schenck & Pérez, 1990).

1.1.2- Paleobotánica

La MA es una de las pocas asociaciones hongo-planta con documentación fósil; mediante la secuenciación de DNA ribosomal de varias especies de HMA se estimó que su origen data de 353-462 millones de años, lo cual es consistente con los estudios de hongos fósiles presentes en plantas ancestrales, que sugieren que la simbiosis se estableció como un mecanismo de ayuda para el establecimiento de la vegetación en ambientes terrestres (Pirozynski & Malloch, 1975, Simon, L. *et al.*, 1993). Sosteniendo la teoría de coevolución entre plantas y hongos, la MA es considerada como la clave del desarrollo de la flora terrestre.

1.1.3- Taxonomía

Históricamente, las micorrizas han sido colocadas en siete categorías, basadas principalmente en características estructurales. Estas categorías son: micorriza arbuscular, ectomicorriza, ectoendomicorriza, micorriza ericoide, micorriza arbutoide, micorrizas monotropeide y micorriza orquidiode. (Peterson & Massicotte, 2004).

1.1.3.1- Micorriza arbuscular

Los hongos micorrízicos arbusculares fueron ubicados dentro del orden Glomerales (Morton & Benny, 1990), phylum Zygomycota. El phylum Zygomycota tiene distintas líneas de descendencia, y no puede ser todavía mantenido en una verdadera clasificación filogenética (O'Donnell *et al.*, 2001). Cavalier Smith (1998) describió a Glomeromycetes como una nueva clase dentro del Zygomycota, conteniendo a los Glomerales (hongos arbusculares) y a los Endogonales.

Schüßler *et.al.* (2001) basados en análisis moleculares y características morfológicas y ecológicas describieron un nuevo phylum el Glomeromycota basado en relaciones naturales para la micorriza arbuscular y hongos relacionados. La clase Glomeromycetes esta ubicada dentro de este phylum, conteniendo más de 150 especies descritas. En este mismo trabajo se corrigen los nombres de los órdenes Glomales y Paraglomales por Glomerales y Paraglomerales. En el orden Glomerales incluyen a la familia Glomeraceae con el género *Glomus*. En el orden Paraglomerales ubican a la familia Paraglomeraceae con el género *Paraglomus*. En el orden Archaeosporales incluyen a las familias Archaeosporaceae y Geosiphonaceae. La primera familia con el género *Archaeospora* y la segunda con *Geosiphon periforme* que es un hongo que se asocia con la cianobacteria *Nostoc* y por lo tanto no forma micorriza arbuscular. Proponen también el

orden Diversisporales con las familias Diversisporaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae. En la familia Diversisporaceae colocan a *Glomus spurcum*, *G. etunicatun* y *G. vermiforme*. En Acaulosporaceae a *Acaulospora* y *Entrophospora* y en Gigasporaceae a *Gigaspora* y *Scutellospora*.

Oehl y Sieverding (2004), describen un nuevo género llamado *Pacispora* en la familia Glomeraceae. La nueva estructura taxonómica generalizada de los hongos arbusculares y hongos relacionados (Glomeromycota) se muestra en la Figura 1.1 y en la Tabla 1.1.

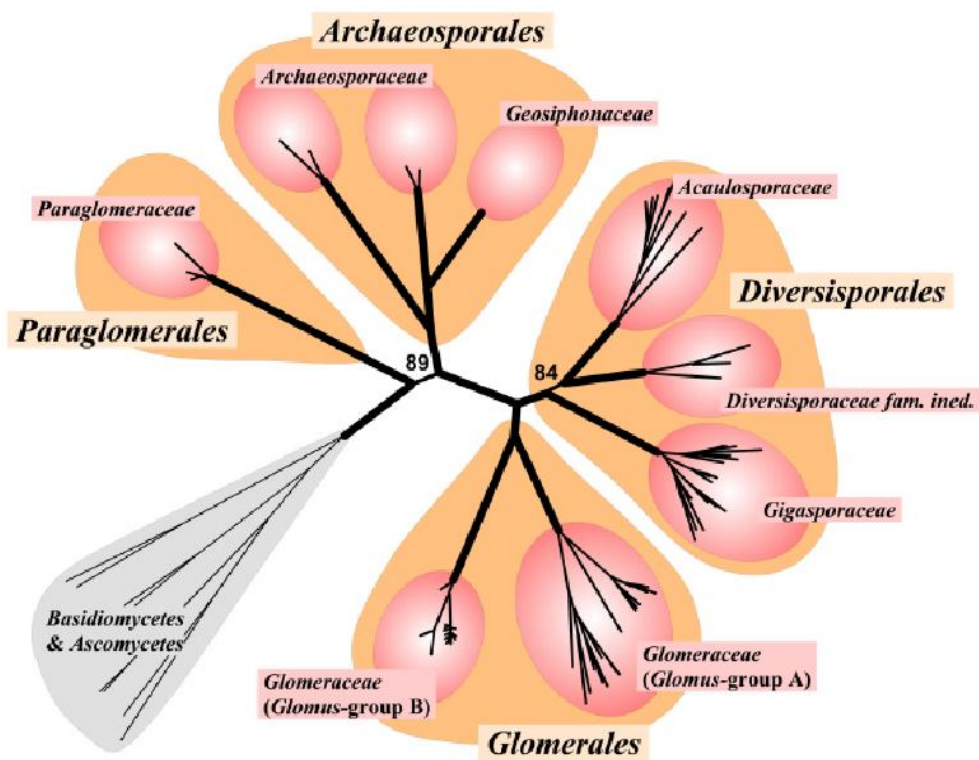


Figura 1.1: Estructura taxonómica generalizada basada en el análisis de las subunidades pequeñas (SSU) de ARNr de secuencias de genes. Se muestran los cuatro órdenes para Glomeromycota y en los óvalos se ubican las nuevas familias que se encuentran actualmente en estudio (Schüßler *et.al.*, 2001).

Tabla 1.1: Clasificación Taxonómica de los hongos arbusculares (Schüßler *et.al.*,2001; Oehl & Sieverding, 2004)

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i> <i>Pacispora</i>
		Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
		Archaeosporales	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>
			Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i> <i>periforme</i>
Diversisporales	Diversisporaceae	<i>G. spurcum</i> <i>G. etunicatum</i> <i>G. vermiforme</i>		
	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> <i>Entrophospora</i>		
	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i> <i>Scutellospora</i>		

1.1.4- Morfología

En el establecimiento de la simbiosis MA se distinguen tres componentes importantes: la raíz propiamente dicha y dos sistemas miceliales asociados: a) micelio intracelular que se encuentra dentro del apoplasto radical y b) micelio externo que se encuentra en el suelo (Figura 1.2).

El micelio intracelular se caracteriza por formar estructuras dentro de la raíz, estas estructuras son: los arbusculos y las vesículas (Duchicela & Gonzáles-Chávez, 2003).

Los arbusculos son ramas intrincadamente dispuestas dentro de células del córtex de la raíz, la membrana de la planta rodea al arbusculo, por lo que el hongo siempre queda localizado fuera del citoplasma de la planta dentro de un compartimiento apoplástico. Se forman por repetidas ramificaciones y reducciones en el ancho de las hifas, iniciando en

una hifa tronco (5-10 μm de diámetro) y finalizando con proliferación de delgadas ramificaciones de esta ($< 1 \mu\text{m}$ de diámetro) (Brundrett, 1999). Su nombre se debe a que presentan forma de pequeños árboles. Los arbusculos funcionan como sitios de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, constituyen los sitios de máxima interacción hospedante-simbionte.

Las vesículas son estructuras de forma globosa que se originan por un ensanchamiento de las hifas, sirven como órganos de almacenamiento de energía ya que están llenas de lípidos y azúcares. Las vesículas se inician pronto después de los primeros arbusculos y su desarrollo continúa durante su senescencia, pueden encontrarse en forma intercelular o intracelular.

De la simbiosis también se generan estructuras externas como el micelio externo y las esporas, algunas especies de hongos arbusculares pueden formar esporas dentro de las raíces de sus plantas hospederas (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988).

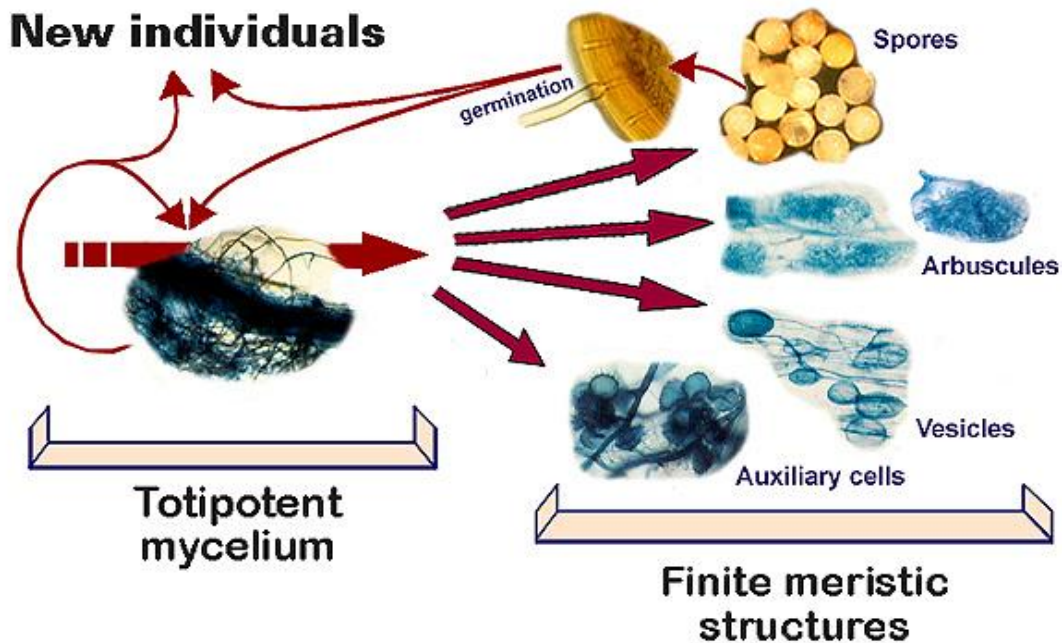


Figura1.2: Ciclo de Vida de los hongos arbusculares (INVAM, 2006)

1.1.4.1- Micelio externo

El micelio externo micorrízico constituye del 80 al 90% de la biomasa fúngica en el suelo, los suelos de diferentes ecosistemas contienen largas redes miceliales constituidas por hifas gruesas corredoras, que se encargan de explorar el suelo; el diámetro de estas disminuye con el incremento en el orden de ramificación (Friese & Allen, 1991). Esta estructura puede trabajar como un sistema de conexión entre la raíz y el suelo. Se distribuye ampliamente formando puentes hifales de conexión entre plantas funcionando como una fuente de intercambio nutrimental de un individuo a otro (van der Heijden & Sanders, 2002). El micelio externo constituye una importante fuente de inóculo para el progreso de la colonización del mismo sistema radical. El crecimiento extensivo del mismo no se inicia hasta después que las raíces han sido penetradas por las hifas del hongo.

A lo largo de las hifas corredoras, se forman redes muy finas ramificadas que funcionan como estructuras de absorción (Basic absorption structures BAS). A partir del micelio externo del hongo, se pueden formar células auxiliares aisladas o agrupadas, cuya función no se ha determinado totalmente y grandes esporas de resistencia de paredes gruesas, las cuales pueden sobrevivir por años y cuya germinación inicia un nuevo ciclo de la simbiosis (Bago *et al.*, 1998).

1.1.4.2- Esporas

El micelio externo da origen a las esporas y éste debe traslocar cantidades relativamente grandes de carbohidratos dentro de ellas, colocando una cantidad considerable de biomasa fúngica fuera de las raíces, por ello las esporas representan una importante biomasa fúngica en el suelo (Smith & Read, 1997).

Las esporas se establecen como estructuras de almacenamiento, resistencia y reproducción. (Smith & Read, 1997). Las esporas con paredes gruesas, resistentes y hasta varios miles de núcleos parecen ser estructuras de supervivencia de largo tiempo con capacidad de ser dispersadas por el viento y el agua (Gemma & Koske, 1992). En el suelo las poblaciones están compuestas de esporas de diferentes edades y en diferentes estados de dormancia o quiescencia (Tommerup, 1983). Por consecuencia la germinación puede ocurrir muy despacio y variablemente, proveyendo así un reservorio de inóculo que persiste por muchos años (Braunberger *et al.*, 1994).

La densidad de esporas en el suelo y su diversidad de especies es muy variable. Sieverding *et al.*, (1999) encontró una densidad máxima de 28 esporas g⁻¹ de suelo y calculó una biomasa de hasta 919 kg ha⁻¹, lo cual estima una biomasa mayor a la que se estima para cuerpos fructíferos de hongos ectomicorrízicos.

La composición de especies y abundancia de la población de esporas, tanto como la contribución de esporas a la infectividad, están probablemente influenciadas por un amplio rango de factores relacionados a la producción de esporas, dormancia e infectividad, esto puede diferir entre especies de hongos, tipos de plantas así como con época y otras variables ambientales (Smith & Read, 1997).

1.1.4.2.1- Germinación y crecimiento hifal

Las esporas no requieren la presencia de una planta para germinar (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989) producen pequeñas cantidades de micelio en el orden de 20-30 mm por espora. Si hay una colonización exitosa se forma un micelio extenso, y si la espora llega a ser separada el crecimiento de la hifa cesa. La germinación puede tomar lugar de tres formas: por germinación del escudo como en *Acaulospora* y *Scutellospora*; directamente a

través de la pared de la espora en especies de *Gigaspora* y en algunas especies de *Glomus*; y a través de la hifa sustentora un método común en muchas otras especies de *Glomus* (Siquiera *et al.*, 1985).

1.1.4.2.2- Pared de la espora

Cada espora sin importar la especie, produce una pared la cual se origina de la hifa fértil en la cual la espora es sostenida, la espora puede permanecer continuamente con la pared hifal o puede llegar a ser separada. La pared de la espora crece y se diferencia más a medida que la espora aumenta de tamaño. Cuando la espora deja de crecer, todas las capas de la pared de la espora han sido formadas, y ellas pueden continuar diferenciando propiedades tales como: color, rigidez y grosor.

Dentro de la pared de la espora son sintetizadas dos o mas capas (raramente más de cuatro). Las capas son numeradas de afuera hacia adentro con relación a la superficie de la espora (L1, L2, L3, etc.) (Figura 1.3). (Stürmer & Morton, 1997).

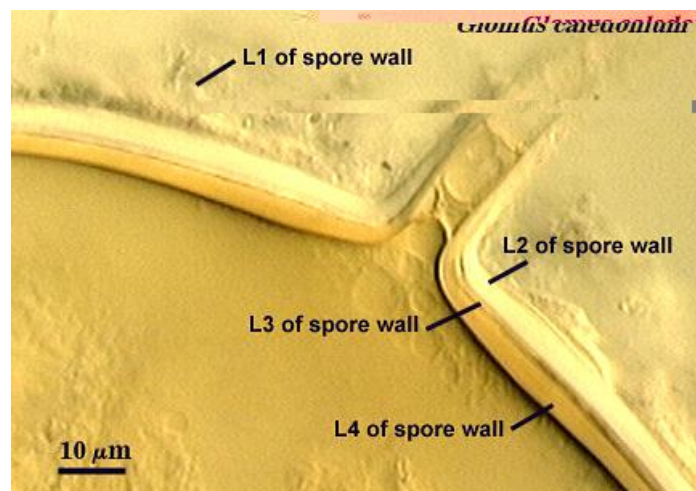


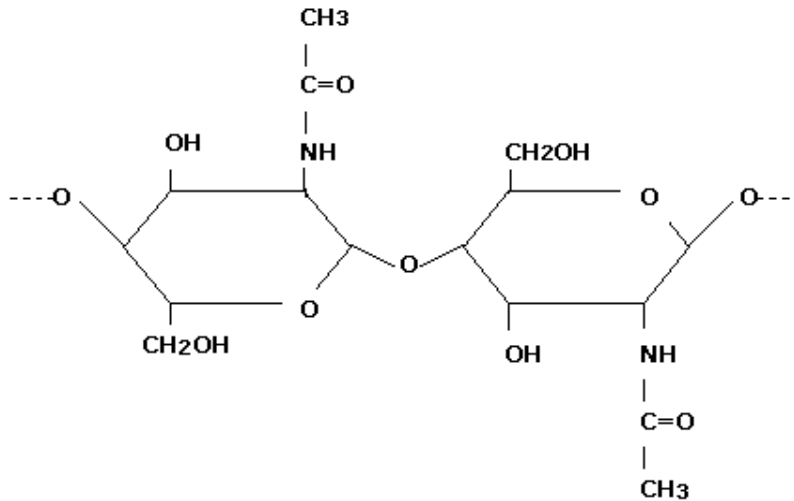
Figura 1.3: Pared de una espora de *Glomus*, representa la continuidad entre las capas de la pared hifal y la pared de la espora. En *Glomus* el vínculo entre la hifa y la pared de la espora es más evidente durante la formación de la espora porque las paredes de la hifa y la espora se diferencian juntas y al mismo tiempo (INVAM, 2006)

La pared celular de los hongos posee constituyentes químicos como: polisacáridos, proteínas, lípidos y otras sustancias. La constitución varía entre las diferentes especies, también varía por factores como, edad, composición del medio, pH y temperatura (Gonzalez & Raisman, 2004) (Tabla 1.2). Los componentes de la pared celular contienen aminoácidos libres, hidroxilos, carboxilos y otros grupos.

Tabla1.2: Composición de la pared celular de los hongos. (Gonzalez & Raisman, 2004)

	Tipo de pared celular	Grupo taxonómico	Géneros representativos
I	Celulosa-glucógeno	Acrasiomicetes	<i>Polysphondylium, Dictyostelium</i>
II	Celulosa-b –Glucana	Oomicetes	<i>Phytophthora, Pythium, Saprolegnia</i>
III	Celulosa-quitina	Hifoquitridiomycetes	<i>Rhizidiomyces</i>
IV	Quitina-Quitosano	Zygomycetes	<i>Mucor, Phycomyces, Misorhynchus</i>
V	Quitina-b –Glucana	Quitridiomycetes, Ascomycetes, Deuteromicetes y Basidiomicetes	<i>Allomyces, Blastocladiella</i> <i>Neurospora, Ajellomyces</i> <i>Aspergillus</i> <i>Schizophyllum, Fomes, Polyporus</i>
VI	Manana-b –Glucana	Ascomycetes	<i>Saccharomyces, Candida</i>
VII	Quitina-Glucana	Basidiomicetes	<i>Sporobolomyces, Rhodotorula</i>
VIII	Galactosamina- Polímeros de galactosa	Tricomycetes	<i>Amoebidium</i>

De acuerdo a la Tabla 1.2 el tipo de pared celular de los HMA es Quitina-Quitosano, que pertenece al grupo taxonómico Zygomycetes que era el grupo dentro del cual se colocaba a los HMA hasta su nueva clasificación realizada por Schüßler *et.al.*(2001). La estructura de la quitina se muestra en las Figura 1.4:



Unidad repetitiva de la Quitina

Figura 1.4: Estructura de la quitina formada por unidades repetidas de acetilglucosamina (2-acetamido-2-deoxiglucosa)

1.1.4.2.3- Estructuras de pregerminación

Las estructuras de pregerminación son la base a partir de la cual el tubo germinativo puede crecer y penetrar la pared y capas de la pared para emerger fuera de la espora. Estas estructuras difieren en forma y posición entre géneros de familias de los Glomerales (INVAM, 2006).

1.1.5- Especies estudiadas

1.1.5.1- *Glomus claroideum*

Las esporas de esta especie tiene forma globosa a subglobosa, son de color crema a amarillo claro y su tamaño varia entre 80-160µm, la media de una muestra de 120 esporas es de 115µm (Figura 1.5)

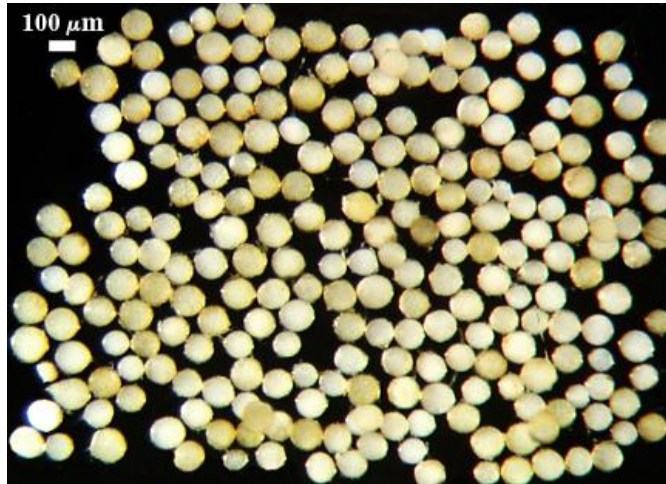


Figura 1.5: Esporas de *Glomus claroideum* (INVAM, 2006)

1.1.5.1.1- Pared de la espora

Contiene cuatro capas (L1, L2, L3 y L4), en las esporas más jóvenes se presentan solo las dos primeras capas (Figura 1.6) como una continuación de la pared joven de la hifa sustentora. La siguiente capa que se desarrolla es la L3, se desarrolla tanto en la hifa sustentora como en la espora (Figura 1.7). La capa L4 es la última en formarse y se origina como parte de la pared de la hifa sustentora pero solo en la región de la base de la espora.

