



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

TESIS

**Caracterización y evaluación del potencial uso biotecnológico de hongos
resistentes a Cadmio y Plomo, aislados a partir de ambientes altamente
contaminados con residuos mineros**

QUE PRESENTA:

LBT. Denisse Elibeth Ramos Suarez

**PARA OBTAR POR EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TUTORES

Dr. Francisco Javier Avelar González

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORIAL

Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera

Aguascalientes, Ags, 22 de noviembre de 2024

UNIVERSIDAD AGUASCALIENTES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Mto. En C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **DENISSE ELIBETH RAMOS SUAREZ** con ID **227669** quien realizó la tesis titulado: **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO DE HONGOS RESISTENTES A CADMIO Y PLOMO, AISLADOS A PARTIR DE AMBIENTES ALTAMENTE CONTAMINADOS CON RESIDUOS MINEROS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 04 de abril de 2025.


Dr. Francisco Javier Avelar González
Tutor de tesis

c.c.p. - Interesado
c.c.p. - Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Técnico del Posgrado
Revisado por: Depto. Control Externofacultad, División de Calidad
Aprobado por: Depto. Control Externofacultad, Depto. Técnico del Posgrado

Código: 00-100-10-01
Actualización: 03
Fecha: 17/02/19

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES
CIBIOTECNOLÓGICAS

Mto. En C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **DENISSE ELIBETH RAMOS SUAREZ** con ID 137669 quien realizó la tesis titulado **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO DE HONGOS RESISTENTES A CADMIO Y PLOMO, AISLADOS A PARTIR DE AMBIENTES ALTAMENTE CONTAMINADOS CON RESIDUOS MINEROS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 04 de abril de 2025.


Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Tutor de tesis

C. C. B. - Interizado.
c.c.p. - Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: María - Manual del Programa.
Revisado por: Terece - Comité Académico/Docente - Comité de Calidad.
Aprobado por: Terece - Comité Académico/Docente - Comité de Programa.

Código: DC-185-FS-01
Actualización: 03
Fecha de: 17/05/19

UNIVERSIDAD DE CALDAS

Mto. En C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESORA** designado del estudiante **DENISSE ELIBETH RAMOS SUAREZ** con ID 137669 quien realizó la tesis titulado: **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO DE HONGOS RESISTENTES A CADMIO Y PLOMO, AISLADOS A PARTIR DE AMBIENTES ALTAMENTE CONTAMINADOS CON RESIDUOS MINEROS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 04 de abril de 2025.


Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera
Asesora de tesis

C.C.P. - Interesado
C.C.P. - Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Progreso
Revisado por: Decano Centro Escolar/Decano Asesoría de Calidad
Aprobado por: Decano Centro Escolar/ Decano Apoyo al Progreso

Código: DO-48-PO-01
Actualización: 13
Fecha: 17/03/19



biology
an Open Access Journal by MDPI







CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

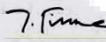
The certificate of acceptance for the manuscript (**biology-3661344**) titled:
Tolerance to cadmium and lead of filamentous fungi isolated from contaminated mining soils.

Authored by:
Denisse Elibeth Ramos Suarez; Arturo Gerardo Valdivia Flores; Alma Lilián Guerrero Barrera; Oscar Abraham Flores Amaro; Laura Yamamoto Flores; J. Felix Gutiérrez Corona; Juan Carlos Bautista Bautista; Francisco Javier Avelar González

was accepted in *Biology* (ISSN 2079-7737) on 10 June 2025



Prof. Dr. Andrés Moya
Editor-in-Chief



Prof. Dr. Jukka Finne
Editor-in-Chief

Article

Cadmium and Lead Tolerance of Filamentous Fungi Isolated from Contaminated Mining Soils

Denisse Elibeth Ramos Suárez ^{1,†}, Arturo Gerardo Valdivia-Flores ^{2,*}, Alma Lilián Guerrero Barrera ^{3,†}, Oscar Abraham Flores Amaro ^{4,†}, Laura Yamamoto Flores ⁵, J. Felix Gutiérrez Corona ^{6,†}, Juan Carlos Bautista Bautista ⁸ and Francisco Javier Avelar González ^{7,9,†}

- ¹ Laboratorio de Genética Ambiental, Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20260, Mexico; denisse@uag.mx (D.E.R.S.) or carlos@uag.mx (J.C.B.B.) (Emails corresponding to authors D.E.R.S. and J.C.B.B.)
- ² Laboratorio de Investigación en Salud Ambiental, Departamento de Ciencias Ambientales, Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20264, Mexico
- ³ Laboratorio de Biología Celular y Tissue, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20262, Mexico; alguerrero@uag.mx
- ⁴ Laboratorio de Genética y Biología de Microorganismos, Departamento de Biología, Centro de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Guanajuato 36050, Mexico; ofg@uag.mx (O.A.F.A.)
- ⁵ Correspondence: gerardov@uag.mx (A.G.V.-F.); javelar@uag.mx (F.J.A.G.); Tel.: +52-449-933-7600 (ext. 51267) (A.G.V.-F.); +52-449-933-7600 (ext. 51267) (F.J.A.G.)

Simple Summary: Soil pollution caused by metals like lead and cadmium, particularly in mining regions, presents a significant risk to the ecosystem and to the health of nearby people and animals. This study was carried out in a location with historical mining activity, where soil samples were collected to identify fungi that thrive in such challenging environments. The objective was to determine which fungi exhibited tolerance to these metals and if this tolerance influenced their growth patterns. Six fungi were found to grow in environments with elevated levels of lead or cadmium. Two of them exhibited greater tolerance than those reported in earlier research. These findings suggest that fungi can adapt to severely contaminated habitats, and although this work provides an initial overview, it marks an important step toward recognizing the importance of local species in this region, which could help mitigate damage to the environment and public health.

Abstract: Heavy metal contamination in soil, especially cadmium (Cd) and lead (Pb), poses serious environmental and health risks, particularly in mining regions. While this contamination affects most organisms present in such areas, some filamentous fungi proliferate and immobilize metals in uncontaminated areas. In this work, six filamentous fungi tolerant to high concentrations of these metals were identified by macroscopic and microscopic morphological characteristics, as well as molecularly, through conserved regions of internal transcribed spacers (ITS). Tolerance to Cd and Pb was evaluated in solid and liquid culture media, and half the maximum inhibitory concentration (IC₅₀) was assessed. Pb tolerance was observed in *Penicillium simplicissimum*, *Pezizomyces ilicinus*, and *Rhizopus microsporus* (IC₅₀: 3874, 1176, and 211.80 mg/L). Cd tolerance was also noted in *Penicillium ilicinus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus microsporus*, and *Cunninghamella* sp. (IC₅₀: 311, 223, 29.25, and 25.18 mg/L). These findings indicate that these fungi have adopted effective strategies for survival in contaminated environments and emphasize their potential for future applications in the bioremediation of multi-metal-contaminated soils. This research lays the groundwork for exploring tolerance mechanisms and evaluating the efficacy of native fungal isolates in mitigating heavy metal contamination.



Received: 9 May 2025
Revised: 8 June 2025
Accepted: 13 June 2025
Published: 23 June 2025

Citation: Ramos Suárez, D.E.; Valdivia-Flores, A.G.; Guerrero Barrera, A.L.; Flores Amaro, O.A.; Yamamoto Flores, L.; Gutiérrez Corona, J.F.; Bautista Bautista, J.C.; Avelar González, F.J. Cadmium and Lead Tolerance of Filamentous Fungi Isolated from Contaminated Mining Soils. *Biology* **2025**, *14*, 608. <https://doi.org/10.3390/biology14060608>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirme realizar este posgrado y por darme acceso a todas las instalaciones que se necesitaron. También reconozco el apoyo del Laboratorio de Estudios Ambientales y el Laboratorio de Investigación en Salud Animal por proporcionarme todo lo necesario para desarrollar esta investigación, al Dr. Francisco Javier Avelar González y al Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores por su apoyo en la tutoría de este proyecto y a la Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera por su asesoría durante todo el proyecto. A Laura Yamamoto Flores por su apoyo técnico y moral, y a el Dr. Oscar Abraham Flores Amaro por su apoyo y guía para la realización de esta investigación. Un agradecimiento a Areli encargada del Microscopio electrónico de barrido por su apoyo y paciencia en la visualización de las muestras.

Gracias al SECIHTI por proporcionarme el apoyo con la beca No. 811213, brindada durante el proyecto, así como la Universidad de Guanajuato por el apoyo en mi estancia académica realizada durante una etapa de la investigación, al Laboratorio de Genética y Bioquímica de Microorganismos donde me apoyaron los doctores J. Félix Gutiérrez Corona y Juan Carlos Bautista Bautista.

Agradezco con todo con todo mi corazón a la Dra. Carolina Cassandra Barajas García y a la Dra. Norma Angelica Chávez Vela por su gran apoyo en mis momentos de oscuridad, su retroalimentación y apoyo emocional. A mis amigos que nunca me dejaron caer y siempre están orgullosos de cada paso que doy.

Gracias a Katy por acompañarme en el trayecto de la investigación y el ambiente del Laboratorio. Gracias a Thanya por siempre estar abierta a ayudarme y por todo su apoyo cuando sentía que ya no podía más y por ser la persona que me ha impulsado a ser mejor.

A mis padres por ser el sostén de mi vida y apoyarme cada que lo necesitaba, por estar orgullosos por cada título que llevo a casa, a mi familia por siempre apoyarme y quererme como soy y a mi pequeño Orion que me ha mantenido en esta vida queriéndome incondicionalmente y esperando por mi en casa.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL..... 1

ÍNDICE DE TABLAS 4

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS 4

RESUMEN 7

ABSTRACT 8

INTRODUCCIÓN 9

1. ANTECEDENTES..... 10

 1.1 Minería en México..... 10

 1.2 Concepción del oro, Zacatecas..... 10

 1.3 Determinación de la concentración de Arsénico en suelos de Concepción del Oro..... 11

 1.4 Caracterización de la zona contaminada y aislamiento de hongos..... 12

2. MARCO TEÓRICO 14

 2.1 El suelo 14

 2.1.1 ¿Qué es el Suelo?..... 14

 2.1.2 Importancia del suelo 14

 2.1.3 Calidad del suelo 16

 2.1.4 Contaminación del suelo 16

 2.2 Microorganismos en suelo 19

 2.2.1 Hongos en suelo 19

 2.3 Los metales en las células fúngicas..... 20

 2.3.1 Plomo y cadmio..... 21

3.	JUSTIFICACIÓN.....	25
4.	HIPÓTESIS.....	25
5.	OBJETIVOS.....	25
	Objetivo General.....	25
	Objetivos Particulares.....	25
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1	Caracterización morfológica.....	26
6.2	Mantenimiento de cepas.....	26
	6.2.1 Conservación de hongos en agua destilada.....	26
6.3	Resistencia a altas concentraciones de Cd o Pb.....	27
6.4	Caracterización molecular de aislados resistentes.....	27
	6.4.1 Obtención de cultivos monospóricos e identificación.....	28
	6.4.2 Extracción de ADN genómico.....	28
	6.4.3 Amplificación de genes con PCR.....	29
	6.4.4 Purificación, clonación y secuenciación de productos amplificados..	29
6.5	Concentración de metal que inhibe el 50% del crecimiento (IC ₅₀).....	31
6.6	Inmovilización de Cd o Pb por los hongos.....	31
	6.6.1 Espectroscopia Infrarroja (FTIR).....	32
	6.6.2 Microscopio electrónico de barrido (SEM-EDX).....	32
7.	RESULTADOS.....	33
7.1	Caracterización morfológica.....	33
7.2	Resistencia a altas concentraciones de Cd y Pb.....	36
7.3	Caracterización molecular de aislados resistentes.....	41
7.4	Concentración de metal que inhibe 50% del crecimiento (IC ₅₀).....	46

7.5 Espectroscopia Infrarroja transformada de Fourier (FTIR)..... 49

7.6 SEM y EDX..... 51

8. DISCUSIÓN 58

9. CONCLUSIÓN 63

10. REFERENCIAS..... 64



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 VALORES MÁXIMOS ENCONTRADOS EN LOS SITIOS DE MUESTREO DE CONCEPCIÓN DEL ORO, ZAC.....	13
TABLA 2 CONCENTRACIONES DE REFERENCIA TOTALES (CRT) POR TIPO DE USO DE SUELO. OBTENIDO DE NOM-147-SEMARNAT-2004.....	18
TABLA 3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS, MICROSCÓPICAS DE LOS GÉNEROS IDENTIFICADOS. IMAGEN REPRESENTATIVA DE CADA GRUPO.....	33
TABLA 4 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS RESISTENTES A Cd O Pb OBTENIDOS DE SUELOS CONTAMINADOS POR JALES MINEROS; COMPARADOS CON SECUENCIAS EXISTENTES EN EL NCBI A TRAVÉS DE LA HERRAMIENTA BLAST.	42
TABLA 5 INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO AL 50% (IC50) DE LOS HONGOS RESISTENTES A Cd AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS CON JALES MINEROS.....	46
TABLA 6 INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO AL 50% (IC50) DE LOS HONGOS RESISTENTES A Pb AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS CON JALES MINEROS.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

FIGURA 1 MAPA OFICIAL DE LOS CENTROS MINEROS DEL PAÍS OBTENIDO DE GARCÍA AGUIRRE, 2012	10
FIGURA 2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL MUNICIPIO DE CONCEPCIÓN DEL ORO	11
FIGURA 3 SITIOS DE MUESTREO EN DEPORTIVA DE CONCEPCIÓN DEL ORO, ZACATECAS.....	12
FIGURA 4 SITIO 1 PARA LA TOMA DE MUESTRAS. JALES MINEROS DE CONCEPCIÓN DEL ORO. ZACATECAS, COORDENADAS: 24°36'42"N, 101°24'43"O (WWW.GOOGLEEARTH.COM)....	12
FIGURA 5 SITIO 2 PARA LAS MUESTRAS. UNIDAD DEPORTIVA DE CONCEPCIÓN DEL ORO ZACATECAS, COORDENADAS 24°36'48"N, 101°24'49"O. ZONA A (CANCHA DE FUTBOL), ZONA B (CANCHA DE BEISBOL), ZONA C (ZONA DE ESCORIA) Y ZONA D (ZONA DE MONTAÑA) (WWW.GOOGLEEARTH.COM).....	13
FIGURA 6 AISLADO Os 1 RESISTENTE HASTA 11 000 MG/L DE Pb PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO. MÉTODO MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LA COLONIA, DE <0.1 CM	37
FIGURA 7 AISLADO Os 6 RESISTENTE HASTA 6 000 MG/L DE Pb PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO. MÉTODO MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LA COLONIA, DE <0.1 CM	37

FIGURA 8 AISLADO Os 7 RESISTENTE HASTA 6 000 MG/L DE Pb PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO. MÉTODO MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LA COLONIA, DE <0.1 CM 38

FIGURA 9 AISLADO Os 6 RESISTENTE HASTA 1050 MG/L DE Cd PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO. MÉTODO MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LA COLONIA, DE <0.1 CM 39

FIGURA 10 AISLADO Os30 RESISTENTE HASTA 550 MG/L DE Cd PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO. MÉTODO MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LA COLONIA, DE <0.1 CM 40

FIGURA 11 AISLADO Os10 RESISTENTE HASTA 550MG/L DE Cd PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO. MÉTODO MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LA COLONIA, DE <0.1 CM 40

FIGURA 12 AISLADO Os27 RESISTENTE HASTA 550MG/L DE Cd PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO. MÉTODO MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LA COLONIA, DE <0.1 CM 41

FIGURA 13 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DE LOS PRODUCTOS DE PCR AMPLIFICADOS DE LA REGIÓN ITS CARRILES: 1-6 AISLADOS RESISTENTES A Cd O Pb, 9 MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 PB)..... 41

FIGURA 14 INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS DE HONGOS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Cd. LA LÍNEA ROJA INDICA EL VALOR DE IC50 PARA CADA AISLADO. A) PAECILOMYCES LILACINUS, 311.3 MG/L; B) FUSARIUM OXYSPOURUM, 223 MG/L; C) RHIZOPUS MICROSPORUS, 29.2 MG/L; D) CUNINGHAMELLA SP, 25.18 MG/L. VALOR Sx.Y ES LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR ARROJADA POR EL PROGRAMA GRAPHPAD PRISM 9.0.0. ... 47

FIGURA 15 INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS DE HONGOS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Pb. LA LÍNEA ROJA INDICA EL VALOR DE IC50 PARA CADA AISLADO. A) PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM, 3874 MG/L; B) PAECILOMYCES LILACINUS, 1176 MG/L; C) RHIZOPUS MICROSPORUS, 211.8 MG/L. VALOR Sx.Y ES LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR ARROJADA POR EL PROGRAMA GRAPHPAD PRISM 9.0.0 48

FIGURA 16 ESPECTROS INFRARROJO TRANSFORMADA DE FOURIER DEL 400 AL 4000 CM-1 PARA LOS HONGOS RESISTENTES A Pb, EN ROJO SE MARCAN LOS PICOS MÁS RELEVANTES ENCONTRADOS PARA LA MUESTRA BIOLÓGICA. 49

FIGURA 17 ESPECTROS INFRARROJO TRANSFORMADA DE FOURIER DEL 400 AL 4000 CM-1 PARA LOS HONGOS RESISTENTES A Cd, EN ROJO SE MARCAN LOS PICOS MÁS RELEVANTES ENCONTRADOS PARA LA MUESTRA BIOLÓGICA. 50

FIGURA 18 MICROFOTOGRAFÍAS DEL HONGO *PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM* EN CONDICIONES DE CONTROL (A, B, C) Y EN TRATAMIENTO CON LA CONCENTRACIÓN DE 3874 MG/L Pb (D, E, F)..... 51

FIGURA 19 MICROFOTOGRAFÍAS DEL HONGO *PAECILOMYCES LILACINUS* EN CONDICIONES DE CONTROL (A, B, C) Y EN TRATAMIENTO CON LA CONCENTRACIÓN DE 1176 MG/L Pb (D, E, F)..... 52

FIGURA 20 MICROFOTOGRAFÍAS DEL HONGO *RHIZOPUS MICROSPORUS* EN CONDICIONES DE CONTROL (A, B, C) Y EN TRATAMIENTO CON LA CONCENTRACIÓN DE 211.8 MG/L Pb (D, E, F)..... 53

FIGURA 21 MICROFOTOGRAFÍAS DEL HONGO *PAECILOMYCES LILACINUS* EN CONDICIONES DE CONTROL (A, B, C) Y EN TRATAMIENTO CON LA CONCENTRACIÓN DE 311.3 MG/L Cd (D, E, F)..... 54

FIGURA 22 MICROFOTOGRAFÍAS DEL HONGO *RHIZOPUS MICROSPORUS* EN CONDICIONES DE CONTROL (A, B, C) Y EN TRATAMIENTO CON LA CONCENTRACIÓN DE 29.25 MG/L Cd (D, E, F)..... 55

FIGURA 23 MICROFOTOGRAFÍAS DEL HONGO *FUSARIUM OXYSPORUM* EN CONDICIONES DE CONTROL (A, B, C) Y EN TRATAMIENTO CON LA CONCENTRACIÓN DE 223 MG/L Cd (D, E, F)..... 56

FIGURA 24 MICROFOTOGRAFÍAS DEL HONGO *CUNINGHAMELLA SP.* EN CONDICIONES DE CONTROL (A, B, C) Y EN TRATAMIENTO CON LA CONCENTRACIÓN DE 25.18 MG/L Cd (D, E, F)..... 57

GRÁFICA 1 GÉNEROS ENCONTRADOS DE LOS 57 AISLADOS DE CONCEPCIÓN DEL ORO, SE MUESTRA LA FRECUENCIA CON LA QUE SON ENCONTRADOS EN ESTOS SUELOS. 35

GRÁFICA 2 RESISTENCIA EN PLACA A PLOMO EN MEDIO DE CULTIVO SOLIDO DE LOS 57 AISLADOS DE CONCEPCIÓN DEL ORO. LMP: LIMITE MAXIMO PERMISIBLE 400 MG/KG SEGUN LA NOM-147-SEMARNAT-2004 36

GRÁFICA 3 RESISTENCIA EN PLACA A CADMIO EN MEDIO DE CULTIVO SOLIDO DE LOS 57 AISLADOS DE CONCEPCIÓN DEL ORO. LMP: LIMITE MAXIMO PERMISIBLE 37 MG/KG SEGUN LA NOM-147-SEMARNAT-2004 39

RESUMEN

El cadmio y plomo son dos metales pesados tóxicos que usualmente contaminan el suelo en lugares cercanos a las actividades mineras. Aunque esta contaminación afecta a los organismos, algunos hongos filamentosos prosperan e inmovilizan los metales de las áreas contaminadas. Se aislaron 57 hongos filamentosos de muestras de suelo contaminados con residuos mineros (jales mineros) de tres zonas de Concepción del Oro, Zacatecas, México los hongos se identificaron mediante características morfológicas macroscópicas y microscópicas, así como se caracterizaron molecularmente a partir de regiones conservadas de los espaciadores transcritos internos (ITS). Se evaluó la tolerancia a Cd y Pb en medio de cultivo sólido y líquido de papa dextrosa y se estimó la concentración media de inhibición de crecimiento (IC_{50}) respectiva. Se detectó la tolerancia al Pb en *Penicillium simplicissimum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Rhizopus microsporus* (IC_{50} : 3 874, 1 176 y 211.8 mg/L). También se detectó tolerancia al Cd en *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus microsporus* y *Cunninghamella sp* (IC_{50} : 311.3, 223, 29.25 y 25.18 mg/L). Además, se reveló que estos hongos son capaces de inmovilizar estos metales. Estos hallazgos sugieren que estos aislados fúngicos autóctonos poseen potencial para biorremediar los suelos contaminados, lo cual los hace importantes en la mitigación de la contaminación del suelo por metales.

