

BACTERIA ASSOCIATED WITH THE EXTRARADICAL MYCELIUM OF AN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS IN AN As/Cu POLLUTED SOIL

BACTERIAS QUE SE ASOCIAN AL MICELIO EXTRARADICAL DE UN HONGO ARBUSCULAR EN SUELO CONTAMINADO CON As Y Cu

Ma. del Carmen A. González-Chávez¹, Ray Newsam², Robert Linderman³, John Dodd⁴, and Jorge M. Valdez-Carrasco¹

¹Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Estado de México, México. (carmeng@colpos.mx). ²Department of Biosciences. University of Kent, Canterbury CT2 7NJ, UK. ³U. S. Department of Agriculture. ARS Horticultural Crops Research Laboratory. Corvallis, OR, 97330, U.S.A. ⁴PlantWorks Ltd, Kent Science Park, Sittingbourne, Kent ME9 8HL, UK.

ABSTRACT

Synergistic interactions between bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) occur under natural soil conditions; however, in polluted soils there is little information regarding these relationships. Microscopy was used to study the interaction between the hyphae of an AM fungus (*Glomus claroideum* BEG134 from an As/Cu polluted soil) and bacteria in polluted soil cultures. BacLight™ staining showed viable bacteria mainly in the runner hyphae of the fungus associated with plants (*Holcus lanatus* L.) growing in polluted soils. Transmission electron microscopy revealed that a morphologically different bacterial population was intimately associated with the extraradical mycelium (ERM). Bacteria were embedded in the mucilaginous outer layer, encrusted at the outer layer, between hyphal wall layers, and inside hyphae. Crystals, comprising precipitated metal, were observed outside the ERM. The ecological relevance of this bacteria-AMF interaction is discussed.

Key words: *Glomus claroideum*, bacterial interaction, endosymbiosis, mycorrhizosphere, rhizosphere synergism.

INTRODUCTION

In the rhizosphere, a dynamic soil zone influenced by roots, microorganisms interact with each other in synergistic and antagonistic processes (Lynch, 1990). Under natural conditions soil bacteria, actinomycetes and fungi may be associated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Vancúra *et al.*, 1989; Walley and Germida, 1996).

Studies from agricultural soils or *in vitro* observations have focused on the association between bacteria and AMF, especially in relation to plant growth (Paulitz and Linderman, 1989) and biological control of root pathogens (Linderman, 2001). The nature of this association has been studied; for example, the direct

RESUMEN

La interacción sinérgica entre bacterias y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) ocurre bajo condiciones naturales del suelo; sin embargo, hay poca información de ésta en suelos contaminados. Se estudió microscópicamente la interacción entre las hifas de un hongo MA (*Glomus claroideum* BEG134, aislado de un suelo contaminado con As y Cu), y bacterias en plantas de *Holcus lanatus* L. en suelo contaminado. La tinción con BacLight™ mostró bacterias vivas, principalmente en las hifas corredoras del hongo asociado a plantas (*Holcus lanatus* L.) que crecieron en suelo contaminado. Por microscopía electrónica de transmisión se observó que una población bacteriana morfológicamente diferente se asoció íntimamente con el micelio extra-radical (MER). Las bacterias estaban embebidas en la capa mucilaginosa externa, incrustadas en la pared externa, entre las capas de la pared hifal, y dentro de las hifas. Se observaron cristales, conteniendo metal precipitado, fuera del MER. Se discute la importancia ecológica de la interacción bacteria-HMA.

Palabras clave: *Glomus claroideum*, interacción bacteriana, endosimbiosis, micorrizosfera, sinergismo en la rizosfera.

INTRODUCCIÓN

En la rizosfera, zona dinámica del suelo donde influyen las raíces, los microorganismos interactúan entre sí en procesos de sinergismo y antagonismo (Lynch, 1990). En condiciones naturales, las bacterias, actinomicetos y hongos del suelo pueden asociarse con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Vancúra *et al.*, 1989; Walley y Germida, 1996).

Los estudios en suelos agrícolas u observaciones *in vitro* se han enfocado en la asociación entre bacterias y HMA, especialmente en relación al crecimiento de la planta (Paulitz y Linderman, 1989) y al control biológico de patógenos radicales (Linderman, 2001). La naturaleza de esta asociación se ha estudiado; por ejemplo, Bianciotto *et al.* (1996a) evaluaron

Recibido: Agosto, 2006. Aprobado: Octubre, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 1-10. 2008.

physical interaction between germinated spores of *Gigaspora margarita* with a suspension of several strains of either *Rhizobium leguminosarum* or *Pseudomonas fluorescens* was evaluated by Bianciotto *et al.* (1996a), who observed that these rhizobacteria interacted with spore and hyphae (from germ tubes) of *Gi. margarita* under sterile conditions, but the degree of interaction depended upon the strain. They also suggested that AMF are a vehicle for the colonization of plant roots by soil rhizobacteria. According to Bianciotto *et al.* (1996b), the cytoplasm of *Gi. margarita* spores harbors a live *Burkholderia* population; similar results were observed in *Scutellospora* sp., but not in *Glomus mosseae* or *Acaulospora laevis*. In germinating AMF spores the expression of *nif* (nitrogen fixation) genes could indicate that the *Burkholderia* endobacteria supply the fungus with nitrogen during its pre-infection growth (Minerdi *et al.*, 2001); however, studies by Bianciotto and Bonfante (2002) did not confirm this.

AMF are beneficial to plants in polluted soils (González-Chávez *et al.*, 2004a). However, the interactions between bacteria and AMF in polluted soils and their significance for remediation practices have been poorly studied. Bacteria and AMF, adapted to metals, may increase metal tolerance in their host plants (Vivas *et al.*, 2003, 2006). Understanding the nature of microbial interactions in polluted soils is important when developing phytoremediation technologies, as microbial species are commonly involved in soil metal transformations and degradation of organic compounds (Gadd, 1993; Anderson *et al.*, 1993). This is especially important at the extraradical mycelium (ERM), since Mansfeld-Giese *et al.* (2002) demonstrated that the ERM has a stronger influence on bacterial population density than roots colonized by AMF.

