



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
MAESTRÍA EN ECOLOGÍA APLICADA

**Hongos endófitos septados oscuros de desechos mineros con  
altos contenidos de plomo: caracterización y potencial en  
biorremediación**

**TESIS**

(Idónea Comunicación de Resultados)

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ecología Aplicada**

PRESENTA:

**Biol. Anaid Penelope Solis Hernández**

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTOR:

Dr. Facundo Rivera Becerril

ASESORES:

Dra. Judith Castellanos Moguel

Dr. Néstor O. Pérez Ramírez

## ÍNDICE

<b>Capítulo 1. Aislamiento y caracterización de hongos endófitos septados oscuros de raíces de plantas establecidas en desechos mineros contaminados por plomo.....</b>	<b>1</b>
Abstract.....	1
Resumen.....	2
1. Introducción.....	3
2. Revisión bibliográfica.....	4
2.1 La minería en México.....	4
2.1.2. Desechos mineros.....	4
2.2. La contaminación del entorno (aire, agua, suelo) en los sitios mineros y desechos mineros de México.....	6
2.3. Dinámica de los metales pesados en el suelo y en los desechos mineros.....	8
2.3.1. Movilización natural de material particulado por acción del viento.....	9
2.4. Rizosfera.....	10
2.4.1. Movilización del plomo en la raíz de las plantas.....	11
2.5. Comunidades fúngicas del suelo.....	14
2.5.1 Hongos micorrízico arbusculares (HMA).....	14
2.5.2 Hongos endófitos septados oscuros (ESO).....	15
2.5.2.1. Papel de los ESO en los ecosistemas.....	16
3. Objetivo.....	17
4. Materiales y métodos.....	18
4.1. Sitio de estudio.....	18
4.2. Evaluación de la colonización de los hongos ESO.....	18

4.2.1. Aislamiento de hongos endófitos septados oscuros.....	19
4.3. Purificación de los hongos ESO.....	20
4.4. Caracterización morfológica de los hongos ESO.....	20
4.5. Inducción de la conidiación.....	21
4.6. Curva de biomasa fúngica.....	21
4.7. Identificación molecular de los hongos ESO.....	22
4.7.1. Identificación molecular.....	22
5. Resultados.....	23
5.1. Evaluación de la colonización radical de los hongos ESO.....	23
5.2. Aislamiento de hongos endófitos septados oscuros.....	24
5.3. Caracterización morfológica de los aislados fúngicos purificados e Inducción de la conidiación.....	25
5.4. Curva de biomasa fúngica.....	28
5.5. Identificación molecular de los hongos ESO.....	28
5.5.2. Identificación molecular con base en el segmento ITS.....	28
6. Discusión.....	32
7. Conclusiones.....	35
8. Literatura citada.....	36
<b>Capítulo 2. Potencial de los hongos endófitos septados oscuros en procesos de fitorremediación de sitios contaminados con plomo.....</b>	<b>44</b>
Abstract.....	44
Resumen.....	45
1. Introducción.....	46

2. Revisión bibliográfica.....	48
2.1. La minería en Zacatecas.....	48
2.2. Desechos mineros en Zacatecas.....	49
2.3. Problemática de la contaminación por plomo en zonas mineras y desechos mineros.....	50
2.3.1. Impacto en la población humana.....	50
2.4. Plomo.....	52
2.5. Remediación de suelos contaminados por metales pesados.....	52
2.5.1. Biorremediación.....	53
2.5.2. Fitorremediación.....	54
2.5.2.1 Fitorremediación de suelos contaminados por MP con ayuda de comunidades fúngicas.....	55
3. Objetivo.....	59
4. Materiales y métodos.....	60
4.1. Tolerancia hacia el plomo por los hongos endófitos septados oscuros <i>in vitro</i> .....	60
4.2. Perfil enzimático de los aislados fúngicos.....	61
4.3. Análisis estadístico de datos.....	63
5. Resultados.....	63
5.1. Tolerancia hacia el plomo por los aislados fúngicos <i>in vitro</i> .....	63
5.2. Perfil enzimático de los aislados fúngicos.....	64
6. Discusión.....	69
7. Conclusiones.....	73
8. Literatura citada.....	74

<b>Capítulo 3. Papel que desempeñan las plantas y los hongos endófitos septados oscuros en la fitorremediación de suelos contaminados con plomo.....</b>	<b>82</b>
Abstract.....	82
Resumen.....	83
1. Introducción.....	85
2. Objetivo.....	85
3. Propuesta de transferencia tecnológica.....	86
4. Factibilidad.....	89
4. 1. Ambiental.....	89
4.2. Tecnológica-Económica.....	91
4. 3. Social.....	91
4. 4. Político-Legal.....	92
5. Conclusión.....	97
6. Literatura citada.....	98

## Capítulo 1

### AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS SEPTADOS OSCUROS DE RAÍCES DE PLANTAS ESTABLECIDAS EN DESECHOS MINEROS CONTAMINADOS POR PLOMO

#### Abstract

Dark septate endophytes (DSE) colonize the roots of almost all plant species, including those growing in stressful environments such as mining wastes which can contain toxic elements such as lead (Pb). Little is known about the interaction that DSE fungi establish with plants under metal stress. The aim was to isolate and to characterize the DSE fungi colonizing plant roots found in mine wastes polluted with Pb; two plant species were selected, a native one, *Tagetes lunulata*, and an introduced one, *Pennisetum villosum*; both were established in mine wastes containing Pb from 73 to 96 mg Pb kg<sup>-1</sup>. Fungal root colonization was evaluated; roots were surface disinfected, deposited on potato dextrose agar plus chloramphenicol as culture media, and incubated in the dark at 28°C for 7 days. Isolates were purified following the monohyphae tip method. It was carried out the morphological analysis of fungal isolates and conidiation was induced. Fungi were molecularly identified based on the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region. Root colonization by DSE fungi in *T. lunulata* attained 1.7%, without microsclerotia, whereas in *P. villosum* it reached 15.7% with 0.3% of microsclerotia. Eighteen fungal isolates were obtained, 14 from *T. lunulata* and 4 from *P. villosum* roots; colonies showed gray, brown or black colors. Only three isolates showed conidia as observed in *Alternaria* genus; other isolates showed dark or hyaline septate hyphae and sterile mycelium. Molecular identification illustrated that from *T. lunulata*, all fungal isolates belonged to *Alternaria* genus, while from *P. villosum* fungal isolates belonged to *Periconia* and *Pleosporales* taxa. A phylogenetic tree, based on ITS sequences of all fungal isolates, included six groups: one group belonging to *Periconia*, four groups belonging to *Alternaria* and one group identified as *Pleosporales*. In conclusion, 18 isolates, belonging to *Ascomycota*, colonized *T. lunulata* and *P. villosum* roots established in mine wastes under Pb stress; a particular specificity fungal-plant species was observed; finally, all fungal isolates are potential tools for use in processes of mine wastes remediation.

## Resumen

Los hongos endófitos septados oscuros (ESO) colonizan las raíces de prácticamente todas las plantas, incluyendo aquellas establecidas en sitios inhóspitos como los desechos mineros que pueden contener elementos tóxicos como el plomo (Pb). Poco se conoce acerca de la interacción que los hongos ESO llevan a cabo con las plantas bajo estrés metálico. El objetivo fue aislar y caracterizar los hongos ESO presentes en raíces de plantas que se encuentran en desechos mineros contaminados por Pb; se eligieron dos plantas, una nativa, *Tagetes lunulata*, y una introducida, *Pennisetum villosum*, ambas creciendo en desechos cuyo contenido en Pb oscila entre 73 y 96 mg kg<sup>-1</sup> de sustrato. Se evaluó la colonización radical por los hongos; las raíces fueron desinfectadas superficialmente, depositadas en papa-dextrosa-agar más cloranfenicol e incubadas en oscuridad a 28°C durante 7 días. Los aislados fueron purificados mediante cultivos monohifales con el método de punta de hifa. Se llevó a cabo la descripción morfológica de las colonias y se indujo la conidiación. Los hongos se identificaron molecularmente con base en la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA. La colonización radical por los hongos ESO en *T. lunulata* fue de 1.7% sin microesclerocios, mientras que en *P. villosum* alcanzó 15.7% con un 0.3% de microesclerocios. En total, se obtuvieron 18 aislados fúngicos, 14 procedentes de *T. lunulata* y 4 de *P. villosum*; macroscópicamente, las colonias presentaron colores grises, oliváceos, marrones y negros. Solamente tres de los aislados formaron conidios y correspondieron al género *Alternaria*; los demás presentaron hifas septadas oscuras o hialinas y micelio estéril. La identificación molecular reflejó que en *T. lunulata* estuvieron presentes hongos ESO del género *Alternaria*, mientras que los habitantes fúngicos de *P. villosum* fueron miembros de *Periconia* y otros *Pleosporales*. Un árbol filogenético con base en las secuencias ITS de los 18 aislados fúngicos permitió identificar seis grupos, cuatro grupos pertenecientes a *Alternaria*, uno a *Periconia*, y el último perteneciente a los *Pleosporales*. En conclusión, diferentes hongos mesófilos ESO, pertenecientes a los *Ascomycota*, colonizaron plantas de *T. lunulata* y *P. villosum* en desechos mineros con estrés metálico por Pb; se observó una cierta preferencia hongo-especie vegetal; finalmente, estos aislados fúngicos se constituyen como potenciales herramientas en estrategias de remediación de sitios contaminados por metales.

## 1. Introducción

Las actividades mineras en México han causado un impacto muy fuerte en el suelo, tanto en las zonas de explotación como en donde se depositan los desechos; el más notable es el enterramiento de grandes áreas de vegetación. En todo el territorio nacional se cuenta con miles de depósitos mineros; de éstos, aproximadamente 200,000 ton se encuentran en el distrito de Zacatecas, 100,000 ton en Guanajuato y más de 200,000 ton en Pachuca (González *et al.*, 2008). Los residuos de esta actividad se liberan al ambiente durante el transporte del material en camiones descubiertos que propician la dispersión del polvo proveniente de las minas; también son aerotransportados una vez que se depositan en el sitio definitivo. Las regiones mineras cercanas a poblaciones humanas merecen especial atención; la presencia del plomo (Pb) biodisponible en el ambiente representa un problema de salud, particularmente en los infantes y en las mujeres en etapa gestante; este metal es uno de los de mayor emisión por la industria minera y es muy tóxico para los organismos (González *et al.*, 2008, Sosa *et al.*, 2008). La normatividad de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) para los suelos establece que el nivel máximo permitido de Pb es de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ; sin embargo, esa concentración es ampliamente superada en Zacatecas (Salas-Luevano *et al.*, 2011). Las especies de plantas dominantes en suelos contaminados por Pb se encuentran asociadas a los hongos endófitos septados oscuros (ESO); estos hongos pueden desempeñar un papel clave en la protección de las plantas contra el estrés por Pb (Regvar *et al.*, 2010), o intervenir en procesos de fitoextracción o fitoestabilización.



## **2. Revisión bibliográfica**

### **2.1 La minería en México**

La minería es una de las actividades económicas de mayor tradición en México desde la época prehispánica; contribuye en gran medida con el desarrollo del país (Hernández *et al.*, 2009). México está situado en una región volcánica rica en minerales; con la llegada de los conquistadores, los metales, sobre todo el oro (Au) y la plata (Ag) adquirieron el mismo valor económico que ya poseían en Europa, por lo que la exploración y explotación de minerales tomaron un ímpetu sin precedentes. Una vez concluido el periodo colonial en el país, nació la industria minera como actividad económica establecida formalmente. La minería abasteció de insumos a las industrias de la construcción, metalurgia, siderurgia y química por más de tres siglos, ayudando a generar infraestructura y polos de desarrollo en el país (Volke *et al.*, 2005). El modo de operación de dicha actividad, más allá de las pautas de exploración basadas en identificar recursos ya conocidos por la población autóctona y de algunos nuevos descubrimientos, varió poco desde sus inicios. Asimismo, la escala de la minería de la época colonial y de los inicios del México independiente no alcanzó las dimensiones de la minería moderna, con la salvedad de distritos con yacimientos especialmente ricos, como Pachuca Real del Monte o Guanajuato (González y Camprubí, 2010).

La minería puede dividirse, según Musik-Asali (2004), en gran minería, mediana minería y pequeña minería, que aportan el 84.1%, el 13% y el 2.9% respectivamente, del valor total de la producción minero-metalúrgica nacional. De acuerdo con información de la Dirección General de Minas, la industria minera nacional es mayoritariamente metálica y se concentra en Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Zacatecas, Durango, Sonora, Coahuila, Guanajuato, San Luis Potosí, Hidalgo, Sinaloa, Colima y Guerrero (Carrillo, 2005). Entre los principales metales y minerales que se extraen están el Au, Ag, cobre (Cu), Pb, zinc (Zn), molibdeno (Mo), hierro (Fe), manganeso (Mn), fluorita, fosforita, caolín y wollastonita (CAMIMEX, 2012; INEGI, 2012).