ABSTRACT

Cadmium and lead are two toxic heavy metals that usually pollute soils surrounding mining areas. Even though this contamination affects most organisms present in those areas, some filamentous fungi thrive and immobilize metals in contaminated areas. In this work 57 filamentous fungi were isolated from contaminated soil samples with mining tailings from three zones in Concepcion del Oro, Zacatecas, Mexico. The isolates were identified by macroscopic and microscopic morphological characteristics, as well as molecularly, through conserved regions of internal transcribed spacers (ITS). Tolerance to Cd and Pb was evaluated in solid and liquid culture media, and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was evaluated. Tolerance to Pb was analyzed in *Penicillium simplicissimum*, *Paecilomyces lilacinus* and *Rhizopus microsporus* (IC_{50} : 3874, 1176 and 211.8 mg/L). Also, tolerance to Cd was detected in *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus microsporus* and *Cunninghamella sp* (IC_{50} : 311.3, 223, 29.25 and 25.18 mg/L). Additionally, these fungi demonstrated the ability to immobilize these metals. These findings suggest that these native fungal isolates have the potential to bioremediate contaminated soils, making them valuable for mitigating soil contamination by heavy metals.

INTRODUCCIÓN

En México, la minería representa una actividad económica clave, especialmente en regiones como el bajío y zacatecas, con un impacto significativo en aspectos empresariales, gubernamentales y medioambientales. Concepción del Oro en Zacatecas se destaca por sus abundantes recursos minerales. Sin embargo, la explotación de estos genera contaminantes en el suelo que pueden llegar a los mantos acuíferos y dañan a las especies presentes en el ambiente. Estudios recientes han identificado niveles críticos de arsénico, cadmio y plomo en suelos de áreas recreativas lo que refuerza la necesidad de estrategias de remediación o inmovilización de los contaminantes.

Los suelos contaminados en zonas mineras presentan características adversas para la vida vegetal y microbiana, aunque se ha observado el desarrollo de microorganismos resistentes, como hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, con potencial para la biorremediación mediante la inmovilización de metales por biosorción. La contaminación del suelo afecta no solo su calidad y funciones ecosistémicas, como la producción de alimentos y el almacenamiento de agua, sino también la biodiversidad microbiana esencial para los ciclos biogeoquímicos. Por ello, es fundamental implementar prácticas sostenibles y aprovechar el potencial de estos microorganismos para mitigar los efectos negativos de la minería.

En este estudio se identificaron hongos autóctonos resistentes a altas concentraciones de Cadmio o Plomo en suelos contaminados con jales mineros. Géneros como *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Fusarium* mostraron resistencia a estos metales pesados con valores superiores a los límites máximos permisibles indicados en la normatividad mexicana. Estos hongos exhibieron cambios morfológicos y una notable adaptación a las altas concentraciones de metales. Los resultados subrayan el potencial de los hongos para inmovilizar los suelos contaminados con Cd y Pb, gracias a la interacción de grupos funcionales en sus paredes celulares como aminas, carboxilos y sulfhídricos. Se resalta la importancia del ambiente de origen en las capacidades adaptativas de los microorganismos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. ANTECEDENTES

1.1 Minería en México

En México las explotaciones mineras de larga duración son una parte importante. Por la fuente de ingresos la minería es significativa en la vida de las comunidades de la nación. Las actividades mineras han cobrado auge, su alcance nacional deriva de los aspectos involucrados: empresariales, gubernamentales, laborales, medioambientales; estas en conjunto evidencian la importancia estratégica para el desarrollo nacional, así como su relevancia geopolítica (García Aguirre, 2012).

Las empresas mineras constituyen el cuarto rubro más importante de la economía nacional. Teniendo el mayor peso en la región bajío (Figura 1). Siendo una de las principales zonas mineras Zacatecas. (García Aguirre, 2012)



Figura 1 Mapa oficial de los centros mineros del país obtenido de García Aguirre, 2012

1.2 Concepción del oro, Zacatecas

Concepción del Oro, municipio del estado de Zacatecas, ubicado al Noroeste del estado ($24^{\circ}36'42''N$, $101^{\circ}24'43''O$ y $24^{\circ}36'48''N$, $101^{\circ}24'49''O$) (Figura 2), cuenta con grandes yacimientos de oro, hierro, plata, zinc, plomo y cobre (INEGI, 2016).



Figura 2 Ubicación geográfica del municipio de Concepción del Oro

Esta región explota los minerales como principal actividad, dentro de estos se encuentra el plomo, cobre, zinc, plata y oro, además de que en algunos puntos del municipio se localizan depósitos de mármol de diferentes colores, ónix y cuarzo que se pueden encontrar en la superficie, existen alrededor de 800 hectáreas para la explotación (Flores Amaro, 2024).

Debido a la explotación de estos minerales y metales se generan desechos altamente nocivos para la salud de todo ser vivo, entre los cuales se encuentra el cadmio y el mismo plomo, que junto con el arsénico son de los metales más tóxicos para la salud de todo organismo vivo. (INEGI, 2016).

1.3 Determinación de la concentración de Arsénico en suelos de Concepción del Oro

En el 2010 Medrano-Monreal obtuvo 15 muestras de 3 zonas mostradas en la Figura 3 esta área de muestreo es una unidad deportiva (zona de recreación) donde acude la población en general. De estos suelos se cuantificó la cantidad de Arsénico mediante la técnica de energía dispersa de fluorescencia de rayos X, y se obtuvieron niveles muy altos de este elemento, siendo la zona 1 la que contenía mayor cantidad con 741.6 ppm, seguida de la zona 3 con 593.4 ppm y al final la zona 2 con 187.7 ppm, estas concentraciones rebasan el límite de 22 ppm que se nombra en la NOM-147-SEMARNAT-2004.



Figura 3 Sitios de muestreo en deportiva de Concepción del Oro, Zacatecas

1.4 Caracterización de la zona contaminada y aislamiento de hongos

Flores Amaro (2024) muestreo dos sitios (Figura 4 y 5) para poder realizar los estudios de los parámetros fisicoquímicos, que demostraron un sistema aerobio, con condiciones oxidantes, bajo en sales y de carácter alcalino. También se mostraron resultados de las concentraciones máximas de metales, en las cuales se observó que el arsénico, plomo, cadmio, cobre y zinc sobrepasan los niveles permitidos por las normativas nacionales mostrado en la Tabla 1.



Figura 4 Sitio 1 para la toma de muestras. Jales mineros de Concepción del Oro. Zacatecas, coordenadas: 24° 36' 42\"/>



Figura 5 Sitio 2 para las muestras. Unidad Deportiva de Concepción del Oro Zacatecas, coordenadas 24° 36' 48"N, 101° 24' 49"O. Zona A (Cancha de Futbol), Zona B (Cancha de Beisbol), Zona C (Zona de Escoria) y Zona D (Zona de Montaña) (www.googleearth.com).

Al realizar la relación de los valores fisicoquímicos con el aspecto microbiológico se observó que las condiciones son favorables para el desarrollo de microorganismos, más específicamente hongos microscópicos que por las altas concentraciones de metales han desarrollado una resistencia a la contaminación.

Se caracterizaron 57 hongos por exámenes microscópicos y macroscópicos, la mayoría de estos hongos se encontró en los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* entre otros, al presentar resistencia se infiere que tienen un potencial de biorremediación alto por lo que este estudio propuso el mecanismo de biosorción que tiene influencia en la remoción del arsénico (Flores Amaro, 2024).

Tabla 1. Valores máximos encontrados en los sitios de muestreo de Concepción del Oro, Zac.

Contaminante	Valores máximos (mg/Kg)	Límite máximo permisible (LMP) NOM-147-SEMARNAT-2004 (mg/Kg)
Arsénico	11230	22
Cadmio	322	37
Cromo	12	280
Cobre	9000	-
Níquel	37,58	1600
Plomo	54140	400
Zinc	7692	-

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El suelo

Se puede concebir este recurso como el medio para el desarrollo de las plantas. Los ecologistas lo consideran parte del medioambiente que es condicionado por los organismos y a su vez ejerce una influencia sobre estos. (Loaiza, 2010)

El suelo está sujeto a la acción de los organismos, controlado por factores topográficos y geológicos, tiene su propia temporalidad y se comporta dependiendo de las condiciones climáticas de cada sitio. En los últimos años el suelo ha sido objeto y sujeto de una intervención entrópica desordenada, lo cual trae como resultado problemas graves de desertización, erosión y pérdida de calidad. (Loaiza, 2010)

2.1.1 ¿Qué es el Suelo?

El suelo es un sistema natural abierto, complejo que se forma en la superficie de la corteza terrestre, donde viven las plantas y gran diversidad de seres vivos. Las características y propiedades de los suelos se desarrollan por la acción de los agentes climáticos y bióticos, actuando sobre los materiales geológicos, acondicionados por el relieve, durante un periodo de tiempo. El suelo se forma muy lentamente en la naturaleza y puede ser considerado esencialmente como un recurso no renovable (Loaiza, 2010)

2.1.2 Importancia del suelo

Los suelos proporcionan muchos servicios ecosistémicos, que incluyen, por ejemplo, la participación en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo, etc., de forma continua y bajo la influencia de la energía disponible. Sin embargo, lo que más se sabe es que los suelos son el lugar natural para la producción de alimentos y materias primas de las que depende las comunidades (Burbano, 2016)

Se puede decir que los suelos tienen una gran influencia en el entorno, además de repercutir en las actividades económicas y sociales de los grupos de personas que se asientan en el territorio que ejercen presiones sobre el suelo y generan afectaciones en diferentes grados (Gardi et al., 2014). La historia muestra cómo los suelos han sido parte de la vida humana, sin embargo, se olvida en gran medida cuando se trata de hablar sobre los recursos naturales (Burbano Orjuela, 2013). Por ello, ahora se argumenta que se requiere una gestión respetuosa de la tierra, no solo para aumentar la producción de alimentos sino también para mantener los servicios ecosistémicos y regular el clima (FAO & ITPS, 2015).

2.1.2.1 Funciones o servicios ecosistémicos del suelo

Los suelos, como parte de los servicios ecosistémicos, prestan importantes funciones que mantienen y apoyan las actividades sociales y económicas de las personas. Varios autores opinan que (Burbano Orjuela, 2013; Cram, Cotler, Morales, & Sommer, 2008; Silva & Correa, 2009) las siguientes son algunas de las más importantes tareas que cumple el suelo en este contexto.

Producción de alimentos y biomasa.

Quizás la función más obvia del suelo es apoyar y proporcionar nutrientes a las plantas para la producción de alimentos y biomasa en general. Se tienen dos observaciones importantes, en primer lugar, más del 95 % de la producción mundial de alimentos depende directa o indirectamente del suelo y en segundo lugar, la pérdida de la calidad es un problema importante que amenaza la producción de alimentos.

Escenario indispensable para los ciclos biogeoquímicos.

Los ciclos biogeoquímicos que ocurren en la naturaleza son los mecanismos necesarios para que existan condiciones estables y para que se produzca la vida. Estos ciclos son muy importantes y el suelo juega un papel insustituible en los mismos. Sin estos ciclos, no habría transferencia continua de elementos químicos.

Además de lo antes mencionado se encuentra la fijación de carbono, almacenamiento y filtración del agua, mejora en la calidad del aire y el soporte de actividades humanas junto con ser fuente de materias primas.

2.1.3 Calidad del suelo

La composición física, química y biológica del suelo varía mucho y no se puede determinar un valor estándar para todos los tipos de suelo. La calidad del suelo y sus estándares de referencia pueden vincularse al concepto de función ecosistémica, ya que integran y vinculan componentes y procesos biológicos, químicos y físicos en una situación determinada. Desde un punto de vista ecológico, este concepto refleja la capacidad específica del suelo para funcionar dentro de los límites de los ecosistemas, mantener o mejorar la productividad de plantas y animales, mantener o mejorar la calidad del suelo, el aire y el agua y mantener la salud humana (Navarrete S., Vela C., Lopez, & Rodriguez, 2011).

La calidad del suelo es un atributo dinámico que puede variar en el corto plazo según las prácticas de uso y manejo que se aplican. Para conservar esta calidad, es fundamental implementar prácticas sostenibles. Evaluarla permite comprender y revertir su deterioro, evidenciado en problemas como la erosión, sedimentación causada por viento o inundaciones, reducción de la infiltración, compactación de la capa superficial, pérdida de nutrientes, efectos nocivos de los pesticidas, alteraciones en el pH, mayor solubilidad de metales pesados, pérdida de materia orgánica, disminución de la actividad biológica, proliferación de organismos patógenos y reducción de la calidad del agua. (Navarrete S. et al., 2011).

2.1.4 Contaminación del suelo

El termino contaminación se refiere a la introducción o incremento anormal de las sustancias que pueden ejercer un efecto dañino sobre los organismos en los ecosistemas. Algunas veces esta contaminación es natural, pero en general, está relacionada con la actividad humana, sobre todo este tipo de contaminación algunas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

veces puede ser transformada por los organismos vivos llamándola biodegradable y otras que no se pueden transformar siendo no biodegradables (Bautista Cruz, Etchevers Barra, del Castillo, & Gutierrez, 2004).

2.1.4.1 Metales en suelo

Las actividades mineras alteran el suelo. Una anomalía bioquímica generada en el momento de la extracción es un aumento del contenido de microelementos en el suelo, su transformación en macroelementos afecta negativamente a los sistemas biológicos (numero, diversidad y actividad) y la calidad del suelo (Wong, 2003). Salomons, 1995 menciona que algunos de los residuos son tóxicos para los organismos vivos son inhibidores de los factores ambientales que afectan el crecimiento de las plantas.

El suelo remanente del proceso minero contiene todo tipo de material residual, incluyendo escombros estériles, lo que presenta serios problemas para el crecimiento vegetativo, y sus características más destacadas son: una capa de textura desigual, la ausencia o escasa presencia de limos estructurales, químicos inusuales y bajo o desequilibrado contenido de nutrientes orgánicos, perturbación del ciclo bioquímico, baja profundidad efectiva, enraizamiento difícil, baja capacidad de intercambio, baja retención de agua y presencia de compuestos tóxicos (Puga, Sosa, Lebgue, Quintana, & Campos, 2006).

Las propiedades del suelo juegan un papel importante en la reducción o el aumento de la toxicidad de los metales en el suelo. Pérez et al., (2008) mencionan que la distribución de metales en las estructuras del suelo, así como la disponibilidad de estos, está controlada por factores intrínsecos de los metales y las propiedades del suelo.

En general, la movilidad de los metales es muy baja, se acumulan en los centímetros superiores del suelo y son arrastrados a las capas inferiores en cantidades muy pequeñas. Por este motivo, la presencia de altas concentraciones en la parte superior disminuye bruscamente en las profundidades cuando se produce la

contaminación humana. Esto sucede precisamente porque la disponibilidad de un elemento también depende de las propiedades del suelo en el que se encuentra. (Galán Huertos & Romero Baena, 2008).

Se menciona que excesivas concentraciones de metales en el suelo podrían impactar la calidad de los alimentos, la seguridad de la producción de cultivos y la salud del medio ambiente (Puga et al., 2006). Otra de las afectaciones que se pueden tener es a nivel microscópico, debido a que existen muchas especies de diversos microorganismos.

En la norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT-2004 se establecen los criterios para determinar las concentraciones de los suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.

Se encuentran referenciados los límites máximos permisibles (LMP) de estos elementos en suelo para evitar una contaminación masiva de estos. En la Tabla 2 se muestran los LMP de cada elemento.

Tabla 2. Concentraciones de referencia totales (CR_T) por tipo de uso de suelo. Obtenido de NOM-147-SEMARNAT-2004

Contaminante	Uso agrícola/residencial /comercial (mg/Kg)	Uso industrial (mg/Kg)
Arsénico	22	260
Bario	5400	67000
Berilio	150	1900
Cadmio	37	450
Cromo Hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1600	20000
Plata	390	5100
Plomo	400	800
Selenio	390	5100
Talio	5,2	67
Vanadio	78	1000

Teniendo estos valores como referencia para que los seres vivos puedan crecer y estar en contacto con estos metales es como se comienza a investigar acerca de los microorganismos que están en constante contacto con estos contaminantes.

2.2 Microorganismos en suelo

Dada la importancia de los suelos en los ciclos biogeoquímicos se han investigado las interacciones entre los diferentes elementos y los microorganismos que participan en estos ciclos.

El número de especies, la composición y la diversidad de un suelo dependen de muchos factores, incluyendo: la aireación, la temperatura, la acidez, la humedad, el contenido de nutrientes y el sustrato orgánico. Sin embargo, el número y tipo de organismos varía de un sistema y un ambiente a otro, ya que las prácticas agrícolas, forestales y mineras tienen impactos significativos tanto positivos como negativos sobre la biota del suelo (FAO, 2012).

García (2011), menciona que en el suelo se pueden observar dos aspectos fundamentales que caracterizan a las comunidades microbianas como la hiperdensidad y la hiperdiversidad, y que la cantidad de microorganismos puede ser de entre 10^7 y 10^9 células por cada gramo de suelo, además se estima que hay por lo menos 10^4 especies microbianas distintas en cada gramo de suelo, y entre estas especies se encuentran los hongos.

2.2.1 Hongos en suelo

Los hongos pueden representar el 50% del total de microorganismos en el suelo. La estructura de las comunidades fúngicas depende del entorno del suelo en el que crecen. Las principales influencias internas sobre las comunidades fúngicas son: nivel y tipo de materia orgánica, pH, uso de algunos fertilizantes orgánicos e inorgánicos, humedad, aireación, variación de temperatura y composición de materiales nativos o cultivados. Los hongos son el segundo grupo de dos grupos principales de microorganismos del suelo (Barrios & Sandoval, 2018)

Samaniego-Gaxiola & Chew-Madinaveitia (2007) señala que la estructura de las comunidades de hongos en el suelo no solo está influenciada por la precipitación como factor climático, sino también por el microhábitat, el cual depende de elementos como la vegetación dominante o la salinidad del suelo. En zonas desérticas, los sitios cubiertos por vegetación presentan una mayor densidad de hongos, predominando *Penicillium spp.*, mientras que en áreas desprovistas de vegetación predominan hongos con micelio oscuro y esporas multicelulares.

Algunos de los géneros más importantes en los suelos y que también están asociados a las raíces de plantas son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* en donde los primeros dos ayudan a movilizar el fósforo y nitrógeno del suelo y los últimos dos ayudan a sostener la humedad. (Delgado, 2008)

Las actividades de los hongos por si solos o en conjunto con otros organismos son determinantes en la ganancia o pérdida de la fertilidad de los suelos y también de la velocidad con la que se puede restaurar un suelo contaminado o deteriorado, y si es que se puede restaurar (Soria, 2016), y es aquí en donde la importancia de estas especies cobra relevancia.

2.3 Los metales en las células fúngicas

El uso de diferentes organismos para la eliminación de un contaminante ha cobrado cada vez más relevancia debido a su bajo impacto ambiental y al ser usados principalmente organismos propios de los lugares contaminados.

Se utilizan los microorganismos como bacterias y hongos, ya que estos poseen asombrosas vías metabólicas que utilizan diversos compuestos tóxicos como fuente de energía para el crecimiento y desarrollo, a través de la respiración, la fermentación y el metabolismo (Ayangbenro & Babalola, 2017). Otra ventaja es la fácil separación de la biomasa fúngica por filtración debido a su estructura filamentosa (Leitão, 2009).