The objective of this research was to microscopically study the interaction of bacteria associated with the ERM of *Glomus claroideum* (BEG134) from an As/Cu polluted soil, simulating polluted conditions.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolate

A single-spore fungal culture of *G. claroideum* BEG134, isolated from Great Consol Mines, Devon, UK (1.6 km North of Gunnislake, 50° 31' N, 4° 12' W), was used in this research. Unrooted tillers of arsenate-resistant *Holcus lanatus* L. were used as a host plant in the propagation of the monosporic cultures.

Pot cultures

After verifying the purity of the *G. claroideum* culture (by the absence of another spore type), it was propagated for four months

la interacción física directa entre esporas germinadas de *Gigaspora margarita* con una suspensión de varias cepas de *Rhizobium leguminosarum* o *Pseudomonas fluorescens*; se observó que las rizobacterias interactuaron con esporas e hifas (de tubos germinativos) de *Gi. margarita* en condiciones estériles, pero el grado de interacción dependió de la cepa. Ellos también sugirieron que los HMA son un vehículo para la colonización de las raíces de las plantas por las rizobacterias del suelo. Según Bianciotto *et al.* (1996b), el citoplasma de esporas de *Gi. margarita* sustenta una población viva de *Burkholderia*; se observaron resultados similares en especies de *Scutellospora*, pero no en *Glomus mosseae* o *Acaulospora laevis*. En esporas de HMA en germinación, la expresión de genes *nif* (fijación de nitrógeno) podría indicar que la endobacteria *Burkholderia* provee al hongo con nitrógeno durante su crecimiento pre-infectivo (Minerdi *et al.*, 2001); sin embargo, esto no se confirmó en otros estudios posteriores (Bianciotto y Bonfante, 2002).

En suelos contaminados, los HMA son benéficos para las plantas (González-Chávez *et al.*, 2004a). Sin embargo, poco se ha estudiado acerca de la interacción entre bacterias y HMA en estos suelos y su significado en las prácticas de remediación. Las bacterias y HMA adaptados a metales pueden incrementar la tolerancia a metales en sus plantas hospederas (Vivas *et al.*, 2003, 2006). Para desarrollar tecnologías de fitoremediación es importante entender de la naturaleza de las interacciones microbianas en suelos contaminados, ya que las especies microbianas están comúnmente involucradas en la transformación de metales en el suelo y la degradación de compuestos orgánicos (Gadd, 1993; Anderson *et al.*, 1993). Esto es especialmente importante en el micelio extra-radical (MER), ya que Mansfeld-Giese *et al.* (2002) demostraron que el MER tiene mayor influencia en la densidad de la población microbiana que la raíz colonizada por los HMA.

El objetivo de la presente investigación fue estudiar microscópicamente la interacción de las bacterias asociadas con el MER de *Glomus claroideum* BEG134, aislado de un suelo contaminado con As y Cu, simulando condiciones de contaminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislado fúngico

En esta investigación se usó un cultivo monospórico del hongo *G. claroideum* BEG134, aislado de Great Consol Mines, Devon, UK (1.6 km norte de Gunnislake, 50° 31' N, 4° 12' O). Se usaron hijuelos no enraizados de *Holcus lanatus* L. resistente a arsenato, como planta hospedera para la propagación del cultivo monospórico.

in 15 cm-diam pots on an attapulgitte clay (Agsorb 8/16, Oil-Dri, Wisbech, Cambs, UK) amended or not with 20 g of polluted soil that had been γ -irradiated (10 kGy). Thus, polluted and non-polluted fungal AMF cultures were obtained after inoculation with 200 spores per pot. Soil was polluted with DTPA-TEA-CaCl₂ available arsenic (130 mg kg⁻¹) and copper (97 mg kg⁻¹) (Lindsay and Norvell, 1978), had pH 6.4, 0.9% organic matter and 3.4 mg P kg⁻¹. This soil and the plant host, *H. lanatus* were obtained from the same area where *G. claroideum* BEG134 was isolated. The fungal cultures were grown in a glasshouse at temperatures between 12 and 25 °C. Plants were watered every 2 d to maintain a water holding capacity of 80% and nutrients were added weekly as 1.4 g L⁻¹ Vitafeed 102 (Vitax Ltd, Leicester, UK) containing 15% N, 0% P, 36% K.

Microscopic detection of bacteria on ERM

BacLight™ staining and fluorescence microscopy

After four months, five samples of the ERM of *G. claroideum* BEG134 were collected from the pot cultures using the wet sieving and decanting method (Gerdemann and Nicolson, 1963). Hyphae collected on a 43 μ m nylon mesh were washed twice with sterile deionized-distilled water and stained with the Live/Dead BacLight™ Bacteria Viability Kit (Molecular Probes Europe BV). BacLight stain is a two-colour fluorescence assay of bacterial viability. Green fluorescence is observed in bacteria with intact plasma membranes (alive) and red fluorescence in bacteria with damaged membranes (dead). The time of incubation was 15 min at room temperature in the darkness (Manufacturer's instructions). Slides of stained ERM were prepared and observed under a fluorescence microscope (Leitz DMRB). Bacteria attached to the hyphae were not quantified.

Transmission electron microscopy (TEM)

The ERM was extracted and washed twice with 0.01 M phosphate buffer solution (PBS, pH=7.3) and transferred to 2.5% glutaraldehyde in PBS. Fixation was carried out for 3 h at 4 °C and was followed by two washes in PBS for 10 min. Postfixation in 1% (w/v) OsO₄ solution for 2 h was performed before dehydration in alcohol series (30%, 50%, 70%, 80%, 90% and 100%, 15 min each step) at room temperature. Samples of ERM were embedded in Spurr's resin. Polymerization occurred overnight. Using a diamond knife, mounted on an ultratome Nova (Leica), 100 μ m sections were made. Samples were stained with uranyl acetate (30 min, 37 °C) followed by lead citrate (10 min) and were observed under a TEM (Phillips 410). Ten thin sections were observed from hyphae growing in non-polluted and polluted substrate.