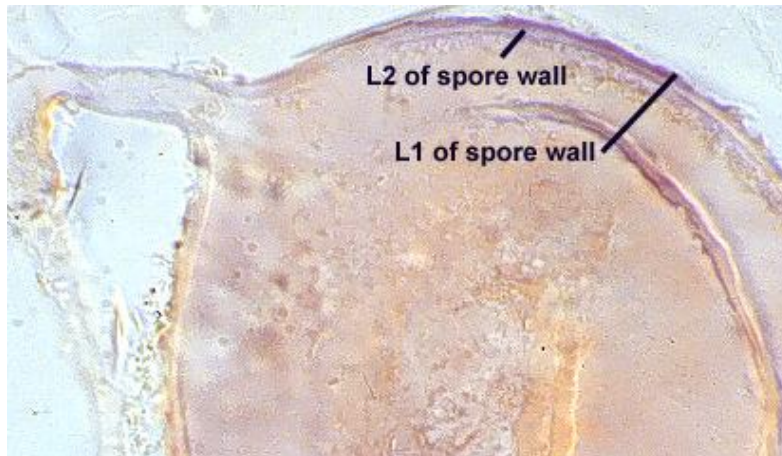


Figura 1.6: Espora joven de *Glomus claroideum* que solo presenta las dos primeras capas L1 y L2 (INVAM, 2006)

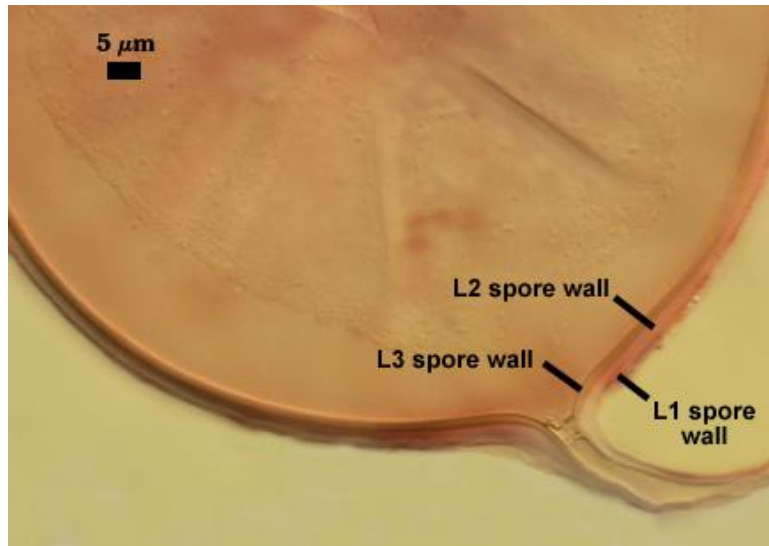


Figura 1.7: Pared de una espora de *Glomus claroideum* que ha desarrollado la tercera capa de la pared L3. L3 se desarrolla tanto en la pared de la espora como en la de la hifa sustentora (INVAM, 2006)

1.1.5.1.2- Hifa sustentora

Su forma es cilíndrica a ligeramente acampanada, de 6-8μm de ancho, su pared presenta tres capas (L1, L2 y L3) continuas con las tres capas externas de la pared de la espora, con un grosor de 1.2 – 3.2μm en la región de la unión, disminuyendo dentro de la espora a menos de 1.0μm de grosor. L1 y L2 usualmente están ausentes de la superficie de la espora madura, en algunas esporas la pared de la hifa es tan frágil que se rompe y no puede ser vista. L4 no se alarga en la hifa más allá del septo que separa a la espora del citoplasma hifal. L3 y L4 o solo L4 llenan el poro hifal y forman una estructura parecida a un septo (INVAM, 2006).

1.1.5.1.3- Germinación

Un tubo germinativo emerge desde el lumen de la hifa sustentora (Figura 1.8). Walker & Vestberg (1998) han reportado germinación también a través de la pared de la espora.

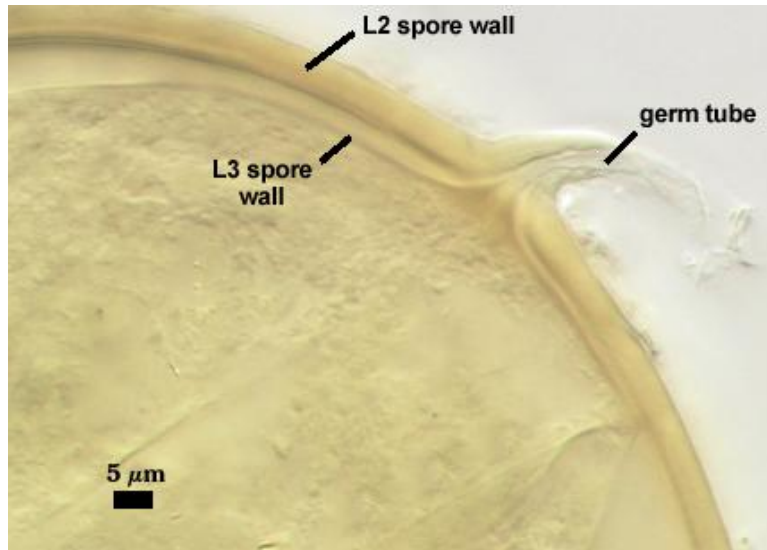


Figura 1.8: Germinación de una espora *Glomus claroideum* (INVAM, 2006)

1.1.5.2- *Glomus mosseae*

Las esporas nacen individualmente (Figura 1.9) en el suelo o en forma de esporocarpos es decir esporas que se encuentran dentro un peridium, el peridium no altera la estructura de la pared de las esporas. Los esporocarpos son de color amarillo-marrón a marrón (Figura 1.10).

Las esporas en su mayoría son de color amarillo-café, son de forma globosa a subglobosa algo irregulares y su tamaño varía entre 100-260μm, la media de una muestra de 166 esporas es de 195μm (INVAM, 2006).



Figura 1.9: Esporas jóvenes de *Glomus mosseae* (INVAM, 2006)

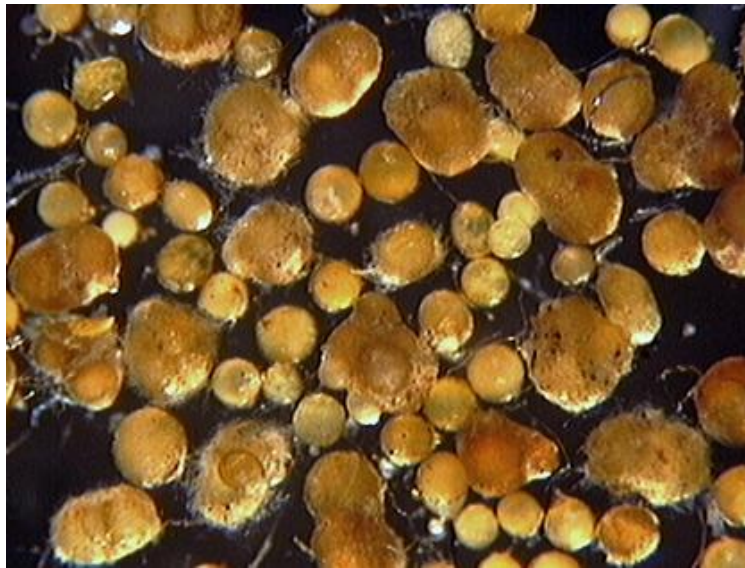


Figura 1.10: Esporas maduras de *Glomus mosseae* con peridium (INVAM, 2006)

1.1.5.2.1- Pared de la espora

A medida que la espora se va diferenciando se forman tres capas (L1, L2 y L3)
(Figuras 1.11, 1.12, 1.13).

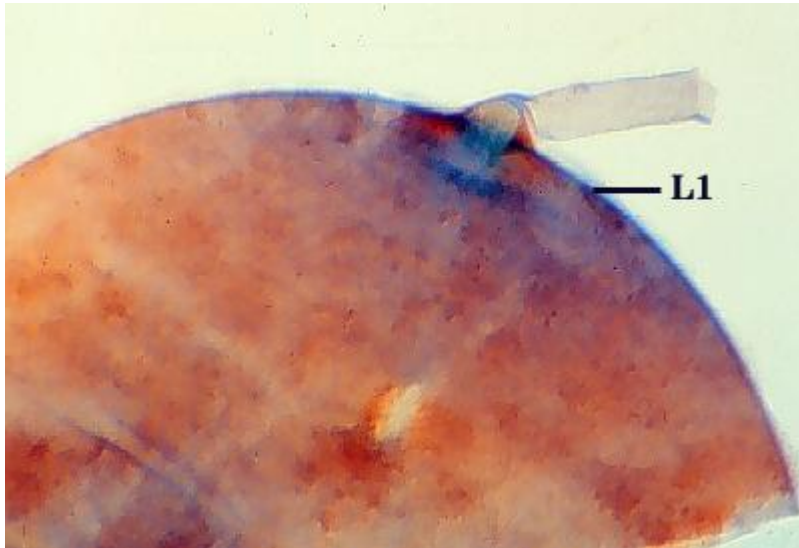


Figura 1.11: Formación de la primera capa L1 en una espora de *Glomus mosseae* (INVAM, 2006)

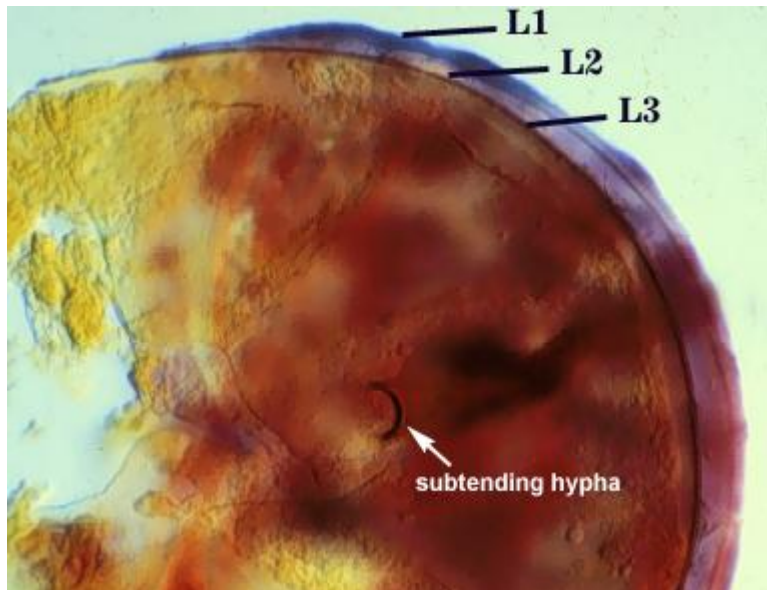


Figura 1.12: Espora que presenta sus tres capas de la pared formadas L1,L2 y L3 (INVAM, 2006)

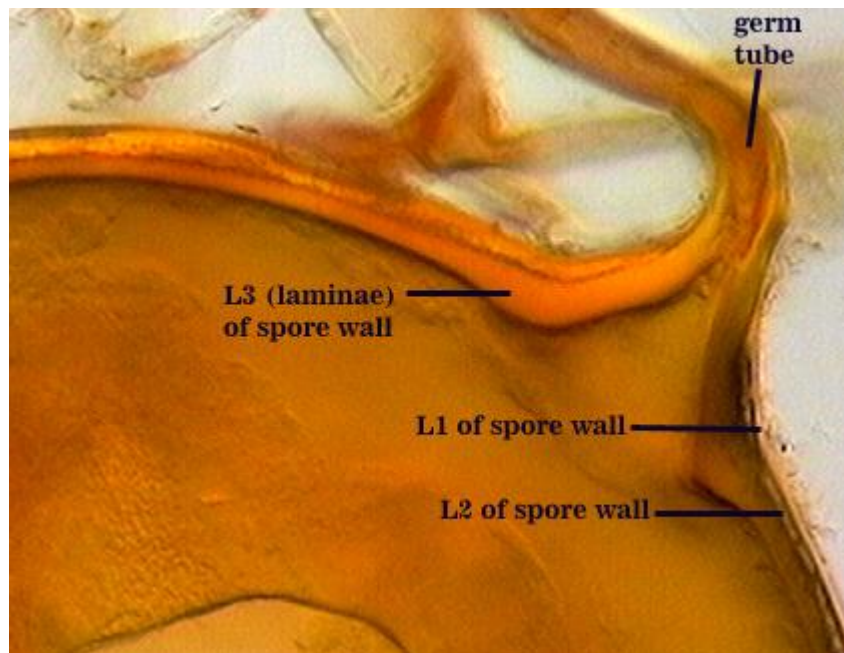


Figura 1.13: Espora diferenciada en proceso de germinación (INVAM, 2006)

1.1.5.2.2- Hifa sustentora

Su forma es de acampanada a forma de túnel, de 16-32 μ m de ancho. Se observan solo dos capas, la capa externa es continua con L1 y la interna es continua con L3 de la pared de la espora, cerca de la espora tienen un grosor de 2.4-4.8 μ m, la externa disminuye a 1.2-1.6 μ m dentro de la espora y raramente esta presente en la hifa de una espora madura. Un septo torcido de 0-30 μ m se forma desde el punto de unión de la espora (INVAM, 2006).

1.1.5.2.3- Germinación

Un tubo de germinación originado desde el septo emerge del lumen de la hifa sustentora (Figura 1.14). Este tubo de germinación se ramifica extensamente después de emerger de la hifa. Los esporocarpos producen numerosas hifas infectivas (INVAM, 2006)

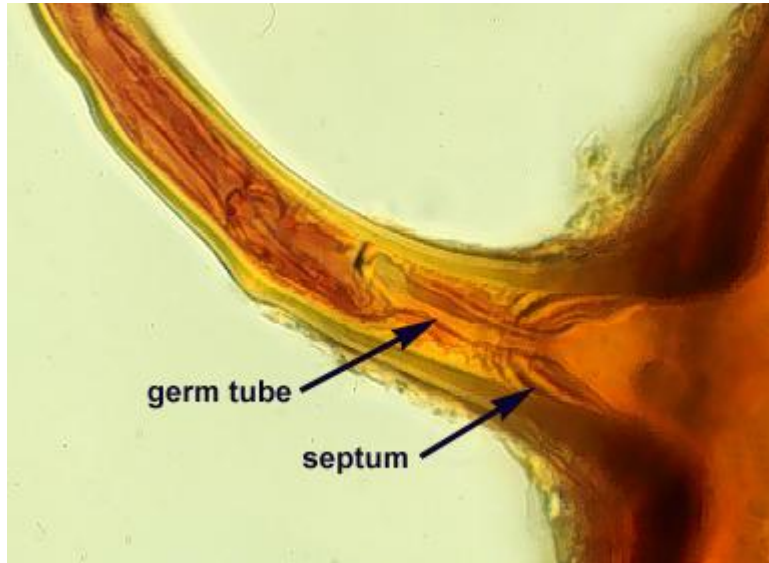


Figura 1.14: Germinación de una espora de *Glomus mosseae*, en esta se puede apreciar el desarrollo del tubo de germinación a partir del septo (INVAM, 2006)

1.1.5.3- *Pacispora*

Pacispora es un género recientemente descrito dentro de la familia Glomeraceae por Oehl y Sieverding (2004). Las esporas se forman terminalmente en la hifa ésta es una característica que solo comparten con *Glomus* y *Paraglomus*.

Se han descrito siete especies de *Pacispora*, que pueden ser morfológicamente diferenciadas por la estructura superficial de la espora, la presencia, posición y las características de la ornamentación de la pared de la espora y por el color y tamaño de la espora. El tipo de ornamentación que se presentan en la pared externa de las esporas puede ser: hoyos, proyecciones en forma de tubos, botones o verrugas en la pared externa dependiendo de la especie. Dos *Pacispora* spp. se caracterizan porque la superficie de la espora es lisa. Las especies con proyecciones en la pared de la espora presentan un color hialino, subhialino a brillante, crema o blanco opaco, las esporas de la especie aislada de *Papallacta* presentan una ornamentación de la pared con proyecciones cortas y un color hialino (Figura 1.15).

Tres de las *Pacispora* spp. fueron encontradas abundantemente a grandes alturas de los Alpes Suizos, sin embargo la ocurrencia de este género en regiones templadas, mediterráneas y tropicales sugiere que es un género ubicuo y adaptada a diferentes climas.

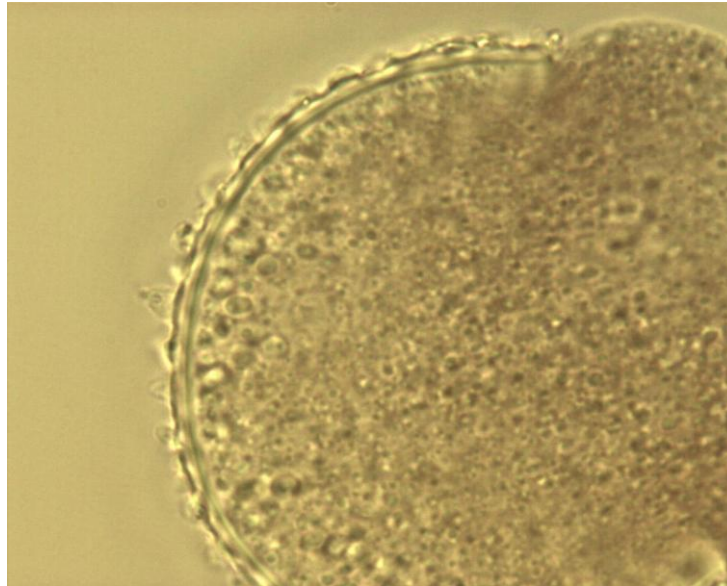


Figura 1.15: Espora de *Pacispora* de color hialino y con ornamentación de proyecciones cortas en la pared

1.1.5.3.1- Pared de la espora y germinación

Una pared interna usualmente dividida en tres subcapas está presente dentro de la espora, desde la cual la espora germina directamente a través de la pared externa, la cual usualmente presenta tres subcapas, la posición de la órbita de germinación en la pared interna es poco visible (Figura 1.16). Esta característica de germinación es compartida con *Scutellospora*, *Acaulospora* y *Entrophospora* pero no con *Glomus* y *Paraglomus*.

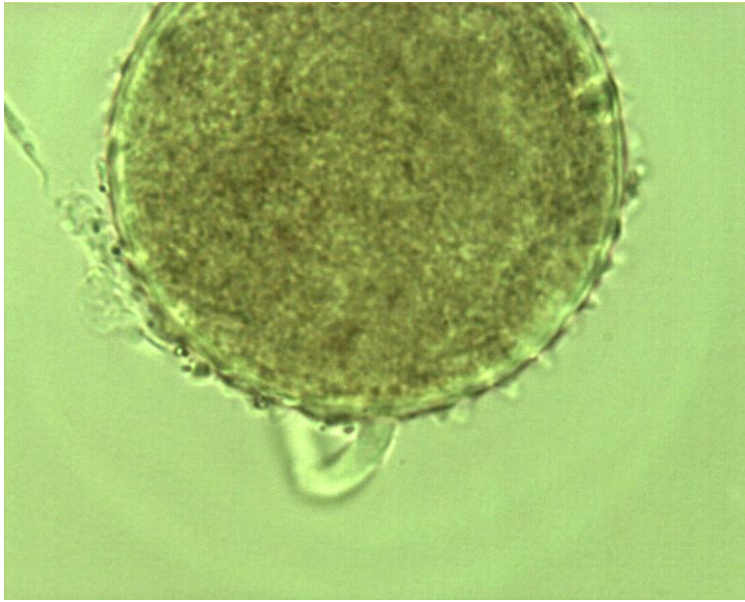


Figura 1.16: Espora de *Pacispora* germinada

1.1.5.3.2- Hifa sustentora

Las características de tinción de las estructuras del hongo dentro de la raíz y las características de la hifa sustentora de las esporas se asemejan más a las especies del género *Glomus*.

1.1.6- Aspectos Fisiológicos de la Simbiosis Micorrízica

La influencia de la simbiosis micorrízica en la nutrición y crecimiento de la planta hospedera es de gran trascendencia fisiológica y ecológica para el buen funcionamiento y estabilidad de las comunidades vegetales (Jaen, 1989). Estos hongos forman parte importante de la biota microbiana del suelo, mediante varios mecanismos de diversa índole contribuyen de manera fundamental en la nutrición, protección y adaptabilidad de las plantas hospederas (Barea, 1991).

El crecimiento del micelio externo en el suelo incrementa la superficie de acción de la planta y su capacidad de absorber nutrientes. El micelio externo absorbe los nutrientes y

los trasloca a su planta hospedera, en un proceso que es mucho más rápido que la difusión a través del sistema suelo - planta (Smith & Read, 1997).

En el suelo la mayor parte del fósforo se encuentra en forma inorgánica, pero una gran fracción puede ser encontrada también en forma orgánica, los hongos arbusculares pueden secretar fosfatasas para ayudar a hidrolizar el fosfato de estos compuestos orgánicos (Joner *et al.*, 2000) y de esta manera incrementar la disponibilidad del P y la toma del mismo.

Los hongos arbusculares pueden estar involucrados en los procesos de descomposición y captura de los iones amonio y aminoácidos menos móviles (Read, 1991). Análisis experimentales indican que la captura y transporte del ion amonio a la planta puede ser incrementado por los hongos arbusculares (Mäder *et al.*, 2000), la ganancia de Nitrógeno en la planta es linealmente relacionada a la densidad hifal en la materia orgánica (Hodge *et al.*, 2001).

El hongo por su parte recibe carbono fijado fotosintéticamente por la planta hospedera (Douds *et al.*, 2000; Graham, 2000). El carbono es utilizado en el crecimiento del micelio externo e interno y en la respiración del hongo (Smith & Read, 1997). Jakobsen y Rosendahl (1990) calcularon que el hongo puede estar usando el 20% del CO₂ total fijado por la planta, lo que equivale a 7.4mg de C por día, las plantas que se emplearon en este ensayo tenían 26 días de edad y un 95% de colonización, así que es probable que los tejidos del hongo estuvieran vivos y activos lo cual explica el alto consumo de carbono.

1.1.7- Tolerancia a Arsénico en hongos micorrízicos

González Chávez, C. *et al.* (2002a), reportan el incremento de la resistencia a arsenato en *Holcus lanatus* conferido por hongos micorrízicos arbusculares. Señalan un

comportamiento ecológico de las especies *Glomus mosseae* y *Glomus caledonium* que fueron aisladas de *Holcus Lanatus* de suelos mineros contaminados con arsénico, contrastados con esporas aisladas de suelos no contaminados. Los hongos arbusculares aislados de suelos contaminados se comportaron como resistentes a arsenato en comparación con los aislados de suelos no contaminados.

H. lanatus adquiere resistencia a arsenato mediante la supresión constitutiva de la alta afinidad del transporte arsenato/fosfato, disminuyendo mediante este mecanismo la tasa de toma de arsenato. En este trabajo se concluye que los hongos arbusculares han adquirido resistencia a arsenato y han conferido un incremento en la resistencia a arsenato de *H. lanatus*.