El tratamiento de desechos en la naturaleza con especies fúngicas se ha puesto en práctica desde hace siglos. La presencia de los hongos ha permitido la aclimatación de la mayoría de los desechos en aguas residuales y se ha establecido el papel de los hongos en la biorremediación de varios compuestos peligrosos y tóxicos en suelos y sedimentos, además estas especies también han demostrado la capacidad de eliminar metales pesados y degradar, en algunos casos mineralizar, fenoles, compuestos fenólicos halogenados, hidrocarburos de petróleo, compuestos aromáticos policíclicos y bifenilos policlorados (Leitão, 2009).

Los hongos no solo son un componente principal de la biota en suelos y sustratos minerales, sino que también, bajo ciertas condiciones ambientales, pueden ser agentes biogeoquímicos eficientes y bioacumuladores de metales y su supervivencia depende de sus propiedades biogeoquímicas y fisiológicas que también determinan el éxito de la biorremediación (Qiu et al., 2021).

Se sabe que estos microorganismos utilizan varios mecanismos, incluidos el intercambio iónico, la quelación, la adsorción, la cristalización, la transformación de valencia, la precipitación extracelular e intracelular y la absorción activa. En otras palabras, la acumulación de metales por hongos se puede dividir en tres categorías, la biosorción de iones metálicos en la superficie de los hongos, la absorción intracelular de iones metálicos y la transformación química de los iones metálicos (Leitão, 2009).

2.3.1 Plomo y cadmio

Algunos metales son fundamentales para el crecimiento y metabolismo microbiano, mientras que otros no tienen una función esencial y pueden ser peligrosos.

Plomo

El plomo (Pb) es uno de los metales pesados más comunes y peligrosos, principalmente debido a actividades humanas como la minería y la fabricación de baterías. Su alta toxicidad y persistencia a largo plazo en el medio ambiente lo

convierten en una forma de contaminación acumulativa de gran preocupación que exige medidas de atención urgentes (Tian et al., 2019).

El plomo, en forma de Pb^{2+} , puede reemplazar al Ca^{2+} e ingresar a las células a través de los canales de calcio y causar daño al ADN, proteínas y membranas celulares al unirse a grupos funcionales de sulfhídricos, fosfato e hidroxilo. Además, el plomo provoca toxicidad en las levaduras al inhibir la síntesis de proteínas y generar especies reactivas de oxígeno. (Newsome & Falagán, 2021).

Algunos microorganismos han desarrollado resistencia al plomo (Pb) mediante el transporte activo utilizando bombas de eflujo de ATPasa de tipo P, como ZntA y CadA. En bacterias resistentes al Pb se ha identificado un operón de resistencia que codifica proteínas responsables de la captación, expulsión y acumulación del Pb (II). Asimismo, se ha observado que microorganismos pueden ligar el metal intracelularmente, formando nanopartículas de Pb en el citoplasma o fijándolo en el periplasma. Estos hallazgos sugieren que proteínas similares a la metalotioneína tienen un papel clave en el secuestro de Pb (Newsome & Falagán, 2021) y aun no se encuentran estudios definitivos que señalen el mecanismo de resistencia de las células fúngicas.

Los microorganismos, como bacterias y hongos, desempeñan un papel importante en la inmovilización del plomo en el suelo de manera indirecta ya que pueden precipitar el plomo en forma de minerales, como pirofilita y hidroxiapatita, tanto dentro como fuera de las células. Además, los hongos pueden transformar el plomo metálico en pirofilita, el mineral de plomo más estable o secretan ácido oxálico para precipitar el plomo como oxalato de plomo. Estos mecanismos microbianos juegan un papel importante en la retención y reducción de la toxicidad del plomo en el medio ambiente. (Newsome & Falagán, 2021)

Cadmio

El cadmio está presente típicamente en la corteza terrestre en una concentración de 0.1-0.5 mg kg⁻¹, pero se encuentra concentrado en minerales y desechos de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cobre, plomo y zinc. Por lo general, el cadmio se inmoviliza en el suelo al unirse fuertemente a la materia orgánica, aunque sigue estando biodisponible en esta forma, especialmente en condiciones de pH ácido. El cadmio no es redox activo y es móvil en el agua en forma de iones Cd^{2+} o formando complejos solubles en agua con aniones, ácidos húmicos y materia orgánica disuelta. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry Sep, 2002)

La toxicidad del cadmio se debe principalmente al daño del ADN a través de la unión a grupos sulfhidrilo en proteínas, aunque también puede ocurrir mediante la interrupción de la membrana celular, la inhibición de la traducción, la división celular, la actividad enzimática y la desnaturalización de proteínas. El cadmio puede entrar en las células a través de los sistemas de transporte de Mn^{2+} y Zn^{2+} . (Newsome & Falagán, 2021).

La resistencia indirecta al Cd puede ocurrir mediante la precipitación de biominerales de Cd, como fosfatos, carbonatos y sulfuros. Algunos microorganismos han demostrado ser capaces de inmovilizar el Cd a partir de soluciones mediante la formación de minerales de fosfato, sulfuro y carbonato. Además, algunos microorganismos pueden precipitar Cd en forma de nanopartículas de CdS. En algunos casos, la presencia de Cd puede inhibir la reducción bacteriana del sulfato. (Newsome & Falagán, 2021).

Se han utilizado transcriptómica y proteómica para investigar la respuesta molecular al cadmio. Después de la exposición a cadmio la expresión de más de 100 proteínas cambió en comparación con los controles y los resultados variaron según el tiempo después de la exposición. Además, se encontró una expresión diferencial de proteínas bacterianas conocidas por estar involucradas en la respuesta al choque de Cd, incluyendo ATPasas, deshidrogenasas, proteínas ribosomales, oxidoreductasas, catalasa, superóxido dismutasa, pirofosfatasa inorgánica y reguladores transcripcionales. En un estudio de proteoma de *S. cerevisiae*, se encontró que la exposición al Cd indujo la expresión de la vía biosintética de aminoácidos sulfurados y aumentó la biosíntesis de glutatión y cisteína, lo que

puede contribuir a la resistencia al Cd a través de la quelación y el transporte a la vacuola. Los autores concluyeron que los sistemas de redox de glutatión y tioredoxina son importantes contribuyentes a la detoxificación celular de Cd en la levadura. (Newsome & Falagán, 2021).



3. JUSTIFICACIÓN

Es de gran relevancia buscar alternativas para mitigar los daños de la industria minera sobre el ambiente. En trabajos anteriores se aislaron hongos provenientes de suelos contaminados con residuos mineros en los cuales se reportan concentraciones superiores a los LMP de As y metales altamente tóxicos. En el presente trabajo se caracterizarán los hongos resistentes a Cd o Pb. Se determinará la capacidad de inmovilizar estos metales para estimar su potencial uso en biorremediación de suelos contaminados.

4. HIPÓTESIS

Los hongos aislados de suelos altamente contaminados por actividades mineras con altas concentraciones de As y metales presentan resistencia a Cd o Pb, y tienen una capacidad significativa para inmovilizar estos xenobióticos representando una alternativa biotecnológica para el tratamiento de suelo con estos metales.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar los hongos obtenidos de los suelos contaminados con actividades mineras, determinar la resistencia a Cd o Pb, y estimar su potencial uso biotecnológico para el tratamiento de suelos contaminados con estos metales.

Objetivos Particulares

Identificar morfológicamente los hongos aislados de suelos contaminados con actividades mineras.

Determinar la resistencia a Cd o Pb de los hongos aislados de suelos contaminados.

Identificar molecularmente los hongos con mayor resistencia a Cd o Pb.

Estudiar la capacidad de inmovilización de los hongos más resistentes a Cd o Pb.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Caracterización morfológica

Para los estudios morfológicos se realizó una reactivación de los aislados recuperados del suelo de Concepción del Oro por Flores Amaro (2024). Estos se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) durante 7 días a 28°C y se observaron sus características morfológicas macroscópicas como anverso y reverso de la colonia, coloración de la colonia y medio de cultivo, además de la forma y textura.

Una vez terminado el tiempo de incubación los aislados se prepararon para observar al microscopio con la técnica Azul algodón de Lactofenol y se observaron al microscopio a 40x. Para una correcta identificación de hongos, ya sea con fines de diagnóstico o estudios taxonómicos, es necesario observar las estructuras fúngicas con una alta calidad y contraste; para ello se utilizan diversos compuestos químicos que permitan la tinción entre la pared y el citoplasma de las células fúngicas, como lo es esta técnica de tinción (López-Jácome et al., 2014).

Las características macroscópicas y microscópicas se cotejaron en libros de micología además de la bibliografía publicada.

6.2 Mantenimiento de cepas

El mantenimiento de las cepas se realizó para poder obtener células jóvenes y activas metabólicamente para poder realizar los estudios correspondientes, además de poder obtener soluciones con una determinada concentración de esporas con las cuales se pueden realizar diferentes experimentos.

6.2.1 Conservación de hongos en agua destilada

Una vez realizada la caracterización morfológica de cada uno de los aislados, se realizó la conservación de cada aislado en agua destilada.

El método de inmersión en agua destilada ha sido utilizado en diversas investigaciones y ha tenido resultados satisfactorios para preservar oomicetos, basidiomicetos, ascomicetos aeróbicos y algunos microorganismos conocidos por ser patógenos de humanos, durante largos periodos de tiempo (Ladino, Rubio, & Chacin, 2016).

Los aislados previamente reactivados se inocularon en PDA con 5 réplicas, durante 7 días a 28°C. Una vez terminado el tiempo de incubación se recolectaron las esporas de los aislados agregando 15 ml de agua destilada estéril en la caja Petri para después realizar un raspado con varilla de vidrio en L, una vez obtenidas las esporas en esta solución se filtró en gasa estéril para la retención de micelio o medio de cultivo. Las esporas se mantuvieron en la suspensión de agua destilada estéril conservándolas en refrigeración a 4°C.

6.3 Resistencia a altas concentraciones de Cd o Pb

Se realizaron medios de cultivo PDA con diferentes concentraciones de CdCl_2 o $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ tomado en cuenta los valores reales de Cd o Pb que se aportan por estas sales. Para los cultivos con Pb se complementó el medio de cultivo con concentraciones crecientes a partir de 1000 mg/L. Para el Cd se complementó el medio con concentraciones crecientes a partir de 50 mg/L (Văcar et al., 2021).

Una vez esterilizados los medios de cultivo se enfriaron a aproximadamente 40°C y se agregaron las diferentes concentraciones de metal para cada análisis, provenientes de una solución madre, después se inocularon con 5×10^5 esporas por ml (Flores-Amaro, 2024).

6.4 Caracterización molecular de aislados resistentes

Una vez que se tuvieron los hongos resistentes y para corroborar la identificación preliminar con las características morfológicas se amplificaron las regiones altamente conservadas del espaciador transcrito interno (ITS).

6.4.1 Obtención de cultivos monospóricos e identificación

Se tomaron 100 μ l de la solución de esporas obtenida anteriormente y se agregaron en agua destilada estéril para completar 40 ml, esta dilución se agito en vortex y se agregaron 100 μ l de esta en placas de PDA que contenían perlas de vidrio (8-12), se agito vigorosamente 20 veces en cada dirección (izquierda-derecha, arriba y abajo) hasta esparcir correctamente los 100 μ l en la superficie del medio de cultivo, se retiraron las perlas de vidrio y se sellaron las cajas para incubar a 28°C monitoreando el crecimiento (Rangel-Muñoz et al., 2022)

A las 24 horas se observó el crecimiento de pequeñas colonias provenientes de una espora o conidio y se eligió una que se tomó con un palillo estéril y se inoculo en medio PDA estéril, se incubaron a 28°C durante 2-3 días.

La técnica de cultivos monospóricos permite obtener cultivos genéticamente homogéneos con una mayor estabilidad en todas sus propiedades (Brunner-Mendoza, et al., 2013)

6.4.2 Extracción de ADN genómico

A partir de los cultivos monospóricos se realizaron depósito de esporas como en el punto 6.2.1, a partir de estos se tomaron 100 μ l para inocular medio PDB y formar la biomasa utilizada para la extracción de ADN, estos cultivos se dejaron a 28°C x 24 hrs. Al término del cultivo se llevó a cabo la extracción de ADN dejado por el método de Aljanabi & Martinez (1997) con modificaciones. Al final de la extracción se agregaron 5 μ l de RNAsa y se incubo a 37°C x 1 hora.

Para visualizar el ADN genómico extraído se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Este gel se visualizó en foto documentador de SynGene Gene Genius Bio Imaging System empleando el software GeneSnap de SynGene. La concentración se cuantifico con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific™.

6.4.3 Amplificación de genes con PCR

Se realizó la amplificación de la región ITS utilizando los oligos ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS 5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') de T4Oligo®, utilizando la Taq polimerasa de alta fidelidad Pushion en un volumen total de reacción por muestra de 50 µl (Buffer 5x 10 µl, dNTPs a 10 mM: 1 µl, MgCl₂ 2 µl, ADN 1 µl, Pushion 0.5 µl, Oligo D 1.5 µl, Oligo R 1.5 µl y H₂O libre de nucleasas 37.5 µl). Las condiciones para la reacción de PCR para la amplificación de la región ITS fueron: Un periodo de desnaturalización de 3 min a 98°C, seguido de 20 ciclos (desnaturalización a 98°C/10 s, alineación a 60°C/20 s y extensión a 72°C/30 s), con una extensión final de 10 min a 72°C.

La calidad de los productos de PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se visualizaron las bandas en el fotodocumentador de SynGene Gene Genius Bio Imaging System empleando el software GeneSnap de SynGene.

6.4.4 Purificación, clonación y secuenciación de productos amplificados

Una vez observadas las bandas de amplificación de la PCR se cortaron del gel y purificaron con el Kit de purificación de Jena Bioscience Agarose Gel Extraction Kit - Column Kit, una vez obtenido el purificado se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific™.

Para poder obtener una mayor concentración del producto de PCR, este se ligó en el plásmido pJET 1.2 con el casete de resistencia a ampicilina en 15 µl total de reacción por muestra (Buffer 2x 7.5 µl, Ligasa 0.5 µl, pJET 1.2 0.4 µl, Purificado 7 µl) incubando a 22°C por 32 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación se realizó la transformación de cepas de *E. coli* DH5α por choque térmico agregando los 15 µl de reacción de ligación a cada tubo ependorf de cepa por muestra estos se dejaron 30 minutos en hielo, 3 minutos a 42°C y finalizando con 2 minutos en hielo. Al término del tiempo de incubación se agregó 1 ml de medio LB y se dejaron a 37°C por una hora.

Después de la hora los tubos se centrifugaron para sedimentar la biomasa en 200 - 300 μ l y agregar a placas de LB complementado con ampicilina al 1% estas se pusieron en incubación a 37°C por 16-18 horas. Al finalizar se seleccionaron 5 colonias de cada muestra para crecer en 3 ml de LB amp líquido que se dejó en incubación por 16-18 horas a 37°C en agitación.

Las colonias elegidas podían o no tener el fragmento de amplificación de PCR y para verificar se realizó PCR en colonia con la Taq polimerasa DreamTaq en un volumen total de 10 μ l de reacción por cada muestra (Buffer 10x 1 μ l, dNTPs 0.2 μ l, Oligo directo 0.2 μ l, Oligo reverso 0.2 μ l, muestra de colonia 1 μ l, Dream Taq 0.25 μ l y H₂O libre de nucleasas 7.15 μ l). El resultado se verificó con electroforesis en gel de agarosa al 1% y las bandas se observaron en foto documentador de SynGene Gene Genius Bio Imaging System empleando el software GeneSnap de SynGene.

Una vez observadas que colonias contenían el fragmento se eligieron dos para extracción de plásmido por el Kit de Jena Bioscience Plasmid Mini-Prep Kit - Column Kit. Las colonias se dejaron crecer en 5 ml de medio LB amp a 37°C por 16-18 horas posterior a la incubación se utilizó el Kit. La cuantificación del plásmido se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific™. Como confirmación para los plásmidos purificados se realizó una reacción de restricción en un volumen de 15 μ l por cada muestra (Buffer 10x 1.5 μ l, H₂O 10 μ l, Bgl II 0.75 μ l y muestra 3 μ l) El resultado se verificó con electroforesis en gel de agarosa al 1% y las bandas se observaron en foto documentador de SynGene Gene Genius Bio Imaging System empleando el software GeneSnap de SynGene.

Para cada muestra se enviaron 4 secuencias, dos directas y dos reversas, a secuenciación en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, los resultados se recibieron en formato Fasta y Electroferograma, los cuales se observaron con el software Chromas Pro, y se ensamblaron con el software Seqman para poder obtener una secuencia consenso, esta secuencia se comparó con las diferentes secuencias en el NCBI utilizando la herramienta Blast.

6.5 Concentración de metal que inhibe el 50% del crecimiento (IC₅₀)

Para poder visualizar con mayor facilidad el efecto de los metales en el crecimiento de los hongos se utiliza el valor de IC₅₀ que es la concentración metal que inhibe el 50% del crecimiento (IC₅₀) del hongo esta es una medida de la eficacia de un compuesto para inhibir la función biológica/ bioquímica (Hendriks, 2010).

Para la preparación del inoculo se realizó con la metodología de Janicki, Długoński, & Krupiński, (2018) con modificaciones. Se agregaron 5×10^5 esporas/ml del aislado resistente en 30 ml de medio de cultivo PDB durante 24 horas a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación. Las soluciones de metal se prepararon a partir de CdCl_2 y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y se esterilizaron bajo luz UV durante media hora. Las soluciones de metales se añadieron por separado a el medio PDB (100 ml) hasta obtener las concentraciones deseadas para cada metal. A cada uno de los matraces de les agrego el 15% de inoculo homogenizado y se cultivaron en agitación a 33°C por 24 horas. Después la biomasa fue lavada dos veces con agua destilada, filtrada en papel filtro Ahlstrom 54 y secada a 60°C por 5 horas. Una vez terminado el tiempo de secado se pesó cada papel filtro y con ayuda del software GraphPad Prism 9.0.0 se calculó el valor de IC₅₀. (Le Berre, et.al, 2022)

6.6 Inmovilización de Cd o Pb por los hongos

Debido a la resistencia que tienen los hongos a estos metales se realizan experimentos de interacción para estudiar la inmovilización de los metales por estos organismos.

Se preparo un inóculo 5×10^5 esporas/ml del aislado resistente en 30 ml de medio de cultivo PDB durante 24 horas a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación. (Janicki et al., 2018). Los medios de cultivo PDB se realizaron con las concentraciones de IC₅₀ anteriormente obtenidas. Cada aislado de hongo tenía dos controles negativos, dos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

controles positivos y el problema por triplicado. Una vez inoculados estos se mantuvieron en agitación durante 72 h a 32°C.

6.6.1 Espectroscopia Infrarroja (FTIR)

Esta metodología nos permite observar los grupos funcionales que se tienen en la pared celular de los hongos y que tienen interacción con los metales como el Pb o Cd.

La biomasa de los cultivos se secó durante 3 días a 60°C y se trituró con mortero hasta obtener un polvo fino que se utilizó para leer en el Infrarrojo transformado de Fourier (FTIR) (Shapaval et al., 2010) en un equipo con sistema automático Jasco FT/IR-4100 en rangos de 400- 4000 cm^{-1} .

6.6.2 Microscopio electrónico de barrido (SEM-EDX)

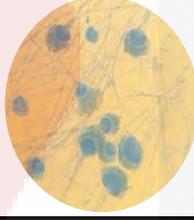
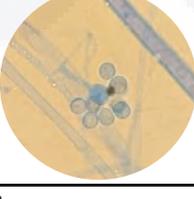
Las 14 muestras de hongos previamente fijadas en glutaraldehído al 2.5% fueron transferidas a viales con pipetas pasteur, lavadas con PBS al 1x hasta eliminar el fijador y deshidratadas en alcohol de manera gradual de 60-100% por 20 min cada una antes de ser secadas en un aparato de punto crítico de secado para eliminar la humedad. Después fueron montadas en cilindros de aluminio con cinta de grafito y recubiertas con una fina capa de oro en el recubridor Denton Vacuum II para reducir la carga eléctrica de las muestras.