#### **2.1.2. Desechos mineros**

La minería y las actividades asociadas han generado por siglos una gran cantidad de desechos o jales (residuos sólidos y semisólidos granulares de arena), es decir, lodos residuales ricos

en metales pesados (MP) que son depositados en la superficie del entorno minero durante el proceso de beneficio del mineral económicamente aprovechable (González *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2009; Salas-Luevano *et al.*, 2011). Así, el suelo original se degrada o se pierde irreversiblemente. Los desechos mineros son frecuentemente inestables y están formados por materiales poco aptos para el desarrollo de las actividades biológicas y los procesos formadores de suelo; contienen todo tipo de materiales residuales y escombros estériles, entre otros, lo que representa graves problemas para el establecimiento de una cubierta vegetal. Según la NOM-141-SEMARNAT-2003, las especificaciones para el almacenamiento de los jales deben contemplar los siguientes aspectos:

- Climáticos: zona hidrológica de ubicación del sitio, precipitación media mensual y anual, tormenta máxima observada durante 24 h, velocidad-dirección y frecuencia de los vientos.
- Edafológicos: textura, conductividad eléctrica y pH.
- Geotécnicos: propiedades mecánicas de las formaciones rocosas (permeabilidad y resistencia), condiciones de fisuramiento y orientación (amplitud, separación y profundidad) y posibilidad de alteración por agentes del intemperismo; propiedades mecánicas de los depósitos de suelo, homogeneidad o heterogeneidad de los depósitos, tipo de suelo, permeabilidad, porosidad, compresibilidad y resistencia al corte; region sísmica.
- Hidrológicos: para comprobar que la presa de jales no representa un riesgo para los cuerpos de agua en cuanto a su uso, aprovechamiento y explotación, deben hacerse estudios del agua superficial (delimitar la subcuenca hidrológica cercana al depósito de jales, determinar el medio anual del escurrimiento de la cuenca aguas arriba, el área de inundación de la subcuenca y la calidad del agua de los cuerpos superficiales) y subterránea (evaluar la vulnerabilidad de la presa de jales, verificar la existencia de aprovechamientos hidráulicos subterráneos en una franja perimetral de 500 m, efectuar la caracterización física y química del agua subterránea nativa, seleccionando los que estén asociados a la generación de lixiviados derivados de la presa de jales).
- Biodiversidad y ecosistemas frágiles o únicos: identificar la presencia de especies enlistadas en la NOM-059-SEMARNAT-2001, el manejo de las especies o

poblaciones de flora y fauna silvestre en riesgo de acuerdo con lo establecido en la Ley General de Vida Silvestre. El sitio seleccionado no tiene que presentar riesgo para las especies y producir el mínimo impacto ambiental sobre los recursos.

En general, los desechos mineros cuentan con una textura desequilibrada, estructura edáfica ausente, propiedades químicas anómalas, disminución o desequilibrio en el contenido de nutrimentos fundamentales, ruptura de los ciclos biogeoquímicos, baja profundidad efectiva (espacio donde las raíces pueden penetrar para conseguir agua y nutrimentos), dificultad de enraizamiento, baja capacidad de intercambio catiónico, baja retención de agua y presencia de compuestos tóxicos (García & Dorronsoro, 2002; Becerril *et al.*, 2007). Durante el siglo pasado los volúmenes de residuos mineros crecieron dramáticamente a medida que la demanda de minerales y metales aumentó gracias a los avances en la tecnología de extracción y procesamiento. Las características de los residuos dependen de las especies minerales presentes en los yacimientos, del proceso a que se les sujeta y de la manera en que se disponen, por lo que cada caso se convierte en un problema particular. A medida que avanza la explotación de una mina puede cambiar la composición del mineral y generar diferentes volúmenes de residuos. En la década de 1960 se producían por día 10 mil ton de desechos y en el año 2000 esta cifra aumentó diez veces. En la actualidad hay minas individuales que producen más de 200,000 ton de residuos por día (Jakubick *et al.*, 2003).

## 2.2. La contaminación del entorno (aire, agua, suelo) en los sitios mineros y desechos mineros de México

La industria minera tiene un alto impacto en el ambiente, desde el subsuelo hasta la atmósfera, incluyendo suelos y cuerpos de agua superficiales y subsuperficiales; genera una gran cantidad de desechos sólidos, líquidos y gaseosos, principalmente en forma de humos (material particulado  $<1\mu\text{m}$ ), partículas, aguas residuales y gases (Pineda, 2004; Rodríguez-Ortíz *et al.*, 2006; Mench *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Una de las anomalías que se generan en el momento de la extracción mineral (Cuadro 1) es el aumento en la cantidad de microelementos en el suelo, alcanzando los niveles de macroelementos. Esto impacta en las características físicas y químicas del suelo, así como en el número, diversidad y actividad de los organismos que ahí habitan, y trae como consecuencia la inhibición de la descomposición de la materia orgánica. Otras afectaciones son la formación de terreros y el movimiento de

sedimentos hacia las cuencas, la oxidación de los minerales insolubles y la formación de sustancias solubles ácidas con alto contenido de metales (drenaje ácido), el alto consumo de agua, la descarga de lixiviados con iones metálicos y la liberación de reactivos tóxicos que son utilizados en los procesos mineros (Wong, 2003; Cerbasi y Yetis, 2001; Mench *et al.*, 2010).

La minería en México explota depósitos a cielo abierto o subterráneos donde se generan jales como remanente del beneficio. Salomons (1995) menciona que los desechos mineros son tóxicos para los organismos y son inhibidores de factores ecológicos; afectan el crecimiento de las plantas, es decir, pueden inhibir la germinación de semillas y el transporte de electrones en la mitocondria, provocar clorosis, reducir la fotosíntesis y la síntesis del ATP. En todo el territorio nacional existen miles de depósitos de residuos mineros; de estos, aproximadamente 200,000 ton se encuentran en el distrito de Zacatecas, 100,000 ton en Guanajuato y más de 200,000 ton en Pachuca. Actualmente, en Vetagrande Zacatecas, operan dos empresas mineras que explotan vetas de donde se extraen Au, Ag y Pb; los residuos se liberan al entorno durante el transporte y depósito final; ambas actividades se realizan a cielo abierto, lo que propicia su dispersión en sitios cercanos a la población (González *et al.*, 2008).

La actividad minera afecta cada año la salud de un número significativo de personas con patologías como tuberculosis, silicosis, neumoconiosis, cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis industrial y asma ocupacional. Paralelamente, la contaminación derivada de esta actividad incrementa exponencialmente el número de personas en riesgo al comprometer la salud de los pobladores de comunidades situadas en las áreas de influencia de los jales, incluyendo las zonas más bajas. Las aguas procedentes de estas áreas muchas veces son utilizadas, tanto para el consumo humano como para las tareas agropecuarias, por comunidades que no están directamente involucradas con la minería (Matos, 2007).

Cuadro 1. Relación de la actividad minera y su impacto en el ambiente.

FASE	DESCRIPCIÓN	IMPACTO AMBIENTAL
Exploración	Barrenación, obras y perforaciones	Destrucción de vegetación
Explotación	Obras diversas: tiros, socavones, patios para depósitos de minerales, zonas para descarga de materiales	Operación de presas de jales: arrastre de residuos peligrosos Descarga de aguas residuales
Beneficio	Concentración Trituración y molienda Tratamientos previos	Generación de ruido Vibración y emisión de polvo
Fundición y refinación	Obtención de metales y sus aleaciones (uso de hornos industriales) Eliminación de impurezas en los metales para aumentar la ley de contenido	Emisiones a la atmósfera, residuos peligrosos y aguas residuales

Fuente: Matos, 2007.

### 2.3. Dinámica de los metales pesados en el suelo y en los desechos mineros

El suelo es el medio más estático donde los contaminantes pueden permanecer durante mucho tiempo. Esta permanencia a largo plazo es especialmente grave en el caso de contaminantes inorgánicos como los MP, los cuales son elementos químicos que poseen un peso atómico de entre 63.55-200.59 y presentan un peso específico superior a  $4 \text{ g cm}^{-3}$ , como el Pb, cadmio (Cd), cromo (Cr), Zn, Cu y Ag; en altas concentraciones son potencialmente tóxicos para los seres vivos (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2006). Los MP pueden quedar retenidos o ser movilizados en la solución del suelo mediante diferentes mecanismos biológicos y químicos (Pagnanelli *et al.*, 2004; Becerril *et al.*, 2007).

Los MP adicionados a los suelos se redistribuyen y reparten lentamente entre los componentes de la fase sólida. Dicha redistribución se caracteriza por una rápida retención inicial y posteriores reacciones lentas dependiendo de la especie del metal, de las propiedades del suelo, del nivel de introducción y del tiempo (Han *et al.*, 2003). La movilidad relativa de los elementos traza en los suelos es de suma importancia en cuanto a su disponibilidad y su

potencial para lixiviarse hacia el agua subterránea, y difiere si su origen es natural o antrópico y, dentro de este último, está determinado por la fuente (Burt *et al.*, 2003). Los factores que influyen en la movilización de los MP en el suelo son: a) características edáficas: pH, potencial rédox, composición iónica de la solución, capacidad de intercambio catiónico, presencia de carbonatos, materia orgánica y textura, entre otros; b) naturaleza de la contaminación: origen de los metales y forma de deposición; c) condiciones ambientales: acidificación, cambios en las condiciones rédox, variación de temperatura y humedad (Sauquillo *et al.*, 2003). Los contaminantes del suelo presentan diferentes grados de movilidad; así, el Pb, As, Zn y Cr, entre otros, tienen una movilidad alta, por lo que existe la posibilidad de contaminación de extensas áreas de suelo (Bureau-Veritas, 2008).

Los MP incorporados al suelo pueden seguir varias vías (García y Dorronsoro, 2005; Navarro-Aviño *et al.*, 2007):

- Retención en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa, ocupando sitios de intercambio o específicamente adsorbidos por constituyentes inorgánicos, asociados con la materia orgánica y/o precipitados como sólidos puros o mixtos. Desde la base físico-química los metales precipitan como resultado de cambios en el pH, la capacidad de intercambio catiónico del suelo, la oxidación u otros factores relacionados con su composición química.
- Absorción por las plantas e incorporación a las cadenas tróficas.
- Movilización a las aguas superficiales o subterráneas.

La toxicidad de los metales depende no sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema. El Pb es un compuesto que no se degrada, más bien se acumula progresivamente cuando es vertido a la atmósfera causando desequilibrio en los ecosistemas (Abollino *et al.*, 2002).

### 2.3.1. Movilización natural de material particulado por acción del viento

El transporte de materia particulada puede suponer la contaminación de las aguas y de los terrenos cercanos. El material particulado transportado por el aire tiene importantes implicaciones desde el punto de vista de la salud, básicamente a través de la inhalación de pequeñas partículas <10 µm de diámetro que pueden ser absorbidas por la región alveolar

del pulmón y entrar en el torrente sanguíneo (las partículas de 10 µm quedan retenidas en la nariz). Bilos *et al.* (2001) mencionan que entre la gran variedad de partículas atmosféricas se destacan las de minerales transportados por el aire ya que pueden contener elevadas concentraciones de elementos como Pb, Cd, Zn, Cr, níquel (Ni), Mn y Cu, y por tanto, son consideradas de sumo interés para la salud. Los modelos de toxicidad de las partículas minerales difieren en muchos aspectos de aquellos de los gases. Un aspecto relevante es que estas partículas, generalmente de baja solubilidad, no actúan en forma molecular sino como una partícula entera (Muhle y Mangelsdorf, 2003).

#### 2.4. Rizosfera

El suelo es la capa delgada que cubre la corteza terrestre, está habitado por organismos y es probablemente el ecosistema con mayor biodiversidad (Carrillo, 2009). En el suelo se encuentra una zona biológicamente activa llamada rizosfera que corresponde a la fracción que está en contacto directo con las raíces y donde se encuentra una gran diversidad de organismos, incluyendo microfauna, bacterias y hongos; el crecimiento, metabolismo y adaptación vegetal al estrés edáfico están mediados por estos microorganismos (Singh *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2013). La rizosfera (Figura 1) se compone por la ectorrizosfera (región del suelo en contacto directo con la raíz), el rizoplano (región radical que está en contacto directo con el suelo) y la endorrizosfera (región del tejido cortical vegetal formado por varias capas de células, colonizadas por microorganismos). Las interacciones biológicas en la rizosfera contribuyen con la fijación del N<sub>2</sub>, la solubilización del fosfato, la fitorremediación de suelos contaminados por MP, el control biológico de patógenos de las raíces y el mejoramiento de la calidad del suelo (Barea *et al.*, 2005).

Los hongos del suelo pertenecen a un grupo de organismos heterótrofos de vida libre y asociados a plantas. Sus estructuras y exudados agrupan partículas de suelo debido principalmente a la producción de polisacáridos. Por esto, mejoran las propiedades físicas del suelo, disuelven minerales e incrementan la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Carrillo, 2009). Además, su asociación con los hongos favorece el establecimiento de las plántulas en suelos marginales porque facilitan la nutrición y sobrevivencia vegetal (Davet, 2004). Las hifas de los hongos pueden funcionar como barreras que retienen MP como el Zn, Cd, Mn y Pb y evitan su absorción por las plantas; permiten así la sobrevivencia vegetal en

suelos contaminados, o bien reducen los efectos tóxicos al suministrar N y P (Barea *et al.*, 2005).