RESULTS AND DISCUSSION

BacLight staining revealed living bacteria associated with the ERM of *G. claroideum* (BEG134) and on young spores (Figure 1). Bacterial accumulation

Cultivos en macetas

Después de verificar la pureza del cultivo de *G. claroideum* (ausencia de otro tipo de esporas), se propagó por cuatro meses en macetas (15 cm de diámetro) con una arcilla de atapulgita (Agsorb 8/16, Oil-Dri, Wisbech, Cambs, UK), adicionada o no con 20 g de suelo contaminado e irradiado con rayos γ (10 KGy). Se obtuvieron cultivos de HMA contaminados y sin contaminar al inocular con 200 esporas por maceta. El suelo fue contaminado con DTPA-TEA-CaCl₂ arsénico 130 mg kg⁻¹ cobre 97 mg kg⁻¹ disponibles (Lindsay y Norvel, 1978), tenía pH 6.4, 0.9% materia orgánica y 3.4 mg kg⁻¹ P. Este suelo y la planta hospedera, *H. lanatus* se obtuvieron de la misma área donde se aisló *G. claroideum* BEG134. Los cultivos fúngicos crecieron en un invernadero a temperatura de 12 a 25 °C. Las plantas se regaron cada 2 d para conservar 80% de la capacidad de campo, y los nutrientes se añadieron semanalmente usando 1.4 g L⁻¹ Vitafeed 102 (Vitax Ltd, Leicester, UK), conteniendo 15% N, 0% P y 36% K.

Detección microscópica de bacterias en el MER

Tinción BacLight™ y microscopía de fluorescencia

Después de cuatro meses, cinco muestras del MER de *G. claroideum* BEG134 se recolectaron de los cultivos fúngicos, usando el método de tamizado en húmedo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963). Las hifas colectadas en una malla de nylon de 43 μ m se lavaron dos veces con agua destilada-desionizada estéril y se tiñeron con el producto comercial Live/Dead BacLight™ Bacteria Viability Kit (Molecular Probes Europe BV). El colorante BacLight™ es un ensayo de fluorescencia de dos colores para determinar la viabilidad bacteriana. Una fluorescencia verde se observa en bacterias con membrana plasmática intacta (vivas) y la fluorescencia roja en bacterias con membrana dañada (muertas). El tiempo de incubación fue 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (según instrucciones de uso). Se prepararon laminillas con el MER teñido y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Leitz DMRB). No se cuantificó el número de bacterias en las hifas.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

El MER se extrajo y se lavó dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (SAF, pH=7.3) y se transfirió a una solución de glutaraldehído (2.5%) en SAF. La fijación se realizó por 3 h a 4 °C y se hicieron dos lavados de 10 min con SAF. La postfixación se hizo por 2 h en una solución de OsO₄ 1% (p/v), antes de la deshidratación y a temperatura ambiente en series de alcohol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100%; 15 min cada una). Las muestras del MER se embebieron durante la noche en resina Spurr, para permitir la polimerización. Se usó un cuchillo de diamante montado en un ultramicrotomo Nova (Leica) para obtener secciones delgadas (100 μ m). Las muestras se tiñeron con acetato de uracilo (30 min, 37 °C) y con citrato de plomo (10 min) para observarlas

was along the thick runner hyphae and at their bifurcations (Figure 1 A, B). Runner hyphae (>20 μm diameter) form entry points on the root surface, as well as the skeleton of the ERM in the substrate and may be an efficient bacterial transporter along the mycorrhizosphere and soil (Dodd *et al.*, 2000).

Living bacteria (green fluorescence) were observed in the ERM extracted from the non-polluted and polluted substrate; in this last substrate, bacteria were easily observable. High concentrations of metals can potentially alter microbial morphology (Gardea-Torresdey *et al.*, 1997), making them more detectable in the metal-contaminated soil and giving the appearance of greater abundance. In non polluted conditions, Bianciotto *et al.* (1996a) observed that bacterial cells were irregularly distributed, producing patches around the hyphae of germinated spores of *Gl. margarita*.

Using fluorescence and transmission electron microscopy, it was demonstrated that under polluted conditions, living bacteria and the ERM of *G. claroideum* BEG134 were very intimately associated (Figure 2). The association of bacteria and the hyphosphere of AMF in non-polluted conditions has been reported, but the physical and cellular interaction in the ERM was studied for the first time

con un MET (Phillips 410). Se observaron 10 secciones delgadas del MER que creció en sustrato contaminado o sin contaminar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tinción con BacLight™ reveló que las bacterias vivas se asociaron con el MER de *G. claroideum* BEG134 y en esporas jóvenes (Figura 1). Hubo acumulación bacteriana a lo largo de las gruesas hifas corredoras y en sus bifurcaciones (Figura 1 A, B). Las hifas corredoras (diámetros >20 μm) forman puntos de entrada en la superficie de las raíces, son el esqueleto del MER en el sustrato y pueden ser transportadoras eficientes en la micorrizosfera y en el suelo (Dodd *et al.*, 2000).

Las bacterias vivas (fluorescencia verde) se observaron en el MER extraído de sustratos contaminados o no. En el sustrato contaminado, las bacterias se observaron fácilmente. Altas concentraciones de metales pueden potencialmente alterar la morfología microbiana (Gardea-Torresdey *et al.*, 1997), haciéndolas más detectables en el suelo contaminado con metales y dando la apariencia de mayor abundancia. En suelos no contaminados, Bianciotto *et al.* (1996a) observaron que las células bacterianas se distribuyeron irregularmente, produciendo aglomeraciones