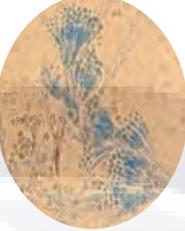
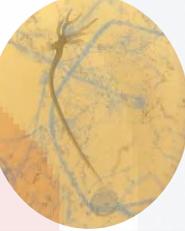
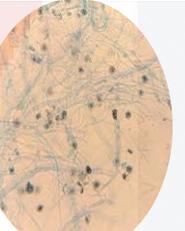
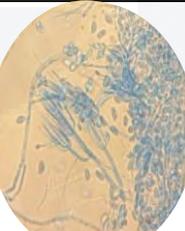
Posteriormente, se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (JEOL JSM-5900LV) acoplada con espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (SEM/EDX), empleando los parámetros específicos (20 kV, WD=10, Spotsize 43, electrones retro dispersados y método lineal). Se examinaron tres sitios por muestra para obtener un análisis cuantitativo del peso atómico y un análisis cuantitativo de los elementos químicos mediante graficas espectrales y distribuciones elementales.

7. RESULTADOS

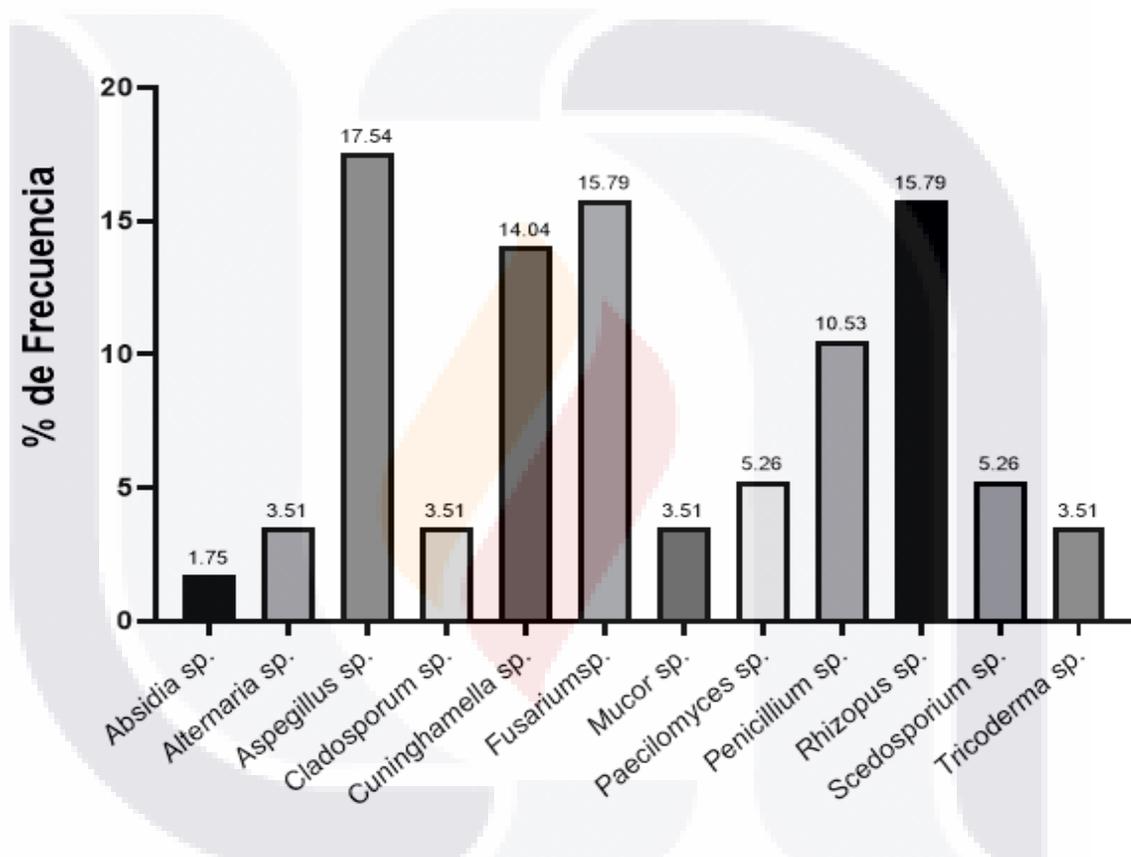
7.1 Caracterización morfológica

Tabla 3: Características macroscópicas, microscópicas de los géneros identificados. Imagen representativa de cada grupo.

<i>Absidia sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: Colonia algodonosa de color blanco con tintes cafés de crecimiento rapido con poco micelio</p> <p>Características microscópicas: Estipite hialino y liso con esporangios pequeños y globosos sostenidos por una apofisis.</p>
<i>Alternaria sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: colonia color negro, invasiva, plana y aterciopelada</p> <p>Características microscópicas: Conidioforos simples, conidias elipsoidales con varios tabiques.</p>
<i>Aspergillus sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: colonia color blanco algodonosa con poca elevacion, periferia de la colonia de color azul-verdoso</p> <p>Características microscópicas: estipite halino y liso, conidioforo globoso de donde se desarrollan fialides que cubren 2/3 de la cabeza</p>
<i>Cladosporium sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: Colonia verde musgo con tintes cafés y bordes blancos, presenta elevacion y textura aterciopelada.</p> <p>Características microscópicas: Conidioforos cortos pigmentados, produccion de conidias por gemacion; conidios elípticos.</p>
<i>Cunninghamella sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: Colonia de crecimiento rapido e invasivo, miselio abundante de color blanco a grisaseo</p> <p>Características microscópicas: esporangioforos irregulares con esporangios globoso que desarrollan esporangiolas equinuladas .</p>
<i>Fusarium sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: Colonia de color púrpura con bordes blancos, de crecimiento lento y plana, sin miselio.</p> <p>Características microscópicas: conidios pequeños en forma de media luna con varias divisiones.</p>

<i>Paecilomyces sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: colonia afelpada color rosa con bordes blancos, coloración beige en el reverso</p> <p>Características microscópicas: fialides con disposición en verticilo y esporas elipsoidales o en forma de limon unidas en cadena</p>
<i>Penicillium sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: colonia plana color verde con bordes blancos y pulvorienta. Presenta coloración amarilla del medio de cultivo</p> <p>Características microscópicas: conidioforos completos ramificados con fialides desarrollando cadenas de conidiosporas</p>
<i>Rhizopus sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: Miselio invasivo filamentoso color blanco y en la orilla color gris</p> <p>Características microscópicas: Micelio hialino y liso con presencia de rizoides, presentan esporangios grandes y globosos sin apofisis.</p>
<i>Scedosporium sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: colonias de aspecto flocoso, inicialmente de colores blancos grisáceos, su reverso es pálido</p> <p>Características microscópicas: hifas hialinas con células conidiogénicas emergiendo. Los conidios son ovales y únicos de color marrón.</p>
<i>Trichoderma sp.</i>			
			<p>Características macroscópicas: colonia blanquecina de crecimiento radial, textura cremosa y con poco miselio</p> <p>Características microscópicas: fialides en forma de botella alargada con conidios pequeños</p>

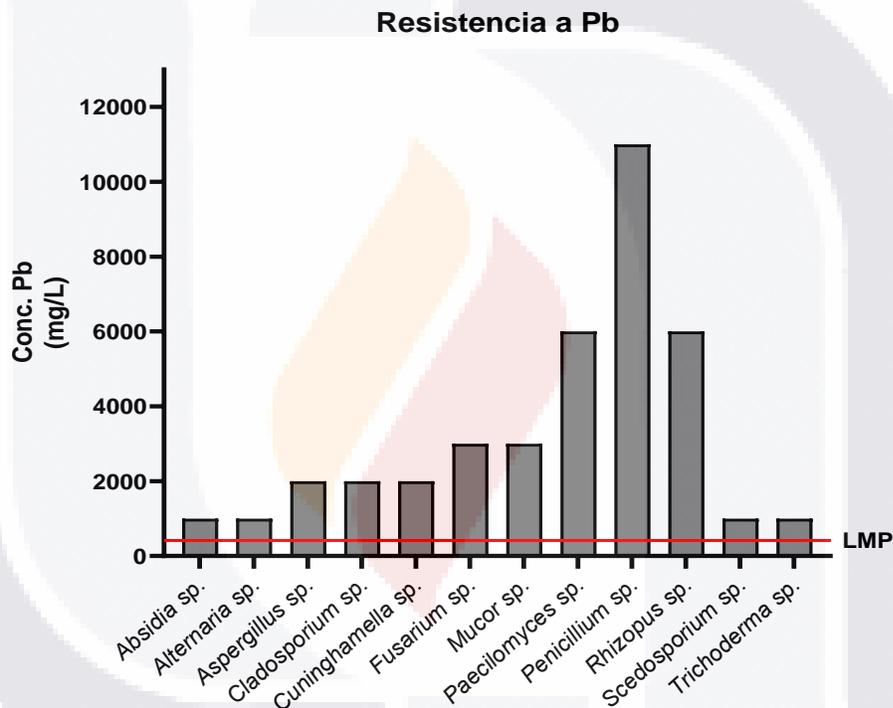
En la tabla 3 se observan las características del anverso y reverso de la colonia de los géneros identificados en los aislados obtenidos de Concepción del Oro, además de las características microscópicas a 40x para revisar el tipo de cuerpo fructífero y espora desarrollada por el aislado, se encontró que el género identificado como *Aspergillus* estuvo presente en el 17,54% de los 57 aislados, mientras que los géneros *Fusarium* y *Rhizopus* estuvieron presentes en el 15,79% de los aislados como se muestra en la gráfica 1.



Gráfica 1 Géneros encontrados de los 57 aislados de Concepción del Oro, se muestra la frecuencia con la que son encontrados en estos suelos.

7.2 Resistencia a altas concentraciones de Cd y Pb

Los aislados que son resistentes a la presencia de plomo se encuentran entre los géneros con alta frecuencia en los suelos contaminados con actividades mineras de Concepción del Oro como se muestra en la Grafica 2, estos aislados son Os6 *Paecilomyces sp*, Os1 *Penicillium sp* y Os 7 *Rhizopus sp*. Además, todos los géneros son resistentes a concentraciones mayores a 400 mg/Kg que es el límite máximo permisible para Pb en suelos.



Gráfica 2 Resistencia en placa a Plomo en medio de cultivo solido de los 57 aislados de Concepción del Oro. LMP: Limite Maximo permisible 400 mg/kg segun la NOM-147-SEMARNAT-2004

Se encontró que el aislado Os1 identificado como *Penicillium sp.*, es resistente hasta 11,000 mg/L de Pb, mostrando cambios morfológicos y reducción de pigmentación, además de la inhibición de crecimiento como se muestra en la figura 6, por su parte el asilado Os6 identificado como *Paecilomyces sp.*, presentó resistencia a la presencia de Pb hasta 6,000 mg/L, mostrando también cambios morfológicos, reducción del diámetro de crecimiento, cambios en la coloración de la colonia al igual que el aislado Os7 identificado como *Rhizopus sp.* figura 7 y 8.

Aislado	0/ control	1000 mg/L	2000 mg/L
Os 1 <i>Penicillium sp.</i>			
3000 mg/L	4000 mg/L	5000 mg/L	6000 mg/L
			
7000 mg/L	8000 mg/L	9000 mg/L	10 000 mg/L
			
11 000 mg/L	12 000 mg/L		
			

Figura 6 Aislado Os 1 resistente hasta 11 000 mg/L de Pb presente en el medio de cultivo. Método medición del diámetro de crecimiento de la colonia, DE <0.1 cm

Aislado	0/ control	1000 mg/L	2000 mg/L
Os 6 <i>Phaecilomyces sp.</i>			
3000 mg/L	4000 mg/L	5000 mg/L	6000 mg/L
			
7000 mg/L			
			

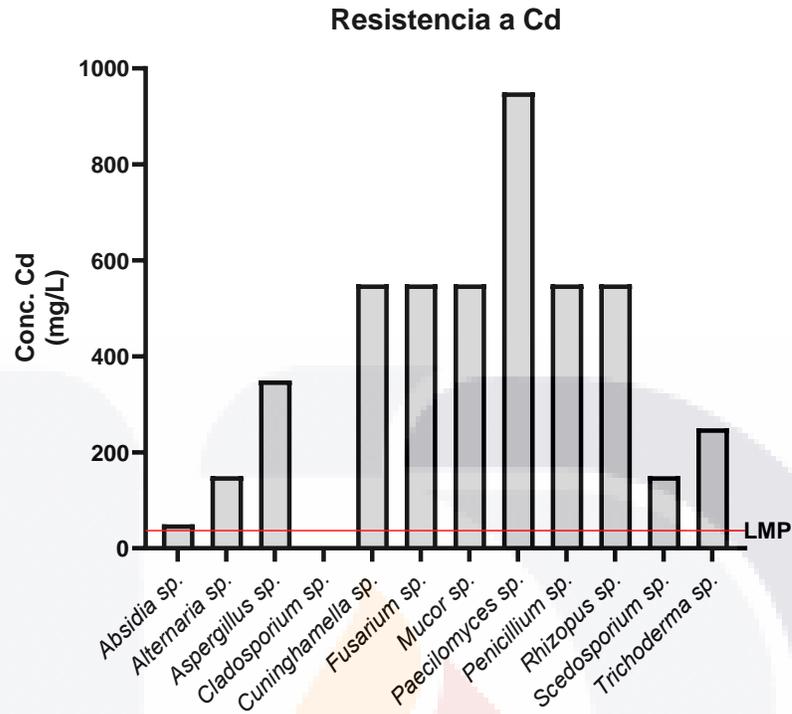
Figura 7 Aislado Os 6 resistente hasta 6 000 mg/L de Pb presente en el medio de cultivo. Método medición del diámetro de crecimiento de la colonia, DE <0.1 cm

Aislado	0/ control	1000 mg/L	2000 mg/L
Os 7 <i>Rhizopus sp.</i>			
3000 mg/L	4000 mg/L	5000 mg/L	6000 mg/L
7000 mg/L			

Figura 8 Aislado Os 7 resistente hasta 6 000 mg/L de Pb presente en el medio de cultivo. Método medición del diámetro de crecimiento de la colonia, DE <0.1 cm

A su vez se encontró que los aislados que son resistentes a la presencia de cadmio también se encuentran entre los géneros con alta frecuencia en los suelos contaminados con actividades mineras de Concepción del Oro estos aislados son Os6 *Paecilomyces sp.*, Os30 *Cunninghamella sp.*, Os27 *Fusarium sp.* y Os10 *Rhizopus sp.* Gráfica 3. Además, todos los géneros son resistentes a concentraciones mayores al límite máximo permisible, 37 mg/Kg.

Se observo que el aislado Os6 identificado como *Paecilomyces sp.*, es resistente hasta 950 mg/L de Cd, mostrando cambios morfológicos y la inhibición de crecimiento como se muestra en la figura 9, por su parte el asilado Os30 identificado como *Cunninghamella sp.*, presentó resistencia a la presencia de Cd hasta 550 mg/L, mostrando también cambios morfológicos, reducción del diámetro de crecimiento, cambios en la coloración de la colonia y cambios en el micelio aéreo al igual que los aislados Os10 y Os 27 identificados como *Rhizopus sp.* y *Fusarium sp.* respectivamente figuras 10-12 .



Gráfica 3 Resistencia en placa a Cadmio en medio de cultivo solido de los 57 aislados de Concepción del Oro. LMP: Limite Maximo permisible 37 mg/kg segun la NOM-147-SEMARNAT-2004

Aislado	0 / control	50 mg/L	100 mg/L
Os 6 <i>Paecilomyces sp.</i>			
150 mg/L	250 mg/L	350 mg/L	450 mg/L
550 mg/L	650 mg/L	750 mg/L	850 mg/L
950 mg/L	1050 mg/L		

Figura 9 Aislado Os 6 resistente hasta 1050 mg/L de Cd presente en el medio de cultivo. Método medición del diámetro de crecimiento de la colonia, DE <0.1 cm

Aislado	0 / control	50 mg/L	100 mg/L
Os 30 <i>Cunninghamella sp.</i>			
150 mg/L	250 mg/L	350 mg/L	450 mg/L
			
550 mg/L	650 mg/L		
			

Figura 10 Aislado Os30 resistente hasta 550 mg/L de Cd presente en el medio de cultivo. Método medición del diámetro de crecimiento de la colonia, DE <0.1 cm

Aislado	0 /Control	50 mg/L	100 mg/L
Os 10 <i>Rhizopus sp.</i>			
150 mg/L	250 mg/L	350 mg/L	450 mg/L
			
550 mg/L	650 mg/L		
			

Figura 11 Aislado Os10 resistente hasta 550mg/L de Cd presente en el medio de cultivo. Método medición del diámetro de crecimiento de la colonia, DE <0.1 cm

Aislado	0 /Control	50 mg/L	100 mg/L
Os 27 <i>Fusarium sp.</i>			
150 mg/L	250 mg/L	350 mg/L	450 mg/L
			
550 mg/L	650 mg/L		
			

Figura 12 Aislado Os27 resistente hasta 550mg/L de Cd presente en el medio de cultivo. Método medición del diámetro de crecimiento de la colonia, DE <0.1 cm

7.3 Caracterización molecular de aislados resistentes

El 100% de los aislados resistentes a Cd o Pb amplificaron para el ITS en un rango de 500 a 700 pb (Fig.16). Cada producto de PCR se purifico para ser secuenciado en sus cadenas directo y reverso, así, de cada producto amplificado se obtuvieron dos secuencias, además este paso se realizó una segunda vez, obteniendo 4 secuencias para cada producto amplificado.

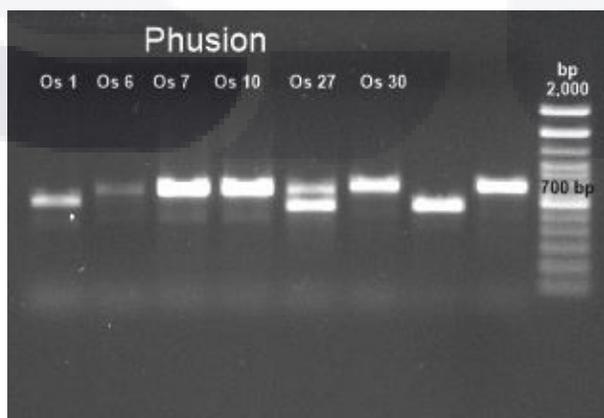


Figura 13 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados de la región ITS Carriles: 1-6 aislados resistentes a Cd o Pb, 9 Marcador de peso molecular (100 pb)

De las secuencias obtenidas se realizó un ensamble en el software Seqman para obtener una sola secuencia consenso por aislado. Todas las secuencias tuvieron un porcentaje de identidad de más del 80% de identidad con alguna secuencia registrada en la base de datos del NCBI (Tabla 4)

Tabla 4. Identificación de los aislados resistentes a Cd o Pb obtenidos de suelos contaminados por jales mineros; comparados con secuencias existentes en el NCBI a través de la herramienta Blast

Aislado	Fragmento ITS (pb)	Especie coincidente	Identidad (%)	No. GenBank
Os 1	552	<i>Penicillium simplisium</i>	99,46	MW485753.1
Os 6	641	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	99.84	MT453285.1
Os 7	664	<i>Rhizopus microsporus</i>	100	MH473977.1
Os 10	666	<i>Rhizopus microsporus</i>	100	MH473977.1
Os 27	513	<i>Fusarium oxysporum</i>	99,61	KX655587.1
Os 30	715	<i>Cunninghamella sp.</i>	87,50	OR096349.1

Secuencia Consenso de Os1

```
AGCGGGTATCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGATAGATTGATGGGGGTCGC
CGGCGGGCGCCGGCCGGGCCTACGGAGCGGGTGACGAAGCCCCATACGCT
CGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGGGGGGA
TCGGGGGGCGGGGCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGC
TCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA
CTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTT
CTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAG
CTAATCGCTCAGACTGCAATCTTCAGACAGAGTTCAATGGTGTCTTCGGCGGG
CGCGGGCCCCGGGGGCGGGTGCCCCCGGCGGCCGTGAGGCGGGCCCCGCC
GAAGCAACAAGGTACGATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCC
TCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCCTA
```

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Penicillium clone TLST405-7-F21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Penici...	1009	1009	100%	0.0	99.64%	591	KR673831.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium simplicissimum isolate WW5A1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Penicillium simpli...	1005	1005	100%	0.0	99.46%	570	MW485753.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fungal sp. strain UBDFM06 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5...	fungal sp.	1000	1000	100%	0.0	99.28%	588	MK116432.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium simplicissimum strain HF3S16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Penicillium simpli...	1000	1000	100%	0.0	99.28%	605	OP179089.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium simplicissimum strain HF2S26 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Penicillium simpli...	1000	1000	100%	0.0	99.28%	604	OP179011.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium sp. CCF3812 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribos...	Penicillium sp. C...	1000	1000	100%	0.0	99.28%	2978	FJ430775.1