Sharples, J., *et al.* (2000), analizaron el mecanismo de resistencia a arsenato exhibido por el hongo micorrízico ericoide *Hymenoscyphus ericae* aislado de suelos mineros contaminados con arsénico, para lo cual estudiaron la cinética de la toma de arsenato, arsenito y fosfato en *H. ericae* resistente y no resistente. La presencia de una mayor concentración de fosfato reprime la toma de arsenato mientras que la exposición a una mayor concentración de arsenato reprime la toma de fosfato en *H. ericae* resistente y no resistente. Los resultados de este estudio demuestran un incremento en el sistema de flujo de arsenito en *H. ericae* de suelos mineros contaminados con arsénico como un mecanismo de resistencia a arsenato. La importancia ecológica de este mecanismo de resistencia a arsenato es aún discutida.

Sánchez, G., *et al.* (2004) estudiaron la tolerancia adaptativa de hongos arbusculares al crecer en sustratos contaminados con As y Cu, analizaron la cinética de germinación, grosor de pared, contenido de quitina y capacidad de las esporas para secuestrar Cu, los resultados de este trabajo muestran que los hongos micorrízicos arbusculares que se

desarrollan durante ciclos continuos o discontinuos en sustrato contaminado con As y Cu presentan modificaciones fisiológicas y morfológicas en sus esporas y que la capacidad de germinación de las esporas, alteraciones de grosor de pared y contenido de quitina dependen de la concentración de los elementos, especie micorrízica y ciclo de cultivo.

1.1.7.1- Mecanismos de Tolerancia a Arsénico de HMA

La influencia de los HMA en la toma y resistencia de arsenato se relaciona a su funcionalidad en el incremento de la adquisición de fosfato por parte de la planta hospedera (Smith & Read, 1997). El fósforo es el material fertilizante que más influencia tiene en la toxicidad de arsénico. La toma del arsenato es afectada por el fosfato, ya que estos son químicamente similares y compiten por los mismos sitios en los suelos y en los sistemas de transporte en una amplia variedad de especies: angiospermas, musgos, líquenes, hongos y bacterias (Meharg & Macnair, 1990). Al ser la química del arsenato similar a la del fosfato, éste es transportado a través de la membrana plasmática como si fuese fosfato (Meharg & Macnair, 1992). El mecanismo de tolerancia conferido por los HMA a la planta se expresa mediante la supresión de la alta afinidad del transporte arsenato/fosfato dentro de las raíces disminuyendo los niveles de arsenato que ingresan a la planta, esto permite a la planta reducir el arsenato a arsenito para complejarlo con fitoquelatinas (PC). En las plantas no resistentes el ingreso de arsenato es tan alto que la planta no alcanza a detoxificarse mediante la reducción y complejación. (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001b). Los HMA pueden ser agentes causantes directos del decremento del transporte arsenato/fosfato mediante la liberación de señales moleculares, alterando el nivel del P en el hospedero

Se sugiere que la síntesis de quitina puede estar estrechamente relacionada con la tolerancia adquirida por los HMA (Roncero *et al.*, 2001). Las características constitutivas

de la pared de las esporas de HMA varían dependiendo de la especie que se trate, la pared de una espora al tener alto contenido de quitina tiene la posibilidad de secuestrar elementos a éste nivel celular, por ello el contenido de quitina puede participar en la supervivencia de las esporas de HMA al ayudar a inmovilizar el As, Cu y otros metales en la superficie de éstas, y de esta forma evitar el ingreso de contaminantes al interior de las mismas. La pared de las esporas de los HMA es químicamente compleja y característica de cada género, además puede diferir entre especies del mismo género y probablemente entre ecotipos de la misma especie. (Sánchez, *et al.*, 2004). En la Figura 1.17 se muestra un esquema del posible mecanismo de interacción quitina-arsénico.

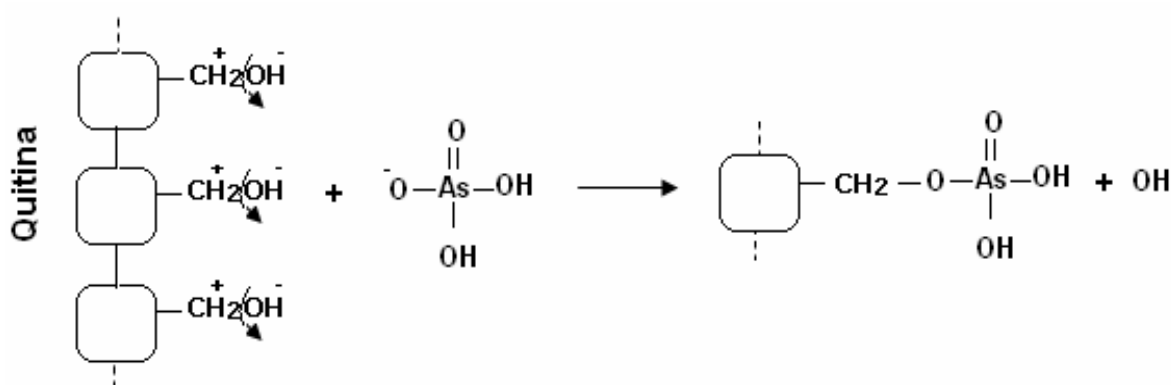


Figura 1.17: Los OH de los alcoholes primarios $\text{-CH}_2\text{OH}$ que forman parte de la estructura de la quitina son altamente reactivos, por ello se puede producir la liberación del grupo OH^- y dejar al CH_2^+ como un carbocatión, este carbocatión mediante atracción electrostática con el anión H_2AsO_4^- (especie predominante a pH inferiores a 6.9) forma un enlace, produciéndose la liberación del OH^- , que puede mantenerse como ion en el medio.

Los componentes de la pared celular de los hongos en general contienen aminoácidos libres, hidroxilos, carboxilos y otros grupos, los cuales pueden ser excelentes sitios de unión de iones Cu^{2+} en hongos y plantas. Las proteínas son unos de los principales

componentes celulares para enlazar elementos fuera de la pared celular debido a su bien establecida interacción con Cu^{2+} y otros metales (Ross, 1994)

1.1.8- Alternativas de empleo de la Asociación Micorrízica

La Simbiosis Micorrízica puede ser empleada en la recuperación de suelos contaminados con metales pesados, varios reportes mencionan que los hongos micorrízicos ayudan a las plantas a establecerse y crecer en condiciones de estrés, tales como: suelos salinos, suelos contaminados con metales pesados, plaguicidas e hidrocarburos (Leyval & Bidet, 1998; Cabello, 1999; Bidet *et al.*, 2000; González-Chávez, 2000a,b; 2004).

Algunos componentes microbianos importantes del suelo como: *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Frankia*, y hongos arbusculares disminuyen las limitaciones del crecimiento de las plantas en suelos contaminados con EPTs (Jasper, 1994). Akhilesh-Kuman *et al.* (1999) y González Chávez *et al.*, (2002b) mencionan que los hongos micorrízicos representan un complemento del sistema suelo- planta.

Los HMA pueden ser empleados en la revegetación de áreas degradadas, ya que el desarrollo de las plantas en éste tipo de medio ambientes puede ser fuertemente influenciado mediante la inoculación de hongos arbusculares. La mayoría de los inóculos pueden ser producidos en macetas de cultivo usando una mezcla de suelos, otras tecnologías han sido desarrolladas con el fin de disminuir costos e incrementar la pureza, entre estas tecnologías se tienen: cultivos aeropónicos e hidropónicos y la reciente producción a gran escala de micorrizas *in vitro* ya que esto podría incrementar el uso de inóculos certificados (Koide & Mosse, 2004).

Los HMA también pueden emplearse como un mecanismo de protección de la planta frente a patógenos, varias investigaciones se han realizado para estudiar la

interacción entre los hongos arbusculares y nematodos fitopatógenos, virus y hongos. Algunas de estas investigaciones han mostrado que los hongos arbusculares pueden inhibir hongos fitopatógenos (Baltruschat & Schönbeck, 1972; Chou & Schmitthenner, 1974; Dehne & Schoenbeck, 1979), no se conocen los mecanismos que están envueltos en la mayoría de estas interacciones, en algunos estudios la infección micorrízica incrementa la actividad de fitoalexinas (Morandi & Gianinazzi-Person, 1985), en otros casos esto no ocurre (Wyss *et al.*, 1991).

1.2- Arsénico

1.2.1- Arsénico

El arsénico está ampliamente distribuido en gran número de minerales, los principales minerales que contienen arsénico son arsenopirita (FeAsS), rejalgar (As₄S₄) y oropimente (As₂S₃) (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995). El arsénico es clasificado como un metaloide ya que tiene propiedades físicas y químicas de metales y de no metales, y puede experimentar un amplio rango de interacciones químicas (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995).

La U.S. Environmental Protection Agency ha reportado que el arsénico está entre las cinco sustancias más tóxicas que se encuentran en sitios contaminados (Johnson & Derosa, 1995).

En el medio ambiente a menudo se encuentra asociado con otros elementos (Au, Ag, Cu y Sn en particular), y se lo encuentra tanto en forma orgánica como inorgánica. Las formas inorgánicas arsenato (As V) y arsenito (As III) son las que predominan en aguas naturales y son las formas fitodisponibles de arsénico en solución en el suelo. El As(V) se presenta como H₃AsO₄ y sus correspondientes productos de disociación son: H₂AsO₄⁻,

HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-} , el As(III) en cambio se manifiesta como H_3AsO_3 y sus productos de disociación son: H_4AsO_3^+ , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-} . Tanto el As(V) como As(III) son móviles en el medio líquido, pero el As(III) es el estado más móvil y biotóxico (Yan *et al.*, 2000).

Algunos microorganismos pueden metilar y desmetilar las especies de arsénico en el suelo transformando el arsénico inorgánico a formas orgánicas y viceversa (Turpeinen *et al.*, 1999). Los invertebrados y mamíferos metabolizan el arsénico de su forma inorgánica a orgánica (Vahter, 2000).

El estado de oxidación del arsénico, y por tanto su movilidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox, Eh) y el pH. El arsénico es un elemento singular entre elementos formadores de oxianiones por su sensibilidad a movilizarse en los valores de pH típicos de las aguas subterráneas (pH 6,5-8,5). En condiciones oxidantes, el estado As(V) predomina sobre As(III), encontrándose fundamentalmente como H_2AsO_4^- a valores de pH bajos (inferiores a 6,9), a pH más alto la especie dominante es HAsO_4^{2-} (en condiciones de extrema acidez, la especie dominante será H_3AsO_4^0 , mientras que en condiciones de extrema basicidad, la especie dominante será AsO_4^{3-}). En condiciones reductoras a pH inferior a 9,2, predominará la especie neutra (Figuras: 1.18, 1.19) (Yan *et al.*, 2000)

El As es estable en condiciones reductoras (As III), en estas condiciones están presentes iones complejos de sulfuros y arsénico, el arsenito es la forma predominante, el arsénico elemental y la arsina también se encuentran en medios reductores. La forma oxidada, arsenato es la más abundante en la naturaleza y está fuertemente enlazada a los minerales del suelo, particularmente a los óxidos e hidróxidos metálicos coloidales, mediante enlaces iónicos (Wauchope, 1983).

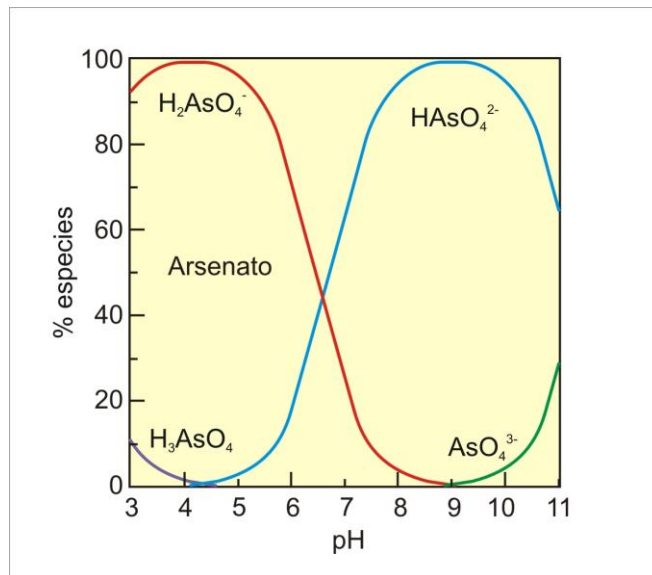


Figura 1.18: Especies de Arsénico (V) en función del pH

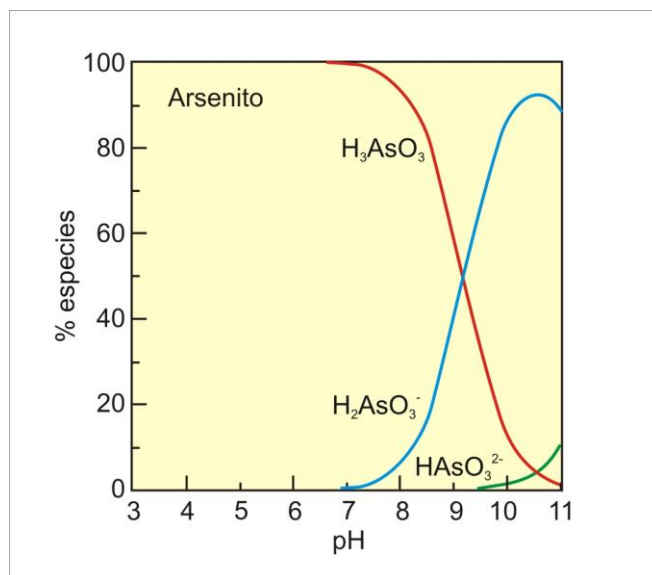


Figura 1.19: Especies de Arsénico (III) en función del pH

Los suelos sin contaminar contienen entre 1 y 20 mgAs/kg (Wauchope, 1983), mientras que los suelos que han sido tratados con As pueden contener más de 550 mgAs/kg (Walsh & Keeney, 1975).

Los suelos que se encuentran sobre depósitos de minerales sulfurados pueden contener varios cientos de mg/kg del elemento, las concentraciones varían entre 300 a 5000 ppm (Wild, 1974); la concentración máxima que ha sido estudiada es de 8000 mgAs/kg (Levander, 1977).

Una de las zonas donde se presenta con frecuencia altas concentraciones de As son las áreas de actividad geotérmica notable (Lancaster *et al.*, 1971; Reay, 1972; Fowler, 1977), y los suelos procedentes de roca madre de origen volcánico (Ferguson & Gavis, 1972).

La elevación de los niveles de arsénico en el suelo desencadena consecuencias considerables con respecto a la toma de arsénico por parte de la planta, su entrada a la vida silvestre y por ende a la cadena alimenticia humana. (Meharg & Hartley- Whitaker, 2002).

1.2.2- Metabolismo del Arsénico

El arsénico es metabolizado de forma inorgánica a orgánica por un amplio rango de organismos, con limitada evidencia de que esto ocurra en plantas (Nissen & Benson, 1982). En un rango de organismos, el metabolismo ocurre típicamente a través de la biometilación produciendo compuestos de arsénico metilados como son la di y trimetilarsina, estas especies tras una oxidación se transforman en los ácidos monometilarsínico (MMAA, $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$) y dimetilarsónico (DMAA, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$) que forman sales solubles con los metales alcalinos, estos ácidos pueden volver a su forma primitiva de arsenias mediante una reducción (Cullen & Reimer, 1989).

Los organismos marinos y las algas contienen altas concentraciones de arsénico orgánico en un rango de 1-100mg/kg, debido a procesos de biotransformación y acumulación, los compuestos tóxicos de arsénico son transformados a arsenobetaína, arsenocolina y otros compuestos orgánicos. El arsénico se encuentra en forma de arsenolípidos y especialmente de arsenofosfolípidos (Morita & Edmonds, 1992). Las algas juegan un papel importante en la producción de formas reducidas y metiladas de arsénico en el agua de mar, en las algas marinas se han identificado principalmente compuestos de arsenoazúcares (derivados de dimetilarsinoylribosides y trimetilarsinoylribosides) (Hirata, *et al.*, 2006). La arsenobetaína es la forma de arsénico orgánico más frecuentemente reportada en organismos marinos como: tiburones, langosta americana, peces, cangrejos, camarones, pepino de mar, y varias especies de moluscos. La trimetilarsina ha sido reportada en muy bajos niveles en algunas especies de crustáceos del fondo del mar. En peces y crustáceos la arsenobetaína es la especie dominante junto con trazas de ácido monometilarsínico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), y óxido de trimetilarsina (TMAO) (Morita & Edmonds, 1992).

En trucha arcoiris se han reportado valores de arsénico de 1mg/kg de músculo, siendo la arsenobetaína el principal compuesto encontrado en estos peces (Svobodova, *et al.*, 2002).

Compuestos como la arsenocolina, arsenobetaína y arsenoazúcares también han sido medidos en algunas plantas terrestres (Tamaki, Frankenberger, 1992; Geiszinger, 1998; Kuehnelt *et al.*, 2000), sin embargo aun no ha sido probado que estos compuestos sean metabolizados por las plantas o que simplemente sean tomados de la solución del suelo. Los factores que pueden influir en el tipo de especies de arsénico presentes en las plantas pueden ser: las especies de arsénico existentes en el suelo, la habilidad de los compuestos

para ingresar a las plantas, la habilidad de las plantas para sintetizar las especies de arsénico y la presencia de especies de arsénico adsorbidas en la superficie de las raíces de las plantas. La reducción de arsenato a arsenito ha sido demostrada en las plantas no así la metilación (Pickering *et al.*, 2000).

Es posible que las mismas plantas estén metilando el arsénico, alternativamente los microorganismos endófitos podrían transformar potencialmente las especies de arsénico. Uno de los primeros estudios sugiere que el tomate en situación de estrés de fósforo (P) puede metilar arsenato (Nissen & Benson, 1982).

Hartley-Whitaker *et al.*, (2001a, b) señalan que es posible que la habilidad de metabolizar arsénico inorgánico ocurra mediante la inducción de enzimas constitutivas. En las plantas se han estimulado una variedad de procesos enzimáticos como mecanismo de defensa contra la presencia de concentraciones potencialmente tóxicas de metales; por ejemplo la producción de fitoquelatinas, glutatión y superóxido dismutasa es estimulada como respuesta a la presencia de Cd y Hg, y el arsenato podría también inducir tales respuestas permitiendo a la planta destoxificarse bajando los niveles de arsenato.

Las enzimas involucradas en la metilación del arsénico son constituidas en las plantas, así que también están involucradas en procesos enzimáticos tales como la síntesis de poliamina y etileno (Kakkar *et al.*, 2000).

La presencia de un amplio rango de especies de arsénico en las plantas sugiere que el metabolismo del arsénico está vinculado a la resistencia que éstas han desarrollado (Meharg, 1994).

1.2.3- Arsénico en el suelo

El arsénico puede añadirse a los suelos en forma de compuestos inorgánicos: arsenito y arsenato, u orgánicos, las formas orgánicas como los derivados de los ácidos metanoarsónicos (ac. monometilarsínico) o del ácido cacodílico (ac. dimetilarsónico) empleados como herbicidas pueden oxidarse lentamente a arsenatos inorgánicos y dióxido de carbono en presencia o ausencia de microorganismos, también pueden volatilizarse y perderse de los suelos (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995).

La capacidad adsortiva del suelo y la disponibilidad del arsénico para las plantas depende de las características físico-químicas del mismo, la capacidad de adsorción depende de la textura, contenido de carbono orgánico, contenido de óxidos metálicos y presencia de otros elementos que interfieren en el proceso (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995).

La persistencia del arsénico está controlada por la capacidad de adsorción del suelo y por las pérdidas que se puedan producir tanto por lavado o lixiviación como por volatilización. La adsorción de arsénico depende del tiempo, en el caso de suelos de texturas gruesas o bajos niveles de arsénico en disolución, el tiempo de equilibrio se alcanza a tiempos inferiores, en suelos de textura fina hay menor cantidad de arsénico en la fracción disponible y esto implica que el contaminante sea menos fitotóxico en este tipo de suelos (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995).

La montmorillonita y la vermiculita son los compuestos arcillosos que presentan un mayor poder de adsorción ya que poseen grupos hidroxilos libres, es decir, superficiales y disponibles, como los óxidos de hierro y aluminio, por lo cual presentan capacidad de intercambio aniónico y el arsenato al igual que el fosfato es adsorbido por los grupos

superficiales presentes en las arcillas. La presencia de estos óxidos en los suelos se suele correlacionar positivamente con los compuestos arcillosos presentes y con la textura del suelo (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995).

En la interfase tiene lugar un fenómeno superficial que es la adsorción, en este las moléculas de sorbato se fijan sobre la superficie del sorbente empleando diversas fuerzas atractivas que fundamentalmente se deben a la asimetría de fuerzas que existen en toda la interfase. De acuerdo a la naturaleza de la fuerza, estas son:

- Fisiadsorción o mecanismo de adsorción no específico o físico: fuerzas moleculares de corto alcance, fuerzas de Van der Waals.
- Quimiadsorción o mecanismo de adsorción específico o químico: fuerzas de enlace covalente (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995).

Los suelos presentan una variedad de óxidos e hidróxidos, los óxidos e hidróxidos amorfos pueden presentar cargas positivas, como $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, que supone la adsorción de aniones. Mediante un mecanismo no específico la superficie de estos compuestos se carga debido a la adsorción o cesión de H^+ y OH^- , que son los iones determinantes del potencial. La carga es función del pH y del punto isoelectrico (pi) de cada óxido e hidróxido (punto isoelectrico es el punto de carga cero, en el que el valor del pH es tal que se adsorben igual número de protones que de hidroxilos), (Sakata, 1987).