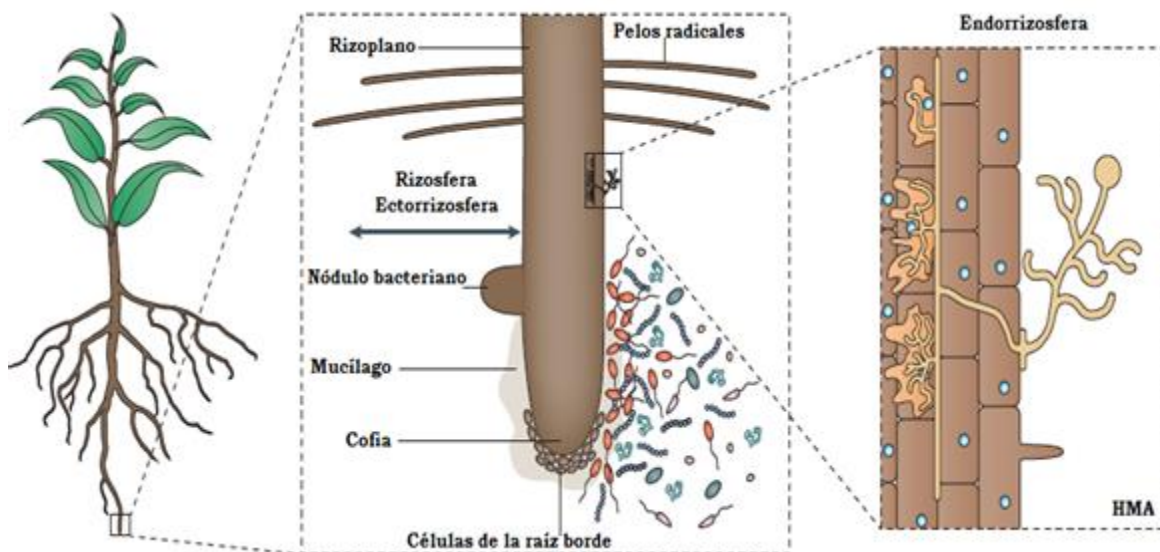


Figura 1. Composición de la rizosfera: ectorrizosfera, rizoplasma y endorrizosfera (modificado de Philippot *et al.*, 2013). HMA, hongo micorrízico arbuscular.

#### 2.4.1. Movilización del plomo en la raíz de las plantas

El catión libre  $Pb^{2+}$  suele ser la forma más tóxica; el Pb se une preferentemente al oxígeno y los grupos amino o sulfhidrilo, y ocasiona estrés iónico debido a su elevado índice de covalencia. Los factores que afectan la disponibilidad y absorción del Pb son el tamaño de partícula de suelo y la capacidad de intercambio catiónico, además de aquellos referentes a la planta tales como la superficie de la raíz, los exudados radicales, la micorrización y la tasa de transpiración (Davies, 1995). El Pb en el suelo está estrechamente ligado a la materia orgánica vegetal o a la materia coloidal. Todas estas condiciones reducen la absorción de Pb por las raíces; el sistema radical es la principal entrada del metal hacia las plantas superiores.

La raíz posee cargas negativas en sus células rizodérmicas (Figura 2), pertenecientes a grupos carboxilo de polímeros como el ácido péctico y diversas proteínas estructurales y enzimáticas. Estas cargas negativas, al unirse en el espacio de la rizosfera a los cationes metálicos  $Pb^{2+}$ , forman una interfase en equilibrio. Estos cationes entrarán por la pared celular que es hidrófila. Una vez allí, se unirán a las cargas negativas de la pared celular y serán transportadas radicalmente, mediante la vía apoplástica (espacio extracelular periférico



a la membrana plasmática de las células por el que fluyen agua y otras sustancias), o a través de la vía simplástica (espacio intercelular de la membrana plasmática a través del cual procede una difusión libre de agua y solutos de bajo peso molecular dentro de la célula). En zonas apicales jóvenes la banda de Caspari no se ha formado y el metal pasa apoplásticamente hasta la zona vascular, lo que no sucede en las raíces adultas donde la diferenciación de tejidos y la formación de endodermis y exodermis obliga a abandonar la vía apoplástica y seguir la simplástica (Barceló *et al.*, 2005).

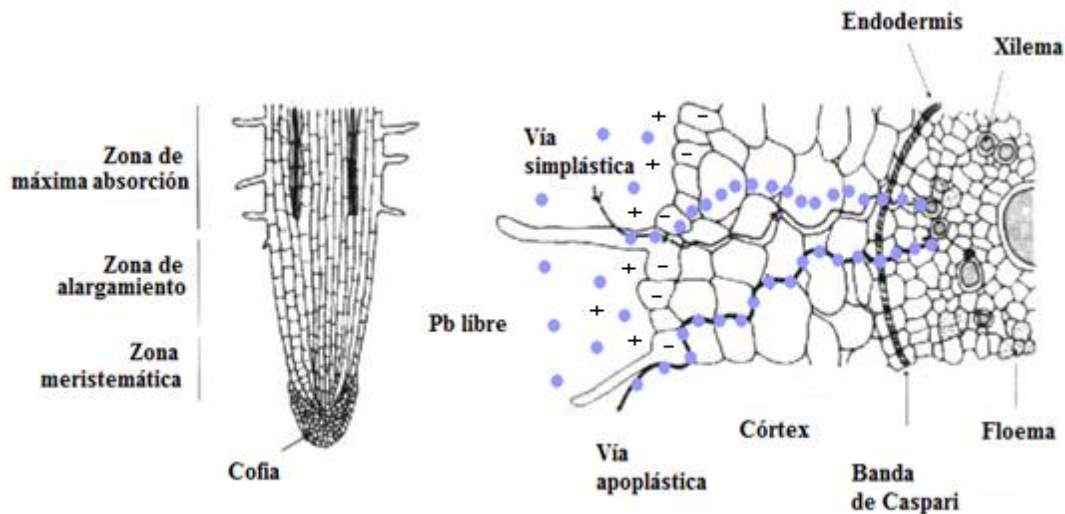


Figura 2. Movilización del Pb libre entre las vías apoplástica y la simplástica (modificado de <http://monicafernancruzbiologia.blogspot.mx/2011/02/tema-10.html>).

En la superficie de la raíz el Pb se une a los grupos carboxilo del ácido urónico del mucílago. El mucílago establece una barrera que protege el sistema radical del metal entrante; algunas de las uniones de los metales son liberadas cuando el mucílago es biodegradado (Morel *et al.*, 1986). Los microorganismos del suelo tienden a afectar la disponibilidad del Pb por procesos de bioabsorción, bioacumulación y solubilización. Además, las micorrizas pueden influir en la entrada, transporte y toxicidad del Pb (Marschner *et al.*, 1996). La retención de Pb en las raíces está basada en su unión a iones con sitios intercambiables sobre la pared celular formando depósitos. Esta precipitación extracelular corresponde principalmente a la forma de carbonato de Pb.

La adición de quelantes sintéticos tales como H-EDTA o EDTA, en combinación con un pH ácido, previene la retención de Pb por la pared celular, permitiendo su absorción y

translocación hacia la parte aérea (Jarvis y Leung, 2002). La localización del metal es mayor en las raíces que en los otros tejidos de la planta. El Pb se une fuertemente a los grupos carboxilo del ácido galacturónico; el propio ácido galacturónico en la pared celular restringe su transporte vía apoplasto (Rudakova *et al.*, 1988). El Pb transportado desde el suelo tiene que cruzar la membrana plasmática de las células de la raíz; a este respecto, una posible vía es a través de los canales catiónicos, tales como los canales de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ). Se ha caracterizado un canal de  $\text{Ca}^{+2}$  operado por voltaje en la membrana plasmática de raíz en trigo y maíz (Marshall *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1994). Huang y Cunningham (1996) reportaron que el  $\text{Pb}^{2+}$  inhibe significativamente el voltaje medido como consecuencia de la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  en el plasmalema de raíces de trigo. La inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  por el Pb puede originarse por bloqueo del canal por el metal o debido al transporte competitivo de ambos. El extremo de la raíz puede ser el sitio de concentración del  $\text{Pb}^{2+}$  (Yo-Young *et al.*, 2002). El Pb se mueve predominantemente dentro del apoplasto radical en una forma radial a través del córtex y se acumula cerca de la endodermis (Figura 2), misma que actúa como una barrera parcial al movimiento del Pb entre la raíz y la fracción aérea, tal y como lo muestran la mayoría de datos referidos a la elevada acumulación radical de Pb (Jones *et al.*, 1973; Verma y Dubey, 2003). Lane y Martin (1977) afirman que el Pb se mueve en el simplasto; según Broyer *et al.* (1972) el movimiento del Pb en la raíz sigue primariamente la vía del apoplasto debido a que una proporción representativa del metal es extraída del agua. Se ha demostrado que el Pb es retenido en mayor proporción en la superficie del plasmalema que en las paredes celulares. El patrón de distribución del Pb en la raíz difiere considerablemente dependiendo de sus concentraciones (Seregin *et al.*, 2004); a bajas concentraciones del metal predomina el flujo de iones en el apoplasto, mientras que a altas concentraciones penetra en las células al dañarse la barrera funcional del plasmalema. La mayor concentración del Pb se halla en las paredes celulares de la raíz a diferencia de otros tejidos. El contenido de Pb en los órganos de la planta tiende a decrecer en el siguiente orden: raíces-hojas-tallos-inflorescencias-semillas. Sin embargo, este orden puede presentar variaciones intraespecíficas (Antosiewicz, 1992).

La fitotoxicidad por Pb ocasiona desórdenes en las actividades fisiológicas hasta matar eventualmente las células a altas concentraciones (Seregin y Ivanov, 2001). Los principales procesos fisiológicos afectados son la actividad enzimática, la nutrición mineral, el potencial

hídrico, el estatus hormonal, la estructura de la membrana y el transporte de electrones. Los síntomas de toxicidad por Pb incluyen una inhibición rápida del crecimiento radical, reducción del área foliar, clorosis; aparición de manchas pardo rojizas fenólicas en tallos, pecíolos y hojas; necrosis foliar, también se inhibe la germinación de las semillas y se retarda el crecimiento vegetal (Burton *et al.*, 1984; Mishra y Choudhari, 1998; Seregin *et al.*, 2004). La toxicidad por Pb puede disminuir el contenido de proteínas en los tejidos y causar alteraciones significativas en la composición lipídica. La inhibición de la actividad enzimática es ocasionada por la interacción de Pb con los grupos sulfhidrilo (-SH) que están presentes en el centro activo de las enzimas; la reacción de estos grupos puede bloquear los grupos -COOH con iones Pb. En el aparato fotosintético, el  $Pb^{+2}$  causa diversos efectos como la disminución de la tasa fotosintética, la distorsión de la ultraestructura del cloroplasto; restringe la síntesis de clorofila, plastoquinona y carotenoides; obstruye el transporte de electrones, inhibe algunas actividades enzimáticas del ciclo de Calvin y produce una deficiencia de  $CO_2$  como resultado del cierre estomático (Stefanov *et al.*, 1995).

## 2.5. Comunidades fúngicas del suelo

Los hongos son organismos heterótrofos presentes en todo tipo de ambientes, son importantes como simbioses mutualistas de plantas y como patógenos, de igual manera son organismos descomponedores de materiales naturales y manufacturados (Burford *et al.*, 2003). Tienen un papel en el mantenimiento de la estructura del suelo. El papel de los hongos en los ciclos biogeoquímicos es determinante y está interrelacionado con la capacidad para adoptar una variedad de crecimientos, metabolismos, estrategias morfológicas y asociaciones con otros microorganismos que permiten aumentar su capacidad de adaptación y resistencia a condiciones ambientales extremas, incluyendo la toxicidad de metales, la irradiación y la desecación (Gadd, 2004; Braissant *et al.*, 2004; Fomina *et al.*, 2005; Gadd, 2007).

### 2.5.1 Hongos micorrízico arbusculares (HMA)

Dentro de los organismos del suelo y particularmente de la rizosfera están los hongos micorrízico arbusculares (HMA) que pueden ser usados para mitigar o revertir la degradación del suelo. Alrededor del 95% de las especies vegetales necesitan de la asociación micorrízica para su nutrición mineral. La formación de esta simbiosis mejora la capacidad de las plantas para enfrentar la sequía y los ambientes pobres en nutrimentos o contaminados; estos hongos,

asimismo, participan en la formación del suelo, no sólo para solubilizar minerales y aportar N y P disponibles (Smith *et al.*, 2004; Gaur y Adholeya, 2004).

#### 2.5.2 Hongos endófitos septados oscuros (ESO)

El término endófito se refiere a aquellos microorganismos que habitan dentro del tejido vegetal sin causar daño aparente (Heredia-Acuña *et al.*, 2014). Los hongos endófitos se asocian con las plantas durante al menos una fracción de su historia de vida (Kusari *et al.*, 2012); tal es el caso de los hongos endófitos septados oscuros (ESO) que han sido encontrados dentro de las raíces de una gran cantidad de especies vegetales (Heredia-Acuña *et al.*, 2014). Los hongos ESO pertenecen a un grupo diverso de los Ascomicetes anamórficos dematiáceos que colonizan intra e intercelularmente los tejidos de las raíces y los tejidos aéreos de las plantas formando asociaciones que van desde el mutualismo al parasitismo, en sitios con mucho estrés ambiental (Jumpponen y Trappe, 1998; Jumpponen, 2001; Grünig *et al.*, 2008; Newsham *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010), especialmente en ambientes tales como pastizales semiáridos (Khidir *et al.*, 2010), hábitats árticos (Upton *et al.*, 2009) y sitios contaminados por MP (Mandyam y Jumpponen, 2005; Zhang *et al.*, 2008).