Secuencia Concenso de Os6

GAAAGATGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAG
GGATCATTACCGAGTTATACAACTCCCAAACCCACTGTGAACCTTACCTCAGTT
GCCTCGGCGGGAACGCCCGGCCGCCTGCCCCCGCGCCGGCGCCGGACCC
AGGCGCCCGCCGCAGGGACCCCAAACCTCTCTTGCATTACGCCAGCGGGCG
GAATTTCTTCTCTGAGTTGCACAAGCAAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
GCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAGCC
CCCCCGGGGGCCTCGGTGTTGGGGGACGGCACACCAGCCGCCCCCGAAAT
GCAGTGGCGACCCCGCCGCAGCCTCCCCTGCGTAGTAGCACACACCTCGCA
CCGGAGCGCGGAGGCGGTACGCCGTAAAACGCCCAACTTTCTTAGAGTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
AATCTTGCTGAAAAA

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Purpureocillium lilacinum isolate DSM100329_DF58_RLCS20 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc...	Purpureocillium li...	1147	1147	97%	0.0	99.84%	1186	MT453285.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Purpureocillium lilacinum culture CBS.226.73B strain CBS.226.73B small subunit ribosomal RNA gene, partial se...	Purpureocillium li...	1147	1147	97%	0.0	99.84%	940	MH860675.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Purpureocillium lilacinum isolate C3W101 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Purpureocillium li...	1147	1147	97%	0.0	99.84%	636	MN783020.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Purpureocillium lilacinum strain PL1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Purpureocillium li...	1147	1147	97%	0.0	99.84%	937	OQ402321.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Purpureocillium lilacinum isolate CaF2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Purpureocillium li...	1147	1147	97%	0.0	99.84%	1565	MZ545388.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Purpureocillium sp. 2 BRO-2013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ri...	Purpureocillium s...	1147	1147	97%	0.0	99.84%	896	KF367485.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paecilomyces lilacinus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	Purpureocillium li...	1147	1147	97%	0.0	99.84%	2314	AB103380.1

Secuencia Consenso de Os7

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACTAATGTATTGGCACTTTACTGGGAT
TCACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGAAGGTCG
TAACTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCTG
TTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCTTTGGGAAGGAA
GGTGCCTGGTACCCTTTACCATATAACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATAAA
ATAACAACCTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC
AAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC
GCAGCTTGCACCTCTATGGATCTTCTATAGAGTACGCTTGCTTCTAGTATCATAACC
AACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGGTGATGGACAATTTTCGGTAAAATTTAAT

TATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTTTCATTAAATTACGAACT
 ACCTAGCCATCGTGCTTTTTTTGGTCCAACCAAAAAACATTTAATCTGGGGGTTT
 TGCCAACCAAGCAGATATTTAATGCTCTTTAACTATGATCTGAAGTCAAGTGGG
 ACTACCCGCT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus sp. isolate LANL_1351.24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spa...	Rhizopus sp.	1227	1227	100%	0.0	100.00%	671	MZ374660.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate CK1330 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Rhizopus micros...	1210	1210	98%	0.0	100.00%	668	MH473977.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate CK1203 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Rhizopus micros...	1210	1210	98%	0.0	100.00%	662	MH473871.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate CK416 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene a...	Rhizopus micros...	1205	1205	98%	0.0	100.00%	665	MH474283.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate CK1333 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Rhizopus micros...	1201	1201	97%	0.0	100.00%	659	MH473980.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate CK1322 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Rhizopus micros...	1201	1201	97%	0.0	100.00%	655	MH473971.1

Secuencia Consenso de Os10

CGTAGGTGAACcTGCGGAAGGATCATTAACTAATGTATTGGCACTTTACTGGGA
 TTCACTTCTCAGTATTGTTTGGCTTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGAAGGTC
 GTAAGTACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCT
 GTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGA
 AGGTGCCTGGTACCCTTTACCATATACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATAA
 AATAACAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAG
 CAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAA
 CGCAGCTTGCCTCTATGGATCTTCTATAGAGTACGCTTGCTTCAGTATCATAAC
 CAACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGGTGGTGGACAATTCGGTAAAATTTAA
 TTATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTTTCATTAAATTACGAAC
 TACCTAGCCATCGTGCTTTTTTTGGTCCAACCAAAAAACATTTAATCTGGGGGTT
 CTGCCAACCAAGCAGATATTTAATGCTCTTTAACTATGATCTGAAGTCAAGTGG
 GACTACCCGCTG

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus sp. isolate LANL_1351.24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spa...	Rhizopus sp.	1230	1230	100%	0.0	100.00%	671	MZ374660.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate CK1330 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Rhizopus micros...	1212	1212	98%	0.0	100.00%	668	MH473977.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate CK1203 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Rhizopus micros...	1212	1212	98%	0.0	100.00%	662	MH473871.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate CK416 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene a...	Rhizopus micros...	1206	1206	98%	0.0	100.00%	665	MH474283.1

Secuencia consenso de OS27

TTGGTGGDACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTG
 TGAACATAACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGG
 ACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAA
 ACCATAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
 AGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
 GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTC
 GAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTC
 GCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAA
 AACCTCGTTACTGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGA
 ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCT

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. cepae isolate AC16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transc...	Fusarium oxyspo...	939	939	100%	0.0	99.61%	520	KX655587.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. cepae isolate CSC6057ITS internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso...	Fusarium oxyspo...	939	939	100%	0.0	99.61%	547	HQ658968.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. cepae isolate CSC6056ITS 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri...	Fusarium oxyspo...	939	939	100%	0.0	99.61%	548	HQ658967.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate N-61-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac...	Fusarium oxyspo...	937	937	100%	0.0	99.61%	585	MT560381.1

Secuencia Consenso de Os 30

GTAAGTCGTACAAGGTGCCGGAGGACCCTCGAAGATCATATTTTAAAAAAGTTT
 TTTCTTTTTGAAAAAATTTTTTTAAAAAATTCATTACAGTGTGGGAAATGTCTA
 CATAAGCTTGTGCCTGGTTCAGTCATTGTGCTGCCACAGGAGTTTACTTTGGAT
 TCTTTGCAGTCCATTGATAGCTTTCCGTTGAGGAAACCTTCTGTAATGGGGAT
 AAGATTTTTCTTTATTATACTTTTTTTTTTTAACTGAATCGATAGACCATAAATTTAT
 GGTGTTTTTTTTTATAATAAAAAATTTAAAAACAACCTTCAGCAATGGATTTTT
 CGGCTTTCGTATCGATGAAGAACCAGCAAATCGCGATATGTAATGTGATTTGC
 CTATAGTGAATCATCAAATTTTTGAACCCATTTTCCACCTTATGGTATTCCATAAG
 GTACGTCTGTTTCAGTACCMCTAATAAATTTCTCCMCCTTTGGGGGGTTTTTTT
 TAAAAAAAACGAGATAAATGATTACTGGTCTGGTGATTCTTTTTTTTCTAAAAA
 AAAAAAAAATCACTCTCAACCTAAATATTAGGCTCGACTTCTTTTTTTTCCC
 CCCGGAAAAAATCAAGTCAGGCTTTAATAAAATTTTCATTTCTACTAAGGTTTAT
 TGCCAATATAATTTTTAAAAAATTTGGCCTGAAATCAGATGGGACTACCC

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cunninghamella sp. DF12098 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribo...	Cunninghamella...	702	702	92%	0.0	86.40%	727	JQ889699.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cunninghamella binariae isolate cby1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp...	Cunninghamella...	684	684	89%	0.0	86.37%	758	KY315570.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cunninghamella sp. SPB-2023a isolate CV00228 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal...	Cunninghamella...	684	684	84%	0.0	87.50%	592	OR096349.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cunninghamella bainieri isolate HT007 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s...	Cunninghamella...	678	678	89%	0.0	86.33%	728	MH512950.1

7.4 Concentración de metal que inhibe 50% del crecimiento (IC₅₀)

El grado de resistencia de los diferentes aislados elegidos con anterioridad al cadmio y plomo se corroboró en base a la medición de la inhibición del crecimiento en cultivos tratados con metales. Además, para analizar los cambios específicos del metal en el hongo, se calculó el valor de IC₅₀ (Tabla 5 y 6). Como se muestra en la Fig 14 y 15, el patrón de crecimiento de los aislados varió con la adición de diferentes concentraciones de estos metales.

Tabla 5. Inhibición de crecimiento al 50% (IC₅₀) de los hongos resistentes a Cd aislados de suelos contaminados con jales mineros.

Aislado	IC ₅₀ (mg/L)
Os 6	311,3
Os 10	29,3
Os 27	223,0
Os 30	25,18

Tabla 6. Inhibición de crecimiento al 50% (IC₅₀) de los hongos resistentes a Pb aislados de suelos contaminados con jales mineros.

Aislado	IC ₅₀ (mg/L)
Os 1	3874
Os 6	1176,0
Os 7	211,8

Se observó una menor producción de biomasa en comparación con la del control en cultivos suplementados por separado con cada metal en las concentraciones correspondientes, lo que demuestra que la toxicidad de los metales probados, para los organismos aislados de suelos contaminados con jales mineros. Cuando se aumentó la cantidad inicial de este metal en el medio, el crecimiento disminuyó significativamente.

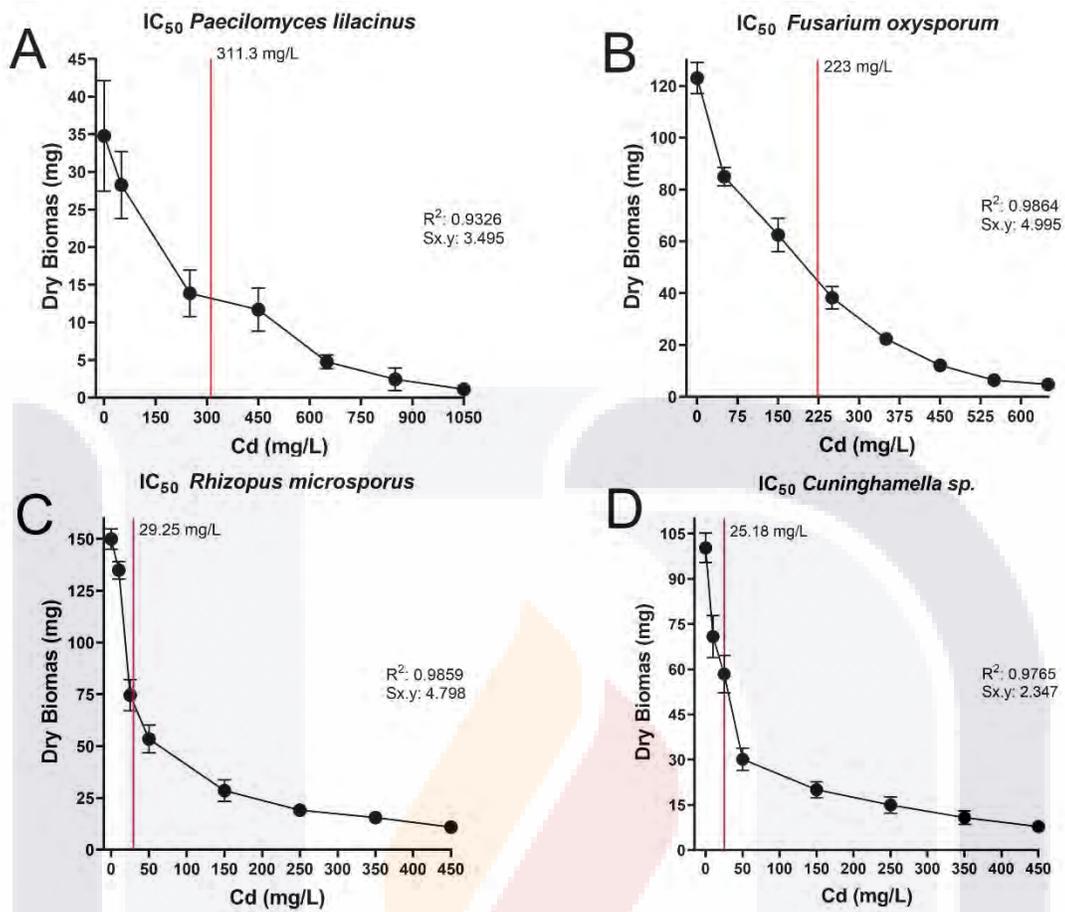


Figura 14 Inhibición de crecimiento de los aislados de hongos frente a diferentes concentraciones de Cd. La línea roja indica el valor de IC₅₀ para cada aislado. A) *Paecilomyces lilacinus*, 311.3 mg/L; B) *Fusarium oxysporum*, 223 mg/L; C) *Rhizopus microsporus*, 29.2 mg/L; D) *Cunninghamella sp.*, 25.18 mg/L. Valor Sx.y es la desviación estándar arrojada por el programa GraphPad Prism 9.0.0.

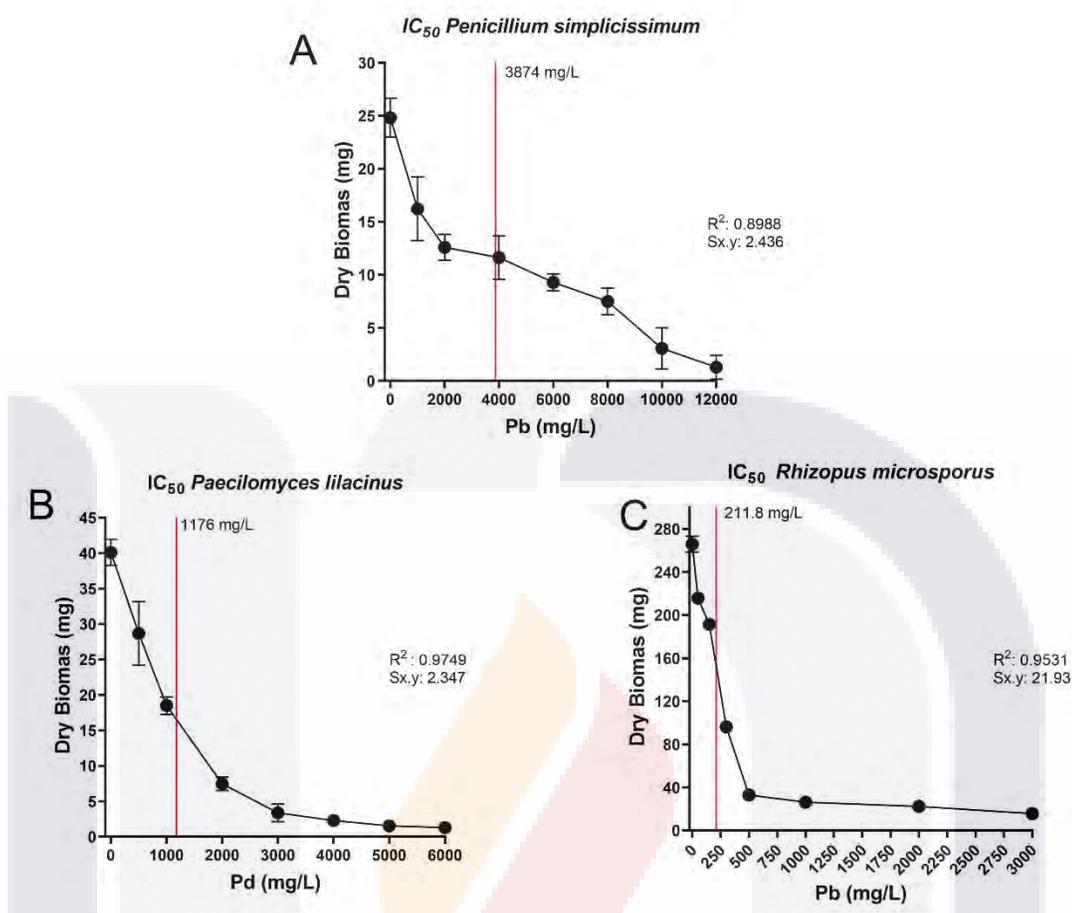


Figura 15 Inhibición de crecimiento de los aislados de hongos frente a diferentes concentraciones de Pb. La línea roja indica el valor de IC₅₀ para cada aislado. A) *Penicillium simplicissimum*, 3874 mg/L; B) *Paecilomyces lilacinus*, 1176 mg/L; C) *Rhizopus microsporus*, 211.8 mg/L. Valor Sx.y es la desviación estándar arrojada por el programa GraphPad Prism 9.0.0

Considerando la exposición al Cd se observa una disminución significativa del crecimiento en *R. microsporus* y *Cunninghamella sp* del 48.7% y 41.76% con respecto al control cuando la cantidad inicial del metal aumento a 25 mg/L. Para la exposición al Pb *P. lilacinus* presenta una disminución del 28.51% del crecimiento con la adición de la primera concentración (500 mg/L) con respecto al control y *R. microsporus* presenta una disminución del 27.94% con la concentración de 50 mg/L de Pb en el medio de cultivo con respecto al control sin metal.

7.5 Espectroscopia Infrarroja transformada de Fourier (FTIR)

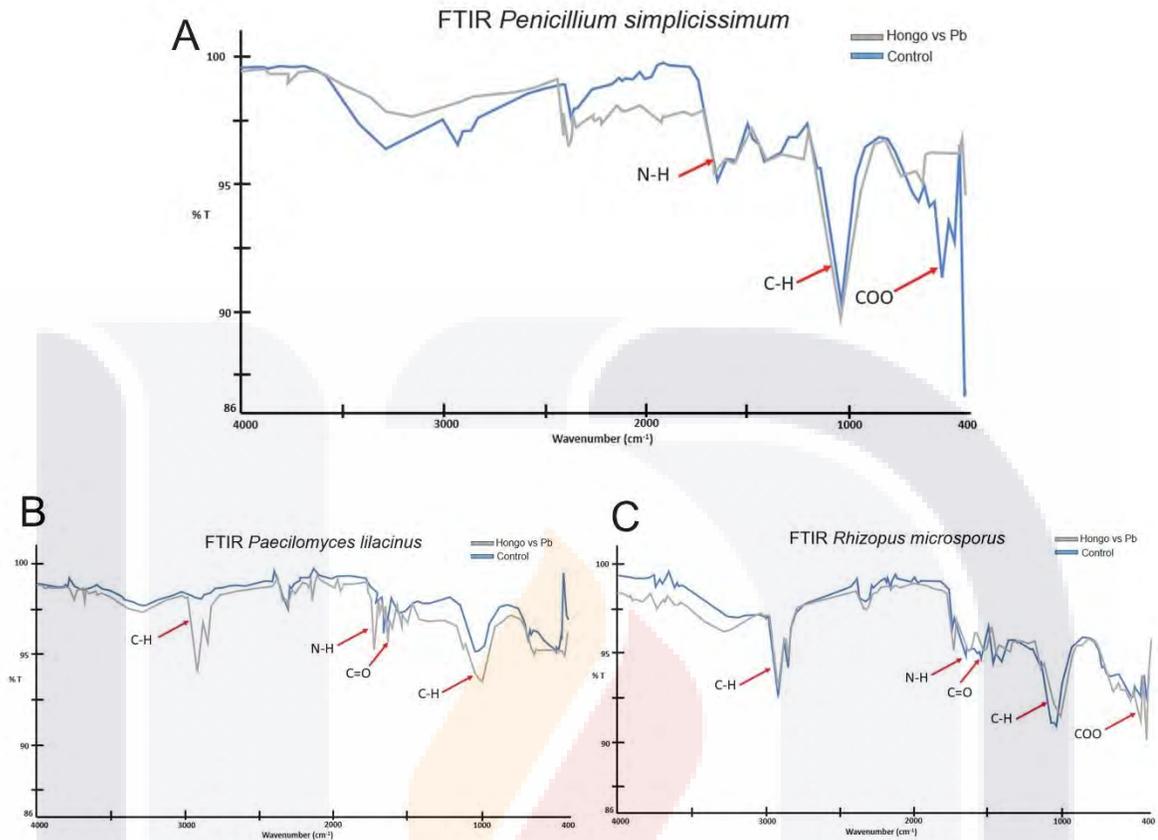


Figura 16 Espectros infrarrojo transformada de Fourier del 400 al 4000 cm^{-1} para los hongos resistentes a Pb, en rojo se marcan los picos más relevantes encontrados para la muestra biológica.