El pH del suelo influye en la actividad del aluminio en arcillas y en óxidos e hidróxidos, pero es la cantidad de dichos coloides más que el efecto del pH sobre ellos el factor que gobierna su capacidad adsortiva. Los óxidos de hierro tienen carga superficial positiva en la mayoría de los ambientes geológicos y adsorben preferentemente aniones, al igual que el hidróxido de aluminio presente en las arcillas. Algunos minerales, que contienen óxidos de hierro logran una eficiencia de hasta 100 % en la remoción de arsénico,

pero esto depende del pH, el cual debe mantenerse entre 6.0 y 7.0 para evitar la solubilización del hierro. Las reacciones de adsorción y desorción entre arsenato y superficies en óxidos de hierro son particularmente importantes, ya que esa fase mineral es muy común como recubrimiento de otras fases sólidas, y porque el arsenato se adsorbe fuertemente sobre las superficies de los óxidos de hierro en condiciones ácidas o con pH próximos a los valores neutros, la desorción de arsenato de éstas superficies se dará a pH con valores alcalinos (Sakata, 1987).

Carbonell-Barrachina *et al.*, (1995) proponen el siguiente modelo de disociación anfótera (Figura 1.20):

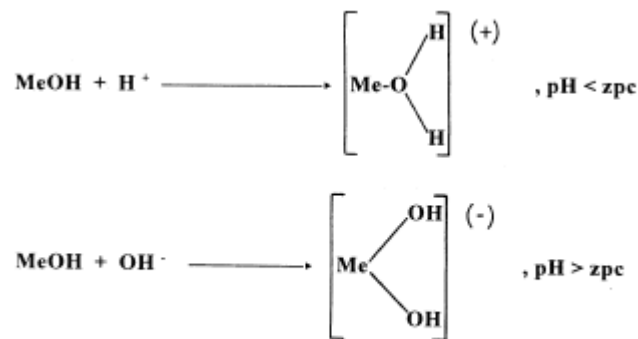


Figura 1.20: Modelo de disociación anfótera

Como consecuencia para compensar su exceso de carga, los óxidos e hidróxidos adsorben en su superficie cationes o aniones (según el pH del medio).

En el mecanismo específico los iones se unen por enlaces covalentes tanto superficialmente como dentro de la estructura de coordinación del metal, dando un compuesto de adsorción más estable.

La adsorción del ión arsenato de la disolución del suelo se considera que, tanto en un mecanismo como en otro, es función de las características del óxido y del pH del medio.

Para el mecanismo no específico lo que ocurre es una simple retención superficial:
 $\text{Me-OH} + \text{An}^- \rightarrow \text{Me-An} + \text{OH}^-$

El arsenato adsorbido por el mecanismo no específico, puede reaccionar a su vez con otros grupos OH^- coordinados al mismo metal y/o a otro próximo. Para el caso de un hidróxido de Hierro esta reacción se esquematiza en la Figura 1.21 (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995).

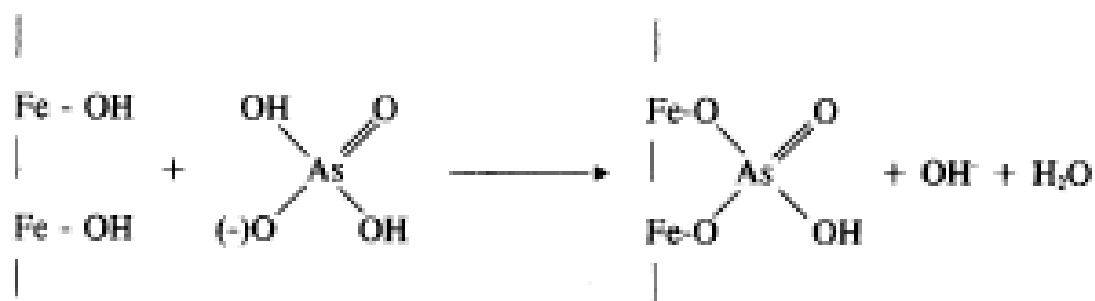


Figura 1.21: Interacción entre hidróxidos de Hierro y arsenato

Para el mecanismo específico Carbonell-Barrachina *et al.* (1995) proponen las siguientes posibilidades Figura 1.22 y Figura 1.23:

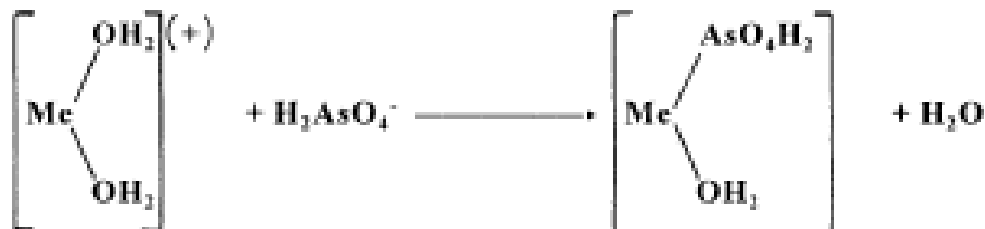


Figura 1.22: Modelo a $\text{pH} < \text{zpc}$ y si la acidez es suficiente

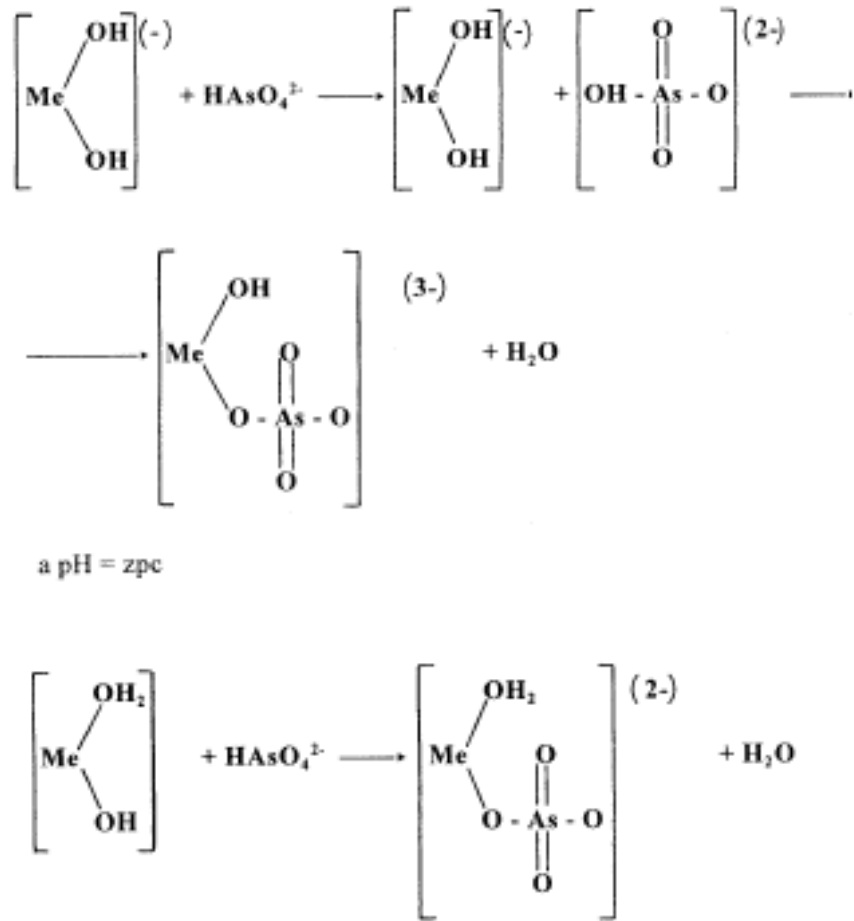


Figura 1.23: Modelo a $\text{pH} > \text{zpc}$ y si la basicidad es suficiente en la disolución y predomina el HAsO_4^{2-} sobre el H_2AsO_4^-

El mecanismo específico de adsorción, supone una protonación del hidroxilo y por tanto, se da en condiciones de pH bajo; este proceso es extremadamente dependiente del pH, por lo que es el mecanismo más frecuente en suelos ácidos ricos en óxidos e hidróxidos de Fe y Al.

1.2.4- Toxicidad del Arsénico

La toxicidad del arsénico depende de la forma en la que se encuentre, la forma inorgánica es más tóxica que la orgánica (Tamaki & Frankenberger, 1992). El arsénico es tóxico para un amplio rango de organismos incluyendo a las plantas.

El estado redox y el pH del suelo influyen fuertemente en la especiación del arsénico y en su solubilidad (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2000). Además los parámetros del suelo influyen en la toxicidad de las especies del arsénico ya que alteran su disponibilidad (solubilidad y movilidad).

1.2.4.1- Humanos

El arsénico es clasificado como un carcinógeno humano, el mecanismo exacto de la toxicidad del arsénico no es bien entendido pero la exposición crónica a éste lleva a problemas agudos de salud (IARC, 1987).

El arsénico no tiene una función probada en el metabolismo humano, por lo que la ingestión continua de éste aun en bajas concentraciones durante largos períodos de tiempo, puede llevar a que se manifiesten sus efectos toxicológicos, produciéndose cambios fisiológicos y desórdenes estructurales. En el hombre los síntomas de envenenamiento por arsénico pueden ser agudos o crónicos, éstos producen alteraciones en el sistema respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular y nervioso. Los efectos pueden ser muy variables, reversibles, pueden desarrollar un cáncer y en caso agudo producir la muerte (Carbonell-Barrachina, 1995).

Entre los efectos nocivos no carcinogénicos de este metaloide los más comunes asociados a su ingestión son los que se presentan en piel: hiperpigmentación, hipopigmentación, hiperqueratosis plantar o aparición de estrías blancas características a

nivel de las uñas (bandas de Mees), daños al sistema cardiovascular, alteraciones renales y hepáticas, desarrollo de neuropatías periféricas y encefalopatías, y su capacidad de disruptor endocrino relacionado con el desarrollo de diabetes (Vega, 2002).

La inhalación de As inorgánico es asociado con cáncer de pulmón, estudios epidemiológicos indican la asociación entre la ingestión de arsénico inorgánico y el desarrollo de carcinomas de la piel. Se ha reconocido la relación entre la presencia de arsénico en el agua de varias regiones y el aumento en la presencia y mortandad por cánceres de vejiga, pulmón, riñón y cáncer hepático en la población potencialmente expuesta (Vega, 2002). La ingestión, a largo plazo, de agua de bebida rica en mineral arsénico (del orden de ppm) puede inducir cáncer de piel, principalmente en países de América del Sur, ricos en terrenos arseníferos (Argentina, Chile, México) así como en Taiwán (Carbonell-Barrachina, 1995).

En la exposición a dosis elevadas de compuestos de arsénico inorgánico (por ejemplo, trióxido de arsénico) por inhalación e ingestión, dependiendo de la dosis, se pueden presentar diversos síntomas, y, si ésta es excesiva, puede resultar fatal. Se han observado síntomas de conjuntivitis, bronquitis y disnea, seguidos por molestias gastrointestinales y vómitos, y posteriormente, síntomas cardíacos y shock irreversible, con un curso temporal de horas. En un caso fatal, se describieron niveles de arsénico en sangre superiores a 3 mg/L. En la exposición a dosis subletales de compuestos de arsénico irritantes en el aire (trioxido de arsénico) debido a la acción caústica de los arsenicales se producen síntomas relacionados con lesiones cutáneas y mucosas. En estos casos, se observa una irritación grave de la mucosa nasal (pudiéndose llegar a producir una perforación), la laringe y los bronquios, además de conjuntivitis y dermatitis (Aragonés *et al.*, 2001; OIT, 2001).

En la ingestión accidental de arsenicales inorgánicos, fundamentalmente de trióxido de arsénico, la intoxicación se caracteriza por profundas lesiones gastrointestinales, que originan vómitos y diarrea graves, que pueden producir shock y la subsiguiente oliguria y albuminuria. Otros síntomas agudos son: el edema facial, calambres musculares y alteraciones cardíacas. Los síntomas pueden aparecer unos minutos después de la exposición al tóxico en solución, pero pueden retrasarse varias horas si el compuesto de arsénico se encuentra en estado sólido o si se ha ingerido con una comida. Cuando se ingiere en forma de partículas, la toxicidad depende también de la solubilidad y del tamaño de las partículas del compuesto ingerido. La dosis letal de trióxido de arsénico ingerido oscila entre 70 y 180 mg. La muerte puede sobrevenir en un plazo de 24 horas, aunque el curso habitual es de 3 a 7 días. La intoxicación aguda con compuestos de arsénico suele ir acompañada de anemia y leucopenia, especialmente granulocitopenia. En los supervivientes, dichos efectos revierten generalmente en 2 ó 3 semanas. También se observa hepatomegalia reversible, pero las pruebas de función hepática y las enzimas hepáticas suelen ser normales. En las personas que sobreviven a una intoxicación aguda, es frecuente que aparezcan alteraciones neurológicas periféricas algunas semanas después de la ingestión (OIT, 2001).

También se puede producir una posible afección hepática que evoluciona eventualmente hacia una cirrosis, así como una afectación de la circulación periférica denominada *blackfoot disease* porque está caracterizada por una gangrena de las extremidades y en especial del pie (Carbonell-Barrachina, 1995).

El arsénico se distribuye por todo el organismo: hígado, riñones, bazo, piel, músculos, tejido óseo, tejido nervioso, útero, etc. La toxicidad varía según el compuesto,

dependiendo de su valencia y solubilidad en los medios biológicos. Los compuestos trivalentes solubles son los más tóxicos (OIT, 2001).

Tanto el As (III) como el As (V) tienen efectos perjudiciales en el metabolismo de los organismos vivientes, pero el As (III) es más tóxico que el As (V) (Lett *et al.*, 2001). El arsénico mineral ingerido es metilado transformándose en ácido monometilarsínico y dimetilarsínico que se excretan en la orina. La metilación progresiva del arsénico mineral es un mecanismo de detoxificación ya que el ácido dimetilarsínico es 25 veces menos tóxico que el As (III). Pero si se ingieren grandes cantidades de arsénico mineral, las posibilidades de metilación disminuyen por lo cual existe mayor riesgo de toxicidad (Carbonell-Barrachina, 1995).

El arsenato se excreta rápidamente en la orina y aparentemente no se acumula en los tejidos, pero el arsenito se acumula, ya que se une a las proteínas tisulares en el hígado, músculos, pelo, uñas y piel y, sobre todo, en los leucocitos, produciendo alteraciones en varios sistemas enzimáticos, éste se excreta posteriormente a través de la bilis (Carbonell-Barrachina, 1995).

Los compuestos organoarsenicales, monometilarsínico, dimetilarsínico y la arsenobetaína, no son retenidos por el organismo y se excretan tal como son ingeridos. (Carbonell-Barrachina, 1995).

El arsénico es asociado con efectos genotóxicos, fetotóxicos, mutagénicos y teratogénicos. No parece afectar directamente al DNA pero puede inhibir algunos mecanismos de reparación del mismo (Irwin & National Park Service, 1997).

Se ha encontrado que varias concentraciones de As inhiben críticamente el sistema enzimático, incluyendo la respiración mitocondrial y reparación de DNA, induciendo una

variedad de estrés a los genes reparadores y a genes promotores de la amplificación, generando así un daño citogenético (Snow *et al.*, 1999).

Con relación al gas arsina y arsinas sustituidas, se han descrito un gran número de casos de intoxicación aguda con un alto índice de mortalidad. La arsina es uno de los agentes hemolíticos más potentes en la industria, su actividad hemolítica se debe a su capacidad para reducir drásticamente el contenido de glutatión de los eritrocitos. La inhalación de 250 ppm de gas arsina es letal instantáneamente, la exposición a 25 a 50 ppm durante 30 minutos es letal y a 10 ppm puede ser letal si la exposición es más prolongada. En los signos y síntomas inicialmente, se produce una hemoglobinuria indolora, trastornos gastrointestinales, como náuseas, y posiblemente vómitos. También pueden presentarse cólicos y dolor abdominal. A continuación, se observa ictericia, acompañada por anuria y oliguria. Pueden existir indicios de depresión de la médula ósea. Tras una exposición aguda e intensa, se puede desarrollar neuropatía periférica, que puede persistir durante varios meses después de la intoxicación (OIT, 2001).

Las arsinas sustituidas no producen hemólisis como efecto principal, pero son potentes irritantes locales y pulmonares y venenos sistémicos. El efecto local sobre la piel produce ampollas circunscritas en el caso de la dicloro(2-clorovinil-)arsina (lewisita). Los vapores producen tos espasmódica con esputos densos o con sangre, que progresa como edema pulmonar agudo. El dimercaprol (BAL) es un antídoto eficaz si se administra en las primeras etapas de la intoxicación (OIT, 2001).

El Consejo Nacional de Investigación de los EUA indica que la dosis de exposición mínima de arsénico a la cual se observan efectos no carcinogénicos es de 0.010 mg/kg/día, se desconoce si a la concentración actual del límite permisible de arsénico, dosis de

exposición de 0.001mg/kg/día, se provoca un aumento en la incidencia de efectos carcinogénicos o no carcinogénicos. (Vega, 2002)

La Dosis de Referencia (RDF) propuesta por la EPA (La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) es de 0,3 µg/kg/día As inorgánico, asumiendo que el consumo de dosis iguales o menores a esa cantidad durante toda la vida, es poco probable que cause un riesgo significativo para la salud en humanos en lo referente a los efectos no carcinogénicos (Cortes *et al.*, 2004).

1.2.4.2- Arsénico en Plantas

Estudios de toxicidad del arsenato, que es la forma dominante de arsénico fitodisponible en suelos aerobios, han demostrado que especies de plantas no resistentes a arsénico sufren considerable estrés por exposición, con síntomas como inhibición de crecimiento radical y hasta la muerte (Macnair & Cumbes, 1987; Meharg & Macnair, 1991; Paliouris & Hutchinson, 1991; Barrachina, *et al.*, 1995), existe evidencia significativa de que la exposición a formas inorgánicas de arsénico lleva a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001a). Esto probablemente ocurre durante la conversión de arsenato a arsenito, un proceso que luego de ocurrir en las plantas lleva a la síntesis de antioxidantes enzimáticos tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión-S-transferasa, y antioxidantes no enzimáticos como glutatión y ascorbato (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001a). El glutatión además de ser un antioxidante es también el precursor de las fitoquelatinas (PCs), las cuales son sintetizadas por la exposición a arsénico inorgánico. La síntesis de fitoquelatinas puede llevar a la reducción del glutatión, reduciendo la cantidad de antioxidante disponible para reprimir a las ROS (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001b). En el interior de las plantas puede ocurrir una

destoxificación bioquímica del arsénico, en la cual el arsenato sería metilado dentro de las células, y éstas reacciones pueden producir ROS ocasionando un estrés oxidativo (Zaman & Pardini, 1996).

El arsenato actúa como un análogo del fosfato y es transportado a través de la membrana plasmática vía sistema cotransporte de fosfato, interfiere con la fosforilación oxidativa e impide la síntesis de ATP. (Ullrich-Eberius *et al.*, 1989). Una vez en el citoplasma, éste compite con el fosfato, por ejemplo reemplazando al fosfato en el ATP para formar ADP-As inestable y ocasionando la interrupción del flujo de energía en las células (Meharg, 1994). El arsenato inhibe la absorción foliar de otros elementos químicos, y tiene un profundo efecto en los sistemas enzimáticos (Wauchope, 1983). Bertolero *et al.* (1987) señalan que como el arsenato es rápidamente reducido a arsenito en los tejidos de las plantas, éste normalmente no puede estar en concentraciones lo suficientemente altas en el citoplasma para ejercer toxicidad.

El arsenito es altamente tóxico, destruye todos los tejidos con los que entra en contacto debido a como éste reacciona con los grupos sulfhidrilos (-SH) de las enzimas y proteínas de tejidos, causa degradación de membranas, inhibición de funciones celulares como disrupción de las funciones de la raíz, muerte celular y rápida necrosis si el contacto es foliar (Ullrich-Eberius *et al.*, 1989; Wauchope, 1983).

Las plantas emplean la producción de fitoquelatinas como una estrategia general para la destoxificación, la fitoquelatinas son péptidos pequeños que quelan metales (Grill *et al.*, 1985), éstas han demostrado poder destoxificar arsénico (Hartley-Whitaker, *et al.*, 2001).

Para los arsenicales orgánicos no se conoce muy bien el mecanismo de fitotoxicidad, Wauchope (1983) ha sugerido que afectan al contenido de aminoácidos, a la respiración y a la síntesis de clorofila, pero ninguna de estas hipótesis ha sido demostrada.

CAPÍTULO II. MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.1- Materiales y Métodos

2.1.1- Ubicación geográfica

El área de estudio a la cual se orientó esta investigación fue La Laguna de Papallacta, esta zona pertenece a la clasificación bioclimática Muy Húmedo Sub-temperado, se extiende de los 3000-4000 msnm, presenta un clima frío y húmedo con más de 1500mm de lluvia al año, la temperatura media es de 6,6 °C, en la estación de Papallacta la mayor cantidad de lluvias se registran en los meses de julio y agosto (Cañadas, 1983).

2.1.2- Especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Se estudiaron cuatro especies micorrízicas: *Glomus mosseae* BEG 132 proveniente de suelos contaminados con As y Cu, *Glomus mosseae* BEG 25 y *Glomus claroideum* DNM 1 originarios de suelos no contaminados. Estas especies fueron aisladas en México y enviadas con fines de investigación por el Dept. Microbiología Ambiental del Colegio de Posgraduados, México (González-Chávez *et al.*, 2002). *Pacispora* sp., aislada del suelo de la Laguna de Papallacta e identificada en este trabajo.

2.1.3- Métodos

2.1.3.1- Muestreo de Suelo

Las colectas del presente trabajo fueron realizadas en Noviembre de 2005 (época seca) y Marzo de 2006 (época lluviosa), se muestreó el borde de la laguna, sector Sur Oeste, donde la vegetación predominantes son gramíneas. Los restantes sectores aledaños a

la Laguna presentaron escasa cubierta vegetal y fueron de difícil acceso por su formación rocosa.

Se retiró la capa superficial de la cubierta vegetal del suelo que estaba constituida por gramíneas de 1 a 3 cm de altura en época seca y de 10 a 15cm de altura en época lluviosa. Se tomaron de forma aleatoria cuatro muestras de raíces y suelo a 20 cm de profundidad; los muestreos se realizaron de 3 a 5 metros de distancia del borde de la Laguna y la distancia entre muestras fue de aproximadamente 10 metros. Las muestras se colocaron en fundas y macetas para su transporte hasta el laboratorio y posterior análisis.