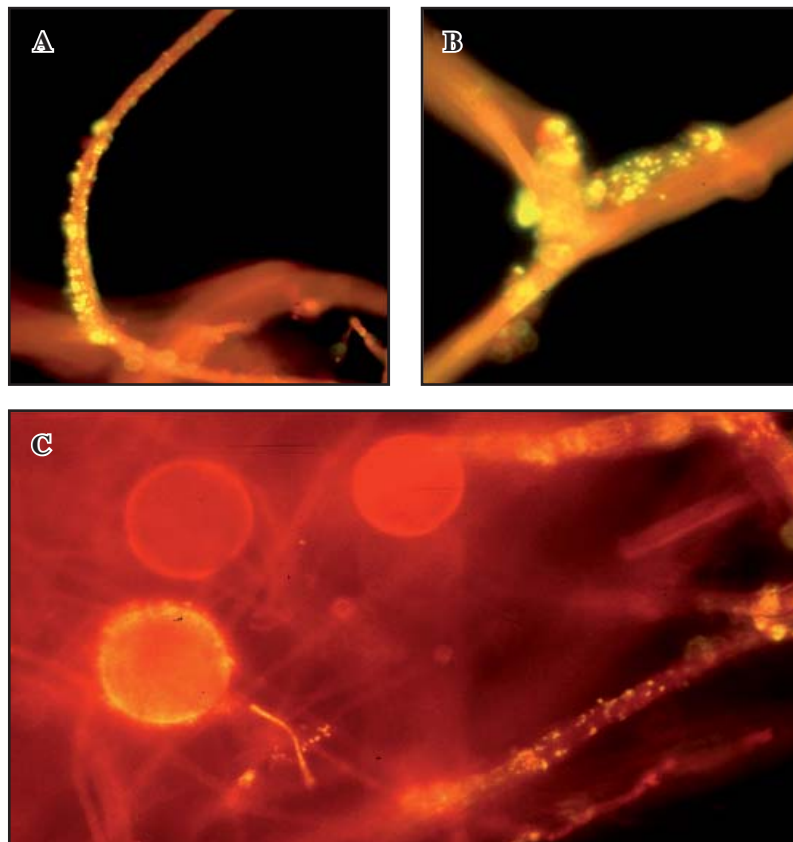


Figure 1. Bacteria associated with the extraradical mycelium of *Glomus claroideum* BEG134 extracted from a polluted substrate and stained with the Live/Dead BacLight Bacteria Viability. A) Bacteria associated with the runner hyphae (magnification 200x); B) bacterial accumulation in bifurcation of hyphae (magnification 400x); C) bacteria associated with a young spore (magnification 200x). Living bacteria fluoresce bright yellow-green.

Figura 1. Bacterias asociadas con el micelio extra-radical de *Glomus claroideum* BEG134 extraído de un sustrato contaminado y teñido con Live/Dead BacLight Bacteria Viability. A) Bacterias asociadas con las hifas corredoras (ampliación 200x); B) acumulación bacteriana en la bifurcación de hifas (ampliación 400x); C) bacterias asociadas con una espora joven (ampliación 200x). Las bacterias vivas tienen fluorescencia verde amarilla brillante.