Los espectros FTIR de biomasa fúngica cultivada en condiciones de control, así como en presencia de Pb y Cd, se obtuvieron en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} (Fig 16 y 17). Se observaron cambios en los espectros de cada hongo.

El pico marcado observado alrededor de 3400 cm^{-1} se atribuye al grupo -OH, mientras que el pico alrededor de 2925 cm^{-1} se debe al estiramiento C-H. El pico observado en 1060 y 1040 se debe al grupo C-H. El pico alrededor de 555 cm^{-1} se debe a la presencia del grupo -OOC. En los casos de *P. lilacinus* y *R. microsporus* hay una mayor tensión de los picos de los grupos funcionales -OOC, C-H Y N-H cuando están en contacto con Pb en el medio de cultivo. A comparación con el espectro de *P. simplicissimum* en donde no se observan cambios significativos, al igual que el espectro de *P. lilacinus* en contacto con Cd en el medio de cultivo.

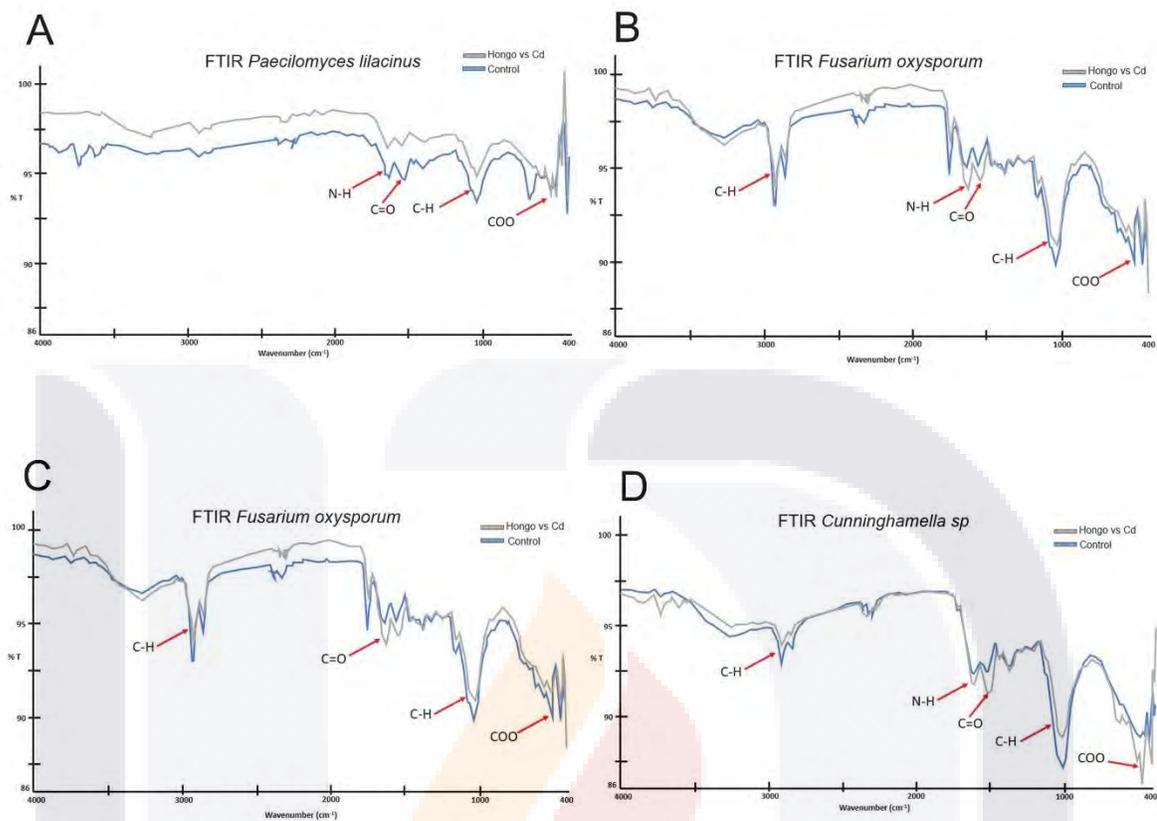


Figura 17 Espectros infrarrojo transformada de Fourier del 400 al 4000 cm^{-1} para los hongos resistentes a Cd, en rojo se marcan los picos más relevantes encontrados para la muestra biológica.

Los picos fuertes alrededor de 1645 cm^{-1} son causados por la flexión de los grupos N-H. Los picos en 2924 y 1043 cm^{-1} que representan vibraciones de estiramiento C-H y vibraciones de estiramiento C-OH. Por otro lado, los picos de las vibraciones de estiramiento N-H en alrededor de 1600 al 1000 cm^{-1} . En los espectros de *F. oxysporum*, *R. microsporus* y *Cunninghamella sp.* Se observa un mayor estiramiento en los picos de los grupos funcionales -OOC, N-H Y C-O.

Los cambios en los espectros de FTIR en presencia de Pb (Fig. 16B y 16C) y Cd (Fig.17B, 17C y 17D) mostraron la participación de grupos funcionales que inmovilizan los metales presentes en el medio de cultivo en las paredes celulares.

7.6 SEM y EDX

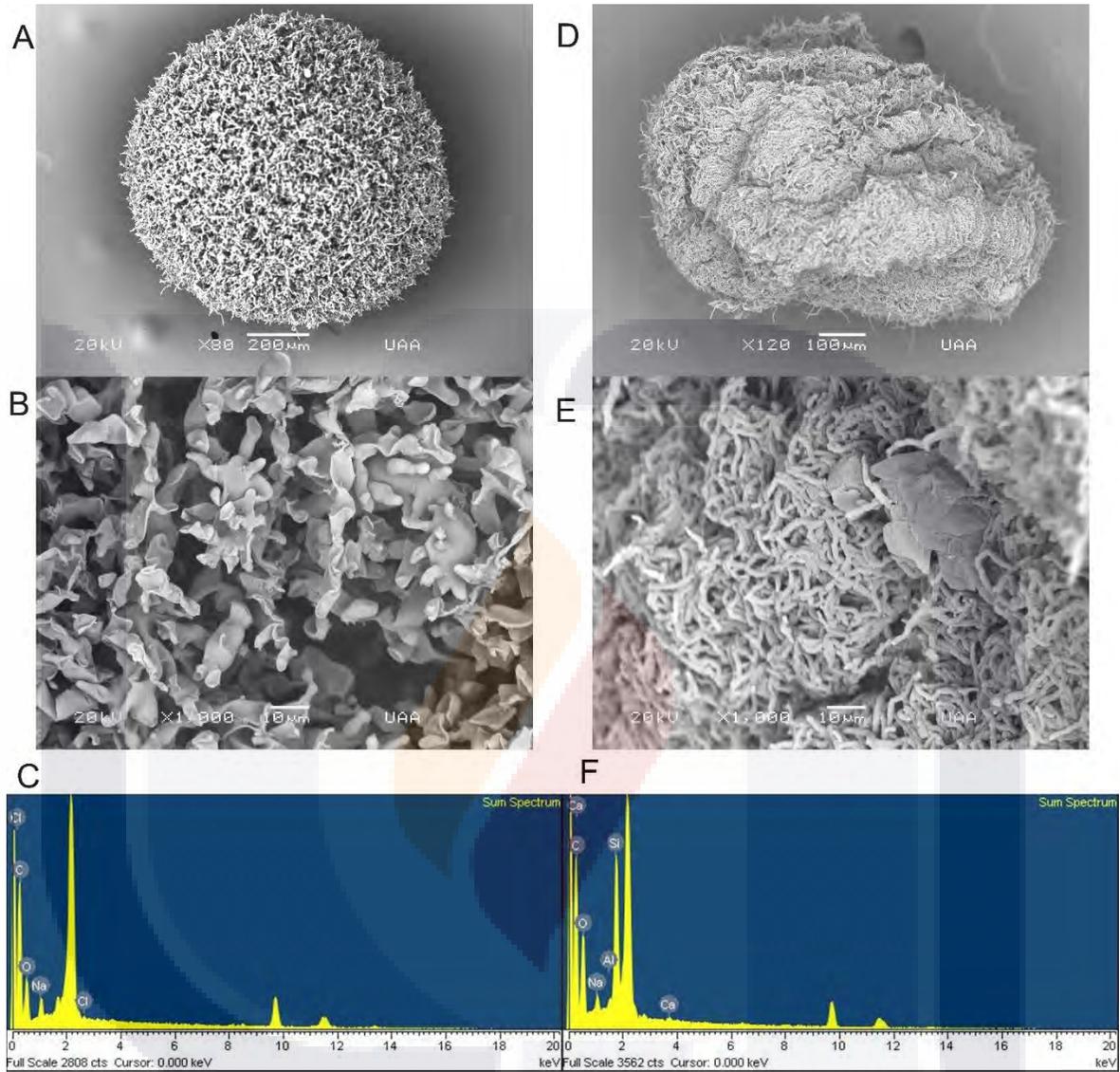


Figura 18 Microfotografías del hongo *Penicillium simplicissimum* en condiciones de control (A, B, C) y en tratamiento con la concentración de 3874 mg/L Pb (D, E, F).

Cada una de las microfotografías muestran los cambios morfológicos que tiene cada uno de los hongos al estar en contacto con el Pb o Cd a comparación con el control sin metal.

La morfología del cumulo de hifas a objetivos de X55-60 presentes en las Fig. 18A, 19A y 20A se muestran con una estructura homogénea y bordes regulares mientras que las muestras tratadas con el Pb (18D, 19D y 20D) se muestran más pequeñas

a objetivos de X55-120 con deformidades en la estructura, además de un apelmazamiento muy notable.

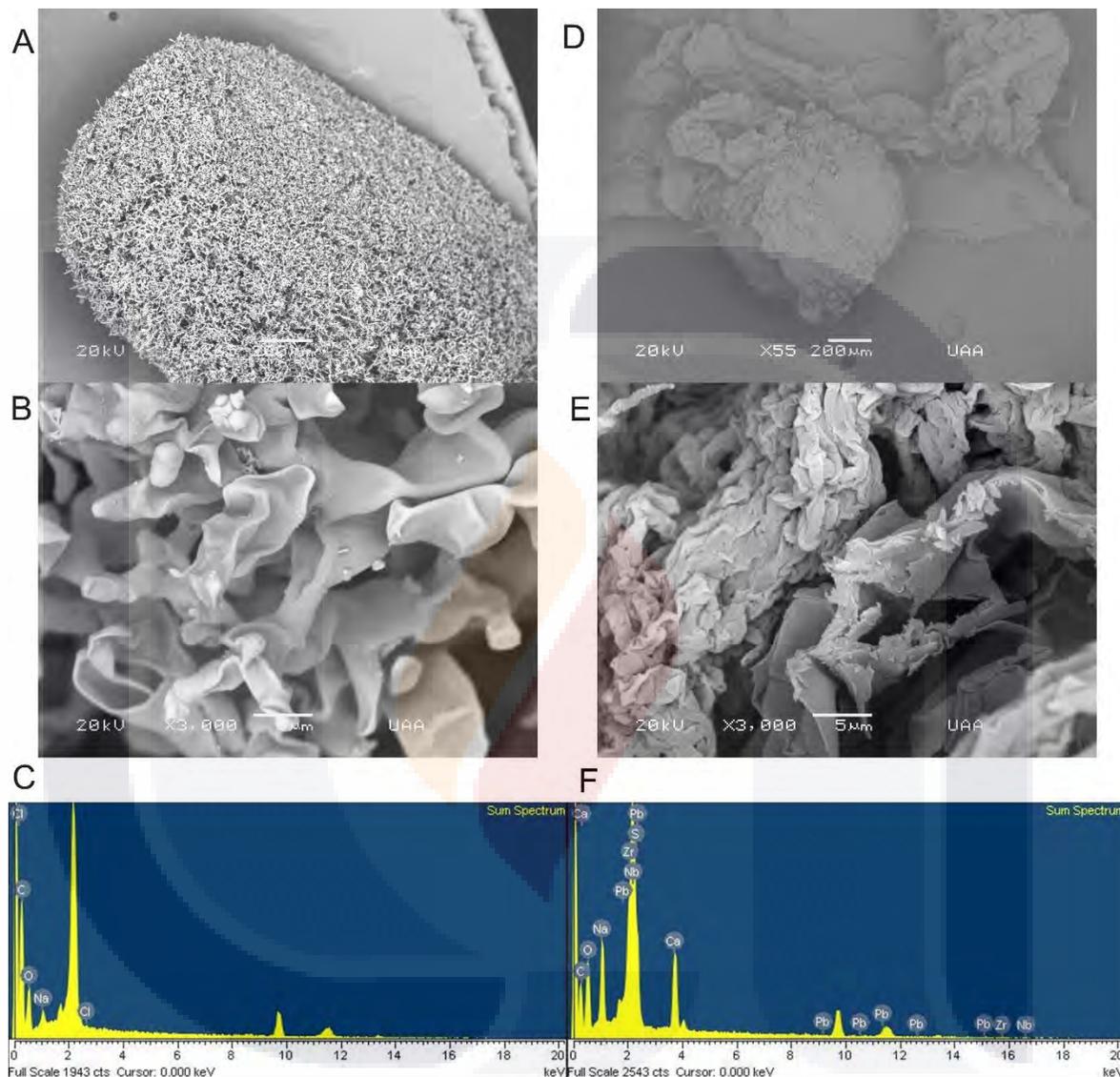


Figura 19 Microfotografías del hongo *Paecilomyces lilacinus* en condiciones de control (A, B, C) y en tratamiento con la concentración de 1176 mg/L Pb (D, E, F).

La morfología del cumulo de hifas a objetivos de X55-60 presentes en las Fig. 18A, 19A y 20A se muestran con una estructura homogénea y bordes regulares mientras que las muestras tratadas con el Pb (18D, 19D y 20D) se muestran más pequeñas a objetivos de X55-120 con deformidades en la estructura, además de un apelmazamiento muy notable.

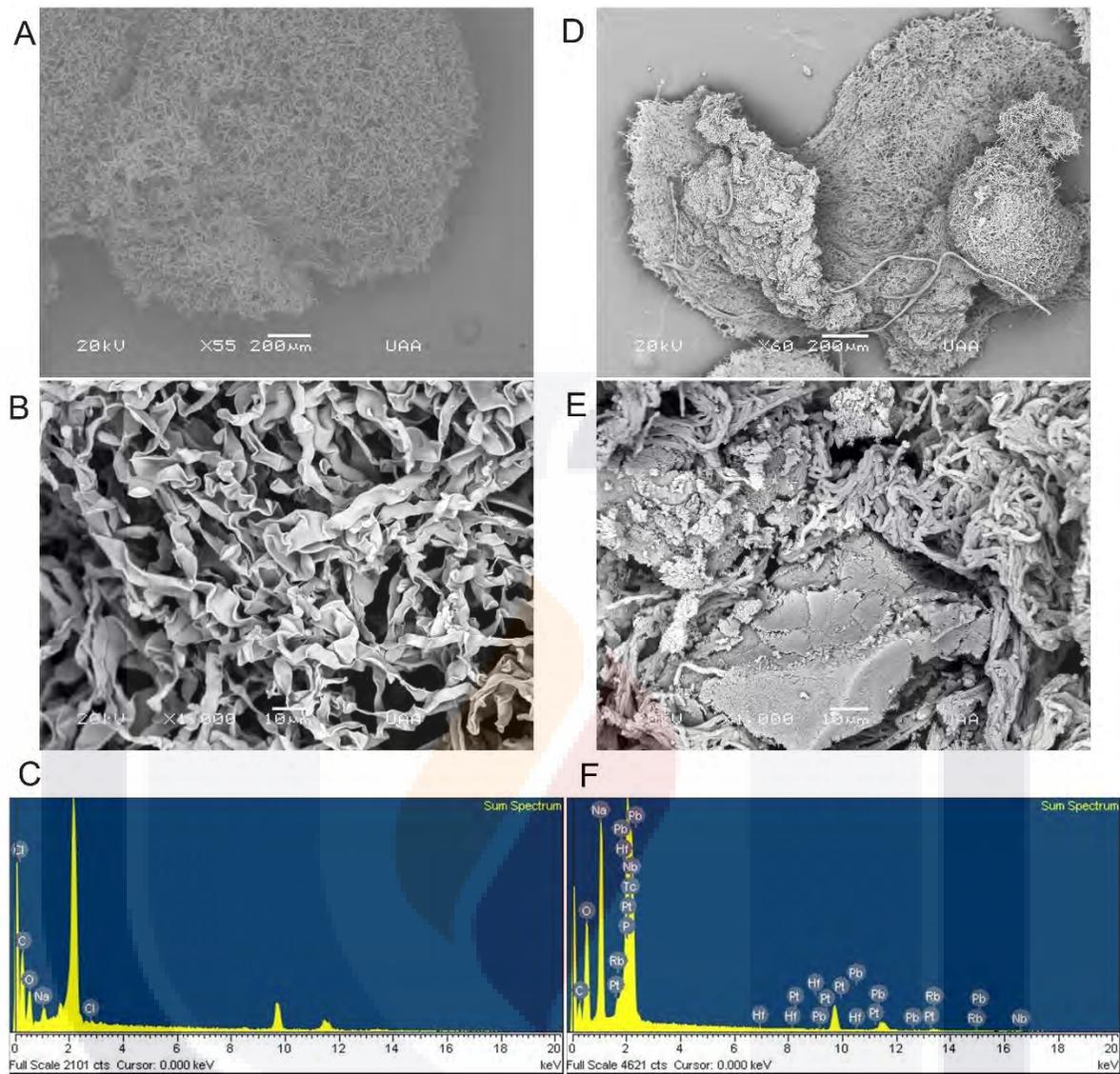


Figura 20 Microfotografías del hongo *Rhizopus microsporus* en condiciones de control (A, B, C) y en tratamiento con la concentración de 211.8 mg/L Pb (D, E, F).

Las hifas a objetivos de X1000 de las Fig. 18B, 19B, 20B se observan de manera uniforme envueltas como cinta, hialinas y con protuberancias que indican el crecimiento de más micelio. Mientras que las que fueron tratadas con Pb se muestran compactadas, densas y de menor longitud (18E, 19E, 20E) con aglomeraciones, en donde se puede observar que las hifas no son continuas y parecen retazos unidos de forma arrugada.

El estudio de EDS Rx mostro que el plomo no está presente en la superficie del hongo tratado (Fig. 18F), Mientras que para los otros hongos (19F y 20F) se encuentra presente en la superficie, en el control no se encontró la presencia aparente de ningún metal (Fig. 18C, 19C, 20C). Cabe resaltar que otros metales encontrados en el estudio pueden ser trazas provenientes de las sales con las que se trabajaron los medios de cultivo y las soluciones de metal.