2.1.3.2- Extracción de esporas y cuantificación

Para la extracción de componentes micorrízicos del suelo se siguió la Técnica de Tamizado Húmedo y Decantación propuesta por Gerdemann y Nicolson (1963) y modificada por Herrera *et al.* (2003). Las muestras de suelo fueron secadas a temperatura ambiente y pasadas por un tamiz de 2mm, del suelo tamizado se tomaron 50g que se sometieron a decantación y pasado a través de tamices de 140 μ m y 40 μ m de apertura de poro. El primer tamizado (140 μ m) fue licuado a 6500 rpm (velocidad 4) durante 30 segundos. El licuado se pasó nuevamente a través de los tamices, se tomó el contenido del segundo tamiz (40 μ m) y fue licuado a 10000 rpm (velocidad 8) durante 60 segundos, se lo pasó una vez más a través del mismo tamiz y se lavo completamente. Los tamizados fueron colectados sobre papel filtro, se retiró el exceso de agua con una bomba de vacío y se pusieron a secar a temperatura ambiente para obtener un peso constante.

Los tamizados secos fueron pasados a través de un tamiz de 500 μ m, obteniéndose tres fracciones: A) 500 μ m - 2mm, B) 140 μ m - 500 μ m, C) 40 μ m -140 μ m. De las fracciones B y C se tomó el 10% y 5% de su peso respectivamente y se colocaron en tubos con una

solución de sacarosa 2M para su centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue extraído para su análisis y conteo de poblaciones bajo el estereomicroscopio de 28X de aumento. Las esporas fueron agrupadas por morfotipos y colocadas en cultivos monospóricos y cultivos trampa.

2.1.3.3- Establecimiento de cultivos monospóricos y cultivos trampa.

a. Acidificación de sustrato

El sustrato (arena de río) se colocó en recipientes plásticos, se realizaron tres lavados sucesivos con agua y se midió el pH. A continuación, se preparó HCl 0,25% y se añadió al sustrato hasta cubrirlo, se dejó en reposo por una hora y se realizaron enjuagues hasta obtener un pH entre 5-6, recomendado para trabajar con HMA.

b. Esterilización de sustrato

Se colocó el sustrato acidificado en fundas de tela y se esterilizo en el autoclave a 15 psi, 121°C por 3 horas, se realizaron 3 ciclos de esterilizado de 1 hora cada uno. Posterior a la esterilización se dejó reposar y secar el sustrato a temperatura ambiente, bajo condiciones de laboratorio.

c. Cultivo trampa

En una maceta se colocaron 600 g de sustrato estéril, sobre esta capa 200g de suelo de muestra y una tercera capa con 200g de sustrato estéril. Se plantaron 30 semillas de cebolla (*Allium cepa*, híbrido Burgunay red) como planta trampa en cada maceta; las macetas se regaron tres veces por semana y se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 h, durante 3 meses, para su posterior estudio y formación de cultivo monospórico.

d. Cultivo monospórico

Se estudiaron los cultivos trampa establecidos siguiendo la Técnica de Tamizado Húmedo y Decantación propuesta por Gerdemann y Nicolson (1963) descrita anteriormente. Se formaron grupos de esporas en base a observación de sus características morfológicas, y se seleccionaron las morfoespecies que se encontraban en mayor número en las muestra para el establecimiento de cultivo monospórico.

Se pusieron a germinar semillas de Ray grass (*Lolium perenne*) una semana antes de realizar los cultivos.

Para el establecimiento del cultivo monospórico se colocó arena estéril en cajas Petri plásticas, sobre el sustrato se colocó la raíz de una plántula de Ray grass dejando la parte aérea fuera de la caja, con la ayuda de una pinza o una micropipeta se colocó una espora en la raíz de la planta, se cubrió la raíz con sustrato, se humedeció y se selló. Se mantuvo el cultivo monospórico por 2 meses para que las esporas germinen y colonicen. Posteriormente éste fue pasado a cultivos trampa siguiendo la metodología ya descrita anteriormente.

2.1.3.4- Identificación de especies

La caracterización de las poblaciones presentes se realizó tomando en cuanto sus características morfológicas, se tomaron como referencia ceparios internacionales e información taxonómica de Mukerji, K.G., *et al.* (2002) y Morton, *et al.* (2005), en el cual se describen diferentes aspectos que se deben tener en cuenta para la identificación tales como: características de la Hifa, Células auxiliares, Hifa de sustentación, esporas, germinación de esporas, esporocarpos.

Para el proceso de identificación de la especie aislada de Papallacta, las esporas aisladas de los cultivos trampa se montaron en placas, se colocaron 2 esporas por placa, a la una se le adiciono una gota de agua y a la otra una gota de Melzer's Reagent como medio de montaje (INVAM, 2006), se observaron las placas en el microscopio óptico en el lente 100x y se tomaron fotografías.

Para el análisis de las imágenes obtenidas se contó con la ayuda de especialistas en taxonomía de HMA, Dr. Ricardo Herrera del IES (Instituto de Ecología y Sistemática de Cuba). Para la confirmación de la especie se contó con la ayuda de Fritz Oehl del Instituto de Botánica de la Universidad de Basel en Suiza, ya que es coautor del único trabajo que se ha reportado en el 2004 de la identificación del nuevo género denominado *Pacispora* para los Glomeromycetes.

La especie aislada del suelo de la Laguna de Papallacta se la identificó como *Pacispora* sp.

2.1.3.5- Germinación de esporas de hongos arbusculares

Después del ciclo de propagación en cultivos trampa, las esporas fueron separadas por el método de Gerdeman y Nicolson (1963). Para evaluar el porcentaje de germinación se empleó el método de Filtro abierto de Brundett y Saito (1995), para lo cual se colocaron 25 esporas de cada uno de los HMA a evaluar en membranas Millipore (0,45µm, 25mm diámetro), se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento, las membranas se colocaron en cajas Petri que contenían 80g de sustrato estéril, el sustrato se humedeció con 20ml de una solución de arsenato (NaH_2AsO_4). Las soluciones correspondieron a las siguientes concentraciones: $c_0 = 0 \text{ mgAs/L}$, $c_1 = 25 \text{ mgAs/L}$, $c_2 = 5398 \text{ mgAs/L}$, $c_3 = 17412 \text{ mgAs/L}$. Las cajas se sellaron e incubaron en la oscuridad a 22°C. La germinación se cuantificó cada dos días con la ayuda de un estereomicroscopio, durante un mes. Para facilitar la observación se adicionó azul de tripano (0.01%), en algunos casos.

2.1.3.6- Determinación de Arsénico en suelo, sustrato y esporas

2.1.3.6.1- Espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros

La espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros (H-AAS), se basa, en la transformación de los compuestos minerales del arsénico, obtenidos tras la correspondiente mineralización, en su hidruro covalente o arsina (H_3As), por medio del hidrógeno nascente (Derache, 1990).

En el proceso las disoluciones acuosas problema se acidifican y se tratan con un agente reductor para obtener el correspondiente hidruro covalente volátil, éste compuesto es arrastrado por un gas inerte (argón o nitrógeno), desde el frasco reactor al interior de los diferentes sistemas de atomización, donde el hidruro se descompone en átomos metálicos gaseosos, que pueden ser cuantificados mediante el empleo de AAS. (Carbonell-Barrachina, 1995).

- **Método de reducción**

El sistema reductor que se emplea es el tetrahidrobórato (III) sódico-ácido, la concentración recomendada de este compuesto por la marca de aparatos analíticos Perkin Elmer es del 3 % de ($NaBH_4$) en 1 % de NaOH. (Carbonell-Barrachina, 1995).

- **Métodos de atomización**

Los métodos de atomización pueden ser: la llama aire-acetileno, la llama gas inerte-hidrógeno-aire forzado, los tubos de cuarzo, tubos de grafito, entre otros. (Carbonell-Barrachina, 1995).

- **Concentración de ácido**

Se pueden emplear tanto ácido clorhídrico como sulfúrico para la reducción del arsénico (V), usualmente se emplea el primero. La recomendación establecida por Perkin

Elmer en su manual de Condiciones estándar para la determinación de arsénico, indica que el disolvente a utilizar debe ser una disolución de HCl 1.5 %.(Carbonell-Barrachina, 1995).

- **Puesta en disolución de la muestra**

Los procedimientos utilizados para la puesta en disolución de la muestra son: mineralización por vía seca, mineralización por vía húmeda y ataques ácidos a presión. La única diferencia la establece la volatilidad del elemento (As), que puede conllevar pérdidas importantes.

En la mineralización por vía seca se utilizan como agentes de incineración el nitrato magnésico, $Mg(NO_3)_2$ y el óxido magnésico MgO, o mezclas de ambos.

En la mineralización por vía húmeda, la mezcla más utilizada es la formada por ácido nítrico-ácido perclórico-ácido sulfúrico.

En los ataques ácidos a presión se emplean hornos microondas, ya que economiza gran cantidad de tiempo y evita pérdidas debidas a la volatilización del elemento.

Las mezclas más empleadas son: ácido nítrico-agua oxigenada o ácido nítrico-agua oxigenada-ácido perclórico. (Carbonell-Barrachina, 1995).

2.1.3.6.2- Determinación de Arsénico en muestras de suelo

El análisis de la concentración de arsénico de las muestras de suelo de la Laguna de Papallacta se lo realizó en la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica (CEEA) – Unidad de Química Analítica. El informe entregado por la CEEA se adjunta en el Anexo 1.

2.1.3.6.3- Determinación de Arsénico en esporas de HMA

Se colocaron 200 esporas en un tubo de ensayo, se secaron por 24 horas a 60°C para obtener un peso constante, se tomó el peso seco de las esporas y se adicionó 3 ml de Ácido

Nítrico concentrado, se dejó reposar toda la noche (Predigestión). Posteriormente se digirieron a 35 °C por 8 horas, en baño María. Esta metodología es una modificación de la propuesta por Bradford *et al.* (1975); utilizada en el trabajo realizado por Sánchez *et al.*(2004) para la evaluación de la tolerancia de HMA a Arsénico y Cobre. El producto de la digestión se analizó en un espectrofotómetro de Absorción Atómica mediante la técnica de Generación de Hidruros.

2.1.3.6.4- Determinación de Arsénico retenido en el sustrato

Se utilizó la técnica de Romero *et al* (2003) modificada. Se secó el sustrato por una semana a temperatura ambiente, se pesó un gramo y se lo colocó en un Erlenmeyer de 125ml, se adicionó 50ml HCl 6N para un primer ciclo de digestión de 48 horas con constante agitación, se realizaron dos ciclos de digestión de 48h.

El producto de la digestión se analizó en un espectrofotómetro de Absorción Atómica mediante la técnica de Generación de Hidruros.

2.2- Análisis Estadístico

2.2.1- Variables analizadas

Las variables que se analizaron en este estudio fueron porcentaje de germinación y contenido de arsénico en esporas de las cuatro especies evaluadas a los 34 días de iniciado el ensayo. Adicionalmente al inicio del ensayo se determinó la población de HMA y contenido de arsénico de la muestra de suelo de la Laguna de Papallacta.

2.2.2- Diseño Experimental

Se empleó un arreglo factorial AxB en un diseño completamente al azar DCA con dieciséis tratamientos y tres repeticiones. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y posteriormente la prueba de Tukey al 5%.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1- Análisis y discusión de resultados

3.1.1- Contenido de As en suelo de la Laguna de Papallacta, sector suroeste

La concentración de arsénico que se reportó en la muestra de suelo fue de 3815 mgAs/kg suelo seco, lo cual es un indicador de un problema de contaminación por As en el suelo que rodea la Laguna de Papallacta, ya que el valor límite de As de acuerdo al criterio de calidad de suelo de áreas no desarrolladas o libre de la influencia de actividades industriales o urbanas generalizadas, establecido por la normativa ambiental ecuatoriana es de 5mgAs/kg suelo (TULAS, 2003).

El valor de concentración de As en suelo se tomó como referencia para establecer las concentraciones evaluadas en este estudio.

El alto valor de As en el suelo aledaño a la laguna de Papallacta, podría deberse a la influencia de las aguas termales con altas concentraciones de arsénico que llegan al río Tambo y que son las principales contribuyentes, que en invierno remueven y redistribuyen el contenido arsenical en los sedimentos.

Tomando en cuenta que este suelo presenta una baja cantidad de mineral tipo arcilloso, 1,5 – 2,9% de vermiculita (De la Torre *et al.*, 2004), una de las arcillas con mayor capacidad de adsorción de arsenato. La capacidad de adsorción del suelo puede que se deba a la presencia de hidróxidos de Hierro y Aluminio cargados positivamente que pueden adsorber aniones.

3.1.2- Población de HMA en suelo de la Laguna de Papallacta, sector suroeste

Se estimó la población de HMA presentes en época seca (noviembre) y época lluviosa (marzo), se encontró un mayor número de esporas en época lluviosa, en cuanto a las morfoespecies encontradas no hubo diferencia entre las épocas. Los datos de número de esporas se presentan en la Tabla 3.1. El análisis detallado de población de HMA se muestra en el Anexo 2.

Tabla 3.1: Población de hongos micorrízicos en muestras de suelo de la Laguna de Papallacta (Condiciones Naturales- Noviembre 2005 y Marzo 2006), Reserva Cayambe – Coca, Ecuador.

Mes / Muestreo	Nº esporas/100g suelo seco
Noviembre	1455
Marzo	3195

Sin embargo de que el número de esporas de HMA es aún discutido como indicador del comportamiento del hongo, ya que su esporulación puede ser gobernada por un sinnúmero de factores bióticos y abióticos, en este estudio, se observó una diferencia global de las poblaciones de HMA presentes por estacionalidad. La presencia de un mayor número de esporas en época lluviosa, puede haberse producido como una respuesta del hongo ante condiciones de estrés. Cabe anotar, que este comportamiento no influyó en la diversidad de morfoespecies presentes, y por tanto en la especie aislada para este estudio.

3.1.3- Identificación de la especie de HMA aislada de suelo de la laguna de Papallacta

De los cultivos monospóricos que se realizaron a partir de esporas aisladas de cultivos trampa de suelo originario de la Laguna de Papallacta, se obtuvo un cultivo puro

que aportó el suficiente material para el ensayo. La especie de este cultivo se identificó como *Pacispora* sp., la cual se encuentra dentro del género descrito recientemente para los Glomeromycetes. Son apenas siete las especies reportadas dentro de este género y solo una se ha reportado en Sudamérica, en Bolivia.

3.1.4- Germinación de esporas de HMA evaluados

Se encontró significación estadística del 1% entre tratamientos. La concentración de As en el sustrato tuvo una significación de 5% y de especies del 1%, por lo que la germinación de esporas fue influenciada por los dos factores concentración y especie. Al considerar el factorial Concentración por Especie resultó no ser significativo. El análisis de varianza se muestra en la Tabla 3.2. (Detalle del análisis estadístico en Anexo 4).

Para los factores significativos especie y concentración se realizó la prueba de Tukey al 5% que efectúa una comparación de medias.

Tabla 3.2: Análisis de Variancia del Estudio de Concentración de As y Especies de HMA en un diseño completamente al Azar.

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F calculado
Total	47	12983.66667		
Tratamientos	15	11853.00000	790.20000	22.36 ^{**}
Concentración (C)	3	531.66667	177.22222	5.02 [*]
Especie (E)	3	11091.66667	3697.22222	104.64 ^{**}
CxE	9	229.66667	25.51852	0.72 ^{ns}
Error experimental	32	1130.66667	35.33333	

*= significativo

** = altamente significativo

ns = no significativo

Factor Especie

Los resultados de la prueba para especies son presentados en la Tabla 3.3 (Detalle de la prueba de Tukey en Anexo 5), los que sugieren diferencias en la tolerancia a As entre especies, ya que al aplicar la prueba se obtuvieron dos rangos de significación basados en la existencia de diferencias en el porcentaje de germinación entre especies. Las especies *Glomus mosseae* BEG 25, *Glomus mosseae* BEG 132 y *Pacispora* sp. se ubicaron dentro del grupo (a), lo cual indica que son las especies que mejor responden a las diferentes concentraciones de As, ya que presentan un mayor porcentaje de germinación. Mientras que *Glomus claroideum* DNM 1 se encuentra en el grupo (b), ya que es la especie cuyo porcentaje de germinación se ve significativamente afectado por la exposición a las diferentes concentraciones de As. Las tres especies del grupo (a) se las podría considerar como tolerantes a As, ya que germinan por igual bajo altas concentraciones de este elemento, expresándose la tolerancia como menor tiempo necesario para germinar y mayor número de esporas germinadas.

En todos los tratamientos los porcentajes de germinación disminuyeron conforme se incrementaba la concentración de As en el sustrato. De las cuatro especies *Glomus claroideum* DNM 1 presentó los porcentajes de germinación más bajos en todas las concentraciones evaluadas. El tiempo de inicio de germinación fue similar para las cuatro especies, en todos los tratamientos se observó un inicio de la germinación a los diez días de establecido el ensayo.

Tabla 3.3: Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para especies de HMA

Promedio	Especie	Rango de significancia
93.333	<i>Glomus mosseae</i> BEG 132	a
91.667	<i>Glomus mosseae</i> BEG 25	a
90.000	<i>Pacispora</i> sp.	a
56.667	<i>Glomus claroideum</i>	b

Los resultados de germinación de esporas señalan que las especies *Glomus mosseae* BEG 25, *Glomus mosseae* BEG 132 y *Pacispora* sp., se presentan como tolerantes a As bajo las concentraciones evaluadas. (Figura 3.1, Figura 3.2, Figura 3.3, Figura 3.4, Figura 3.5 y Figura 3.6).

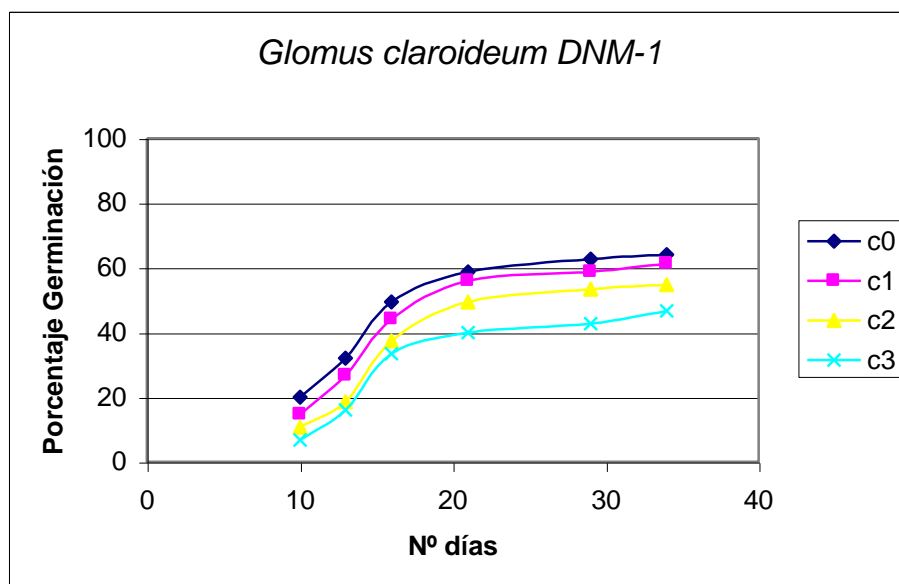


Figura 3.1: Cinética de germinación de esporas de *Glomus claroideum* DNM 1 durante 34 días expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3 = 17412 mgAs/L

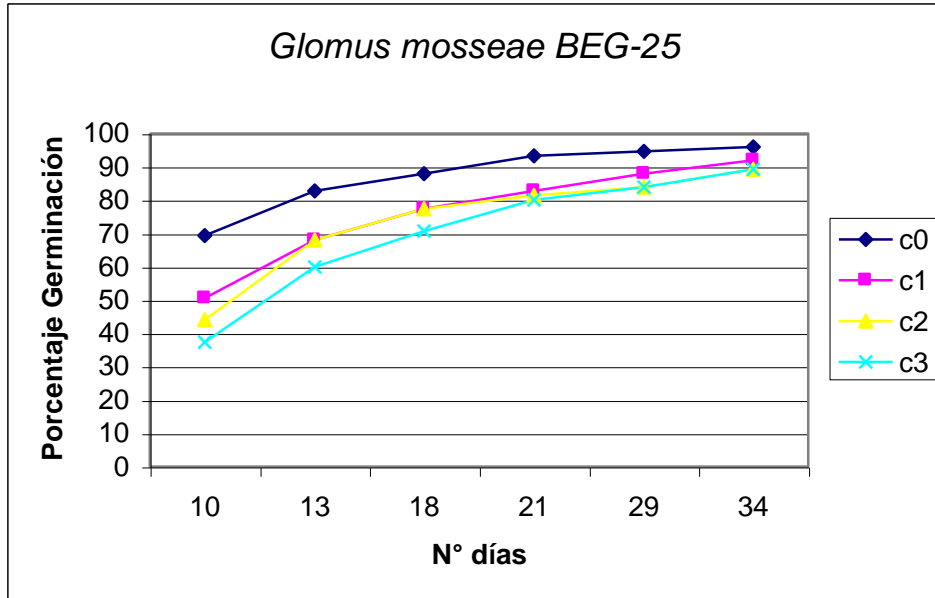


Figura 3.2: Cinética de germinación de esporas de *Glomus mosseae* BEG 25 durante 34 días expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3 = 17412 mgAs/L

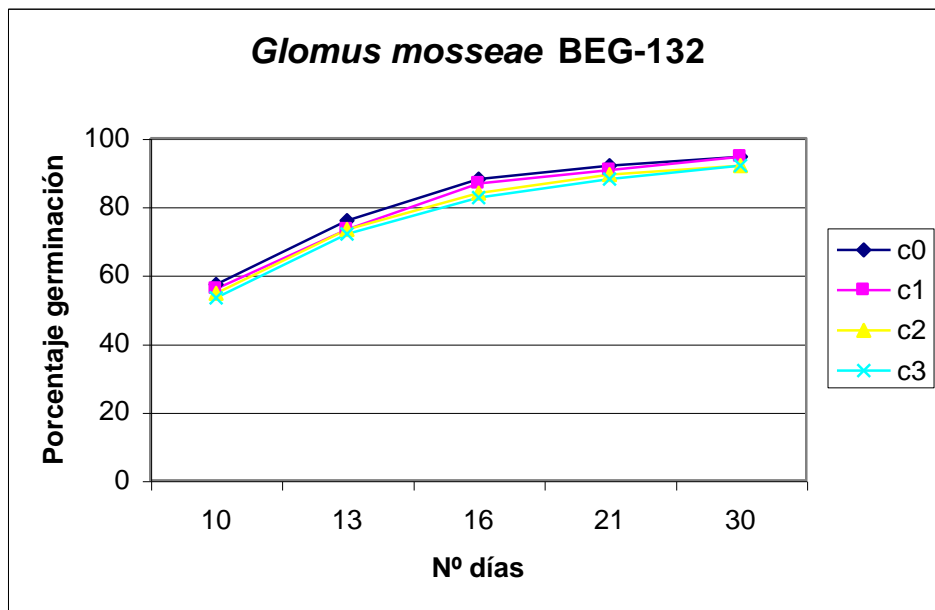


Figura 3.3: Cinética de germinación de esporas de *Glomus mosseae* BEG 132 durante 34 días expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3 = 17412 mgAs/L