La colonización radical por los ESO inicia cuando la hifa entra en contacto con la superficie de la raíz. La hifa puede penetrar de varias maneras, ya sea por los pelos radicales y a través de las células epidérmicas, por la cofia si los meristemas de la raíz apical están invadidos, o por heridas causadas por el crecimiento de raíces secundarias. Una vez dentro, la hifa prolifera e invade las células epidérmicas y corticales. Los hongos ESO están en su mayoría pigmentados de color oscuro y crecen en el parénquima cortical y en elementos del vaso del cilindro vascular central (Barrow y Aaltonen, 2001; Barrow, 2003). Forman microesclerocios pigmentados, de estructura hifal apretada y sinuosa, que contienen polisacáridos, proteínas y polifosfatos (Jumpponen y Trappe, 1998). Además, presentan hifas hialinas y delgadas con cuerpos lipídicos en su interior (Barrow, 2003) que colonizan en forma sistémica el huésped; estas hifas incoloras constituyen zonas potenciales de transferencia de carbono (Barrow y Aaltonen, 2001). Con base en las características morfo-anatómicas, se ha sugerido que los ESO pueden mejorar la absorción de nutrimentos y mantener una relación adecuada de agua para la supervivencia de las plantas hospederas (Jumpponen, 2001; Barrow, 2003).

### 2.5.2.1. Papel de los ESO en los ecosistemas

El papel que juegan los hongos ESO en los ecosistemas es clave en el ciclo de los elementos. Además, transforman el entorno local e inciden en el potencial redox, la concentración de oxígeno, el pH, la producción de enzimas extracelulares y la liberación de metabolitos. Con respecto a las interacciones con las plantas, aumentan la biodisponibilidad de los nutrientes y de metales no esenciales, favorecen el flujo de carbono y la productividad vegetal; modifican el funcionamiento biogeoquímico de la raíz-suelo-planta, propician el aumento de la actividad metabólica para combatir el estrés e incrementan la tolerancia contra el exceso de MP en el suelo (Mandyam y Jumpponen, 2005; Gadd, 2007; Colpaert *et al.*, 2011). El estudio de la interacción entre los hongos y los MP ha sido durante mucho tiempo de interés científico ya que los hongos tienen la capacidad de resistir y adaptarse a ellos (Gadd, 1993). Las interfases formadas por los ESO difieren de las interfases observadas en las micorrizas; los hongos ESO son capaces de formar las interfases específicas y estructuras que permiten una asociación mutualista con los hospederos autótrofos (Barrow y Aaltonen, 2001). Se ha demostrado que los hongos ESO pueden, bajo ciertas condiciones ambientales o experimentales, estimular el crecimiento del hospedero y la absorción de nutrientes, por lo que se ha considerado que funcionan de una manera similar a los hongos de las asociaciones micorrízicas. Newsham (2011) menciona que los hongos ESO mejoran el rendimiento de la planta en condiciones controladas, sobre todo cuando el N está disponible en forma orgánica. También se ha observado que la asociación con endófitos está relacionada con un aumento de la resistencia de las plantas a factores de estrés biótico tales como herbívoros o patógenos. La presencia de estos hongos podría alterar las poblaciones de herbívoros cercanas a las plantas infectadas; existe un interés en la utilización de estos endófitos como agentes de control biológico. El aumento de la resistencia a nemátodos y hongos en plantas colonizadas por endófitos puede atribuirse a tres mecanismos: inducción de los mecanismos de defensa por parte del endófito, producción de sustancias antibióticas que inhiben patógenos, o competencia con otros organismos por el espacio o los nutrientes de la planta (Zabalgoeazcoa, 2008). Son relativamente comunes los ejemplos de endófitos productores de sustancias antibióticas (Kim *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Otro caso es la competencia

directa del endófito al tener la capacidad de parasitar otros hongos (Rivera-Varas *et al.*, 2007).

Como fue mencionado, la interacción entre los hongos y los MP es de interés ya que los hongos tienen la capacidad de resistir y adaptarse al estrés metálico (Gadd, 1993); además, juegan un papel clave en el ciclo de los elementos, las transformaciones minerales y las interacciones con las plantas (Gadd, 2007). Los hongos ESO colonizan las raíces de prácticamente todas las plantas en la naturaleza (Jumpponen y Trappe, 1998). Mandyam y Jumpponen (2005) mencionan que el papel de los ESO en los ecosistemas está centrado en mediar la absorción de nutrientes minerales por la planta huésped. Regvar *et al.* (2010) reportaron que la colonización por hongos ESO en el sauce *Salix caprea* podría mejorar la tolerancia vegetal a la alta contaminación por Pb y Cd. Un estudio realizado por Ban *et al.* (2012) menciona que la colonización de hongos ESO ayuda a la planta *Astragalus adsurgens* a mejorar la tolerancia a la alta contaminación por Pb y Zn.

### **3. Objetivo**

Aislar y caracterizar los hongos endófitos septados oscuros presentes en raíces de plantas que se encuentran en desechos mineros contaminados por plomo

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Sitio de estudio

El sitio base de este trabajo fue la mina inactiva El Bote, de la Compañía Minera Argentum, ubicada en la ciudad de Zacatecas (22°47'5.5" N, 102°36'28.8" O, 2370 msnm). Los principales minerales de extracción en esta mina son Zn, Pb y Ag. Este sitio se caracteriza por un clima subtropical templado árido a lo largo del año; la temperatura promedio es de 19°C, con una precipitación anual que varía de 200 mm a 300 mm (Carrillo-González y González-Chávez, 2006). Los desechos mineros de la mina El Bote contienen una concentración de Pb de 56 a 188.6 mg Pb kg<sup>-1</sup> de sustrato (Flores-Torres, 2015). Junto a la mina se encuentra una presa de jales parcialmente vegetada por herbáceas, arbustos y árboles (Figura 3). La planta *Tagetes lunulata* es una herbácea de la familia Asteraceae; es nativa de México, crece en matorrales, pastizales, bosques de *Quercus* y *Juniperus*; es una planta ruderal que aparece en hábitats alterados por el ser humano, como bordes de caminos o zonas urbanas (Conabio, 2015). *Pennisetum villosum* es una herbácea de la familia Poaceae, ruderal en terrenos baldíos y en orillas de caminos; es una especie invasora, capaz de tolerar circunstancias desfavorables y de modificar las condiciones ecológicas de los lugares que coloniza (Conabio, 2015).



Figura 3. Presa de desechos mineros de la mina El Bote de la Compañía Argentum (derecha), en la ciudad de Zacatecas.

### 4.2. Evaluación de la colonización de los hongos ESO

Se tomaron muestras de raíces previamente lavadas con agua corriente para la evaluación de los niveles de colonización por los hongos ESO. Las raíces fueron clarificadas con KOH al 10% y teñidas con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970) en lactoglicerol; se depositaron

30 segmentos de 1 cm en un portaobjetos con glicerol para su observación al microscopio. La evaluación de la colonización fúngica en cada segmento de raíz consideró hifas septadas y microesclerocios en el córtex del sistema radical (Trouvelot *et al.*, 1986) de acuerdo con la siguiente escala ([www.dijon.inra.fr/bbceipm/Mychintec/](http://www.dijon.inra.fr/bbceipm/Mychintec/)): 0 (0% de colonización), 1 (<1% de colonización), 2 (<10% de colonización), 3 (<50% de colonización), 4 (>50% de colonización) y 5 (>90% de colonización). La riqueza de microesclerocios consideró la presencia de estas estructuras en cada segmento de raíz de acuerdo con la siguiente escala: ME0 (0% de microesclerocios), ME1 (pocos microesclerocios), ME2 (microesclerocios frecuentes) y ME3 (microesclerocios abundantes). Los niveles de colonización se calcularon considerando la intensidad de la colonización endófito en el sistema radical (E%) y la abundancia de microesclerocios en el sistema radical (ME%), con el programa Mycolcalc ([www.dijon.inra.fr/bbceipm/Mychintec/](http://www.dijon.inra.fr/bbceipm/Mychintec/)).

#### 4.2.1. Aislamiento de hongos endófitos septados oscuros

En la presa de desechos de la mina El Bote se seleccionaron tres individuos de cada especie de las herbáceas *T. lunulata* y *P. villosum*, que en un ensayo previo mostraron elevada colonización radical por los hongos ESO. De cada individuo se tomó una muestra de raíces secundarias y se conservó a 4°C hasta su procesamiento en laboratorio.

Previo al aislamiento de los hongos ESO, las raíces fueron lavadas con agua de la llave hasta eliminar los restos de sustrato. A continuación fueron desinfectadas superficialmente con base en los siguientes protocolos:

a).- Etanol al 99% durante 1 min, peróxido de hidrógeno al 35% durante 5 min, etanol al 99% durante 30 s, y posteriormente se lavaron tres veces con agua deionizada estéril (Ban *et al.*, 2012).

b).- Etanol al 95% durante 1 min, hipoclorito de sodio al 2.5% durante 10 min, etanol al 95% durante 30 s, y posteriormente se lavaron cinco veces con agua deionizada estéril (Salgado-Salazar y Cepero-García, 2005).

A continuación, las raíces fueron cortadas en segmentos de 1.5 cm de largo; se hicieron cortes longitudinales y transversales de cada uno de ellos para ser depositados en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) natural; se adicionó el antibiótico cloranfenicol (250 mg l<sup>-1</sup> de



medio de cultivo) para inhibir el crecimiento bacteriano. Las cajas se incubaron en la oscuridad a 20°C durante 7 días hasta observar colonias fúngicas.

#### 4.3. Purificación de los hongos ESO

Los aislados fúngicos procedentes directamente de campo tienen información genética heterogénea, lo que puede dar lugar a variaciones celulares que implican cambios en las propiedades físicas, fisiológicas y bioquímicas (Cortez-Madrigal *et al.*, 2003). Por lo anterior, fue necesario purificar los hongos ESO aislados de raíz por medio de cultivos monohifales, lo que permitió contar con aislados genéticamente homogéneos, con una mayor estabilidad en sus propiedades (Ángel-Sahagún *et al.*, 2010; Ayala-Zermeño *et al.*, 2012). Para la purificación se siguió el método punta de hifa ya que no fue posible obtener conidios de la mayoría de los aislados fúngicos.

Para el método de punta de hifa, los aislados fúngicos se sembraron en medio de cultivo PDA natural, a 28°C durante tres días; con un esteremicroscopio y dos mecheros se observaron los bordes de la colonia para identificar las puntas de las hifas en crecimiento; con un alfiler flameado se cortó el segmento de agar que contenía la punta de una sola hifa para ser transferido a una nueva caja con medio PDA natural. Los aislados fueron incubados a 28°C; transcurridas 72 h se realizaron observaciones a 40x para asegurar que el crecimiento fuera originado por una sola hifa y que estuviera libre de contaminación. Una vez obtenidos los cultivos monohifales, los hongos fueron sembrados para los experimentos siguientes. Asimismo, los aislados se conservaron en aceite mineral y fueron depositados en el Cepario del Laboratorio de Micología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

#### 4.4. Caracterización morfológica de los hongos ESO

Los aislados fueron sembrados en medio PDA natural y medio Czapek para describir las siguientes características morfológicas: color del anverso y reverso; aspecto de la superficie (algodonoso, aterciopelado, pulverulento, zonado); consistencia (blanda o dura); superficie (convexa, elevada, plana) y si hubo liberación de exudados al medio de cultivo (Mier *et al.*, 2013).

Asimismo, se llevó a cabo la caracterización micromorfológica de cada uno de los hongos incluyendo las estructuras reproductoras en un microscopio óptico con los objetivos 40x y 100x (Mier *et al.*, 2013). Se consultaron claves dicotómicas para identificar características de los hongos ESO, los cuales presentan en su mayoría pigmentos de color oscuro, una estructura hifal apretada y sinuosa, las hifas son hialinas y delgadas con cuerpos lipídicos en su interior, además de conidios pigmentados de color oscuro (Jumpponen y Trappe, 1998; Barrow y Aaltonen, 2001; Barrow, 2003).

Posteriormente, se llevó a cabo una preselección de aproximadamente 20 aislados considerando el color oscuro de las colonias, así como la pigmentación oscura de los conidios y de las hifas septadas.

#### 4.5. Inducción de la conidiación

En aquellos aislados fúngicos que no presentaron conidios se indujo la conidiación en tres medios; el primero de ellos fue de harina de arroz (arroz pulido 32 g, agua destilada 1,000 ml); el segundo medio fue de jugo V8 (agua destilada 1,200 ml, agar 23 g, carbonato de calcio 3 g, lata de jugo V8 340 ml); el tercer medio fue de extracto de malta (agua destilada 1,000 ml, extracto de malta 20 g y agar 20 g). Los aislados fúngicos fueron incubados a 28°C durante 10 días; posteriormente, se llevaron a cabo preparaciones en fresco para observar las estructuras reproductoras en un microscopio óptico con los objetivos 40x y 100x (Mier *et al.*, 2013).

#### 3.6. Curva de biomasa fúngica

Debido a que aún con la inducción de conidiación no se logró el objetivo en la mayoría de los aislados, se llevó a cabo una curva de biomasa fúngica para conocer la cantidad de hifas a utilizar en los ensayos subsecuentes.

Los aislados fúngicos fueron sembrados en medio de cultivo PDA natural, a 28°C durante 10 días; posteriormente se preparó una suspensión de hifas en tween 20 al 0.05%. Se prepararon cajas con medio de cultivo PDA natural; en el centro de cada una de ellas se depositaron 500 µl de esta suspensión y se esparció con un rastrillo de vidrio estéril; las cajas se incubaron a 28°C durante 11 días. En el césped de micelio se llevaron a cabo 100 cortes circulares para obtener discos homogéneos de micelio, por aislado. Posteriormente, los discos de micelio

fueron pesadas en una balanza analítica, se colocaron en papel estroza y se secaron en un horno a 100°C; los discos de micelio fueron pesadas hasta peso constante.