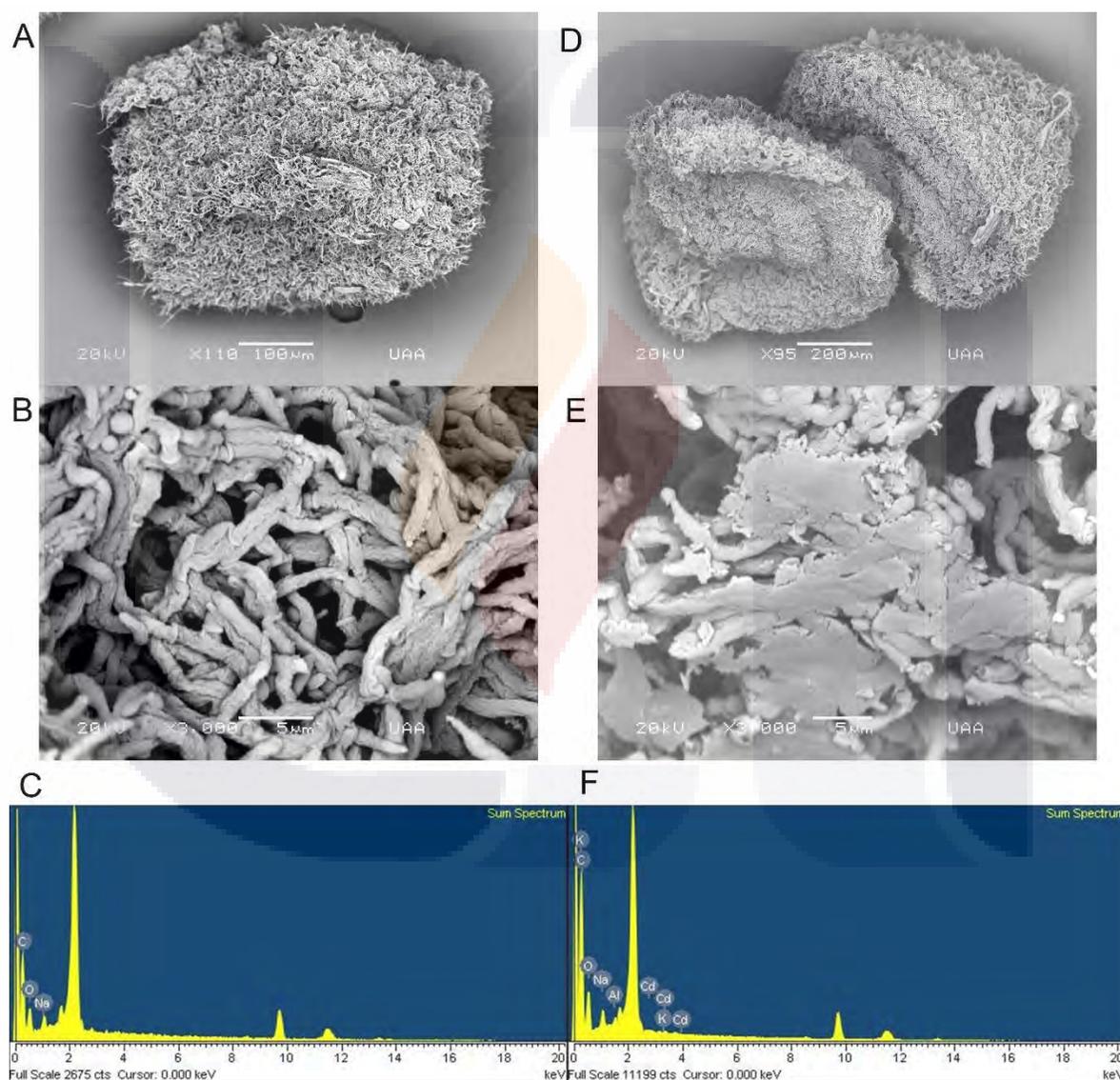


Figura 21 Microfotografías del hongo *Paecilomyces lilacinus* en condiciones de control (A, B, C) y en tratamiento con la concentración de 311.3 mg/L Cd (D, E, F).

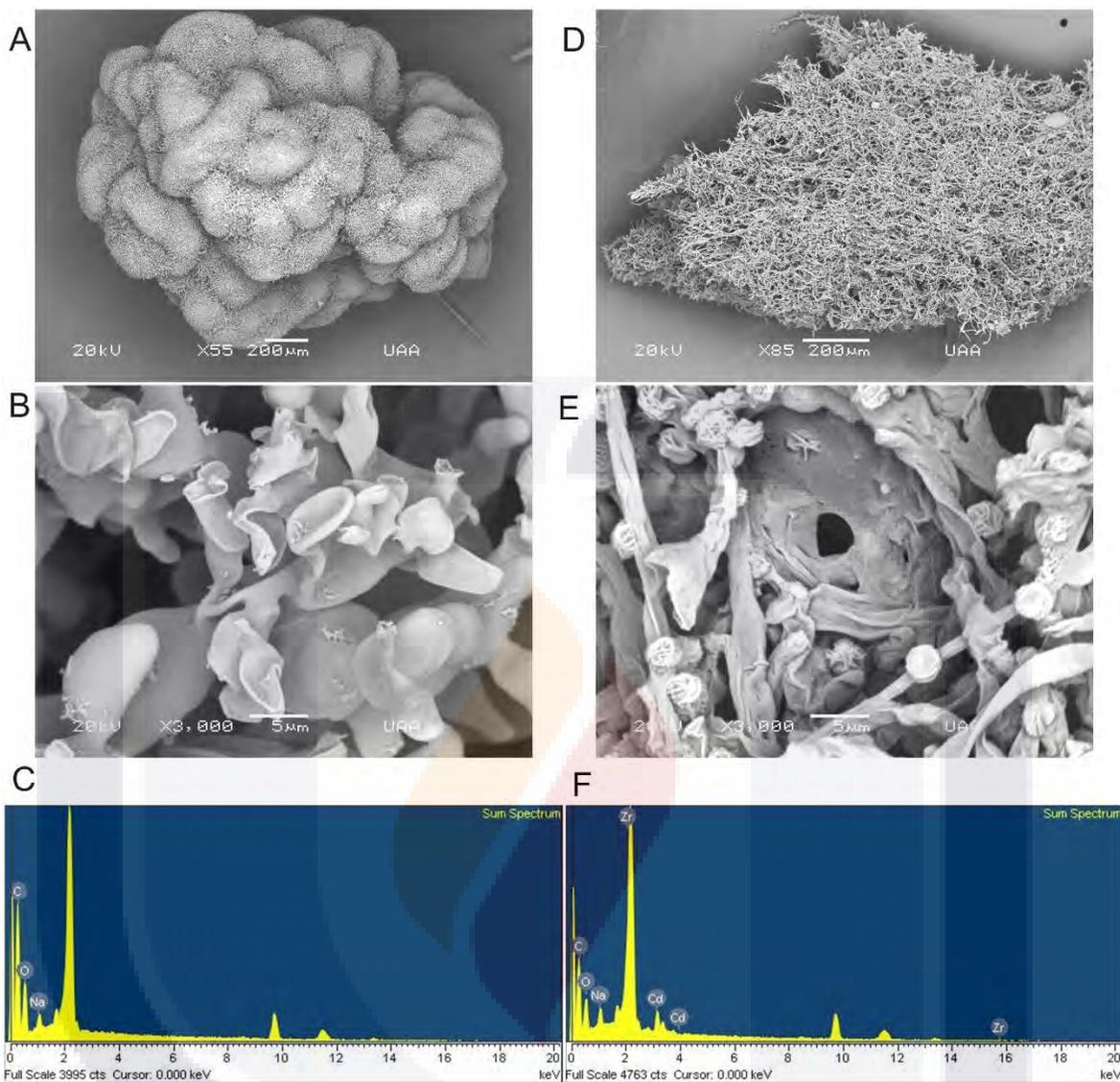


Figura 22 Microfotografías del hongo *Rhizopus microsporus* en condiciones de control (A, B, C) y en tratamiento con la concentración de 29.25 mg/L Cd (D, E, F).

En cuanto a las muestras tratadas con cadmio Fig. 21D, 22D, 23D, 24D a objetivos de X60-85 se observan deformidades en la estructura, así como bordes irregulares y compactación del micelio, a comparación de los hongos sin la presencia de metal, donde se observan bordes más regulares y menos compactación del micelio (Fig. 21A, 22A, 23A, 24A)

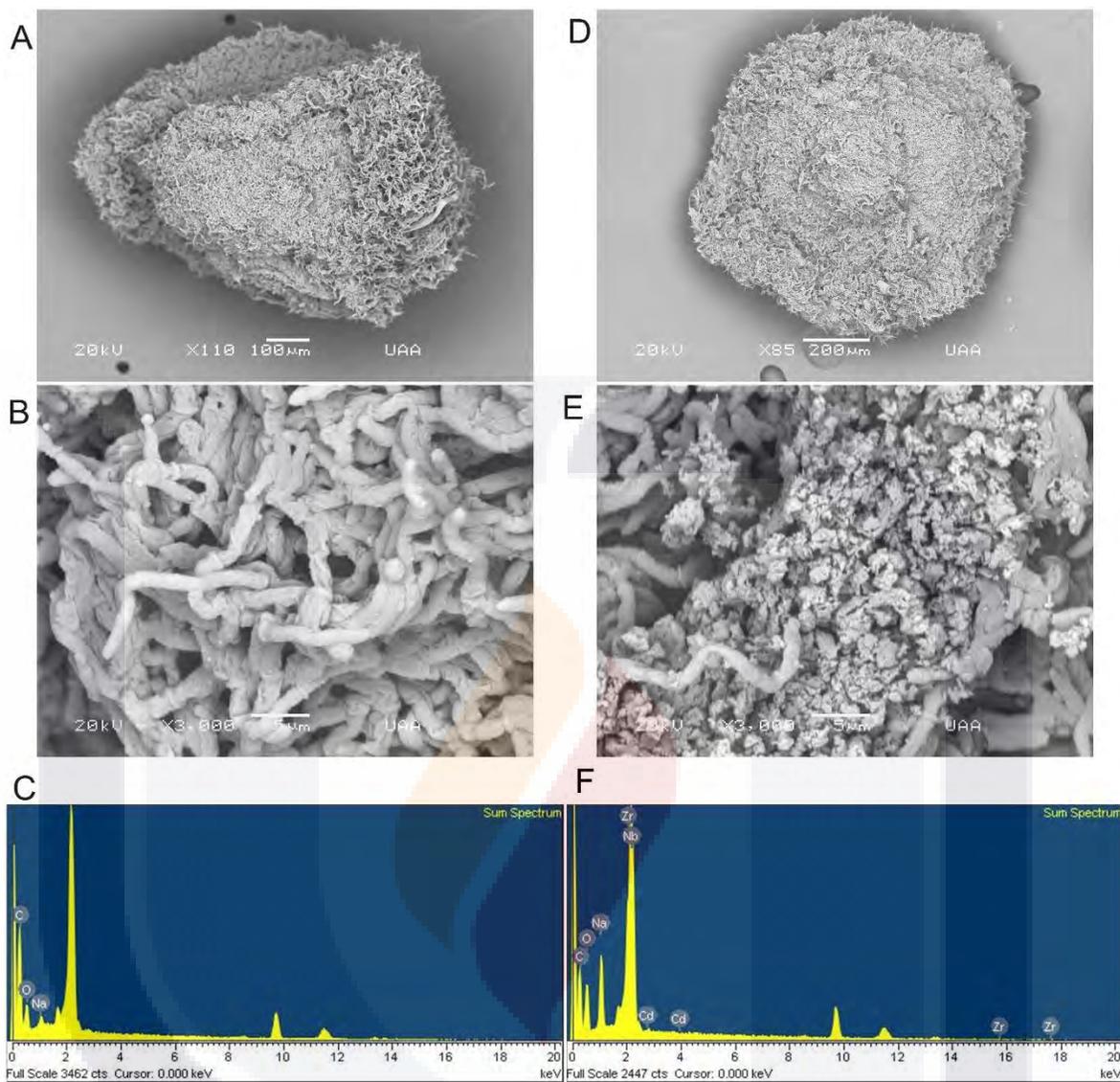


Figura 23 Microfotografías del hongo *Fusarium oxysporum* en condiciones de control (A, B, C) y en tratamiento con la concentración de 223 mg/L Cd (D, E, F).

Además, en los objetivos X1000 y X3000 se distinguen las hifas de aspecto largo menos compactadas y de aspecto largo rugoso enredadas (Fig. 21B y 23B) mientras que para las Fig. 22B, 24B, se muestran cristalinas y uniformes con pequeñas protuberancias corrugadas que indican el crecimiento de nuevo micelio. En cuanto a los hongos tratados con cadmio se observan hifas prensadas, delgadas y con gránulos presentes en la estructura (Fig. 21E, 23E y 24E) mientras que en la Fig. 22E se puede distinguir estructuras circulares grandes y un orificio en una parte del micelio.

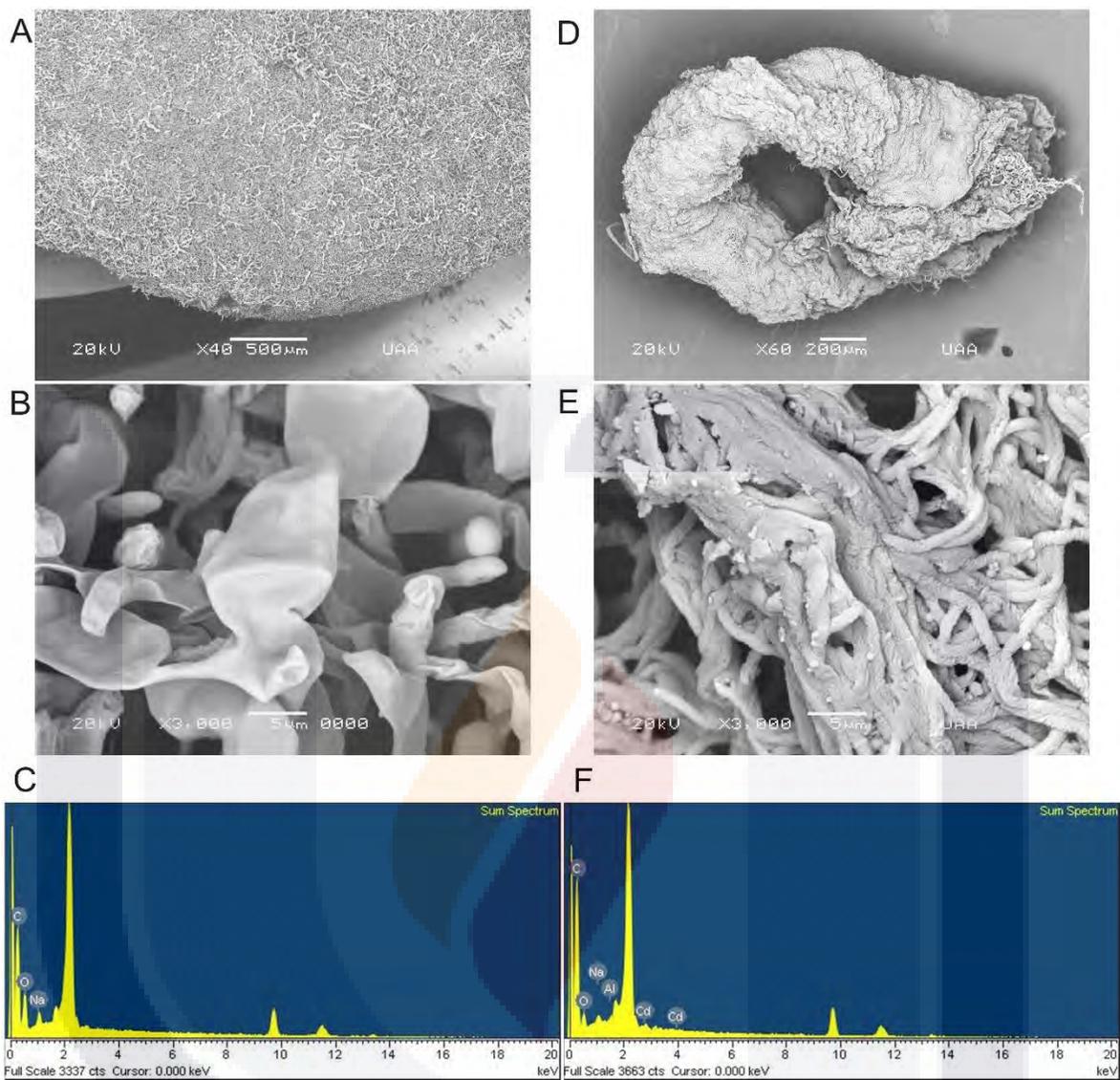


Figura 24 Microfotografías del hongo *Cunninghamella* sp. en condiciones de control (A, B, C) y en tratamiento con la concentración de 25.18 mg/L Cd (D, E, F).

El análisis de EDS Rx del cadmio mostro la presencia de cadmio en la superficie de los hongos, pero en este caso a comparación del Pb se encentra en menor cantidad. Las gráficas (Fig 21F, 22F 23F y 24F) tienen picos mostrando la presencia del cadmio mientras que las gráficas control (Fig. 21C, 22C, 23C y 24C) no muestran estos picos.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se detectó una alta resistencia al Pb en tres especies fúngicas autóctonas de suelos contaminados con jales mineros mexicanos y al Cd en cuatro especies. Estos hallazgos sugieren que algunos hongos han desarrollado la capacidad para inmovilizar metales pesados presentes en el suelo; lo cual tiene relevancia en la mitigación de la contaminación causada por la minería al medio ambiente y disminuir el riesgo de exposición y daño a las poblaciones humanas colindantes. Se llevó a cabo la identificación morfológica de los hongos resistentes a Cd o Pb y su identidad se corroboró con los resultados obtenidos en las pruebas moleculares para la identificación de los aislados mediante la secuenciación de fragmentos ITS altamente conservados en los hongos y su correspondencia con secuencias registradas en el NCBI.

Los aislados mostraron resistencia a distintas concentraciones de Cd o Pb. En la exposición a Pb se observó que *P. simplicissimum* mostró resistencia hasta 11,000 mg/L de Pb, mientras que los aislados *P. lilacinus* y *R. microsporus* presentaron resistencia hasta 6,000 mg/L de Pb.

En la exposición al Cd, *P. lilacinus* fue tolerante hasta 950 mg/L, y *Cunninghamella* sp., *R. microsporus* y *F. oxysporum* mostraron resistencia hasta 550 mg/L. Todos los aislados experimentaron reducción en el crecimiento en presencia de estos metales por lo que el crecimiento radial del micelio fue significativamente más corto en proporción a los controles. Esta reducción del crecimiento en presencia de diversos metales se ha reportado previamente. Urquhart, et al., (2022) reportó que el crecimiento de *P. variotii* se inhibió a 1,000 mg/L de Pb después de tres días de incubación. Otros estudios reportan concentraciones inhibitorias del crecimiento de 1,000 mg/L de Pb para el género *Penicillium* y 843 mg/L de Cd para el género *Paecilomyces* (Słaba, et al., 2013; Tian et al., 2019). Zeng et al., (2010) muestra un crecimiento de micelio blanco de alta densidad con el fondo de color amarillo para *P. lilacinus* en concentraciones de hasta 8,950 mg/L de Cd este estudio fue realizado con el hongo aislado de una planta fundidora de cadmio. Lo cual resalta

la importancia de realizar estudios a profundidad de los hongos que están en los suelos contaminados con metales, como los presentados en este estudio.

Se ha reportado también que los microhongos saprotróficos autóctonos exhiben niveles muy altos de resistencia a diferentes contaminantes, entre ellos los metales. Estos incluyen a *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Cladosporium sp.* (Alori & Fawole, 2012; Hassan, et al., 2020; Joshi, et al., 2011; Sey & Belford, 2021), sin embargo, ninguno de estos hongos ha mostrado la variación de niveles de resistencia en placa o medio líquido como los observados en esta investigación.

En el estudio de Chun, et al. (2021) se aislaron hongos filamentosos como *Fusarium* y *Trichoderma*, de minas abandonadas que están relacionados con la resistencia a Cu, pero no se menciona si estos presentan resistencia Pb o Cd. *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* han mostrado resistencia a metales como Cd y Pb, además de Cr, Cu y Zn (Liaquat et al., 2020; Zotti et al., 2014) presentando cambios morfológicos en las colonias, en presencia de Cd o Pb tales como colonias pequeñas y cambios de coloración en la colonia. Estos cambios son visibles en este estudio con altas concentraciones de Pb en *P. simplicissimum* y con colonias pequeñas en los hongos con presencia de Cd en el medio de cultivo. Oladipo, et al., (2018) analizó la respuesta al crecimiento y la resistencia a metales pesados en hongos filamentosos aislados específicamente de sitios de minería de oro y piedras preciosas obteniendo como resultado que *Rhizopus microsporus* aislado de este sitio resistió hasta 250 mg/kg de Pb, cantidad que es 24 veces menor a la mostrada por *R. microsporus* en el presente estudio, lo cual sugiere que cada especie de hongo tiene una respuesta particular dependiendo del sitio del que fue aislado.

Un estudio reciente de Văcar et al., (2021) mostró que las concentraciones de IC₅₀ del hongo *Fusarium oxysporum* pueden llegar hasta 1,568 mg/L para el Pb con una disminución del crecimiento considerable, pero no se tienen datos de la IC₅₀ del Cd para esta especie. Para *Paecilomyces* aislado de suelos contaminados con Cd se ha reportado una resistencia de 10 mg/L a Cd y 1,243 mg/L de Pb con un

crecimiento irregular con el Pb y la inhibición del crecimiento con la concentración de 10 mg/L Cd (Urquhart, et al., 2022). Para otros hongos como *Mucor sp.* la biomasa disminuyó considerablemente en presencia de las primeras concentraciones de Pb y Cd (Deng et al., 2011). Este mismo patrón de inhibición de crecimiento lo presentan *R. microsporus* tanto en Pb como en Cd y *Cunninghamella sp.* en presencia de Cd. Lo que nos indica que los hongos tienen resistencia y patrones de crecimiento específicos como los mostrados en los siete hongos encontrados en el presente estudio, por lo cual es importante seguir estudiando la resistencia específica de hongos autóctonos y su posible utilidad para biorremediar el tipo de contaminante para el que están capacitados (Singh & Roy, 2021). De acuerdo con estos resultados es de suma importancia resaltar que la resistencia a ciertos xenobióticos pudiera estar conferida por las características del lugar del que son aislados.