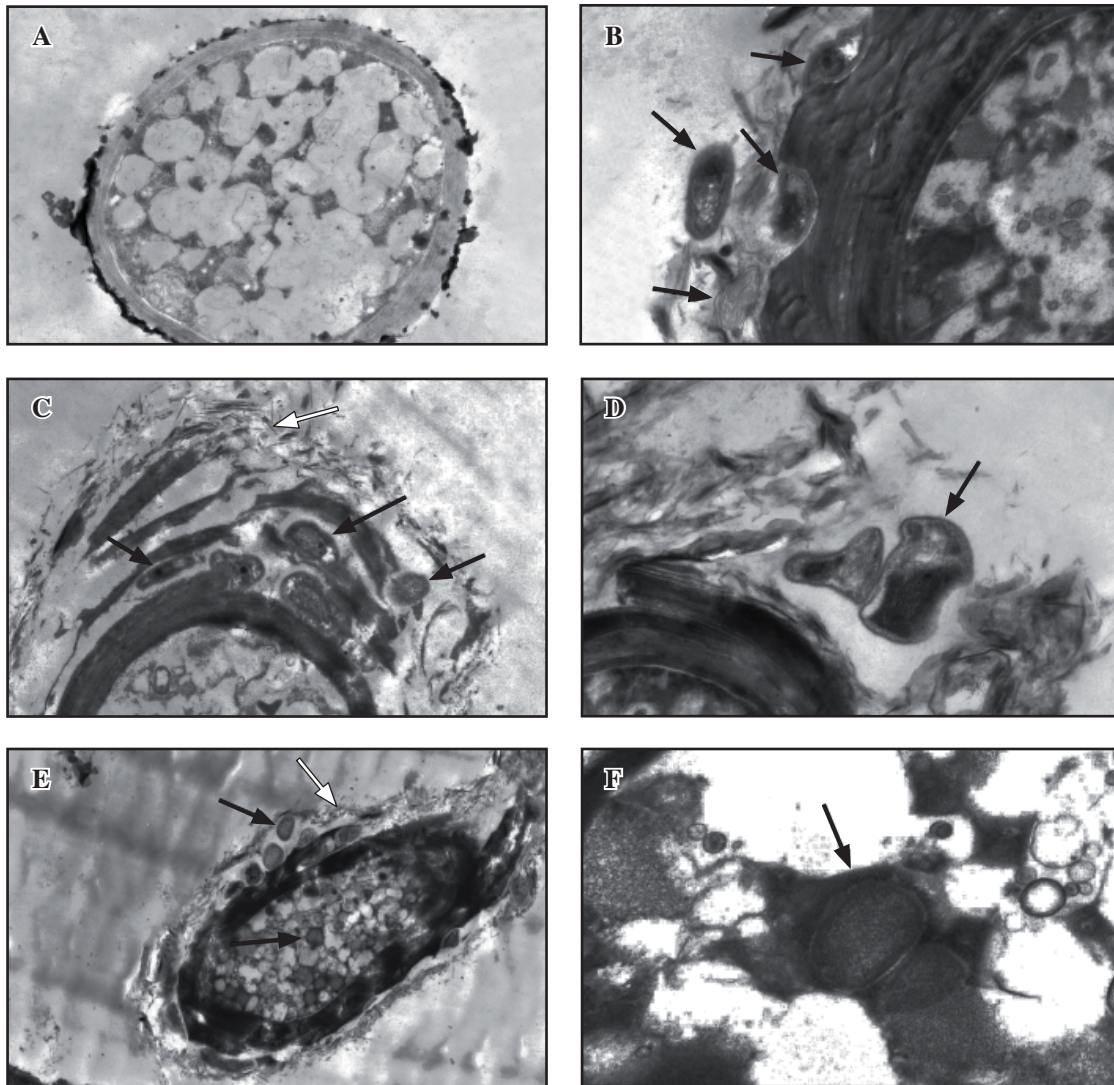


Figure 2. Transmission electron microphotographs of bacteria associated with the extraradical mycelium of *Glomus claroideum* BEG134 when growing in polluted substrate. A) Transversal section of hyphae from extraradical mycelium growing in non-polluted soil (control); B and D) bacteria embedded in the mucilaginous outer hyphal wall (arrows show the variety of bacteria); C) different bacterial morphology (black arrows) and the crystals around the mucilaginous layer on hyphae (white arrow); E) bacteria inside and outside of hyphae (black arrows), and crystals around the hyphae mucilaginous layer (white arrow); F) bacterium growing inside of the hyphae.

Magnifications: A, B, D) 24 000x; C) 11 500x; E) 5400x; F) 34 000x.

Figura 2. Microfotografías electrónicas de transmisión de bacterias asociadas con el micelio extra-radical de *Glomus claroideum* BEG134 cuando crece en un sustrato contaminado. A) Sección transversal de la hifa de micelio extra-radical creciendo en suelo no contaminado (testigo); B y D) bacterias embebidas en la pared hifal externa mucilaginosa (las flechas muestran la variedad de las bacterias); C) morfología bacteriana diferente (flechas negras) y los cristales alrededor de la capa mucilaginosa en la hifa (flecha blanca); E) bacterias dentro y fuera de la hifa (flechas negras), y cristales alrededor de la capa mucilaginosa de la hifa (flecha blanca); F) bacteria creciendo dentro de la hifa.

Ampliaciones: A, B, D) 24 000x; C) 11 500x; E) 5400x; F) 34 000x.

in the present research under polluted soil conditions. Andrade *et al.* (1997) analyzed bacterial population in the hyphosphere (defined by them as soil not adhering to roots) by counting colony-forming units in a non selective medium and identifying it via fatty

alrededor de las hifas de esporas germinadas de *Gi. margarita*.

La microscopía electrónica de transmisión y de fluorescencia demostraron que en condiciones contaminadas, las bacterias vivas se asociaron íntimamente

acid methyl ester analysis (FAME). They found qualitative changes in bacterial communities affected by different AMF in the hyphosphere. Interestingly, successful establishment of *Alcaligenes eutrophus* (reclassified as *Ralstonia eutropha*) in soil depended on the presence of AM fungal hyphae and not on the presence of host roots (Andrade *et al.*, 1998). Using FAME analysis Mansfeld-Giese *et al.* (2002) observed that *Paenobacillus* was mainly associated with the hyphosphere (defined as root-free compartment) of *G. intraradices*, but it was not elucidated whether these bacteria were living in the proximity, on the surface or inside the mycelium. Under unpolluted soil conditions, a *Bacillus cereus* Swedish strain was attached to hyphae of *Glomus dussii* at significantly higher levels than bacterial control strains (Artursson and Jansson, 2003). Toljander *et al.* (2006) also compared the attachment of five different (green fluorescent protein) gfp-tagged bacterial strains to the ERM of *G. claroideum*. These last two reports studied the superficial interaction of the ERM and bacteria, but a more detailed cellular interaction was not attempted.

Different features of the association between bacteria and the ERM under metal polluted soil conditions as well as the superficial and internal bacterial interactions in the ERM were shown in our research. Bacteria were observed outside and inside the ERM; when outside the ERM, they were mainly embedded in the mucilaginous layer on the outer hyphal wall. Using microscopic interference contrast in 3-dimension, González-Chávez *et al.* (2004b) showed the mucilaginous outer cell wall and sloughed material from hyphae of the ERM. Bianciotto *et al.* (1996a) also observed the mucilaginous cell wall in the hyphae of germinated *Gi. margarita* spores, with the formation of interstices and surface irregularities, which was suggested as a preferential bacterial microniche.

In Figure 2 C-D it is shown clearly a remarkable bacterial immersion into the mucilaginous on the hyphal cell wall. Additionally, on the mucilaginous layer on hyphae extracted from the polluted substrate (Figure 2 C, E), but not from non-polluted substrate, abundant crystals were present. These crystals occurred not only around sites where bacteria were embedded, but also in segments of hyphae of *G. claroideum* BEG134 where bacteria were absent (Figure 2 E). This result confirms that the hyphae are participating in the precipitation of Cu at the cell wall (González-Chávez *et al.*, 2002).

The chemical nature of the sloughed mucigel material is unknown, but a protein (glomalin) produced by AMF hyphae, seems to represent this fungal mucigel. Some of its properties are: glomalin is extracted from hyphae of all AMF tested, it is an

al MER de *G. claroideum* BEG134 (Figura 2). Se ha reportado la asociación de bacterias y la hifosfera de los HMA en condiciones no contaminadas, pero la interacción física y celular en el MER en suelos contaminados se estudió por primera vez en la presente investigación. Andrade *et al.* (1997) analizaron la población bacteriana en la hifosfera (definida por ellos como suelo no adherido a la raíz) al cuantificar las unidades formadoras de colonias en un medio no selectivo e identificarlas por análisis de ácidos grasos metil ésteres (AGME). Ellos encontraron que los diferentes HMA en la hifosfera afectaron cualitativamente la comunidad bacteriana. Interesantemente, el establecimiento exitoso de *Alcaligenes eutrophus* (reclasificado como *Ralstonia eutropha*) en el suelo dependió de la presencia de hifas de HMA y no de la presencia de raíces de la plantas hospedante (Andrade *et al.*, 1998). Mansfeld-Giese *et al.* (2002) usaron el análisis de AGME y observaron que la bacteria *Paenobacillus* se asoció principalmente con la hifosfera (definida como compartimiento libre de raíces) de *G. intraradices* pero no se dilucidó si las bacterias estaban viviendo en la proximidad, en la superficie o dentro del micelio. Artursson y Jansson (2003) demostraron que en suelos no contaminados, una cepa sueca de *Bacillus cereus* se unió a las hifas de *Glomus dussii* en niveles significativamente mayores que bacterias testigos. Toljander *et al.* (2006) también compararon la unión de cinco diferentes cepas bacterianas marcadas con la proteína verde fluorescente al MER de *G. claroideum*. Estos dos últimos reportes estudiaron la interacción superficial del MER y bacterias, pero no consideraron una interacción celular más detallada.