#### 4.7. Identificación molecular de los hongos ESO

##### 4.7.1. Identificación molecular

Se obtuvo micelio fresco de los aislados de los hongos ESO a partir de cultivos en medio PDA natural, incubados durante 7 días a 25°C en la oscuridad. El DNA fúngico de los ESO se extrajo con base en el método CTAB (Girlanda *et al.*, 2002) para ser utilizado como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores específicos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White, 1990), que amplifican la región ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 4). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador MaxyGene Gradient (E.E.U.U.); la mezcla de reacción tuvo un volumen de 50 µl con 34 µl de agua destilada estéril, 2 µl de DNA total (relación densidad óptica 260/280 nm: A1 TAG= 1.63; A2 TAG=1.65; A4 TAG=1.50; A5 TAG=1.46; A6A TAG=1.53; A6B TAG=1.47; A6C TAG=1.47; A6D TAG=1.48; A7 TAG=1.67; A8 TAG=1.45; A9 TAG=1.73; A10A TAG=1.48; A10B TAG=1.47; A11 TAG=1.67; A2 PEV=1.76; A3 PEV=1.77; A4A PEV=1.84; A4B PEV=1.82), 1 µl de cada iniciador (ITS1-ITS4-ITS5) a 1 µg ml<sup>-1</sup>, 5 µl de MgCl<sub>2</sub> a 25 nM, 5 µl del amortiguador 10x, 1 µl de dNTP's y 1 µl *Taq* DNA polimerasa (Thermo Scientific). El programa de amplificación fue: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, hibridación a 55°C durante 1 min, una extensión inicial a 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C durante 7 min. El producto de la PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio y las bandas amplificadas fueron visualizadas en un transiluminador bajo luz UV. Los productos de la PCR fueron purificados con el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, E.E.U.U.) y se secuenciaron en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-IZTACALA, UNAM. Las secuencias de los amplicones se sometieron a un análisis BLAST en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para determinar su identidad y cualquier relación potencial con secuencias existentes de hongos ESO. Las secuencias fueron editadas manualmente y alineadas utilizando el programa ClustalX 1,83 (Thompson *et al.*, 1997). Basándose en las secuencias de la región

ITS, se realizó un análisis de probabilidad máxima a 1,000 pseudo réplicas mediante el programa ALRT-PHYML 3.0 ([www.atgc-montpellier.fr/phyml/alrt/](http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/alrt/)) para identificar los aislados fúngicos y evaluar su relación filogenética (Guindon y Gascuel, 2003), con respecto a las secuencias disponibles en el GenBank. El modelo más adecuado de la evolución de nucleótidos y los parámetros del modelo para el conjunto total de las secuencias se determinó mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC) con el software JModel test v.3.7 (Posada y Crandall, 1998). Se utilizó el modelo general reversible en el tiempo GTR (AIC =, -lnL =, G =) (Tavaré, 1986). Los nodos fueron apoyados por un bootstrap generado a partir de 500 pseudo réplicas.

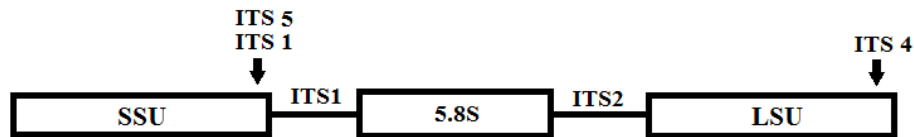


Figura 4. Región del genoma ITS que se encuentra entre los genes del RNA ribosomal de la subunidad mayor (LSU) y menor (SSU) del DNA nuclear. El ITS contiene dos regiones espaciadoras (ITS1 e ITS2) separadas por el gen 5.8S rRNA.

## 5. Resultados

### 5.1. Evaluación de la colonización radical de los hongos ESO

La colonización de los hongos ESO en el sistema radical de *T. lunulata* presentó una intensidad (E%) de 1.7; los microesclerocios estuvieron ausentes. La colonización de hongos ESO en *P. villosum* tuvo una intensidad (E%) de 15.17 y la abundancia de microesclerocios fue de apenas 0.3% (Figura 5).

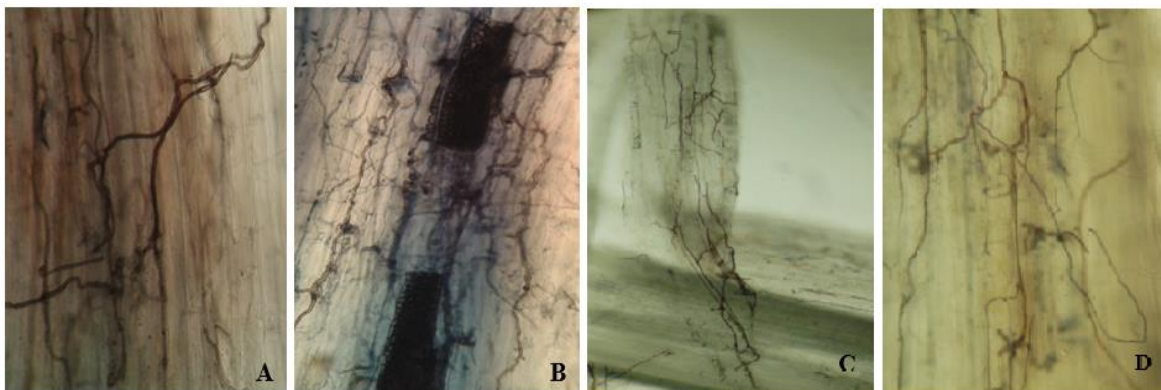


Figura 5. Estructuras de hongos ESO en el interior de las raíces. Hifas septadas en *Tagetes lunulata* (A, C); hifas septadas y microsclerocios en *Pennisetum villosum* (B, D).

## 5.2. Aislamiento de hongos endófitos septados oscuros

Los protocolos de desinfección de las raíces de ambas especies vegetales permitieron que los hongos endófitos se desarrollaran en el medio de cultivo (Figura 6). De los 60 fragmentos de raíz de *T. lunulata* depositados en las cajas, el 80% presentó colonización por hongos microscópicos, en tanto, a partir de un total de 60 fragmentos de raíz de *P. villosum*, en el 70% hubo crecimiento fúngico.

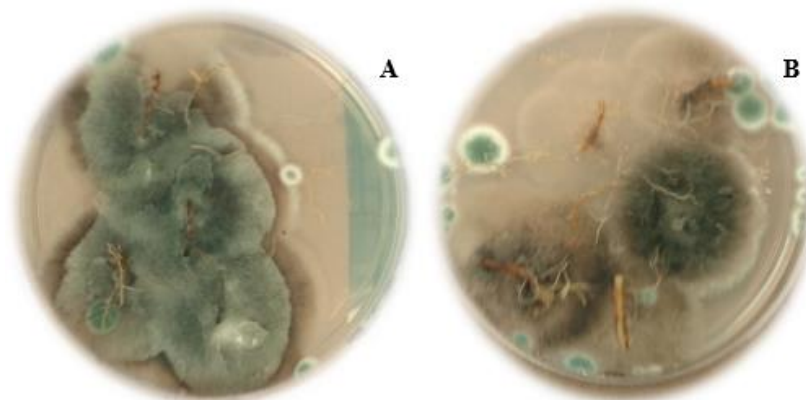


Figura 6. Hongos microscópicos desarrollados en el medio PDA procedentes del interior de las raíces vegetales: A) Protocolo de desinfección con peróxido de hidrogeno, B) Protocolo de desinfección con hipoclorito de sodio.

Se obtuvieron 53 aislados fúngicos mixtos de *T. lunulata* y 34 de *P. villosum*; se seleccionaron aquellos que presentaron una coloración oscura característica de los hongos ESO. De igual manera, se hizo una observación al microscopio para corroborar la selección de los ESO (Figura 7).

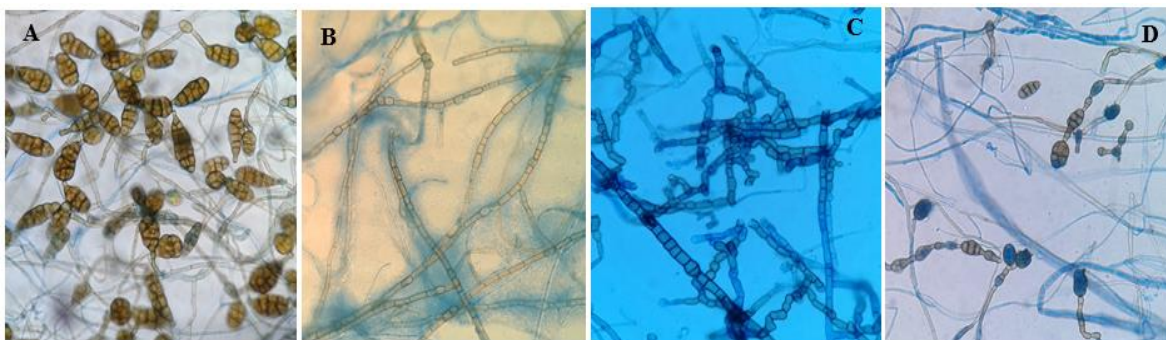


Figura 7. Hongos aislados: Conidios de *Alternaria* sp. (A), Hifas septadas oscuras (B, C), Conidios pigmentados (D).

### 5.3. Caracterización morfológica de los aislados fúngicos purificados e inducción de la conidiación

A partir de los diferentes aislados mixtos se lograron purificar 18 aislados: 14 aislados procedentes de *T. lunulata* (TAG) y 4 aislados pertenecientes a *P. villosum* (PEV). Asimismo, fueron descritas las características macromorfológicas y micromorfológicas de los aislados fúngicos cultivados en medio PDA y medio Czapek (Cuadro 2).

Cuadro 2. Descripción fenotípica de los aislados fúngicos cultivados en medio PDA y en medio Czapek.

Aislados	Descripción macro y micromorfológica	
	Medio PDA natural	Medio Czapek
<b>A1 TAG</b>	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris oscuro verdoso y negro, respectivamente; aspecto vellosos; consistencia media; superficie de la colonia, convexa. Hifas septadas en espiral hialinas u oscuras.	Color de la colonia en el anverso gris, borde blanco, el reverso negro con borde blanco; aspecto vellosos, aterciopelado; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas hialinas y oscuras.
<b>A2 TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris oliváceo, pero en el centro es más oscuro, el reverso es negro; aspecto vellosos, flocoso, aterciopelado; consistencia dura; superficie plana. Con el tiempo la colonia se oscurece y se torna verde oliva. Presencia de exudados y pigmentación rojiza difusible al medio. Hifas septadas café oscuro.	Color de la colonia en el anverso es gris claro pero en el centro es más oscuro, el reverso negro; aspecto vellosos, aterciopelado; consistencia media; superficie plana. Hifas septadas café oscuro.
<b>A4 TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris verdoso, con un halo blanco con tonalidades verdosas; el reverso negro, halo verdoso en el borde; aspecto vellosos, flocoso; consistencia media; superficie de la colonia, convexa. Hifas septadas oscuras con vacuolas.	Color de la colonia en el anverso gris oliva, halo ligeramente blanco al borde, el reverso negro; aspecto vellosos, cerebriforme, flocoso, aterciopelado; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas oscuras.
<b>A5 TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris pero en el centro es más oscuro; el reverso es negro; aspecto vellosos, flocoso,	Color de la colonia en el anverso marrón, el centro blanco, el reverso marrón oscuro; aspecto vellosos, lanoso, flocoso; consistencia

	aterciopelado; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro.	media; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro.
<b>A6A TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris oscuro; el reverso negro, halo blanco en el borde; aspecto veloso, flocoso; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro e hialino.	Color de la colonia en el anverso gris oliváceo, el centro blanco y halo claro al borde, el reverso gris oscuros y halo blanco en el borde; aspecto veloso, aterciopelado, el centro flocoso; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro y hialino.
<b>A6B TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris oscuro; el reverso negro; aspecto veloso, aterciopelado; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro e hialino.	Color de la colonia en el anverso gris claro, el reverso gris oscuro; aspecto veloso, aterciopelado; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro y hialino.
<b>A6C TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris oscuro, el reverso negro; aspecto veloso, flocoso; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro.	El color de la colonia en el anverso es gris oliváceo con un halo blanco en el borde, el reverso es de color negro; su aspecto es veloso, flocoso; su consistencia es media y la superficie de la colonia convexa. Presenta hifas septadas de color café oscuro.
<b>A6D TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris pero en el centro es más oscuro, el reverso negro; aspecto veloso, flocoso, aterciopelado, consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas color oscuro y conidios alargados color pardo, septos transversales y verticales de disposición irregular.	Color de la colonia en el anverso gris pero en el centro es más oscuro, el reverso negro; aspecto veloso, aterciopelado; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas de color oscuro y conidios alargados muriformes pardos, con septos transversales y verticales de disposición irregular.
<b>A7 TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris verdoso, el reverso café; aspecto polvoso, veloso, flocoso; consistencia blanda; superficie convexa. Presenta pigmentación café. Hifas septadas oscuras e hifas septadas globosas hialinas.	Color de la colonia en el anverso marrón, arillos beige, el reverso marrón oscuro; aspecto veloso, flocoso, aterciopelado; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas oscuras.
<b>A8 TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, gris oliváceo pero en el centro es más oscuro, el reverso negro; aspecto veloso, flocoso, aterciopelado; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro.	Color de la colonia en el anverso marrón, el reverso marrón oscuro; aspecto veloso, flocoso, aterciopelado; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro.
<b>A9 TAG</b>	Color de la colonia en el anverso, beige grisáceo, el reverso marrón; aspecto veloso, flocoso; consistencia blanda; superficie convexa. Pigmentación difusible café. Hifas septadas grandes oscuras.	Color de la colonia en el anverso beige grisáceo y centro blanco, el reverso marrón; aspecto veloso, flocoso, aterciopelado; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas oscuras.
<b>A10A TAG</b>	Color de la colonia en el anverso gris claro pero en el centro es más oscuro, el reverso negro; aspecto veloso, flocoso, aterciopelado; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas oscuras.	Color de la colonia en el anverso marrón y el centro blanco, el reverso marrón oscuro; aspecto veloso, flocoso; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro.
<b>A10B TAG</b>	Color de la colonia en el anverso gris pero en el centro es más oscuro, el reverso gris; aspecto veloso, flocoso, aterciopelado; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro e hifas hialinas.	Color de la colonia en el anverso gris oliváceo y centro blanco, el reverso gris; aspecto veloso, aterciopelado; consistencia media; superficie convexa. Hifas septadas café oscuro e hifas hialinas.
<b>A11 TAG</b>	Color de la colonia en el anverso gris pero en el centro es más oscuro, el reverso negro; aspecto veloso, flocoso; aterciopelado;	Color de la colonia en el anverso marrón y centro gris, el reverso marrón oscuro; aspecto veloso, flocoso; consistencia media;