En cuanto a la inmovilización del Cd o Pb, es conocido que las paredes celulares de los hongos están compuestas mayoritariamente por polisacáridos (glucanos, quitina y quitosano, mananos y/o galactomananos) y glicoproteínas, lípidos y pigmentos se encuentran en menores proporciones. Varios grupos funcionales, incluidos amina, carboxilo, fosfato, sulfato, sulfhidrilo e hidroxilo, presentes en estos polímeros ofrecen una gran cantidad de sitios de unión de iones metálicos (Risconi Toledo, et al. 2021)

En las figuras 16 y 17 se observan señalizados con flechas los grupos funcionales encontrados en los espectros de los hongos resistentes a Cd o Pb, al igual que en el estudio de Bayramoğlu & Arica, (2008) donde se observan grupos funcionales distintivos como amino, carboxílicos, hidroxilos y carbonilos en las paredes celulares fúngicas. Además, se observan cambios en los espectros entre el control y los hongos en contacto con el Cd (Fig. 17B, 17C y 17D), mostrando una mayor tensión de los picos con los aislados que están en contacto con este metal en el medio de cultivo al igual que con el Pb (Fig. 16B y 16C). Estos cambios son significativos entre la biomasa fúngica ya que estas diferencias en los picos indican que se está

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

teniendo una inmovilización de los metales, muy seguramente por el mecanismo de biosorción como es mostrado en el estudio de Nirmal Kumar, et al., (2010) donde hubo una disminución en la intensidad de estas bandas lo que indica posibles interacciones químicas entre los iones de metal y los grupos hidroxilo o amina presentes en la biomasa.

En el estudio de Rissoni Toledo et al., (2021) se redujeron los picos ligeramente después de la biosorción, lo que puede ser indicativo de que los iones de metal son inmovilizados con los grupos amina y carboxilo en la biomasa por atracción electrostática. Estos grupos funcionales han demostrado una gran capacidad para interactuar con diferentes metales según el estudio de Barraza-Garza et al., (2013).

En comparación con el estudio de Chen, et. al., (2017) donde se muestra la resistencia de *P. simplicissimum* a 1500 mg/L de Pb se observan colonias de color blanco grisáceo como las obtenidas en este estudio, esto es debido a que el plomo es un metal muy tóxico para los organismos como hongos y levaduras (Chen, Ng, Cheow, & Ting, 2017b). En los análisis de FT-IR de este estudio no se muestra una interacción del Pb con la pared celular del hongo ya que los picos de los grupos funcionales no tienen un estiramiento mayor a los del control, esto da la pauta para pensar en otra forma de inmovilización de este metal por *P. simplicissimum* como lo es algún tipo de secuestro intracelular (Chen et al., 2017b; Firincă et al., 2024a).

En cuanto a las fotos tomadas en el SEM se mostraron cambios morfológicos entre el control y los tratamientos con cada metal. En las figuras 18, 19 y 20 se encontraron los cambios estructurales en el cumulo de micelio y a objetivo de 1000x se observaron cambios específicos en las hifas, estos cambios han sido visibles en hongos de estudios como la remoción de colorantes y metales en agua (Gola, et al., 2018), el estudio de las interacciones del plomo con *T. viride* (Luo et al., 2022) y la eliminación de metales por cepas autóctonas realizado por Firincă et al., (2024) donde se tiene claro que las interacciones con los grupos funcionales en la pared celular causan cambios morfológicos visibles en las hifas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A altas concentraciones de los metales como el Pb y el Cd se observan deformaciones y daños a los hongos observados (Luo et al., 2022) también en este estudio a 1000x con el SEM. Estos cambios son por la degradación de la estructura de la quitina en la pared celular de los hongos debido a la adsorción de los metales dando como resultado la contracción y arrugas en el micelio (Tu et al., 2018).

El análisis de EDX nos muestra resultados del porcentaje atómico de Pb y Cd en la superficie de los hongos en una cantidad pequeña, siendo *P. lilacinus* el que presenta adsorción con un 2.47% de Pb encontrado en su superficie, mientras que *P. simplicissimum* y *R. microsporus* no indican algún porcentaje atómico del Pb en la superficie de su pared celular. Para el Cd se encuentra en un 11.59% para *R. microsporus*, 7% *Cunninghamella sp.*, 2.3% *P. lilacinus* y un 1% en *F. oxysporum*. Estos datos corroboran la información obtenida por los estudios de FT-IR donde *P. simplicissimum* no presenta interacciones con grupos funcionales por lo tanto el Pb no está adsorbido en las células del hongo como lo descrito por Chen et al., (2017b), donde nos menciona que el proceso de tolerancia al metal está más indicado a un proceso intracelular. Además, las interacciones del Cd con grupos funcionales se lograron observar en pequeña medida por *R. microsporus* y *Cunninghamella sp.*, pero *P. lilacinus* y *F. oxysporum* no presentaron algún tipo de interacción con estos grupos, lo que indicaría que el mecanismo de tolerancia de estos dos hongos está siendo de manera intracelular o por precipitación del metal en el medio de cultivo.

En comparación con el control se puede observar aumentos de porcentaje de Ca (2.4%, 9.21%) en los hongos tratados con Pb, lo que es un indicativo de alguna formación de carbonatos de Pb que estarían precipitando dentro de la célula así como el aumento de P a 7.2% indicativo de algún fosfato (Firincă et al., 2024b). En cuanto al Cd también se observan aumentos en Ca y P en comparación con el control, siendo el aumento de 1.62% de Ca para *R. microsporus*, 3.80% de Ca *Cunninghamella sp.*, 1.92% de Ca *P. lilacinus* y un 6.5% de P en *F. oxysporum*. Estos resultados nos indican que la adsorción no es el principal mecanismo para la tolerancia a Cd por estos hongos sino una precipitación con ayuda del calcio y fósforo de manera extracelular o en pequeñas cantidades en la pared celular del

hongo, mientras que los mecanismos intracelulares y extracelulares están siendo más prominentes con la presencia de Pb en medio de cultivo.

9. CONCLUSIÓN

Este estudio mostró que los hongos filamentosos aislados de ambientes contaminados en jales mineros tienen resistencia a altas concentraciones de Cd o Pb. Especialmente *Penicillium simplicissimum* y *Rhizopus microsporus* presentaron elevada resistencia al Pb y *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus microsporus* y *Cunninghamella sp.* mostraron resistencia al Cd. De manera destacada, *Paecilomyces lilacinus* mostró resistencia al Cd y Pb. La inhibición del crecimiento de los hongos por estos metales mostró niveles característicos en cada especie aislada, con notables diferencias entre ellos y con los reportes señalados en otros estudios realizados en hongos aislados de suelos agrícolas y de diversas minas. Lo anterior nos dice que los hongos desarrollan mecanismos diferenciales de resistencia a los metales, a través de las FTIR, SEM-EDx se observa que, *R. microsporus* y *Cunninghamella sp.* adsorben o precipitan el Cd en su pared celular mediante las interacciones con grupos funcionales como carboxilos y aminos o el calcio y fosforo presente en la pared celular, mientras que *P. lilacinus* y *F. oxysporum* estarían precipitando este metal de manera extracelular observando el aumento de fosforo y las pocas o nulas interacciones con los grupos funcionales de la pared celular. *P. simplicissimum* y *R. microsporus* parecen internalizar el Pb, debido a un secuestro intracelular o precipitación de fosfatos y carbonatos dentro de la célula o al exterior de ella. Estos hallazgos nos dicen que los hongos utilizan estos mecanismos para reducir la toxicidad de el Pb y el Cd, lo que destaca su potencial para la biorremediación de los suelos contaminados por jales mineros.

10. REFERENCIAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry Sep. (2002). Toxicological Profile for Cadmium. *ATSDR's Toxicological Profiles*, (September). https://doi.org/10.1201/9781420061888_ch48
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692–4693.
- Alori, E., & Fawole, O. (2012). Phytoremediation of Soils Contaminated with Aluminium and Manganese by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Journal of Agricultural Science*, 4(8), 246–252. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n8p246>
- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
- Barraza-Garza, G., De La Rosa, L. A., Martínez-Martínez, A., Castillo-Michel, H., Cotte, M., & Alvarez-Parrilla, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 41(3), 125–148.
- Barrios, M., & Sandoval, M. (2018). Caracterización de hongos presentes en suelos con usos contrastantes. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental.*, 5(1), 3–9. Retrieved from <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2017/06/14/Pacheco-Juan.pdf>
- Bautista Cruz, A., Etchevers Barra, J., del Castillo, R. F., & Gutierrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *ECOSISTEMAS*, 13(2), 90–97.
- Bayramoğlu, G., & Arica, M. Y. (2008). Removal of heavy mercury(II), cadmium(II)

and zinc(II) metal ions by live and heat inactivated *Lentinus edodes* pellets. *Chemical Engineering Journal*, 143(1–3), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.01.002>

Brunner-Mendoza, C., Navarro-Barranco, H., Ayala-zermeño, M. A., Mellín-Rosas, M., & Toriello, C. (2013). Obtención y caracterización de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) para genotipificación. *Memorias Del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico*, (November), 52–55. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/288669838_Obtencion_y_caracterizacion_de_cultivos_monosporicos_de_Metarhizium_anisopliae_Hypocreales_Clavicipitaceae_para_genotipificacion

Burbano, H. (2016). El suelo y su relación con los servicios ecosistémicos y la seguridad alimentaria. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(2), 117–124. <https://doi.org/doi: http://dx.doi.org/10.22267/rcia.163302.58>

Burbano Orjuela, H. (2013). La Sociedad Depende Del Todo Y Las Partes: Naturaleza Y Suelo. *Tendencias*, 14(2), 9–22. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5016729.pdf>

Chen, S. H., Ng, S. L., Cheow, Y. L., & Ting, A. S. Y. (2017a). A novel study based on adaptive metal tolerance behavior in fungi and SEM-EDX analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 334, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.004>

Chen, S. H., Ng, S. L., Cheow, Y. L., & Ting, A. S. Y. (2017b). A novel study based on adaptive metal tolerance behavior in fungi and SEM-EDX analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 334, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.004>

Cram, S., Cotler, H., Morales, L. M., & Sommer, I. (2008). Identification of the potential soil environmental services in the urban landscape of Mexico City.

Investigaciones Geograficas, Boletin Del Instituto de Geografia UNAM, 66, 81–104. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/igeo/n66/n66a6.pdf>

Delgado, M. (2008). Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. *Investigación ORIOUS Biotecnología*, 1–9. Retrieved from <https://portalcamaronero.com/wp-content/uploads/2016/10/Los-microorganismos-del-suelo-en-la-nutrición-vegetal.pdf>

Deng, Z., Cao, L., Huang, H., Jiang, X., Wang, W., Shi, Y., & Zhang, R. (2011). Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2–3), 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.078>

FAO & ITPS. (2015). *Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Technical Summary. Food and Agriculture Organization of the United Nation and Intergovernmental echnical Panel on Soils, Rome, Italy. Status of the World's Soil Resources*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/i5126e/i5126e.pdf> link accessed on 28/04/2020

Firincă, C., Zamfir, L. G., Constantin, M., Răut, I., Capră, L., Popa, D., ... Şesan, T. E. (2024a). Microbial Removal of Heavy Metals from Contaminated Environments Using Metal-Resistant Indigenous Strains. *Journal of Xenobiotics*, 14(1), 51–78. <https://doi.org/10.3390/jox14010004>

Firincă, C., Zamfir, L. G., Constantin, M., Răut, I., Capră, L., Popa, D., ... Şesan, T. E. (2024b). Microbial Removal of Heavy Metals from Contaminated Environments Using Metal-Resistant Indigenous Strains. *Journal of Xenobiotics*, 14(1), 51–78. <https://doi.org/10.3390/jox14010004>

Flores Amaro, O. A. (2024). *CARACTERIZACIÓN DE UNA ZONA CONTAMINADA CON ARSÉNICO (As) Y METALES, Y AISLAMIENTO DE HONGOS CON USO POTENCIAL EN LA BIORREMEDIACIÓN*. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE

AGUASCALIENTES.

- Galán Huertos, E., & Romero Baena, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla*, 10, 48–60.
- García Aguirre, F. (2012). La minería en México. *Espacios Para El Capital a Cielo Abierto*, INEGI, 128–136. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/124/12426062013.pdf>
- García, I. E. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(1), 1–3. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213019226001.pdf>
- Gola, D., Malik, A., Namburath, M., & Ahammad, S. Z. (2018). Removal of industrial dyes and heavy metals by *Beauveria bassiana*: FTIR, SEM, TEM and AFM investigations with Pb(II). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(21), 20486–20496. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0246-1>
- Hassan, A., Pariatamby, A., Ossai, I. C., & Hamid, F. S. (2020). Bioaugmentation assisted mycoremediation of heavy metal and/metalloid landfill contaminated soil using consortia of filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 157(February), 107550. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107550>
- Hendriks, B. S. (2010). Functional pathway pharmacology: Chemical tools, pathway knowledge and mechanistic model-based interpretation of experimental data. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(4), 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.167>
- INEGI, I. N. de E. y G. (2016). *Conociendo México Zacatecas INEGI MÉXICO*.
- Janicki, T., Długoński, J., & Krupiński, M. (2018). Detoxification and simultaneous removal of phenolic xenobiotics and heavy metals with endocrine-disrupting activity by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabellina*. *Journal of*

Hazardous Materials, 360, 661–669.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.047>

Joshi, P. K., Swarup, A., Maheshwari, S., Kumar, R., & Singh, N. (2011). Bioremediation of Heavy Metals in Liquid Media Through Fungi Isolated from Contaminated Sources. *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), 482–487. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0110-9>

Ladino, O. E., Rubio, J. D., & Chacin, C. A. (2016). Evaluation of two conservation methods of filamentous fungal oil palm pathogens. *Centro Agrícola*, 43(2), 36–41.

Le Berre, M., Gerlach, J. Q., Dziembała, I., & Kilcoyne, M. (2022). Calculating Half Maximal Inhibitory Concentration (IC50) Values from Glycomics Microarray Data Using GraphPad Prism. *Methods in Molecular Biology*, 2460, 89–111. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2148-6_6

Leitão, A. L. (2009). Potential of penicillium species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(4), 1393–1417. <https://doi.org/10.3390/ijerph6041393>

Liaquat, F., Munis, M. F. H., Haroon, U., Arif, S., Saqib, S., Zaman, W., ... Liu, Q. (2020). Evaluation of metal tolerance of fungal strains isolated from contaminated mining soil of Nanjing, China. *Biology*, 9(12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biology9120469>

Loaiza, J. C. (2010). El recurso suelo. *Suelos Ecuatoriales*, 41(1), 6–18. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Juan_Loaiza_Usuga/publication/301291240_THE_SOIL_AS_A_RESOURCE/links/570fc70e08ae19b18693831e/THE-SOIL-AS-A-RESOURCE.pdf

López-Jácome, E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, A., Ortega-Peña, S., Cerón-

González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidad*, 3(1), 10–18. Retrieved from www.medigraphic.org.mx

Luo, D., Qiang, S., Geng, R., Shi, L., Song, J., & Fan, Q. (2022). Mechanistic study for mutual interactions of Pb²⁺ and *Trichoderma viride*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 233. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113310>

Navarrete S., A., Vela C., G., Lopez, J., & Rodriguez, M. D. L. (2011). Naturaleza y utilidad de los indicadores de calidad del suelo. *ContactoS*, 80, 29–37.

Newsome, L., & Falagán, C. (2021). The Microbiology of Metal Mine Waste: Bioremediation Applications and Implications for Planetary Health. *GeoHealth*, 5(10), 1–53. <https://doi.org/10.1029/2020GH000380>

Nirmal Kumar, J. I., George, B., Kumar, R. N., Sajish, P. R., & Viyol, S. (2010). Biosorption of mercury and lead by dried *aspergillus niger* Tiegh. isolated from estuarine sediments. *International Journal of Environmental Studies*, 67(5), 735–746. <https://doi.org/10.1080/00207233.2010.517644>

Oladipo, O. G., Awotoye, O. O., Olayinka, A., Bezuidenhout, C. C., & Maboeta, M. S. (2018). Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.003>

Pérez, A., García, R., Vázquez, A., Colinas, T., Pérez, M., & Navarro, H. (2008). Concentration of Pb, Cd, Ni, and Zn in Polluted Soils and their Transference to Broccoli Heads. *Terra Latinoamericana*, 26(3), 215–225.

Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., & Campos, A. (2006). Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología Aplicada*, 5((1-2)), 1–7.

Qiu, J., Song, X., Li, S., Zhu, B., Chen, Y., Zhang, L., & Li, Z. (2021). Experimental

and modeling studies of competitive Pb (II) and Cd (II) bioaccumulation by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16–17), 6477–6488. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11497-3>

Rangel-Muñoz, E. J., Valdivia-Flores, A. G., Hernández-Delgado, S., Cruz-Vázquez, C., De-Luna-López, M. C., Quezada-Tristán, T., ... Mayek-Pérez, N. (2022). Assessment of the Potential of a Native Non-Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Isolate to Reduce Aflatoxin Contamination in Dairy Feed. *Toxins*, 14(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins14070437>

Rissoni Toledo, A. G., Reyes Andrade, J. C., Palmieri, M. C., Bevilaqua, D., & Pombeiro Sponchiado, S. R. (2021). Innovative method for encapsulating highly pigmented biomass from *Aspergillus nidulans* mutant for copper ions removal and recovery. *PloS One*, 16(11), e0259315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259315>

Salomons, W. (1995). Environmental Impact of Metals Derived from Mining Activities: Processes, Predictions, Prevention. *Journal of Geochemical Exploration*, 52, 5–23.

Samaniego-Gaxiola, J. A., & Chew-Madinaveitia, Y. (2007). Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78(2), 383–390.

Sey, E., & Belford, E. J. D. (2021). Heavy Metals Tolerance Potential of Fungi Species Isolated from Gold Mine Tailings in Ghana. *Journal of Environmental Health and Sustainable Development*, 6(1), 1231–1242. <https://doi.org/10.18502/jehsd.v6i1.5765>

Shapaval, V., Møretrø, T., Suso, H. P., Åsli, A. W., Schmitt, J., Lillehaug, D., ... Kohler, A. (2010). A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *Journal of Biophotonics*, 3(8–9), 512–521. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000014>

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Silva, S., & Correa, F. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: Revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. *Semestre Económico*, 12(23), 13–34. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/seec/v12n23/v12n23a2>

Singh, A., & Roy, A. (2021). *In Fungal communities for the remediation of environmental pollutants*. Springer International Publishing (A. N. Yada, Vol. 1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.2307/829255>

Słaba, M., Gajewska, E., Bernat, P., Fornalska, M., & Długoński, J. (2013). Adaptive alterations in the fatty acids composition under induced oxidative stress in heavy metal-tolerant filamentous fungus *Paecilomyces marquandii* cultured in ascorbic acid presence. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 3423–3434. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1281-6>

Soria, M. A. (2016). Why are soil microorganisms important for agriculture ? *Revista Quimica Viva*, 1, 3–10.

Tian, D., Jiang, Z., Jiang, L., Su, M., Feng, Z., Zhang, L., ... Hu, S. (2019). A new insight into lead (II) tolerance of environmental fungi based on a study of *Aspergillus niger* and *Penicillium oxalicum*. *Environmental Microbiology*, 21(1), 471–479. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14478>

Tu, C., Liu, Y., Wei, J., Li, L., Scheckel, K. G., & Luo, Y. (2018). Characterization and mechanism of copper biosorption by a highly copper-resistant fungal strain isolated from copper-polluted acidic orchard soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(25), 24965–24974. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2563-4>

Urquhart, A. S., Chong, N. F., Yang, Y., & Idnurm, A. (2022). A large transposable element mediates metal resistance in the fungus *Paecilomyces variotii*. *Current Biology*, 32(5), 937-950.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.048>

Văcar, C. L., Covaci, E., Chakraborty, S., Li, B., Weindorf, D. C., Frențiu, T., ... Podar, D. (2021). Heavy metal-resistant filamentous fungi as potential mercury bioremediators. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050386>

Wong, M. H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50(6), 775–780. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00232-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00232-1)

Zotti, M., Di Piazza, S., Roccotiello, E., Lucchetti, G., Mariotti, M. G., & Marescotti, P. (2014). Microfungi in highly copper-contaminated soils from an abandoned Fe-Cu sulphide mine: Growth responses, tolerance and bioaccumulation. *Chemosphere*, 117(1), 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.057>