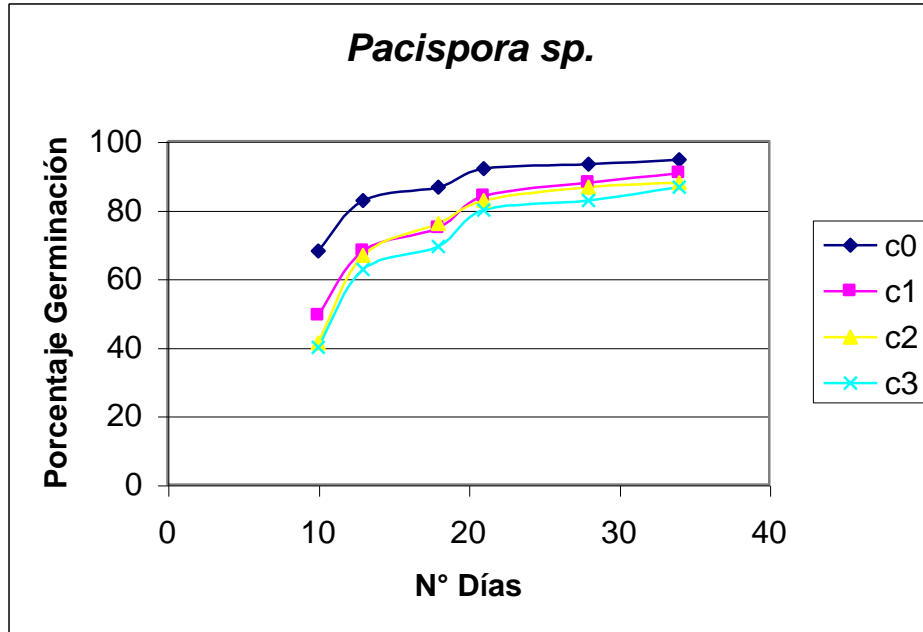


Figura 3.4: Cinética de germinación de esporas de *Pacispora* sp. durante 34 días expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3 = 17412 mgAs/L

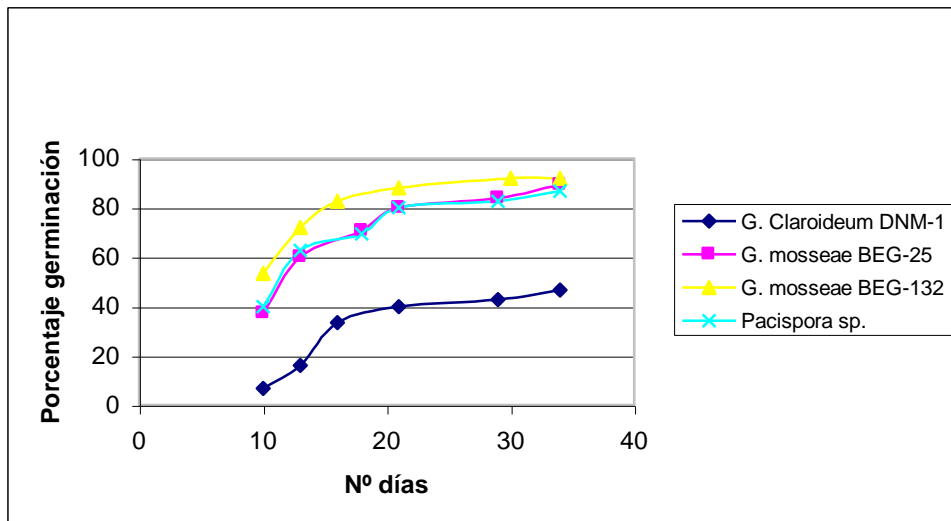


Figura 3.5: Respuesta de germinación de esporas de *Glomus claroideum* DNM 1, *Glomus mosseae* BEG 25, *Glomus mosseae* BEG 132 y *Pacispora* sp. expuestas a la más alta concentración de Arsénico(c3) evaluada en este estudio

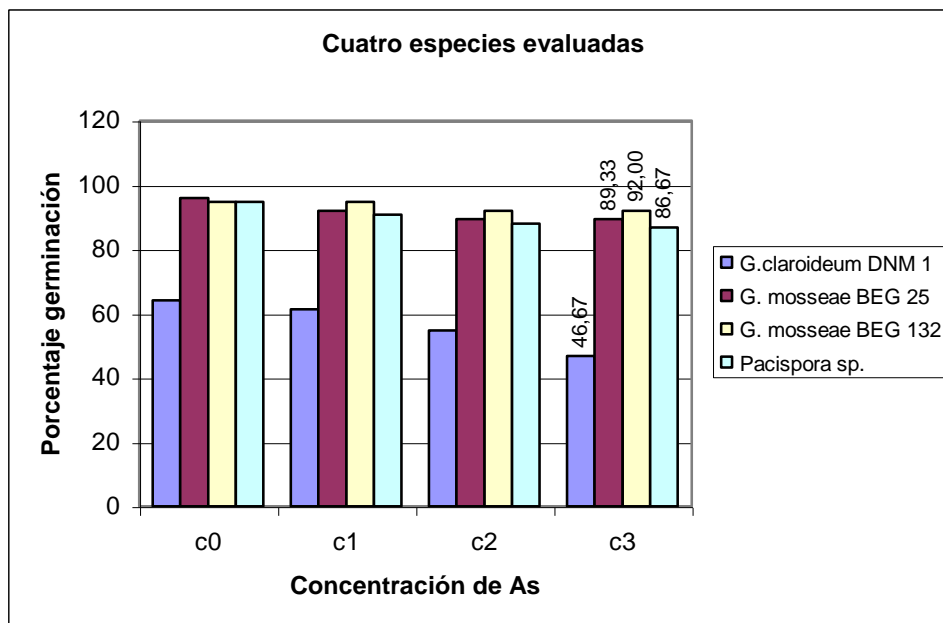


Figura 3.6: Porcentaje de germinación final (34 días) en las cuatro especies expuestas a diferentes concentraciones de As: c0 = 0 mgAs/L, c1 = 25 mgAs/L, c2 = 5398 mgAs/L, c3 = 17412 mgAs/L

Estos resultados demuestran que existen diferencias entre las especies de HMA evaluadas. El menor porcentaje de germinación de *Glomus claroideum* DNM 1 podría deberse a su origen, ya que es una especie aislada de suelo no contaminado, y a su morfología, ya que las esporas de esta especie presentaron una pared mas delgada y mas propensa a romperse que las de *Glomus mosseae*. Sin embargo, *Glomus mosseae* BEG 25 que también proviene de suelo no contaminado respondió mejor que *Glomus claroideum* DNM 1 al contaminante, lo cual podría deberse a una característica de especie, ya que la pared de la espora es más gruesa y no se rompe con facilidad. El mayor grosor de la pared, podría estar relacionado a un mayor contenido de quitina, mayor número de grupos funcionales y mayor retención de arsénico a nivel de pared de espora, disminuyendo la entrada de los iones tóxicos, proveyendo de esta manera a la espora mayor protección ante condiciones de contaminación.

Las esporas de *Glomus mosseae* BEG 132 y *Pacispora* sp., presentaron una mayor capacidad de germinación en las diferentes concentraciones de As que las de *Glomus claroideum* DNM 1, lo cual podría relacionarse con su procedencia ya que las dos especies fueron aisladas de suelos contaminados con As.

Estas variaciones de respuesta entre especies, concuerdan con trabajos que muestran diferencias en la susceptibilidad entre ecotipos de HMA aislados de suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos (EPT) y ecotipos de ambientes no contaminados (Weissenhorn *et al.*, 1994; DeVal *et al.*, 1999). Hepper & Smith, (1976) señalan que en HMA derivados de hábitats bajos en metales, la germinación de esporas es altamente sensible, mientras que los ecotipos de ambientes ricos en metales tienen altos niveles de tolerancia. Se ha reportado un efecto de selección a EPT en los hongos arbusculares, que tiene importancia a nivel presimbiótico (germinación de esporas), ya que esta puede ocurrir en ausencia de un hospedero, es por ello importante la selección de especies de HMA a este nivel, ya que la capacidad de germinación dependerá exclusivamente de la tolerancia del hongo y no de la tolerancia de la especie hospedera (Weissenhorn *et al.*, 1994; DeVal *et al.*, 1999). En este contexto, Reguar y Vogel (2000), propusieron la existencia de una selección natural en los ecotipos de HMA, que conduce a una variación genotípica para tolerar altas concentraciones de EPT en el suelo.

Leyval *et al.*, (1997) señala que los aislados de HMA difieren en su efecto en la toma de metales por parte de la planta, y que la selección de aislados apropiados es muy importante para establecer una estrategia de fitorremediación.

La tolerancia de las especies de HMA puede estar relacionada con la composición química de su pared, que generalmente está constituida por Quitina-Quitosano, los componentes de la pared celular pueden contener aminoácidos libres, hidroxilos, carboxilos

y otros grupos. La quitina y los $\beta(1-3)$ glucanos son los principales componentes de la pared en las especies de *Glomus* (Smith & Read, 1997). Sin embargo, la constitución varía entre las diferentes especies (Gonzalez & Raisman, 2004), factor que podría influir en la adaptación de la especie en condiciones de contaminación.

Sánchez *et al.* (2004) señalan que la quitina, puede participar en el secuestro de As y Cu, en la superficie de las esporas, previniendo así el ingreso del contaminante al interior de las mismas, sin embargo no se especifica los grupos funcionales que podrían estar involucrados en el secuestro de As o Cu. La captura a nivel superficial podría ser el mecanismo mediante el cual la espora tolera altas condiciones de contaminación por As.

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 3.7.

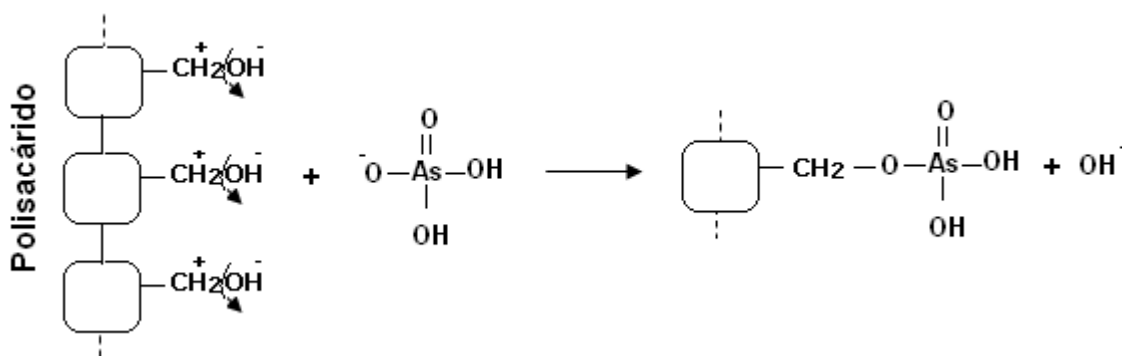


Figura 3.7: Esquema de mecanismo de captura de Arsénico

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 3.8.

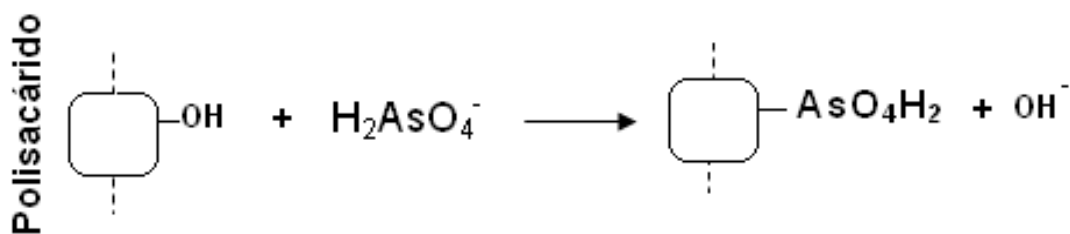


Figura 3.8: Esquema de mecanismo de retención de arsenato en la superficie de los polisacáridos

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 3.9, y para el quitosano en la Figura 3.10.

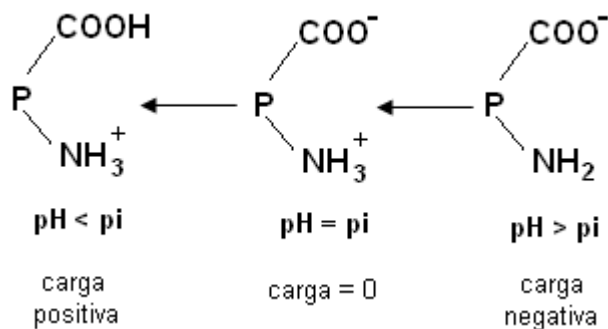


Figura 3.9: Variaciones de carga en la cadena peptídica para las Glicoproteínas

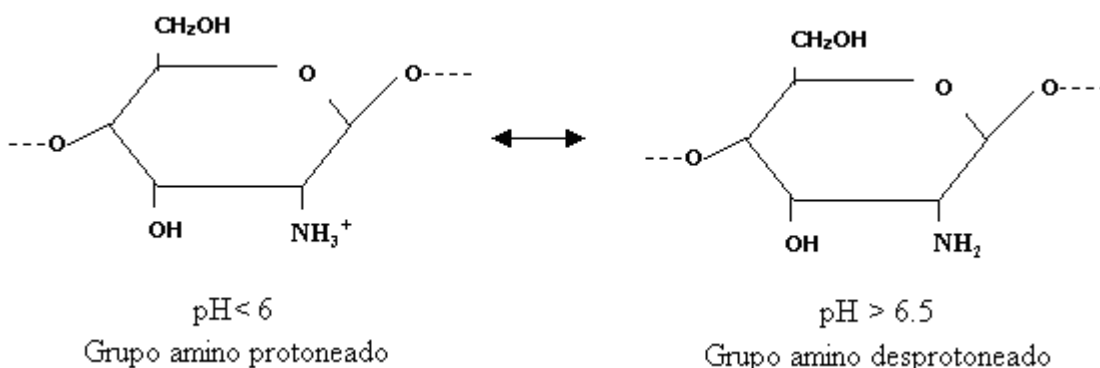


Figura 3.10: Variaciones de carga para el Quitosano

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 3.11.

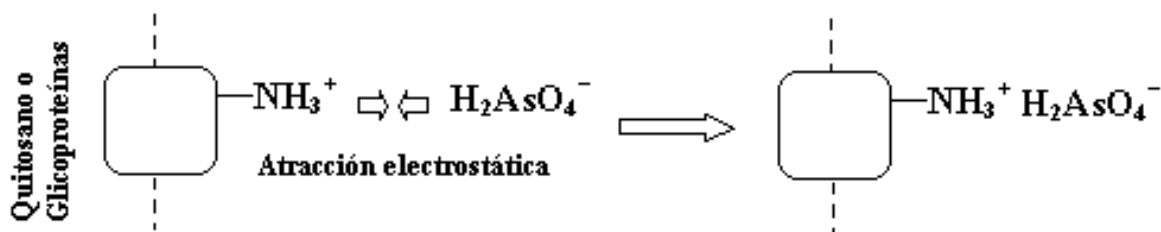


Figura 3.11: Esquema de interacción electrostática entre el grupo amino y el ion arsenato

Los posibles mecanismos de captura de arsenato por parte de los componentes de la pared celular, que se proponen 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^- .

Factor Concentración

Al aplicar la prueba de Tukey (Tabla 3.4) para las concentraciones de arsénico evaluadas se obtuvieron dos rangos de significación: las concentraciones c_0 , c_1 y c_2 se ubicaron dentro del grupo (a); c_1 , c_2 y c_3 dentro del grupo (b), lo cual indica que c_0 es la concentración que menos afecta a la germinación de las esporas, entre c_1 y c_2 no hay diferencias es decir las dos afectan en el mismo grado, y c_3 es la concentración que más afecta a la germinación de las esporas de las cuatro especies. (Detalle de la prueba de Tukey en Anexo 6).

Tabla 3.4: Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para concentraciones

Promedio	Concentración(mgAs/L)	Rango de significancia
87.333	$c_0=0$	a
84.667	$c_1=25$	a b
81.000	$c_2=5398$	a b
78.667	$c_3=17412$	b

Adicionalmente, al colocar las soluciones de las diferentes concentraciones evaluadas sobre el sustrato (arena de río estéril), se determinó la concentración de arsénico retenida en el sustrato y la disponible en solución. Estos valores se resumen en la Tabla 3.5. En base a estos datos y dos concentraciones adicionales, se condujo un ensayo para determinar la isoterma de adsorción de arsénico, que se muestra en la Figura 3.11 (los datos de la isoterma se muestran en el Anexo 7). La isoterma de adsorción es una curva que representa la cantidad del sorbato adsorbida frente a su concentración en la fase líquida en condiciones de equilibrio. Para determinar el modelo al que se ajustan los datos del laboratorio, se seleccionó el modelo de Langmuir:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{b \cdot q_{max}} + \frac{1}{q_{max}} C_e$$

Donde q_e es la cantidad de sorbato (As) retenida por parte del sorbente (arena de río) (mg/g), q_{max} (mg/g) es la capacidad máxima de adsorción del sorbente. C_e (mg/L) es la concentración final de equilibrio del sorbato en la disolución. El término b está relacionado con la energía de adsorción y refleja la afinidad entre el sorbente y el sorbato.

Representando C_e/q_e respecto a C_e se encuentra el valor de $1/(b \cdot q_{max})$ como ordenada en el origen y $1/q_{max}$ como valor de la pendiente de la recta.

La capacidad máxima de adsorción del sustrato q_{max} es 10.53 mg/g y la afinidad entre el sorbente y sorbato b es 5.42E-05L/mg. Al comparar el valor de q_{max} del sustrato con los valores de q_{max} de materiales como: alumina e hidróxidos de hierro amorfos, el valor obtenido se encuentra dentro del rango de q_{max} de la alumina, que es 15.90 y 9.93 (mg/g) a pH 5.2 y 7.2, respectivamente (Tsair-Fuh & Jun-Kun, 2001). Según los autores del

estudio se indica que la adsorción corresponde a una cinética lenta. Mientras que para los hidróxidos de hierro amorfos, que presentan una capacidad de adsorción extremadamente alta, los valores de q_{max} son 82.46 y 63.716 (mg/g) para pH 5 y 6 respectivamente (Pierce & Moore, 1981), estos valores de q_{max} son considerablemente mayores que el valor de q_{max} encontrado para el sustrato analizado. Por lo que se puede indicar que el sustrato tiene mayor fracción de compuestos de aluminio.

Tabla 3.5: Concentraciones de Arsénico evaluadas

	Concentración de As (mg/L)	As retenido en sustrato seco (mg/kg)	As en fase líquida de sustrato (mg/kg)
c0	0	0	0
c1	25	4.4	1.7
c2	5398	914	301.5
c3	17412	2663	1603

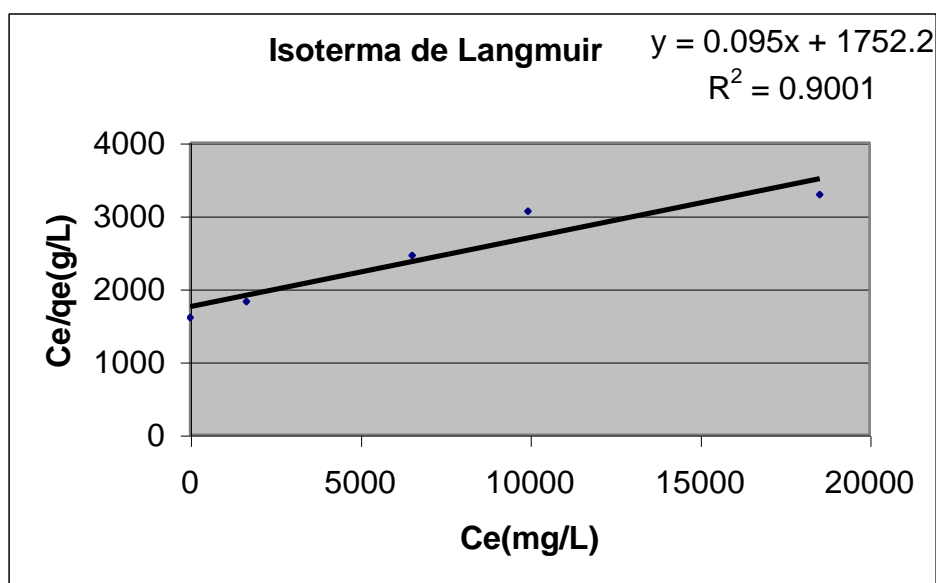


Figura 3.11: Isoterma de adsorción de arsenato en sustrato (arena de río estéril)

3.1.5- Concentración de Arsénico en esporas de HMA evaluados

Se encontró significación estadística del 1% entre tratamientos, lo cual indica que hay diferencias entre tratamientos y por ende en la capacidad de retención de arsénico entre especies. Esto se puede apreciar en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Análisis de Variancia del Estudio de la Concentración de As retenida en las esporas de las cuatro especies en un diseño completamente al Azar

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F calculado
Total	47	6180011.7		
Tratamientos	15	6142072.86	409471.524	345.37**
Error experimental	32	37938.8393	1185.58873	

** = altamente significativo

El contenido de arsénico en las esporas de las cuatro especies se incrementó significativamente conforme aumentó la concentración de As a la que fueron expuestas. Se encontró un mayor contenido de As en las esporas expuestas a la concentración 3, obteniéndose concentraciones de 802,8; 1246,806; 612,813; 422,258 (μg de arsénico/ g seco de espora) para *Glomus claroideum* DNM 1, *Glomus mosseae* BEG 25, *Glomus mosseae* BEG 132 y *Pacispora* sp. respectivamente (Tabla 3.7). Las especies *G. mosseae* BEG 25 y *G. claroideum* DNM 1, presentaron los valores más alto de contenido de arsénico, pero *G. claroideum* DNM 1 fue la más afectada en cuanto a porcentaje de germinación a la concentración 3 de As. En cambio *G. mosseae* BEG 132 y *Pacispora* sp., que presentaron valores menores de contenido de As en esporas, respondieron mejor que *G. claroideum* DNM 1 al ser expuestas a germinación bajo la concentración 3 de As.