	consistencia dura; superficie convexa. Presencia de exudados y pigmentación negra. Hifas septadas oscuras.	superficie convexa. Hifas septadas oscuras y conidios pardos, con septos transversales y verticales de disposición irregular.
<b>A2 PEV</b>	Color de la colonia en el anverso gris verdoso con halo blanco en el borde, el reverso gris oscuro y halo blanco; aspecto polvoso, velloso; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas ornamentadas oscuras.	Color de la colonia en el anverso gris verdoso y borde marrón, el reverso beige oliváceo; aspecto polvoso, velloso; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas oscuras.
<b>A3 PEV</b>	Color de la colonia en el anverso es gris verdoso con halo blanco en el borde, el reverso gris oscuro y halo blanco; aspecto polvoso, velloso; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas ornamentadas oscuras.	Color de la colonia en el anverso gris verdoso, con borde marrón, el reverso beige oliváceo; aspecto es polvoso, velloso; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas oscuras.
<b>A4A PEV</b>	Color de la colonia en el anverso gris verdoso con halo blanco verdoso en el borde, el reverso negro, halo blanco en el borde; aspecto polvoso, velloso, lanoso; consistencia dura; superficie convexa. Hifas septadas ornamentadas oscuras e hifas hialinas globosas.	Color de la colonia en el anverso marrón y centro beige, el reverso marrón oscuro y borde beige; aspecto polvoso, velloso; consistencia media, superficie convexa. Hifas septadas oscuras.
<b>A4B PEV</b>	Color de la colonia en el anverso verdoso, halo blanco en el borde, el reverso negro, halo blanco en el borde; aspecto polvoso, velloso, flocoso; lanoso; consistencia media; superficie convexa. Hifas hialinas globosas.	Color de la colonia en el anverso marrón y centro beige, el reverso marrón oscuro; aspecto polvoso, velloso, flocoso; consistencia media; superficie convexa. Hifas hialinas.

Como se observa en el cuadro 2, únicamente uno de los aislados (A6D TAG) presentó conidios. La inducción de conidiación en los 17 aislados restantes fue lograda solamente en los aislados A10A TAG y A11 TAG de *T. lunulata*. Los conidios de estos tres aislados permitieron identificar estos hongos en forma preliminar dentro del género *Alternaria* spp. (Figura 8). Los aislados restantes de hongos ESO permanecieron como micelio estéril, sin estructuras reproductoras.



Figura 8. Conidios muriformes transversales de disposición irregular de color pardo (A, B), y conidios



alargados de color pardo con septos transversales de disposición irregular (C), de tres aislados de hongos ESO de *T. lunulata*.

#### 5.4. Curva de biomasa fúngica

Debido a que no hubo conidiación en la mayoría de los aislado fúngicos, se llevó a cabo una curva de calibración (Cuadro 4) en cada uno de ellos para conocer la cantidad de propágulos hifales a utilizar en los ensayos *in vitro* de tolerancia al Pb.

Cuadro 4. Biomasa de los aislados fúngicos obtenidos de *T. lunulata* y *P. villosum*.

Aislado	Biomasa fúngica húmeda (g)	Biomasa fúngica seca (g)	Peso real fúngico (g micelio * unidad de área)
A1 TAG	0.6	0.0038	0.5962
A2 TAG	0.5	0.0023	0.4977
A3 TAG	0.5	0.0019	0.4981
A4 TAG	0.6	0.0019	0.5981
A5 TAG	0.6	0.0021	0.5979
A6A TAG	0.5	0.0021	0.4979
A6B TAG	0.6	0.0023	0.5977
A6C TAG	0.5	0.0019	0.4981
A6D TAG	0.6	0.0017	0.5983
A7 TAG	0.7	0.0020	0.6980
A8 TAG	0.6	0.0023	0.5977
A9 TAG	0.7	0.0025	0.6975
A10A TAG	0.5	0.0013	0.4987
A11 TAG	0.5	0.0017	0.4983
A2 PEV	0.7	0.0023	0.6977
A3 PEV	0.6	0.0019	0.5981
A4A PEV	0.7	0.0025	0.6975
A4B PEV	0.7	0.0021	0.6979

#### 5.5. Identificación molecular de los hongos ESO

##### 5.5.2. Identificación molecular con base en el segmento ITS

Se amplificó la región ITS1 e ITS2 que contiene en el centro el gen 5.8S rDNA. En la figura 9 se muestran los geles respectivos de cada uno de los 18 aislados; se obtuvo un amplicón de entre 500 y 600 pares de bases (pb) que corresponde a la talla esperada.

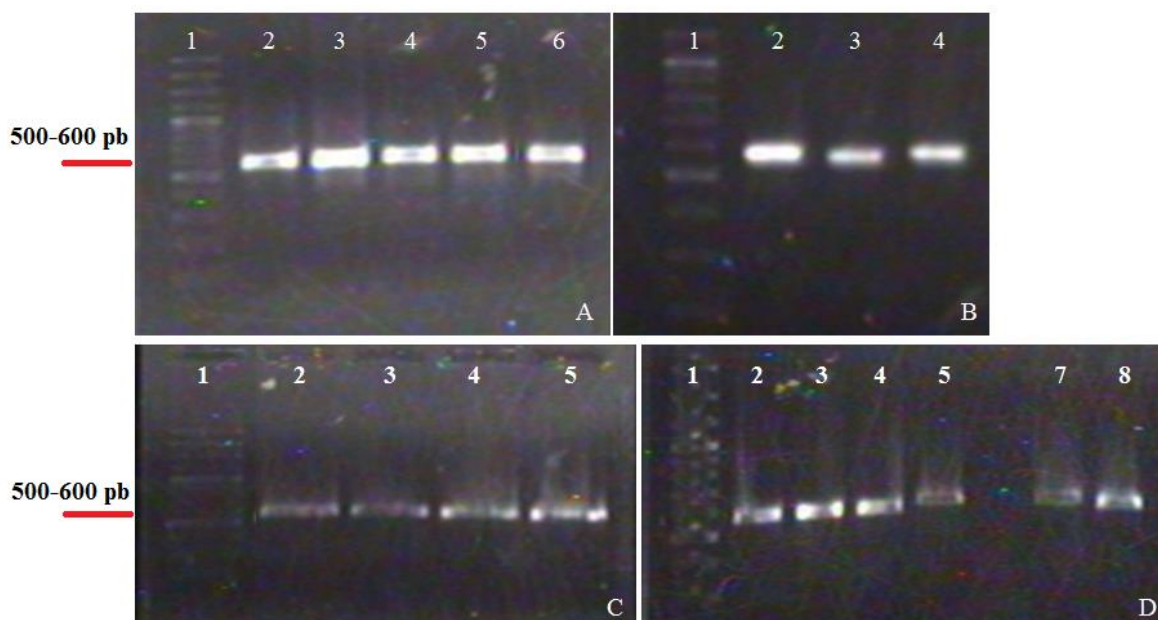


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, con la región ITS del rDNA amplificada por PCR. El carril 1, en todos los casos, corresponde al marcador molecular; A) carril 2 A1 TAG, carril 3 A2 TAG, carril 4 A7 TAG, carril 5 A9 TAG, carril 6 A11 TAG; B) carril 2 A4 TAG, carril 3 A5 TAG, carril 4 A8 TAG; C) carril 2 A2 PEV, carril 3 A3 PEV, carril 4 4A PEV, carril 5 4B PEV; D) carril 2 A6A TAG, carril 3 A6B TAG, carril 4 A6C TAG, carril 5 A6D TAG, carril 7 A10A TAG, carril 8 A10B TAG.

Solamente 17 secuencias fúngicas presentaron la calidad adecuada para ser consideradas en el análisis de homología en el GenBank del NCBI. Todas las secuencias pertenecieron al Phylum *Ascomycota* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Identidad de las 17 secuencias amplificadas con los iniciadores ITS1, ITS4 y ITS5 a partir de DNA fúngico extraído de *T. lunulata* y *P. villosum*, especies vegetales establecidas en desechos mineros de Zacatecas.

A1 TAG	98% (525)	<i>Alternaria</i> sp., <i>A. macrospora</i> , <i>A. citrullicola</i>
A2 TAG	99% (510)	<i>Alternaria dauci</i> , <i>A. macrospora</i> , <i>A. sesami</i>
A4 TAG	98% (510)	<i>Alternaria macrospora</i> , <i>A. nitrimali</i> , <i>A. agerati</i>
A5 TAG	98% (520)	<i>Alternaria agerati</i> , <i>A. citrullicola</i> , <i>A. macrospora</i>
A6A TAG	100% (474)	<i>Alternaria alternata</i>
A6B TAG	99% (507)	<i>Alternaria solani</i> , <i>A. dauci</i> , <i>A. ipomoea</i>
A6C TAG	100% (486)	<i>Alternaria calendulae</i> , <i>A. bataticola</i> ,

		<i>A. echinaceae</i>
A6D TAG	100% (402)	<i>Alternaria daucci</i>
A7 TAG	98% (519)	<i>Alternaria agerati, A. citrullicola, A. macrospora</i>
A8 TAG	100% (513)	<i>Alternaria alternata</i>
A9 TAG	99% (515)	<i>Alternaria dauci, A. conidiophore, A. nitrimali</i>
A10A TAG	100% (372)	<i>Alternaria alternata</i>
A11 TAG	100% (512)	<i>Alternaria alternata</i>
A4A PEV	99% (508)	<i>Periconia macrospinoso</i>
A4B PEV	99% (504)	<i>Periconia macrospinoso</i>
A2 PEV	99% (499)	Orden <i>Pleosporales</i>
A3 PEV	99% (500)	Orden <i>Pleosporales</i>

El análisis filogenético permitió apreciar que las 17 secuencias de los hongos ESO de las plantas de los desechos mineros se organizaron en seis grupos (Figura 10). Diez secuencias ubicadas en los grupos A, C y D mostraron afinidad con el género *Alternaria*; tres secuencias se agruparon con la especie *Alternaria alternata* (Grupo B); dos secuencias tuvieron afinidad con *Periconia macrospinoso* (Grupo E); por último, dos secuencias más formaron un grupo dentro del Orden *Pleosporales* (Grupo F).

Cada especie vegetal mostró una preferencia por ciertos hongos ESO; en *T. lunulata* los hongos ESO presentes en sus raíces pertenecieron al género *Alternaria*, mientras que en *P. villosum* correspondieron al Orden *Pleosporales* y al género *Periconia*.