La presente investigación muestra diferentes rasgos de la asociación entre bacterias y el MER en condiciones de suelo contaminado con metales, así como las interacciones bacterianas en la superficie y en el interior del MER. Las bacterias se observaron fuera y dentro del MER; fuera del MER las bacterias estaban principalmente embebidas en la lámina mucilaginoso de la pared hifal externa. González-Chávez *et al.* (2004b) usaron el microscopio de contraste de interferencia en tercera dimensión para mostrar la pared mucilaginoso externa y el material producido por la hifa del MER. Bianciotto *et al.* (1996a) también observaron la pared mucilaginoso en hifas de esporas germinadas de *Gi. margarita*, con la formación de intersticios e irregularidades de la superficie, lo cual sugirió ser un micronicho bacteriano preferencial.

En la Figura 2 C-D claramente se muestra una inmersión bacteriana muy marcada dentro de la pared celular mucilaginoso de la hifa. Además, se observan abundantes cristales sobre la pared mucilaginoso de la hifa extraída del sustrato contaminado (Figura 2 C,

insoluble, glue-like and hydrophobic glycoprotein, with N-linked oligosaccharides and 0.8-8% iron (Wright and Upadhyaya, 1998).

As metal sequestration depends on electrostatic characteristics of the fungal wall (Morley and Gadd, 1995), glomalin properties suggest its role in metal immobilization, thus affecting metal bioavailability. González-Chávez *et al.* (2004a) showed that glomalin produced by AMF hyphae is able to sequester Cu and other metals (Cd, Pb and Zn).

By fluorescence microscopy and BacLight™ staining, bacteria were visualized on AMF hyphae from polluted and non-polluted soil conditions; however, by using TEM, we could not observe bacteria in the hyphae from the non-polluted fungal culture (Figure 2A). Therefore, stronger bacterial retention by the AMF hyphae may be occurring under polluted conditions, which would be explained by:

1) Hyphae from As/Cu polluted soil contained metal crystals on their surfaces, which appeared to increase retention of bacteria in the hyphae; then, during sample preparation it is more difficult to wash bacteria off of crystallized hyphal surfaces than non-crystallized surfaces in hyphae from non-polluted cultures.

2) In a more stable bacterial binding, microbial cell components may be involved (Toljander *et al.*, 2006), whereas in polluted conditions more mucigel (glomalin) is produced and bacteria may be embedded and retained in it. In our lab it has been shown that the concentration of glomalin is increased in the presence of metals (Cd and Pb; Cuellar-Sánchez *et al.*, unpublished results), and there is irregular bacterial attachment along the root, depending on the quality of mucigel and the exudates produced by the host (Wiehe *et al.*, 1994).

3) Bacterial ability to stick to the mucigel surface. Bianciotto *et al.* (1996a) observed that *Rhizobium leguminosarum* strain B556 and *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365 heavily colonized fungal surfaces of *Gi. margarita*, but very rare cells of *P. fluorescens* strains CHAO, F113G22 and F113 were found on the fungal surface. Besides, there are major differences in the bacterial strains' ability to attach to hyphae and bacterial attachment may be affected by a diminution in electrostatic attraction by washing the hyphae with strong solutions before microscopic examination (Toljander *et al.*, 2006).

Vancúra *et al.* (1989) showed that the hyphosphere selected gram-negative bacteria from the rhizosphere, but no fluorescent pseudomonads were present. In contrast, in our study, preliminary biochemical

E), pero no en la hifa de sustrato no contaminado. Estos cristales ocurrieron no sólo alrededor de los sitios donde las bacterias estaban embebidas, sino también en segmentos de hifas de *G. claroideum* BEG134 donde no había bacterias (Figura 2E). Este resultado confirma que las hifas participan en la precipitación de Cu en la pared celular (González-Chávez *et al.*, 2002).

Se desconoce la naturaleza química del material mucilaginoso producido, pero una proteína (glomalina), producida por las hifas del MER, parece representar este mucigel fúngico. Algunas de sus propiedades son: la glomalina se extrae de las hifas de todos los HMA probados, es una glicoproteína hidrofóbica, insoluble y parecida a un cemento, tiene oligosacáridos vinculados con N y hierro 0.8-8% (Wright y Upadhyaya, 1998).

Puesto que el secuestro de metales depende de las características electrostáticas de la pared fúngica (Morley y Gadd, 1995), las propiedades de la glomalina sugieren su función en la inmovilización de metales, por lo que afectan su biodisponibilidad. González-Chávez *et al.* (2004a) mostraron que la glomalina, producida por las hifas de los HMA, puede secuestrar Cu y otros metales (Cd, Pb y Zn).

Por microscopia de fluorescencia y tinción con BacLight™, las bacterias se visualizaron sobre las hifas del HMA en las condiciones contaminadas o no; sin embargo, por MET, no se pudieron observar bacterias en las hifas del cultivo de hongo no contaminado (Figura 2A). Por tanto, una retención bacteriana más fuerte por las hifas del HMA puede servir en condición contaminada, lo cual se explicaría por:

1) Las hifas del suelo contaminado con As/Cu contienen cristales de metal en sus superficies que parecen aumentar la retención de bacterias en las hifas. Entonces, hay más dificultad durante los pasos de la preparación de la muestra para lavar las bacterias de la superficie hifal cristalizada que de las superficies hifales no cristalizadas en cultivos no contaminados.