Estos resultados corroboran lo expuesto por Sánchez *et al.* (2004), que las esporas son estructuras fúngicas que también participan en la estabilización de los contaminantes, en este caso del As en el suelo. Corroboran también, que la retención del As por la espora representa una cantidad de este elemento que no va a estar disponible para la planta y por ende representa menos riesgo de toxicidad para la misma.

Tabla 3.7: Concentración de Arsénico retenido en esporas de las cuatro especies evaluadas bajo cuatro concentraciones de As

Tratamiento	C($\mu\text{gAs/g}$ espora)
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1 - c0	0,000
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1 – c1	4,473
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1 – c2	196,468
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1 – c3	802,800
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25 - c0	0,000
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25 – c1	4,422
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25 – c2	526,757
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25 – c3	1246,806
<i>Glomus mosseae</i> BEG 132 - c0	0,000
<i>Glomus mosseae</i> BEG 132 – c1	4,995
<i>Glomus mosseae</i> BEG 132 – c2	407,500
<i>Glomus mosseae</i> BEG 132 – c3	612,813
<i>Pacispora</i> sp. - c0	0,000
<i>Pacispora</i> sp. – c1	4,894
<i>Pacispora</i> sp. – c2	371,774
<i>Pacispora</i> sp. – c3	422,258

El coeficiente de correlación (r) general entre las variables porcentaje de germinación y contenido de arsénico en esporas es de -0,11668984, lo cual sugiere que las dos variables no se afectan entre si, es decir que un mayor contenido de arsénico en las esporas no se relaciona con un menor porcentaje de germinación, por lo que las dos variables no tienen casi ninguna covariación lineal. Tabla 3.8.

Tabla 3.8: Correlación entre Porcentaje de germinación y Arsénico retenido en esporas de las cuatro especies evaluadas

Tratamiento	Porcentaje de germinación	µg As/g espora
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1 - c0	64	0
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1 – c1	61,33	4,473
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1 – c2	54,67	196,468
<i>Glomus claroideum</i> DNM 1 – c3	46,67	802,8
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25 - c0	96	0
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25 – c1	92	4,422
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25 – c2	89,33	526,757
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25 – c3	89,33	1246,806
<i>Glomus mosseae</i> BEG 132 - c0	94,67	0
<i>Glomus mosseae</i> BEG 132 – c1	94,67	4,995
<i>Glomus mosseae</i> BEG 132 – c2	92	407,5
<i>Glomus mosseae</i> BEG 132 – c3	92	612,813
<i>Pacispora</i> sp. – c0	94,67	0
<i>Pacispora</i> sp. – c1	90,67	4,894
<i>Pacispora</i> sp. – c2	88	371,774
<i>Pacispora</i> sp. – c3	86,67	422,258
Coefficiente de correlación (r)		-0,11668984

En base a estos resultados se sugiere que las esporas son una de las estructuras de los HMA que participan en el secuestro de As, por lo cual se podría considerar a estos hongos dentro de las alternativas de bioestabilización en las prácticas de recuperación de suelos contaminados.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

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.

RECOMENDACIONES

- El uso de HMA en la remediación de suelos es realista, se basa en diferentes estudios* que demuestran que la inoculación de las plantas es importante porque al ser transplantadas al sitio contaminado tienen mayor oportunidad de supervivencia que plantas no inoculadas. Estos hongos tienen un papel ecológico importante en la modificación de EPTs en el suelo y en la tolerancia de las plantas**.
- Tomando como referencia estos resultados que sugieren que las esporas de los HMA participan en el secuestro de As, lo cual puede relacionarse con la

* Dehn & Schuepp, 1989; Lamber & Cole, 1980

** González-Chávez et al., 2000

disminución de la biodisponibilidad y estabilización del contaminante en el suelo, se podría emplear a las especies seleccionadas como tolerantes en futuros estudios para analizar su simbiosis con las plantas y establecer su capacidad de auxiliarlas en condiciones de alta contaminación.

- Enfocar investigaciones futuras en torno a la especie encontrada e identificada en este trabajo que fue *Pacispora* sp., ya que se encuentra dentro del género más recientemente descrito para los Glomeromycetes, en el que hasta la fecha se ha reportado solo una especie a nivel de Sudamérica en Bolivia por lo cual sería de gran interés estudiar e investigar las características morfológicas y moleculares de esta especie para poder reportarla como una especie de Ecuador.
- Durante el ensayo de germinación de esporas es recomendable verificar la humedad de las cajas en cada revisión para evitar que las membranas y las esporas se sequen, y para mantener la humedad se puede añadir agua destilada estéril al sustrato.
- En el proceso de extracción de esporas es considerable la cantidad de trabajo y tiempo invertido para la obtención del material fúngico para el ensayo, por ello es aconsejable considerar el desarrollo de una metodología de extracción de esporas que facilite su obtención para futuras investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abedin, J., Cresser, M., Meharg, A.A, Feldmann, J., Cotter-Howells, J. (2002). Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Technology*.
2. Aragonés, N., Palacios, M., Avello de Miguel, A., Gómez, P., Martínez, M., Rodríguez, M. (2001). Nivel de Arsénico en Abastecimientos de Agua de Consumo de Origen Subterráneo en La Comunidad de Madrid. *Revista Española Salud Pública*, 75, 421-432.
3. Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., Piché (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 139, 375-388.
4. Baltruschat, H. & Schöenbeck, F. (1972). The influence of endotrophic mycorrhiza on the infestation of tobacco by *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathol Z*, 84, 171-188.
5. Barrachina, A.C., Carbonell, F.B., Beneyto, J.M. (1995). Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants – effect of arsenite on plant growth and yield. *Journal of Plant Nutrition*, 18, 1237-1250.
6. Benny, G.L. (1995). Classical morphology in zygomycete taxonomy. *Canadian Journal of Botany*, 73, S725-S730.
7. Berg, M., Tran, H.C., Nguyen, T.C., Pham, H.V., Schertenleib, R., Giger, W. (2001). Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: a human health threat. *Environmental Science and Technology*, 35, 2621-2626.
8. Bertolero, F., Pozzi, G., Sabbioni, E., Saffiotti, U. (1987). Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis*, 8, 803-808.
9. Binet, Ph., Portal, J.M., Leyval, C. (2000). Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil*, 227, 207-213.
10. Braunberger, P.G., Abbott, L.K, Robson, A.D. (1994). The effect of rain in the dry season on the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the growing season of annual clover-based pastures. *New Phytologist*, 127, 107-114.
11. 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.

12. Brundrett, M. (1999). Arbuscular Mycorrhizas. *CSIRO Forestry and Forest Products*.
13. Cabello, M.N. (1999). Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from hydrocarbons polluted soils. *J. Basic Microbiol*, 2, 89-95.
14. Cañadas, L.(1983). El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador. MAG-PRONAREG. Quito-Ecuador.
15. Carbonell-Barrachina, A.A., Burló-Carbonell, F. M., Mataix Beneyto, J. J. (1995). Arsénico en el Sistema Suelo-Planta: Significado ambiental. In: Espagrac (ed.). España, 1-139.
16. Carbonell-Barrachina, A.A., Jugsujinda, A. Burlo, F., De Laune, R.D., Patrick, W.H. (2000). Arsenic chemistry in municipal sewage sludge as affected by redox potential and pH. *Water Research*, 34, 216-224.
17. Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73, 203-266.
18. Chou, L.G. & Schmitthenner, A.F. (1974). Effect of *Rhizobium japonicum* and *Endogone mosseae* on soybean root rot caused by *Pythium ultimum* and *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Dis Rep*, 58, 221-225.
19. Christen, K. (2001). The arsenic threat worsens. *Environmental Science and Technology*, 35, 286A-291A.
20. Cortes, S., Pino, P., Atalah, E., Silva, C., Jará, M., (2004). Exposición a Arsénico Ambiental en Niños de Antofagasta, II Región, Chile. *Arsénico y sus consecuencias en la Salud y Ambiente*, 85, 1-14.
21. Crecelius, E.A., Johnson, C.J., Hofer, G.C. (1974). Contamination of soils near a copper smelter by arsenic, antimony and lead. *Water Air Soil Pollut.*, 3, 337-42.
22. Cullen, W.R & Reimer, K.J. (1989). Arsenic speciation in the environment. *Chemical Review*, 89, 713-764.
23. De la Torre, E., Guevara, A., Muñoz, G., Criollo, E., (2004). Estudio de aguas superficiales y sedimentos de la cuenca de los ríos Sucus, Tambo y Papallacta. Departamento de Metalurgia Extractiva. Escuela Politécnica Nacional – Quito, Ecuador
24. Dehn, B. & Schuepp, H. (1989). Influence of VA mycorrhizae on the uptake and distribution of heavy metals in plants. *Agric. Ecosyt. Environ.*, 29, 79-83.

25. Dehne, H.W. & Schoenbeck, F. (1979). The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. 1. Colonization of tomato plants by *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici*. *Phytopathol Z*, 95, 105-110.
26. Derache, R. (1990). Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega. Barcelona.
27. DeVal, C., Barea, J.M. 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.
28. Dodd, J.C., Dougall, T.A., Clapp, J.P., Jeffries, P. (2002). The role and species richness of AMF in plant community establishment at the Eurotunnel site of special scientific interest, Samphire Hoe, Kent, UK. *Biodiversity Conserv*, 11, 39-58.
29. Douds, D.D., Pfeffer, P.E., Shachar-Hill, Y. (2000) Application of in vitro methods to study carbon uptake and transport by AM fungi. *Plant Soil*, 226, 255-261
30. Duchicela E.J. & Gonzáles-Chávez, M.C. (2003). *La micorriza arbuscular en el contexto de la agricultura sustentable* (Monografía CEINCI-02-03). Sangolquí, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Centro de Investigaciones Científicas.
31. Ferguson, J.F. & Gavis, J. (1972). A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water Res.*, 6, 1259-1274.
32. Fitter, A.H., Wright, W.J., Williamson, L., Belshaw, M., Fairclough, J., Meharg, A.A. (1998). The phosphorus nutrition of wild plants and the paradox of arsenate tolerance: does leaf phosphate concentration control flowering? In: Lynch JP, Deikman J, (eds.). *Phosphorus in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes*. American Society of Plant Physiologists, 39-51.
33. Fowler, B.A. (1977). Toxicology of environmental arsenic. In: Toxicology of Trace Elements. (R.A., Goyer; M.A., Mahlman) (eds), *Halsted*, London, 79-122.
34. Franjen, P. & Requena, N. (2001). Analysis of gene expression in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges. *New Phytologist*, 150, 517-527.
35. Friese, C.F. & Allen, M.F. (1991). The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: Inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*, 83, 409-418.
36. Gemma, J. N. & Koske, R.E. (1992). Are mycorrhizal fungi present in early stages of primary succession? In: Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, A. H. & Alexander, I. J. (eds.). *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, Wallingford, UK., 183-189.

37. 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.
38. Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B., Gianinazzi, S. (1989). *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*, 7, 243-255.
39. Giles, C., Macewan, T., Nakhwa, S., Smith, D. (1960). Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanism and in measurement of specific surface areas of solids. *J. Chem. Soc.*, 3976-3993.
40. Giovannetti, M. & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection roots. *New Phytologist*, 84, 489.
41. Gonzáles Chávez, M.C. (2000a). Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. In: Quintero Lizaola, R., T. Reyna-Trujillo, L. Corlay-Chee, A. Ibáñez-Huerta, N.E. García-Calderón (eds.). *La Edafología y sus Perspectivas al siglo XXI. Tomo II*. Colegio de Postgraduados-Universidad Nacional Autónoma de México-Universidad Autónoma Chapingo. México, D.F., 714-731.
42. Gonzáles Chávez, M.C. (2000b). Arbuscular mycorrhizal fungi from As/Cu polluted soil, contribution to plant tolerance and importance of the external mycelium. PhD Thesis. Reading University. Reading UK.
43. Gonzáles Chávez, M.C. (2004). Los hongos micorrízicos en suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos: Mecanismos de tolerancia, relevancia ecológica y su uso en biorremediación. In: Ferrera-Cerrato, R. y A. Alarcón. (eds.). *Microbiología Agrícola para el siglo XXI. Editorial Mundi-Prensa*. México. (En prensa).
44. Gonzáles Chávez, M.C., Carrillo-Gonzáles, R., Wright, S., Nichols, K. (2004). Role of Glomalin, protein produced by hypha of arbuscular mycorrhizal fungi in the sequestration of potentially toxic elements. *Environ. Pollut.*, 130, 317-323.
45. Gonzáles Chávez, M.C., Harris, P.J., Dodd, J., Meharg A.A. (2002a). Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus*. *New Phytologist*, 155, 163-171.
46. Gonzáles-Chávez, M.C. & Ferrera-Cerrato, R. (1997). La Biotecnología Micorrízica. *Perspectivas de la Microbiología en México*. México, 325-343
47. Gonzalez, A.M. & Raisman, J.S. (2004). Hipertextos del área de biología. In: Gonzalez, A.M., Raisman, J.S.(eds.). Argentina.

48. González-Chávez, C., D'Haen, J., Vangronsveld, J., Dodd, J. (2002b). Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil*, 240, 287-297.
49. Graham, J.H. (2000). Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystems fungi. In: GK Podila, DD Douds Jr, (eds.). *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, 127-140
50. Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230, 674-676.
51. Harley, J. & Smith, S. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academia Press. London.
52. Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A. (2001a). Copper and arsenate induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell & Environment*, 24, 713-722.
53. Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Ten Bookum, W.M., Schat, H., Meharg, A.A. (2001b). Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Plant Physiology*, 126, 299-306.
54. Hepper, C.M. & Smith, G.A. (1976). Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans. Br. Mycol.*, 66, 189-194.
55. Herrera, R., Furrázola, E., Ferrer, R., Fernández, R., Torres, Y. (2004). Functional strategies of root hair and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosários, Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 35, 11-121.
56. Hirata, S., Toshimitsu, H., Aihara, M. (2006). Determination of arsenic species in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Analytical Sciences*, 22, 39-43.
57. Hodge, A., Campbell, C.D., Fitter, A.H. (2001). An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, 413, 297-299.
58. IARC (International Agency for Research on Cancer). (1987). IARC Monograph of the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans – Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Update of IARC Monograph 1 to 42. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 100.
59. INVAM. (2006). Mycorrhiza Information Exchange Web Site clearinghouse for information on research, teaching, business of mycorrhizal symbiosis.
60. Irwin, R. & National Park Service. (1997). Arsenic Entry. *Environmental Contaminants Encyclopedia*

61. Jakobsen, I. & Rosendahl, L. (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist*, *115*, 77-83.
62. Jasper, D.A.(1994). Management of mycorrhizas in vegetation. In: Robson, A.D., Abbott, L.K., Malajezuk, N. (eds.). *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. Kluwer. Dordrecht, The Netherlands, 211-219.
63. Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fert. Soil*, *17*, 1-16.
64. Joner, E.J., Ravnskov, S., Jakobsen, I. (2000). Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radiolabeled inorganic and organic phosphate. *Biotechnol Lett*, *22*, 1705-1708.
65. Jonson, B.J & Derosa, C.T. (1995). Chemical mixtures released from hazardous waste sites: Implications for health risk assessment. *Toxicology*, *105*, 145-156.
66. Kakkar, R.K., Nagar, P.K., Ahuja, P.S., Rai, V.K. (2000). Polyamines and plant morphogenesis. *Biologia Plantarum*, *43*, 1-11.
67. Kelly, A.P. (1990). Mycotrophy in plants. Lectures on the Biology of mycorrhizae and related structures. Bishen Singh Mahendra. Pal Singh 23 – A, Connaught Place, Dhra Dun., 11-167.
68. Kirk, R. & Othmer, D. (eds.).(1995). Enciclopedia de Tecnología Química (1^{ra} ed., Vol 13). México.
69. Klironomos, J.N. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, *84*, 2292-2301.
70. Koide, R. & Mosse, B. (2004). A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, *14*, 145-163.
71. Lamber, D.H. & Cole, H. (1980). Effects of mycorrhizae on establishment and performance of forage species in mine spoil. *Agron. J.*, *71*, 275-260.
72. Lancaster, R.J., Coup, M.R., Hugues, J.W. (1971). Toxicity of arsenic present in Lakeweed. *N. Z. Vet. J.*, *19*, 14-5.
73. Lawrence, J., Michalik, P., Tam, G., Conacher, H. (1986). Identification of Arsenobetaine and Arsenocholine in Canadian Fish and Shellfish by High-Performance Liquid Chromatography with Atomic Absorption Detection and Confirmation by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, *34*, 315-319

74. Leonard, A. & Lauwerys, R. (1980). Carcinogenicity, teratogenicity, and mutagenicity of arsenic. *Mut. Res.* 75, 49-62.
75. LePage, Ben A., Currah, R.S., Stockey, R.A., Rothwell, G.W. (1997). Fossil Ectomycorrhizae from the Middle Eocene. *American Journal of Botany*, 84, 410-412.
76. Lepp, N.W. (1981). Effect of heavy metals pollution on plants. In: Lepp, N.W. (ed.). *Effects of trace metal on plant fuction*. Applied Science Publishers. London and New Yersey.
77. Lett, M.C., Paknikar, K.M., Lievremont, D. (2001). A simple and rapid method for arsenite and arsenate speciation. In: Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development. Ciminelli, V.T. & Garcia, O (eds.). Amsterdam: Elsevier Science B.V., 541-546.
78. Levander, O. (1977). Nutritional factors in relation to heavy metal toxicants. *Federation Proceedings*, 36, 5, 1683-87.
79. Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K. (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7, 139-153.
80. Leyval, C. & Binet, P. (1998). Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil arbuscular mycorrhizal plants. *J. Environ. Qual*, 27, 402-407.
81. Macnair, M.R. & Cumbes, Q. (1987). Evidence that arsenic tolerance in *Holcus lanatus* L. is caused by an altered phosphate uptake system. *New Phytologist*, 107, 387-394.
82. Mäder, P., Vierhailig, H., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Frey, B., Christie, P., Wiemken, A. (2000). Transport of ¹⁵N from soil compartment separated by a polytetrafluoroethylene membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 146, 155-161.
83. Meharg, A.A. & Hartley- Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistance and non-resistance plant species. *New Phytologist*, 154, 29-43.
84. Meharg, A.A. & Macnair, M.R. (1990). An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytologist*, 116, 29-35.
85. Meharg, A.A. & Macnair, M.R. (1991). The mechanisms of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.). Beauv and *Agrostis capillaries* L. *New Phytologist*, 119, 291-297.

86. Meharg, A.A. & Macnair, M.R. (1992). Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system – a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*, 43, 519-524.
87. Meharg, A.A. & Macnair, M.R. (1994). Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv that differ in their tolerance to arsenate. *Plant and Soil*, 162, 99-106.
88. Meharg, A.A. (1994). Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant, Cell & Environment*, 17, 989-993.
89. Moore, L., Fleishcher, M., Woolson, E. (1977). Distribution of arsenic in the environment. In: Grossblatt, N. (ed.). *Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants: Arsenic*. Washington, D.C: National academy of Sciences, 16-26.
90. Morandi, D. & Gianinazzi-Person, V. (1985). Influence of mycorrhizal infection and phosphate nutrition on secondary metabolite contents of soybean roots. In: Gianinazzi-Person, V., Gianinazzi, S. (eds.). *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris
91. Morita, M. & Edmonds, J. (1992). Determination of arsenic species in environmental and biological samples. *Pure & Applied Chemistry*, 64, 575-590.
92. Mukerji, K.G., Manoharachary, C., Chamola, B.P. (2002). Arbuscular Mycorrhizal Fungi – Identification, Taxonomic Criteria, Classification, Controversies and Terminology. In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C., Chamola, B.P. (eds.). *Techniques in Mycorrhizal Studies*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 249-272.
93. Mukherjee, A. & Bhattacharya, P. (2001). Arsenic in groundwater in the Bengal Delta Plain: slow poisoning in Bangladesh. *Environ. Rev.*, 9, 189-220.
94. Murphy, E.A. & Aucott, M. (1998). An assessment of the amounts of arsenical pesticides used historically in a geographical area. *Science of the Total Environment*, 218, 89-101.
95. Nickson, R., McArthur, J., Burgess, W., Ahmed, K.M., Ravenscroft, P., Rahmann, M. (1998). Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater. *Nature*, 395, 338.
96. Nissen, P. & Benson, A.A. (1982). Arsenic metabolism in freshwater and terrestrial plants. *Physiologia Plantarum*, 54, 446-450.
97. O'Donnell, K., Lutzoni, F., Ward, T. J., Benny, G. L. (2001). Evolutionary relationships among mucoralean fungi (*Zygomycota*): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia*, 93, 286-297.