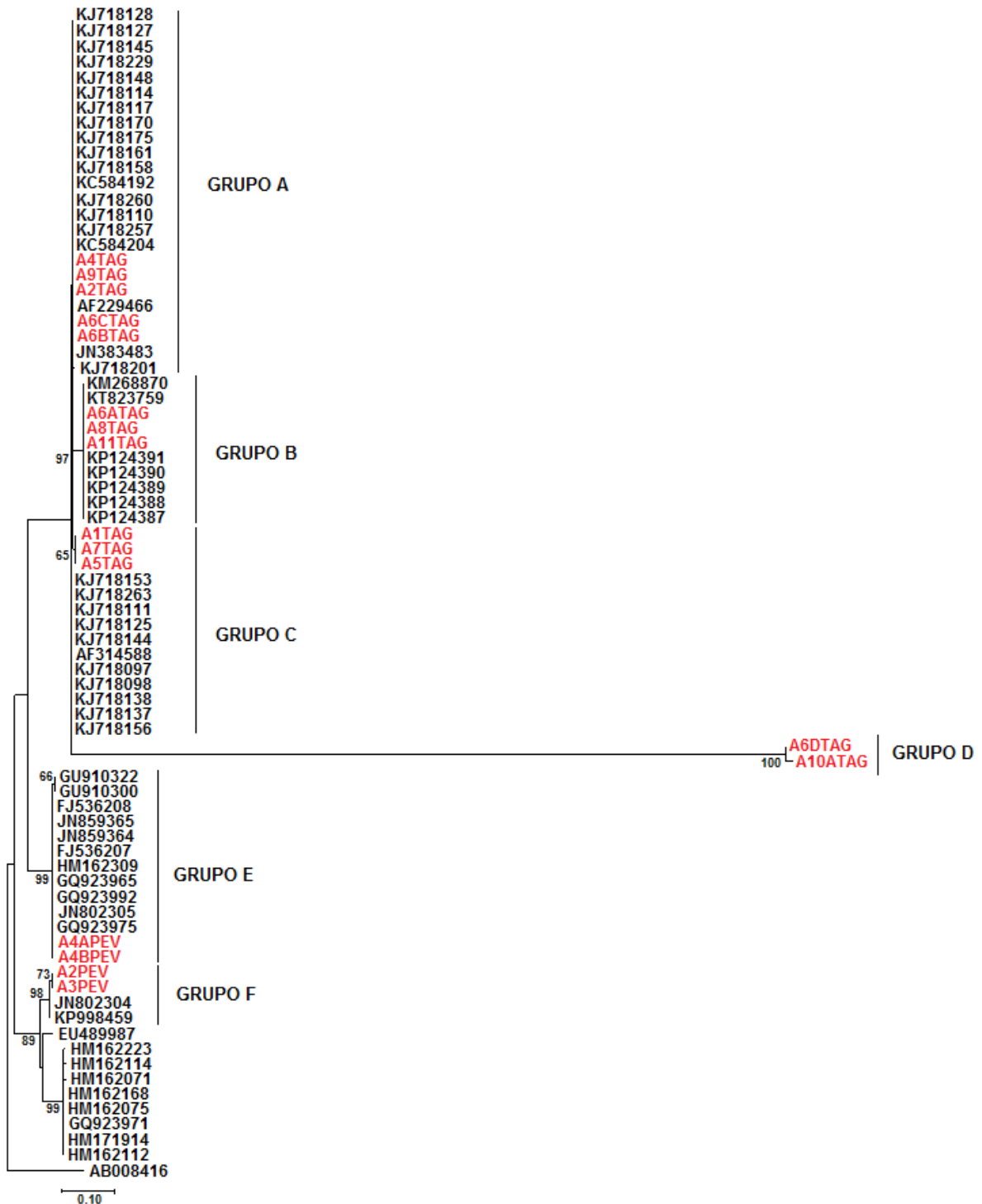


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (500 bootstrap) construido sobre la base de 520 pb de la región ITS2-5.8S- ITS1 con el modelo de sustitución de GTR + G. En rojo se encuentran las secuencias pertenecientes a esta investigación; en negro están las secuencias tomadas del GenBank del NCBI; *Aspergillus flavus* se utilizó como grupo externo (Rigó *et al.*, 2002). Los valores de las ramas se muestran en los nodos superiores a 60.

## 6. Discusión

Esta investigación constituye el primer reporte en México sobre la colonización de hongos ESO en plantas establecidas en desechos mineros; *T. lunulata* presentó una colonización radical fúngica de 1.7 % y *P. villosum* de 15.2%. Los ESO son hongos comunes y abundantes que pueden colonizar las raíces de plantas expuestas a MP. En este sentido, previamente, fue descrito que las especies vegetales *Salix caprea* y *Astragalus adsurgens*, establecidas en desechos mineros con altas concentraciones de Pb (1,350.7 mg kg<sup>-1</sup>) y Cd (526.4 mg kg<sup>-1</sup>), estuvieron asociadas con hongos ESO, los cuales pueden mejorar la adaptación y el crecimiento de las plantas en esos ambientes (Likar y Regvar, 2009; Ban *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). *Zea mays* en presencia de Pb, Zn y Cd presentó niveles altos de colonización fúngica (12-79%) por el hongo ESO *Exophiala pisciphila* (Li *et al.*, 2011; Madyam y Jumpponen, 2015). En contraste, Zhang *et al.* (2013) reportaron que 29 especies de plantas establecidas en una escombrera del sur de China con altas concentraciones de Pb y Zn, tuvieron una baja intensidad de colonización por hongos ESO (0-35.7%); sólo el 21% de las especies vegetales exhibieron una intensidad de colonización superior al 10%.

En este trabajo se obtuvieron 18 aislados de hongos ESO a partir de las plantas colonizadas; solo tres aislados fúngicos, pertenecientes al género *Alternaria*, formaron conidios. Algunos autores mencionan que la conidiogénesis en los hongos ESO sólo ocurre dentro del tejido vegetal; en ciertos casos se puede inducir la conidiación fúngica después de una exposición del aislado a luz UV (Jumpponen y Trappe, 1998, Sieber y Grünig, 2006). En la presente investigación fueron identificados 18 aislados fúngicos mesófilos cultivables; a este respecto, Xu *et al.* (2015) identificaron una mayor riqueza de especies de hongos ESO en un análisis metagenómico en sitios mineros, que incluye tanto los hongos cultivables como los no cultivables.

Los hongos ESO representan un grupo de hongos endófitos de diferentes linajes que forman estructuras similares (Jumpponen y Trappe, 1998). Por lo general pertenecen a los *Ascomycota* (Newsham 2011, Knapp *et al.*, 2012, Knapp *et al.*, 2015; Heredia-Acuña *et al.*, 2014); el Orden *Pleosporales* es el más representativo en las comunidades de los hongos ESO (Porrás-Alfaro *et al.*, 2008, Knapp *et al.*, 2012; Andrade-Linares y Franken, 2013).

Los géneros *Alternaria* y *Periconia* se han descrito como hongos ESO (Li *et al.*, 2012; Heredia-Acuña *et al.*, 2014). Los aislados A6A TAG, A8 TAG, A10A TAG y A11 TAG procedentes de *T. lunulata* concuerdan con las características morfológicas descritas por Simmons (2007) y Woudenberg *et al.* (2013) para la especie *A. alternata*. Los aislados A4A PEV y A4B PEV de *P. villosum* concuerdan con las características morfológicas de *P. macrospinoso* descrita por Knapp *et al.* (2015).

*Alternaria* es un género ubiquista; crece en un amplio intervalo de temperatura (2-30°C) y de pH (2-8); sus conidios resisten la radiación UV y la desecación, además de formar parte del aerosol (DataBio, 2014). Asimismo, *Alternaria* es un género dominante en sitios contaminados con MP donde tiende a producir metabolitos bioactivos para promover el crecimiento de la planta huésped y protegerla contra el estrés ambiental (Li *et al.*, 2010; Sørensen *et al.*, 2010). Li *et al.* (2012) consideran que el género *Alternaria* tiene una marcada adaptación a sustratos con altos contenidos de Pb, lo cual explica por qué 14 aislados de Zacatecas mostraron una homología del 98-100% con este género. En *P. villosum* se aislaron miembro del género *Periconia*; Mandyam *et al.* (2010) registraron este género en una amplia gama de ambientes, desde templados hasta tropicales; sin embargo, es la primera vez que se reporta en desechos mineros. Mandyam *et al.* (2012) mencionan que la preferencia de los hongos ESO por una planta dependerá del genotipo vegetal y de las condiciones del sustrato.

El complejo *Alternaria* comprende actualmente nueve géneros y ocho secciones (Woudenberg *et al.*, 2013); es por ello que en la presente investigación se observaron miembros de *Alternaria* en diferentes grupos del árbol filogenético. Se necesita llevar a cabo un análisis molecular más complejo de todos los aislados del género para lograr una identificación hasta especie de los mismos; además de la región ITS, podrían considerarse para este análisis otros segmentos del genoma como el 18S nrDNA, el 28S nrDNA, así como ciertos genes, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la RNA polimerasa subunidad II, el factor de elongación alfa y la región de la  $\beta$ -tubulina (Woudenberg *et al.*, 2013).

En la presente investigación los 18 aislados de hongos ESO provenientes de desechos mineros con altos contenidos de Pb, son candidatos para una futura aplicación potencial en la fitoextracción o fitoestabilización de metales en sitios contaminados como los desechos

mineros. Lo anterior implica la implementación de metodologías para evaluar este potencial *in vitro*.

## 7. Conclusiones

- Se aislaron y purificaron 18 aislados fúngicos de endófitos septados oscuros de las raíces de *T. lunulata* y *P. villosum* procedentes de sitios contaminados con plomo.
- Los 18 aislados se asociaron con el Orden *Pleosporales*, dentro del Phylum *Ascomycota*.
- Fue identificada una preferencia de los hongos ESO por especie vegetal; el género *Alternaria* estuvo presente en las raíces de *T. lunulata*, mientras que el género *Periconia* se aisló solamente de *P. villosum*.
- Los aislados fúngicos obtenidos en esta investigación podrán utilizarse en ensayos futuros para evaluar su aplicación potencial en programas de fitoextracción o fitoestabilización de metales en jales.



## 8. Literatura citada

- ABOLLINO O, M ACETO, M MALANDRINO, E MENTASTE, C SARZANINI, R BARBERIS. 2002. Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environmental Pollution*, 119: 117.
- ANDRADE-LINARES DR, P FRANKEN. 2013. Fungal endophytes in plant roots: taxonomy, colonization patterns, and functions. In: AROCA R. (eds.), Symbiotic endophytes. *Soil biology*, Springer-Verlag, Berlin, 311-334.
- ÁNGEL-SAHAGÚN CA, R LEZAMA-GUTIÉRREZ, J MOLINA-OCHOA, A PESCADOR-RUBIO, SR SKODA, C CRUZ-VÁZQUEZ, AG LORENZONI, E GALINDO-VELASCO, H FRAGOSO-SÁNCHEZG, JE FOSTERI. 2010. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 170: 278-286.
- AYALA-ZERMEÑO MA, R MONTESINOS-MATÍAS, A BERLANGA-PADILLA. 2012. Obtención de cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-27, 4 p.
- BAN Y, M TANG, H CHEN, Z XU, H ZHANG, Y YANG. 2012. The response of dark septate endophytes (ESO) to heavy metals in pure culture. *PLoS ONE*, 7(10): 1-11.
- BAREA JM, MJ POZO, R AZCÓN, C AZCÓN-AGUILAR. 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761-1778.
- ANTOSIEWICZ DM. 1992. Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 61: 281-299.
- BARCELÓ J, M LLUGANY, A LOMBINI, C POSCHENRIEDER. 2005. Glycine may contribute to the protection of *Silene armeria* against excess copper. In: LI CJ. (eds.), Plant nutrition for food security, human health and environmental protection. Tsinghua University Press. Beijing, China, 634-635.
- BARROW JR, RE AALTONEN. 2001. A method evaluating internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and how they are influenced by physiological activity. *Mycorrhiza*, 11: 199-205.
- BARROW JR. 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*, 13: 239-247.
- BECERRIL JM, O BARRUTIA, JL GARCÍA, A HERNÁNDEZ, JM OLANO, C GARBISU. 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas*, 16(2): 50-55.
- BILOS C, JC COLOMBO, C SKORUPKA, MJ RODRIGUEZ PRESA. 2001. Sources, distribution and variability of airborne trace metals in La Plata City area, Argentina. *Environ Pollut*, 111: 149-158.
- BRAISSANT O, G CAILLEAU, M ARAGNO, EP VERRECCHIA. 2004. Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment. *Geobiology*, 2: 59-66.
- BROYER R, CM JOHNSON, RE PAULL. 1972. Some aspects of lead in plant nutrition. *Plant and Soil*, 36: 301-313.
- BURFORD EP, M KIERANS, GM GADD, 2003. Geomycology: fungal growth in mineral substrata. *Mycologist*, 17: 98-107.

- BUREAU-VERITAS. 2008. Manual para la formación en medio ambiente. España: Lex Nova S.A
- BURT R, MA WILSON, TJ KECK, BD DOUGHERTY, DE STROM, JA LINDAHL. 2003. Trace Element Speciation in Selected Smelter-Contaminated Soils in Anaconda and Deer Lodge Valley, Montana, USA. *Advances in Environmental Research*, 8: 51-67.
- BURTON KW, E MORGAN, A ROIG. 1984. The influence of heavy metal on the growth of sitka-spruce in South Wales forests. II green house experiments. *Plant Soil*, 78: 271-282.
- CÁMARA MINERA DE MÉXICO (CAMIMEX). 2012. Informe anual
- CARRILLO R. 2005. Niveles de contaminación de los suelos y las plantas. En: GONZÁLEZ MC, J PÉREZ, R CARRILLO. (eds), El sistema planta-microorganismo-suelo en áreas contaminadas con residuos de minas. Colegio de Postgraduados, Montecillo Estado de México, 161.
- CARRILLO R. 2009. Degradación del suelo: conceptos generales. En: ÁLVAREZ FJ. (ed.), Ecología de micorrizas arbusculares y restauración de ecosistemas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 361 p.
- CARRILLO-GONZÁLEZ R, MC GONZÁLEZ-CHÁVEZ. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environmental Pollution*, 144: 84-92.
- CERBASI IH, U YETIS. 2001. Biosorption of Ni (ii) and Pb (ii) by *Phanerochaete chrysosporium* from binary metal system -Kinetics. *Water Research*, 27: 15-20.
- COLPAERT JV, JHL WEVERS, E KRZARNIC, K ADRIAENSEN. 2011. How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Annals of Forest Science*, 68:17-24.
- CONABIO. 2015. Ficha informativa. Consultado el 9 de septiembre de 2014, del sitio web: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-lunulata/fichas/ficha.htm> ; <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/pennisetum-villosum/fichas/pagina1.htm>
- CORTEZ-MADRIGAL H, RALATORRE-ROSAS, GMORA-AGUILERA, H BRAVO-MOJICA, CF ORTIZ-GARCÍA, LAACEVES-NAVARRO. 2003. Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium* (=Verticillium) *lecanii* for the management of *Toxopteraaurantii* in cocoa. *BioControl*, 48: 321-334.
- DATABIO. 2014. *Alternaria* spp. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Consultado el 01 de Septiembre de 2015. En: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Alter%20spp.pdf>
- DAVET P. 2004. Microbial ecology of the soil and plant growth. Chapter 2. Science Publishers, Inc. Endfield, USA, 22-72.
- DAVIES BE. 1995. Lead and other heavy metals in urban areas and consequences for the health of their inhabitants. In: MAJUMDAR SK, EW MILER, FJ BRENNER. (eds.), Environmental Contaminants, ecosystems and human health. The Pennsylvania Academy of Science, Easton PA, USA, p 287-307.
- FLORES-TORRES G. 2015. Colonización de hongos micorrízicos arbusculares y endófitos septados oscuros en raíces de plantas establecidas en desechos mineros. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Ciudad de México. 58 p.
- FOMINA M, S HILLIER, JM CHARNOCK, K MELVILLE, IJ ALEXANDER, GM GADD. 2005. Role of oxalic acid over-excretion in toxic metal mineral transformations by *Beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 371-381.
- GADD GM. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124: 25-60.