2) En un enlace bacteriano más estable los componentes celulares microbianos pueden estar involucrados (Toljander *et al.*, 2006), mientras que en condiciones contaminadas se produce más mucigel (glomalina), y la bacteria puede ser embebida y retenida en éste. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la concentración de glomalina aumenta en presencia de metales (Cd y Pb; Cuellar-Sánchez *et al.*, resultados no publicados), y hay enlazamiento bacteriano irregular a lo largo de la raíz, dependiendo de la calidad del mucigel y de los exudados producidos por el hospedero (Wiehe *et al.*, 1994).

identification suggested that *Pseudomonas* spp. were present in the ERM and were the most easily isolated from the ERM (data not shown). However, this does not adequately define which bacteria were associated in the ERM because different bacteria forms were microscopically observed *in situ* (Figure 2B-D). Molecular studies should be used to identify culturable and non-culturable bacteria associated with the ERM. Additionally, *in vitro* tolerance tests showed that these bacteria were Cu-tolerant (data not shown). Hence, the ecological relevance of these bacteria interacting with the ERM and their effects on plants and soil under metal-polluted conditions should be studied, since bacteria and AMF adapted to metals alleviate toxicity in their host plants (Vivas *et al.*, 2003, 2006).

Bacteria were also observed inside AMF hyphae in our study (Figure 2 E-F). The association of endobacteria with mycorrhizas was first reported by McDonald and Chandler (1981). Bianciotto *et al.* (1996b) showed that bacteria of the genus *Burkholderia* were endosymbionts in all life cycle stages of *Gi. margarita* as well as in two *Scutellospora* species, but not in different isolates of *Gi. rosea* (Bianciotto *et al.*, 2000). Endobacteria in fungi is not a common event because fungi contain a physically strong cell wall which prevents bacterial penetration (De Boer *et al.*, 2005); however at hyphal tips this occasionally may occur, an event more common in damaged hyphae or when fungi are attacked by lytic bacteria. Levy *et al.* (2003) observed lysis of spores due to bacteria and in our work bacteria were found either encrusted at the outer layers of the hyphal wall or between the layers of the hyphal wall (Figure 2 B-C), especially bacteria in the hyphal cell wall with light degradation (Figure 2B). This may be one of the first events to final penetration involving mycolytic bacterial producers of chitinases, glucanases, proteases and antibiotics acting on living hyphae (Levy *et al.*, 2003). However, this hypothesis needs to be probed in AMF.

Synergistic activities of AMF and bacteria are potentially useful in bioremediation processes often found in heavy metal-polluted areas (Trevors and van Elsas, 1997). In addition, bacteria are important to plants due to their potential to produce siderophores, plant growth-promoting substances, anti-fungal compounds, and participate in the degradation of organic pollutants and in nitrogen fixation (Paulitz and Linderman, 1989; Vancúra *et al.*, 1989).

CONCLUSIONS

The extraradical mycelium of *G. claroideum* BEG134 was intimately associated with a bacterial population when grown in a polluted substrate. This

3) La habilidad bacteriana para adherirse a la superficie del mucigel. Bianciotto *et al.* (1996a) observaron que *Rhizobium leguminosarum* cepa B556 y *Pseudomonas fluorescens* cepa WCS365 colonizaron fuertemente la superficie fúngica de *Gi. margarita*, pero células de *P. fluorescens* CHAO, F113G22 y F113 muy raramente se encontraron en su superficie fúngica. Además, hay grandes diferencias en la habilidad de las cepas bacterianas para unirse a las hifas, y el enlazamiento bacteriano puede ser afectado por una disminución en la atracción electrostática, por el lavado de las hifas con soluciones fuertes antes del examen microscópico (Toljander *et al.*, 2006).

Vancúra *et al.* (1989) mostraron que la hifosfera seleccionó de la rizosfera bacterias gram-negativas, pero no había pseudomonas no fluorescentes. En contraste con este estudio, la identificación bioquímica preliminar sugirió que cepas de *Pseudomonas* spp. estuvieron presentes en el MER y fueron las bacterias más fácilmente aisladas (datos no mostrados). Sin embargo, esto no define adecuadamente cuales bacterias estuvieron asociadas al MER porque diferentes formas bacterianas se observaron microscópicamente *in situ* (Figura 2 B-D). Estudios moleculares deberían usarse para identificar las bacterias cultivables o no asociadas al MER. Adicionalmente, pruebas de tolerancia *in vitro* mostraron que estas bacterias son tolerantes a Cu (datos no mostrados). Por tanto, la importancia ecológica de estas bacterias que interactúan con el MER y sus efectos en plantas y en suelos contaminados con metales debería ser estudiada, porque las bacterias y los HMA adaptados a metales alivian la toxicidad en sus plantas hospederas (Vivas *et al.*, 2003, 2006).

En este estudio también se observaron bacterias dentro de las hifas del HMA (Figura 2 E-F). McDonald y Chandler (1981) fueron los primeros que reportaron la asociación de endobacterias con micorrizas. Bianciotto *et al.* (1996b) demostraron que bacterias del género *Burkholderia* son endosimbiontes en todos los estados del ciclo de vida de *Gi. margarita* y en dos especies de *Scutellospora*, pero no en los diferentes aislados de *Gi. rosea* (Bianciotto *et al.*, 2000). Las endobacterias no son un evento común en hongos, porque los hongos contienen una pared celular físicamente fuerte, la cual previene la penetración bacteriana (De Boer *et al.*, 2005); sin embargo, esto puede ocurrir ocasionalmente en las puntas hifales, un evento más común en hifas dañadas o cuando los hongos son atacados por bacterias líticas. Levy *et al.* (2003) observaron lisis de esporas debido a bacterias y en el presente trabajo se encontraron bacterias incrustadas en las láminas externas de la pared hifal o entre las láminas de éstas (Figura 2 B-C), especialmente bacterias en la pared hifal con ligera

kind of association may have important ecological contributions to plant survival, metal tolerance and nutrition. However, the ecological role of AMF and soil microbial associates should be elucidated by studying microbial interactions under polluted conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The critical review from Sara F. Wright and anonymous referees is greatly appreciated. CGC thanks Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera and M.C. Iván Mauricio Andrade Luna for their initial help with the graphic work. This paper is part of the project research SEMARNAT-CONACYT C0-01-2002-739.