98. Oehl, F. & Sieverding, E. (2004). *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany*, 78, 72-82.
99. OIT & Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales (eds.) (2001). Metales: Propiedades Químicas y tóxicas. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (3ª Edición). España
100. Onken, B. M. & Hossner, L. R. (1996). Determination of Arsenic Species in Soil Solution under Flooded Conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 60, 1385-1392.
101. Paliouris, G. & Hutchinson, T.C. (1991). Arsenic, cobalt and nickel tolerances in two populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke from Ontario, Canada. *New Phytologist*, 117, 449-459.
102. Pawlowska, T. & Charvat, I. (2004). Heavy-Metal Stress and Developmental Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 11, 6643-6649.
103. Pawlowska, T.E., Douds, D.D., Charvat, I. (1999). *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycol. Res*, 103, 1549-1556.
104. Peterson, R. & Massicotte, H. (2004). Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1074-1088.
105. Phillips, J. M. & Hayman. (1986). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55, 158 – 161.
106. Pickering, I.J., Prince, R.C., George, M.J., Smith, R.D., George, G.N. Salt, D.E. (2000). Reduction and coordination of arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiology*, 122, 1171-1177.
107. Pierce, M., Moore, C. (1981). Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Res.*, 16, 1247-1253.
108. Pirozynski, K.A & Malloch, D.W. (1975). The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *BioSystems*, 6, 153-164.
109. Ragaini, R.C., Ralston, H.R., Roberts, N. (1977). Environmental trace metal contamination in Kellogg, Idaho, near a lead smelting complex. *Environ. Sci. Technol.*, 11, 773-81.
110. Read, D.J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 47, 376-391.

111. Read, D.J. (1999). The ecophysiology of mycorrhizal symbioses with special referente to impacts upon plant fitness. In: Press MB, JD Scholes, MG Barker (eds.). *Physiological plant ecology*. Backwell Science, Oxford. Reino Unido.
112. Read, D.J. (2002). Toward ecological relevante – Prograss and pitfalls in the path towards an understanding of mycorrhizal functions in nature. In, Mycorrhizal Ecology. M.G.A. van der Heijden y I.R. Sanders (eds.), *Ecological Studies 157 Springer*, New York. 3-29.
113. Reay, P.F. (1972). The accumulation of arsenic from arsenic rich natural waters by aquatic plants. *J. Appl. Ecol.*, 9, 557-65.
114. Reguar, M. & Vogel, K. (2000). Mycorrhiza as a bioindicator of polluted sites. *Intercost Wokshop on Bioremediation*. Sorrento, Italia, 50-52.
115. 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.
116. Roncero, C., García-Rodríguez, L.J., Sanz M., Castrejón, F., Trilla J.A., Durán, A. (2001). The control of chitin síntesis in *Saccharomyces cerevisiae*. In, Chitin Enzimology. R.A.A. Muzzarelli (ed.), *Atec*, Italy. 456-468.
117. Ross, S.M. (1994) Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. In: Ross SM (ed.) *Toxic Metals in Soil-Plant System*. John Wiley & Sons. Chichester, 3-25.
118. Sakata, M. (1987). Relationship between adsorption of arsenic (III) and boron by soil and soil proprieties. *Environ. Sci. Technol.*, 21,1126-1130.
119. Sánchez, G., Carrillo, R., Martínez, A., Gonzáles-Chávez, M.C. (2004). Tolerancia adaptativa de hongos micorrízicos arbusculares al crecer en sustratos contaminados con As y Cu. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 20, 147-158.
120. Schenck & Perez (1990) Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. Published by Synergistic Publications Gainesville, USA.
121. Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, 1413-1421.
122. Sharples , JM., Meharg, AA., Chambers, SM., Cairney, JWG. (2000b). Symbiotic solution to arsenic contamination. *Nature*, 404, 951-952.

123. Sharples, J., Meharg, AA., Chambers, S. and Cairney, J. (2000). Mechanism of Arsenate Resistance in the Ericoid Mycorrhizal Fungus *Hymenoscyphus ericae*. *Plant Physiology*, 124, 1327-1334.
124. Sieverding, E. & Barea, J.M. (1999). Perspectivas de la inoculación de sistemas de producción vegetal con hongos formadores de micorrizas VA. In: Ecofisiología de la Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. IV , 203-221.
125. Sieverding, E. (1991). Vesicular arbuscular mycorrhiza mangement in Tropical Agrosystems. GTZ. Federal Republic of Germany.
126. Simon, L. M. Lalonde, T.D. Bruns. (1992). Specific amplification of 18s fungal ribosomal genes from vesicular arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied Environmental Microbiology* , 58, 291-295.
127. Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C., Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidente with vascular land plants. *Nature*, 363, 67-69.
128. Siquiera, J. O. (1987). Cultura axénica e monoaxénica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. *II Reuniao Brasileira sobre Micorrizas*. Sao Paulo, 44-70.
129. Smith, F.A. & Smith, S.E., (1997). Structural diversity in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol*, 137, 373-388.
130. Smith, S.E. & Gianinazzi-Pearson, V. (1988). *Ann. Rev. Plant Physiology*. Plant, 39, 221-244.
131. Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edn. London, Uk: Academic Press Ltd.
132. Snow, E.T., Hu, Y., Chao Yang, C. Chouchane, S. (1999). Modulation of DNA repair and glutathione levels in human keratinocytes by micromolar arsenite. In: *Arsenic Exposure and Health Effect*. Abermathy, C.O. & Calderon, R.L. (eds.). Amsterdam: Elsevier Science B.V., 243-251.
133. Stubblefield, S.P., Taylor, T.N., Trappe, J.M. (1987). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *American Journal of Botany*, 74, 1904-1911.
134. Stürmer, S.L. & Morton, J.B. (1997). Developmental patterns defining morphological characters in spores of species in *Glomus* (Glomales, Zygomycetes). *Mycologia* 89,72-81.
135. Svobodova, Z., Elechovska, O., Machova, J. Randak, T. (2002). Content of Arsenic in Market-Ready Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *ACTA VET.BRNO*, 71, 361-367.

136. Tamaki, S. & Frankenberger, W.T. (1992). Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 124, 79-110.
137. Tommerup, I.C. (1983). Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 81, 37-45.
138. Tsair-Fuh Lin & Jun-Kun Wu (2001). Adsorption of arsenite and arsenate within activated alumina grains: Equilibrium and Kinetics. *Elsevier Science*, 35, 2049-2057.
139. TULAS (TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA), (2003). Libro VI, Título VII, Anexo 2, Norma de Calidad Ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados.
140. Turpeinen, R., Pansar-Kallio, M., Haggblom, M., Kairesalo, T. (1999). Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Science of the Total Environment*, 236, 173-180.
141. U.S. Environmental Protection Agency (1996). Electronic chemical data files. Cincinnati: Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office.
142. Ullrich-Eberius, C.I., Sanz, A., Novacky, A.J. (1989). Evaluation of arsenate-and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *Journal of Experimental Botany*, 40, 119-128.
143. Vahter, M. (2000). Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicology Letters*, 112, 209-217.
144. van der Heijden & I. Sanders. (2002). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning. In: Mycorrhizal Ecology. M.G.A. van der Heijden y I. R. Sanders (eds.). *Ecological Studies 157 Springer*. New York, 225-242.
145. Vega Gleason, S. (2002). Riesgo Sanitario Ambiental por la Presencia de Arsénico y Fluoruros en los Acuíferos de México. Arsénico y sus consecuencias en la salud y ambiente, 1-15
146. Walker, C. & M. Vestberg. (1998). Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstansum* and *G. fistulosum*. *Annals of Botany*, 82, 601-624.
147. Walsh, L.M. & Keeney, D.R. (1975). Behaviour and phytotoxicity of inorganics arsenicals in soil. In: Arsenical Pesticides (E.A. Woolson)(ed). *American Chemical Society Symposium Vol 7. American Chemical Society*. Washington, 35-52.
148. Wauchope, R.D. (1983). Uptake, translocation and phytotoxicity of arsenic in plants. In: Arsenic: Industrial, Biomedical, Environmental Perspectives (Lederer y

- Fensterheim) (ed.). *Arsenic Symposium, Gaithersburg, Maryland. Van Nostrand Reinhold Company*. New York, 348-374.
149. Weissenhorn, I., Glashoff, A., Leyval, C., 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.
150. Wilcox, H.G (1990). Mycorrhizae. In: Plant Roots. The Hidden Half. Yoav Waisel, Amram Eshel and Uzi Kafkafi (eds.). New York, U.S.A., 948.
151. Wild, H. (1974). Geobotanical anomalies in Rhodesia. 4. The vegetation of arsenical soils. *Kirkia*. 9, 243-64.
152. Woolson, E.A., Axley J.H., Kearney, P.C. (1971). The chemistry and phytotoxicity of arsenic in soils. I. Contaminated field soils. *Soil Science Society of America Proceeding*, 35, 938-943.
153. Wyss, P., Boller, T., Wiemken, A. (1991). Phytoalexin response is elicited by a pathogen (*Rhizoctonia solani*) but not by a mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*) in soybean roots. *Experientia*, 47, 395-399.
154. Yan,X., Kerrich,R., Hendry, M. (2000). Distribution of arsenic(III),arsenic(V)and total inorganic arsenic in pore-waters from a thick till and clay-rich aquitard sequence, Saskatchewan,Canada.*Geochim.Cosmochim.Acta*, 64, 2637 -2648.
155. Zaman, K. & Pardini, R.S. (1996). An overview of the relationship between oxidative stress and mercury and arsenic. *Toxic Substance Mechanism*, 15, 151-181.
156. Zhou, J. (1999). Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 51, 686-693.

GLOSARIO

A

Anfótero(a).- Se dice de las moléculas que pueden reaccionar como ácido o como base.

Anión.- Ion con carga negativa.

B

Biorremediación.- La Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados se basa en los procesos de descontaminación del suelo o estabilización de los contaminantes en el suelo mismo. En este último procesos, denominado fitoestabilización o bioestabilización, de acuerdo al uso de plantas o microorganismos, la cantidad de contaminante no se reduce en el sitio, pero el contaminante queda secuestrado o adsorbido en la matriz del suelo y su disponibilidad se reduce y también los riesgos ambientales.

C

Catión.- Ion con carga positiva.

E

Enlace covalente.- Enlace que tiene lugar entre átomos al compartir pares de electrones.

Elemento potencialmente tóxico (EPT).- El término metales pesados, metales tóxicos o elementos traza es aplicado a un amplio grupo de elementos, los cuales son importantes desde el punto de vista biológico e industrial. GDA (1993) y Alloway (1995) establecieron que estos nombres no son completamente satisfactorios, por ello ha sido sugerido el término elemento potencialmente tóxico (EPT) como un nombre más conveniente para referirse a estos elementos cuando están presentes en la solución del suelo en concentraciones altas y pueden ser tóxicos para las plantas.

H

Hifa.- Las hifas son el resultado de la germinación de esporas que presentan una capacidad limitante para crecer y pueden morir si no encuentran una raíz susceptible dentro de un tiempo determinado. Las hifas del suelo son también llamadas extraradicales o hifas

externas, estas son estructuras fúngicas filamentosas que se ramifican a través del suelo. Son responsables de la adquisición de nutrientes, propagación de la asociación, formación de esporas, etc.

L

Lumen.- La cavidad celular, limitada por las paredes.

P

Peridium (Peridio).- Cubierta externa o pared de una fructificación. Presente en los Gasteromycetes y Myxomycetes, en éstos tiene una estructura variable y puede estar impregnado de sales de calcio.

Propágulo.- Estructura que sirve para la reproducción vegetativa de un organismo.

Psilotales.- plantas vasculares inferiores, que tienen esporofito dicótomo ramificado dividido en tallo y rizoma aéreos, y que carecen de raíces verdaderas.

Pteridophyta.- Planta en la cual la generación esporofítica es la fase de mayor tamaño y en la cual el gametofito vive en forma independiente del esporofito del cual se originó. Las Pteridophytas son casi todas plantas vasculares, incluyen las Lycophitas, Sphenophytas y Helechos.

Punto isoeléctrico.- El punto isoeléctrico es el pH al que una sustancia anfótera tiene carga neta cero. A este valor de pH la solubilidad de la sustancia es casi nula.

Q

Quitina.- Sustancia azufrada compleja similar a la encontrada en el tegumento de los insectos. Se encuentra en la pared celular de algunos hongos.

R

Rizósfera.- La rizósfera es la parte del suelo inmediata a las raíces, tal que al extraer una raíz, es aquella porción de tierra que queda adherida a la misma; se considera también como la porción del suelo en la que están las raíces de las plantas. Este medio es una región de intensa actividad biológica. En la rizosfera por lo tanto se concentran una gran cantidad de

microorganismos, muchos de los cuales pueden ser beneficiosos y a la vez potencialmente patógenos.

S

Senescencia.- La senescencia se la conoce como un proceso de desmantelamiento celular, que finaliza con la muerte de células, tejidos u órganos.

Septo.- Pared transversal para delimitar células.

Sesquióxido.- Óxido cuya molécula está constituida por tres átomos de oxígeno y tres de otro elemento.

Simbiosis.- Asociación íntima de dos organismos diferentes, los que obtienen beneficios mutuos de la misma.

ANEXOS

ANEXO 1

Informe Comisión Ecuatoriana De Energía Atómica



COMISIÓN ECUATORIANA DE ENERGÍA ATÓMICA

UNIDAD DE QUÍMICA ANALÍTICA

INFORME DE ANÁLISIS

CLIENTE: CEINCI
TELÉFONO: 099232210
TOTAL DE MUESTRAS : 1 MUESTRA DE SEDIMENTO

FECHA DE RECEPCIÓN: 07.12.05
FECHA DEL REPORTE: 22.12.05
No. DEL REPORTE: 05-12.86
ORDEN DE TRABAJO No.: 0317

OBSERVACIONES:

1. Muestra recibida en el Laboratorio, la CEEA se responsabiliza únicamente de los análisis.
2. Técnica de Análisis Absorción Atómica
3. Determinación: metales.
4. Método: Digestión ácida con KI, lectura en generador de hidruros.

ITEM	MATRIZ	REFERENCIA DE LA MUESTRA	CONCENTRACION (mg As/kg suelo)	
			As	--
1	Suelo	SUELO CEINCI-MUESTRA SECA	3815	--

Ing. Enrique Arévalo
ANALISTA

Nota: Reporte válido, sólo con el sello de la Institución

ANEXO 2

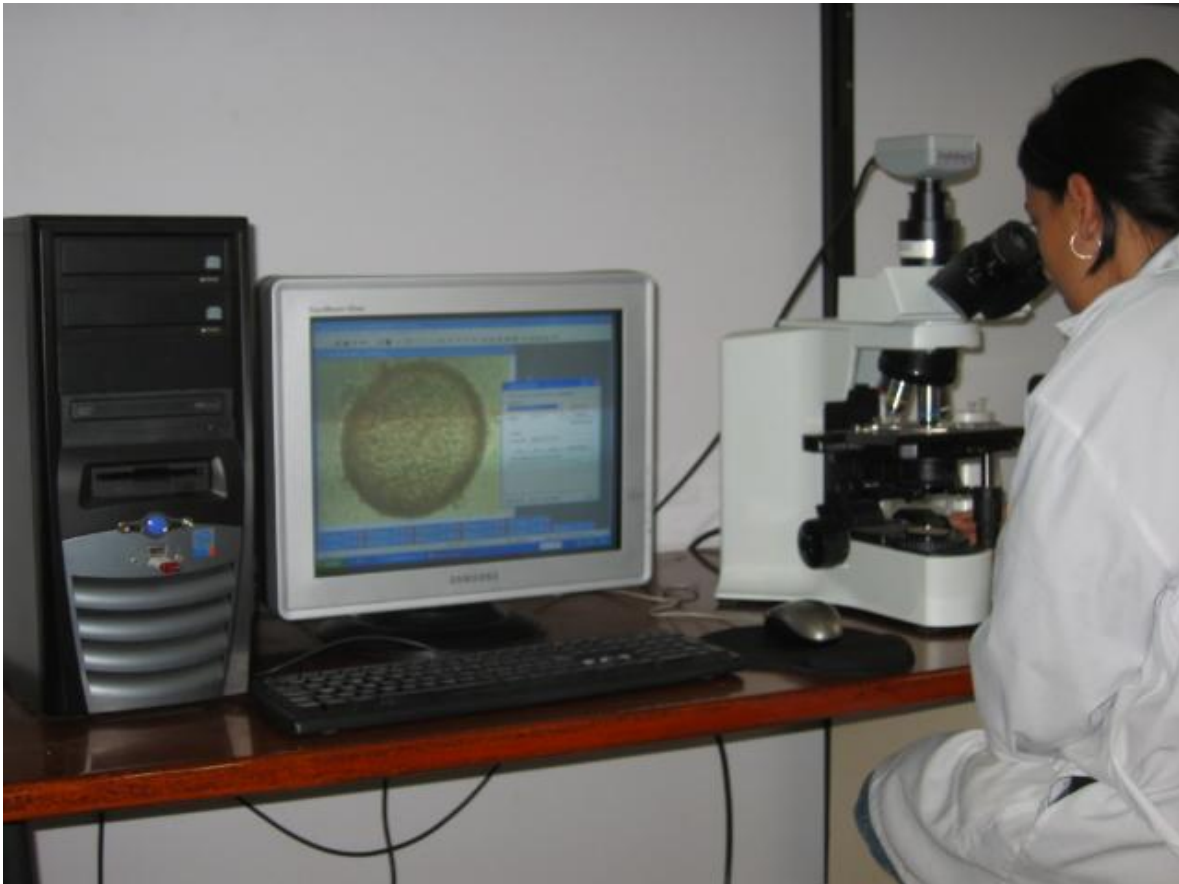
Población de HMA en suelo de la Laguna de Papallacta, sector suroeste

Noviembre (época seca)		Tamiz	Factor		Sumatoria	N° esporas/10 0g suelo seco
			Multiplicación	10		
Muestra	140	40	10	20	50 g	100g
M1	9	18	90	360	450	900
M2	6	61	60	1220	1280	2560
M3	1	26	10	520	530	1060
M4	5	30	50	600	650	1300
Promedio						1455

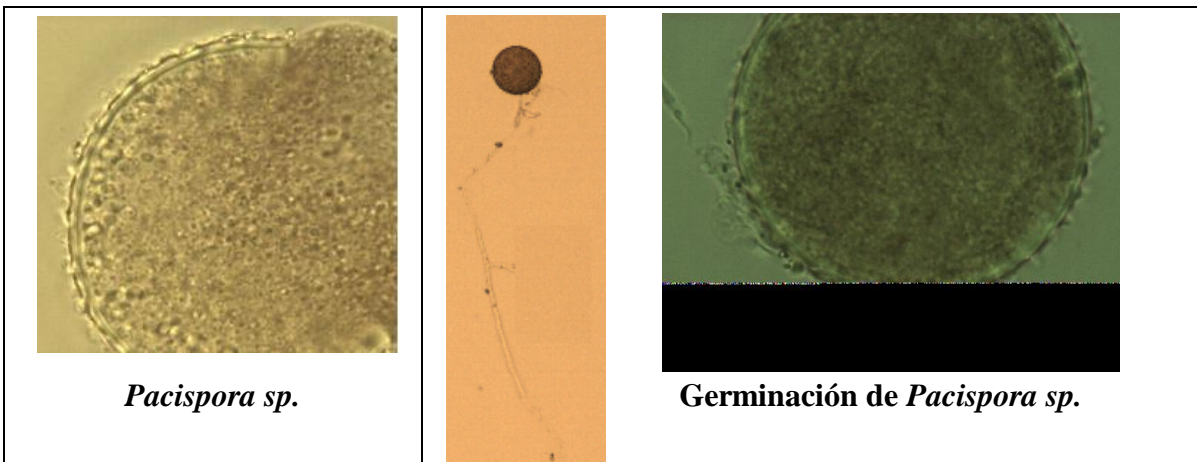
Marzo (época lluviosa)		Tamiz	Factor		Sumatoria	N° esporas/10 0g suelo seco
			Multiplicación	10		
Muestra	140	40	10	20	50 g	100g
M1	5	43	50	860	910	1820
M2	7	84	70	1680	1750	3500
M3	2	85	20	1700	1720	3440
M4	5	98	50	1960	2010	4020
Promedio						3195

ANEXO 3

Identificación de la especie de HMA aislada de suelo de la laguna de Papallacta



Observación en el microscopio de esporas de la especie aislada de suelo de la Laguna de Papallacta, sector suroeste, toma de fotografías e identificación de la especie en base a características morfológicas.



Fotografías de esporas de la especie aislada de suelo de la laguna de Papallacta, sector suroeste.

ANEXO 4

Análisis de Varianza - ADEVA

----- lectura=6 -----

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
esp_cod	4	GC GM_132 GM_25 PA
conc	4	1 2 3 4

Number of observations 48

ADEVA FACTORIAL

19:12 Friday, June 7, 1996 129

----- lectura=6 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: esp_ger_p

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	11853.00000	790.20000	22.36	<.0001
Error	32	1130.66667	35.33333		
Corrected Total	47	12983.66667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	esp_ger_p Mean
0.912916	7.168866	5.944185	82.91667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
esp_cod	3	11091.66667	3697.22222	104.64	<.0001
conc	3	531.66667	177.22222	5.02	0.0058
esp_cod*conc	9	229.66667	25.51852	0.72	0.6851

ADEVA FACTORIAL

19:12 Friday, June 7, 1996 130

ANEXO 5

Prueba de Tukey Factor Especie

----- lectura=6 -----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for esp_ger_p

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error Mean Square	35.33333
Critical Value of Studentized Range	3.83162
Minimum Significant Difference	6.5748

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	esp_cod
A	93.333	12	GM_132
A			
A	91.667	12	GM_25
A			
A	90.000	12	PA
B	56.667	12	GC
	ADEVA FACTORIAL		19:12

Friday, June 7, 1996 131

ANEXO 6

Prueba de Tukey Factor Concentración

----- lectura=6 -----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for esp_ger_p

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher

Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error Mean Square	35.33333
Critical Value of Studentized Range	3.83162
Minimum Significant Difference	6.5748

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	conc
A	87.333	12	1
A			
B A	84.667	12	2
B A			
B A	81.000	12	3
B A			
B	78.667	12	4
B			
ADEVA FACTORIAL GENERAL			19:12

Friday, June 7, 1996 132

ANEXO 7

Datos empleados en la elaboración de la isoterma

	As retenido en sustrato seco	As en fase líquida de sustrato (mg/kg)	Concentración de As en Soluciones preparadas
	qe(mg/kg)	Ce(mg/L)	Cin(μg/ml)
c1	4,399	7,074	25,029
c2	914,400	1666,651	5398,896
c3	2662,752	6543,711	17412,087
c4	3247,077	9950,986	23204,362
c5	5628,477	18534,426	41507,802

qe(mg/g)	Ce/qe
0,004	1608,093
0,914	1822,671
2,663	2457,499
3,247	3064,598
5,628	3292,974