LITERATURE CITED

- Anderson, T. A., E. A. Guthrie, and B. T. Walton. 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630-2636.
- Andrade, G., K. L. Mihara, R. G. Linderman, and G. J. Bethlenfalvay. 1997. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 192: 71-79.
- Andrade, G., R. G. Linderman, and G. J. Bethlenfalvay. 1998. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Soil* 202: 79-87.
- Artursson, V., and J. K. Jansson. 2003. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6208-6215.
- Bianciotto, V., and P. Bonfante. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 365-371.
- Bianciotto, V., E. Lumini, L. Lanfranco, D. Minerdi, P. Bonfante, P., and S. Perotto. 2000. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belong to the family Gigasporaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4503-4509.
- Bianciotto, V., C. Bandi, D. Minerdi, M. Sironi, H. Volker Tinchì, and P. Bonfante. 1996a. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3005-3010.
- Bianciotto, V., D. Minerdi, S. Perotto, and P. Bonfante. 1996b. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193: 123-131.
- de Boer, W., L. B. Folman, R. C. Summerbell, and L. Body. 2005. Living in a living world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 795-811.
- Dodd, J. C., C. L. Boddington, A. Rodríguez, M. C. González-Chávez, and I. Mansur. 2000. Hyphae of AMF from different genera in planta: form, function and detection with isozymes. *Plant Soil* 226: 135-153.
- Gadd, G. M. 1993. Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25-60.
- Gardea-Torresdey, J. L., I. Cano-Aguilera, H. Webb, and F. Gutiérrez-Corona. 1997. Enhanced copper absorption and morphological alterations of cell of copper stressed *Mucor rouxii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 435-441.
- Gerdemann, J. W., and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- González-Chávez, C., J. D'Haen, J. Vangrosveld, and J. C. Dodd. 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* 240: 287-297.
- González-Chávez, M. C., R. Carrillo-González, K. Nichols, and S. F. Wright. 2004a. The role of glomalín, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Poll.* 130: 317-323.
- González-Chávez, M. C., M. C. Gutiérrez Castorena, y S. F. Wright. 2004b. Hongos micorrízicos arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad. *Terra Latinoamericana* 22: 507-514.
- Levy, A., B. J. Chang, L. K. Abbott, J. Kuo, G. Garnett, and T. J. Inglis. 2003. Invasion of spores of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6250-6256.
- Linderman, R. G. 2001. Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases. *In: Kapulnik, Y., and D. D. Douds* (eds). *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp: 345-365.
- Lindsay, W. L., and W. A. Norvel. 1978. Development of a DTPA test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sc. Soc. Am. J.* 42: 421-428.
- Lynch, J. M. 1990. *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons. New York, USA. 274 p.

CONCLUSIONES

El micelio extra-radical de *G. claroideum* BEG134 estuvo íntimamente asociado con una población bacteriana cuando creció en un sustrato contaminado. Esta clase de asociación puede tener importantes contribuciones ecológicas para la supervivencia de la planta, la tolerancia a metales y la nutrición. Sin embargo, la función ecológica de los HMA y los asociados microbianos del suelo debe dilucidarse con más estudios sobre interacciones microbianas en condiciones de contaminación.

—Fin de la versión en Español—



- Mansfeld-Giese, K., J. Larsen, and L. Bødker. 2002. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. FEMS Microbiol. Ecol. 41: 133-140.
- McDonald, R. M., and M. R. Chandler. 1981. Bacterium-like organelles in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*. New Phytol. 89: 241-246.
- Minerdi, D., R. Fani, R. Gallo, A. Boarion, and P. Bonfante. 2001. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. Appl. Environ. Microbiol. 67: 725-732.
- Morley, G. F., and G. M. Gadd. 1995. Sorption of toxic metals by fungi and clay minerals. Mycol. Res. 99: 1429-1438.
- Paulitz, T. C., and R. G. Linderman. 1989. Interactions between fluorescent *Pseudomonads* and VA mycorrhizal fungi. New Phytol. 113: 37-45.
- Toljander, J. F., V. Artursson, R. L. Paul, J. K. Jansson, and R. D. Finlay. 2006. Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. FEMS Microbiol. Letters 254: 34-40.
- Trevors, J. T., and K. D. van Elsas. 1997. Microbial interactions in soil. In: van Elsas, J. D., J. T. Trevors, and E. M. H. Wellington (eds). Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker. New York, USA. pp: 215-243.
- Vancúra, V., M. O. Orozco, O. Grauova, and Z. Prikryl. 1989. Properties of bacteria in the hyphosphere of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Agric. Ecosystem Environ. 29: 421-427.
- Vivas, A., I. Vörös, B. Biró, J. M. Ruiz-Lozano, and R. Azcón. 2003. Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus brevis* in improving plant tolerance to Cd contamination. Appl. Soil Ecol. 24: 177-186.
- Vivas, A., B. Biró, J. M. Ruiz-Lozano, J. M. Barea, and R. Azcón. 2006. Two bacterial strains isolated from Zn-polluted soil enhanced plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn toxicity. Chemosphere 62: 1523-1533.
- Walley, F. L., and J. J. Germida. 1996. Failure to decontaminate *Glomus clarus* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. Mycorrhiza 6: 43-49.
- Wiehe, W., C. Hecht-Buchholz, and G. Hoflich. 1994. Electron microscopic investigations on root colonization of *Lupinus albus* and *Pisum sativum* with two associative plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Symbiosis 17: 15-31.
- Wright, S. F., and A. Upadhyaya. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 198: 97-107.