- GADD GM, 2004. Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist*, 18: 60-70.
- GADD GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111(1): 3-49.
- GARCÍA I, C DORRONSORO. 2002. Contaminación por metales pesados. En Tecnología de Suelos. Departamento de edafología y química agrícola de España. Universidad de Granada, <http://edafologia.ugr.es>.
- GARCÍA I, C DORRONSORO. 2005. Contaminación por Metales Pesados. En Tecnología de Suelos. Departamento de edafología y química agrícola de España. Universidad de Granada, <http://edafologia.ugr.es>.
- GAUR A, A ADHOLEYA. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metals contaminated soils. *Current Science*, 86 (4): 528-534.
- GIRLANDA M, S GHIGNONE, AM LUPPI. 2002. Diversity of sterileroot-associated fungi of two Mediterranean plants. *New Phytologist*, 155: 481-498.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ F, A CAMPRUBÍ. 2010. La pequeña minería en México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 62(1): 101-108.
- GONZÁLEZ E, E GONZÁLEZ, C BEDOLLA, E ARROLLO, E MANZANARES. 2008. Niveles de plomo en sangre y factores de riesgo por envenenamiento de plomo en niños mexicanos. Universidad de Antioquia, *Revista Facultad de Ingeniería*, 43: 114-119.
- GRÜNIG CR, V QUELOZ, TN SIEBER, O HOLDENRIEDER. 2008. Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii*, *Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. *Botany*, 86: 1355-1369.
- GUINDON S, O GASCUEL. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- GUTIÉRREZ ME, M MORENO. 1995. Los residuos en la minería mexicana. En: GARFIAS FJ, L BAROJAS. (Eds.), Residuos peligrosos de México. Instituto Nacional de Ecología. México, 126.
- HAN FX, A BANIN, WL KINGERY, GB TRIPLETT, LX ZHOU, SJ ZHENG, WX DING. 2003. New Approach to Studies of Heavy Metal Redistribution in Soil. *Advances in Environmental Research*, 8: 113-120.
- HEREDIA-ACUÑA C, A ALARCÓN, LV HERNÁNDEZ-CUEVAS, R FERRERA-CERRATO, JJ ALMARAZ-SUAREZ. 2014. Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Botanical Sciences*, 92 (3): 321-333.
- HERNÁNDEZ E, E MONDRAGÓN, D CRISTOBAL, JE RUBIÑOS, S ROBLEDO. 2009. Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Forestal y del Ambiente*, 15: 109-14.
- HUANG JW, DL GRUNES, LV ROCHIAN. 1994. Voltage dependent  $Ca^{+2}$  influx into right-side-out plasma membrane vesicles isolated from wheat roots: characteristic of a putative  $Ca^{+2}$  channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 3473-3477.
- HUANG JW, SD CUNNINGHAM. 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*, 134: 75-84.
- INEGI. 2012. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. <http://www.inegi.org.mx/>
- JAKUBICK, A, G MCKENNA, A ROBERTSON. 2003. Stabilisation of tailings deposits. International experience. In proceedings of mining and the environment III, Sudbury, Ontario, Canada.

- JARVIS MD, DWM LEUNG. 2002. Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 21-32.
- JONES LHP, CR CLEMENT, MJ HOPPER. 1973. Lead uptake from solution by perennial ryegrass and its transport from roots to shoots. *Plant and Soil*, 38: 403-414.
- JUMPPONEN A, JM TRAPPE. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi. *New Phytologist*, 140: 295-310.
- JUMPPONEN A. 2001. Dark septate endophytes are they mycorrhizal? *Mycorrhiza*, 11: 207-211.
- KNAPP DG, A PINTYE, GM KOVÁCS. 2012. The dark side is not fastidious - Dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS ONE*, 7: e32570.
- KNAPP DG, GM KOÁCS, E ZAJTA, JZ GROENEWALD, PW CROUS. 2015. Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. *Persoonia*, 35: 87-100.
- KIM HY, GJ CHOI, HB LEE, SW LEE, HK KIM, KS JANG, SW SON, SO LEE, KY CHO, ND SUNG, JC KIM. 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 332-337.
- KHIDIR HH, DM EUDY, A PORRAS-ALFARO, J HERRERA, DO NATVIG, RL SINSABAUGH. 2010. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *Journal of Arid Environments*, 74(1): 35-42.
- KUSARI S, VCVERMA, M LAMSHOFT, M SPITELLER. 2012. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1287-1294.
- LANE SD, ES MARTIN. 1977. A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. *New Phytologist*, 79: 281-286.
- LI HY, CA ZHAO, CJ LIU, XF XU. 2010. Endophytic fungi diversity of aquatic/riparian plants and their antifungal activity in vitro. *The Journal of Microbiology*, 48: 1-6.
- LI T, MJ LIU, XT ZHANG, HB ZHANG, T SHA, ZW ZHAO. 2011. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment*, 409: 1069-1074.
- LI HY, DW LI, CM HE, ZP ZHOU, T MEI, HM XU. 2012. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*, 5: 309-315.
- LIKAR M, M REGVAR. 2009. Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Science of the Total Environment*, 407: 6179-6187.
- MANDYAM K, A JUMPPONEN. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, 53: 173-189.
- MANDYAM K, T LOUNGHIN, A JUMPPONEN. 2010. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia*, 102(4): 813-821.
- MANDYAM K, C FOX, A JUMPPONEN. 2012. Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. *Mycorrhiza*, 22:109-119.
- MANDYAM K, A JUMPPONEN. 2015. Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Frontiers in Microbiology*, 5: 1-13.
- MARSHALL J, A CORZO, RA LEIGH, D STANDERS. 1994. Membrane potential-dependent calcium transport in right-side-out plasma membrane vesicles from *Zea mays* L. roots. *The Plant Journal*, 5: 683-694.

- MARSCHNER P, DL GODBOLD, G JUTSCHHE. 1996. Dynamics of lead accumulation in mycorrhizal Norway spruce (pices abies L. karst.). *Plant and Soil*, 178: 239-245.
- MATOS V. 2007. Los impactos sobre la salud humana de los polvos minerales y el desarrollo sustentable de la minería como alternativa para mitigar sus efectos. *Revista Latinoamericana y Caribeña de Desarrollo Sustentable*, 18(5): 1-16.
- MENCH M, N LEPP, V BERT, JP SCHWITZGUÉBEL, SW GAWRONSKI, P SCHÖDER, J VANGRONVELD. 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST action 859. *Journal of Soils and Sediments*, 10:1039-1070.
- MIER T, F RIVERA-BECERRIL, MA AYALA-ZERMEÑO, C TORIELLO, S AGUILAR, M ULLOA. 2013. Métodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. 103 p.
- MILLER GT. 1991. Environmental science: sustaining the earth. Tercera edición. Belmont. California.
- MISHRA A, MA CHOUDHARI. 1998. Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. *Journal of Plant Biology*, 41: 469-473.
- MOREL JL, M MENCH, A GUCKERT. 1986. A measurement of Pb, Cu, Cd binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, 2: 29-34.
- MUHLE H, I MANGELSDORF I. 2003. Inhalation toxicity of mineral particles: critical appraisal of endpoints and study design. *Toxicology Letters Journal*, 11: 223-228.
- MUSIK-ASALI, GA. 2004. El sector minero en México; diagnóstico, prospectiva y estrategia. Tecnología de Suelos, Centro de Estudios de Competitividad, Instituto Tecnológico Autónomo de México, 7.
- NAVARRO-AVIÑO JP, AI AGUILAS, JR LÓPEZ-MOYA. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2): 10-25.
- NEWSHAM KK, R UPSON, DJ READ. 2009. Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology*, 2(1): 10-20.
- NEWSHAM KK. 2011. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, 190: 783-793.
- PAGNANELLI F, E MOSCARDINI, V GIULIANO, L TORO. 2004. Sequential Extraction of Heavy Metals in River Sediments of an Abandoned Pyrite Mining Area: Pollution Detection and Affinity Series. *Environmental Pollution*, 132:189-201.
- PHILLIPS JM, DS HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 158-161
- PHILIPPOT L, JM RAAIJMAKERS, P LEMANCEAU, WH VAN DER PUTTEN. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Microbiology*, 11: 789-799.
- PINEDA H. 2004. Presencia de hongos micorrízicos arbusculares, contribución de *Glomus intraradices* en la absorción y translocación de zinc y cobre en girasol (*Helianthus annuus* L.) crecido en un suelo contaminado con residuos de mina, Tecomán, Colima. Universidad de Colima. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias.
- PORRAS-ALFARO A, J HERRERA, RL SINSABAUGH. 2008. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1308-1315.

- POSADA D, KA CRANDALL. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- REGVAR M, M LIKAR, A PILTAVER, N KUGONIC, JE SMITH. 2010. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant Soil*, 330: 345-356.
- RIVERA-VARAS VV, TA FREEMAN, NC GUSMESTAD, GA SECOR. 2007. Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. *Phytopathology*, 97: 1331-1337.
- RODRÍGUEZ-ORTÍZ JC, RD VALDEZ-CEPEDA, JL LARA-MIRELES, H RODRÍGUEZ-FUENTES, RE VÁZQUEZ-ALVARADO, R MAGALLANES-QUINTANAR, JL GARCÍA HERNÁNDEZ. 2006. Soil nitrogen fertilization effects on phytoextraction of Cd and Pb by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bioremediation Journal* 10(3): 105-114.
- RUDAKOVA EV, KD KARAKIS, ET SIDORSHINA. 1988. The role of plant cell walls in the uptake and accumulation of metals ions. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 20: 3-12.
- SALAS-LUEVANO MA, E MANZANARES-ACUÑA, C LETECHIPIA-DE LEON, VM HERNÁNDEZ-DAVILA, HR VEGA-CARRILLO. 2011. Lead concentration in soil from an old mining town. *Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 289 (1): 35-39.
- SALGADO-SALAZAR C, M CEPERO-GARCÍA. 2005. Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 99-101.
- SALOMONS W. 1995. Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *Journal of Geochemical Exploration*, 52: 5-23.
- SAUQUILLO A, A RIGOL, G RAURET. 2003. Overview of the use of leaching extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 152-159.
- SEREGIN IV, VB IVANIOV. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48: 606-630.
- SEREGIN IV, LK SHPIGUN, VB IVANIOV. 2004. Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51: 525-533.
- SIEBER TN, CR GRÜNIG. 2006. Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii*. In: SCHULZ B, C BOYLE, TN SIEBER. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. *Microbial root endophytes*: 107-132.
- SIMMONS EG. 2007. *Alternaria*. An identification manual. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. p 261
- SMITH SE, FA SMITH, I JACOBSEN. 2004. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist*, 162 (2): 511-424.
- SINGH BK, P MILLARD, AS WHITELEY, JC MURRELL. 2004. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology*, 12(8): 386-393.
- SOSA M, B REYES, M MORENO, S MIRANDO, J ALCALÁ, C QUINTANA, S PUGA. 2008. Evaluación del impacto ambiental en suelo contaminado con Pb y Cd provocado por una empresa minera en la Ciudad de Chihuahua. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 4 (2): 155-161.

- SØRENSEN JL, MM AVESKAMP, U THRANE, B ANDERSEN. 2010. Chemical characterization of *Phoma pomorum* isolated from Danish maize. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 310-317.
- STEFANOV K, K SEIZOVA, I POPOVA, VL PETKOV, G KIMENOV, S POPOV. 1995. Effects of lead ions on the phospholipid composition in leaves of *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 147: 243-246.
- SU Z-Z, L-J MAO, N LI, X-X FENG, Z-L YUAN, L-W WANG, F-C LIN, C-L ZHANG. 2013. Evidence for biotrophic lifestyle and biocontrol potential of dark septate endophyte *Harpophora oryzae* to rice Blast disease. *PLoS ONE*, 8(4): 1-14.
- TAVARE S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of dna sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences. *American Mathematical Society*, 17: 57-86.
- THOMPSON JD, TJ GIBSON, F PLEWNIAK, F JEANMOUNGIN, DG HIGGINS. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*.25: 4876-4882.
- TROUVELOT A, JL KOUGH, V GIANINAZZI-PEARSON. 1986. Measure du taux de mycorhisation VA d'un systeme racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: GIANINAZZI-PEARSON V, S GIANINAZZI. (eds.), *Mycorrhizae: physiology and genetics*. INRA Press, Paris.
- UPSON R, NEWSHAM KK, PD BRIDGE, DA PEARCE, DJ READ. 2009. Taxonomic affinities of dark septate root endophytes of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*, the two native antarctic vascular plant species. *Fungal Ecology*, 2(4): 184-196.
- VERMA S, RS DUBEY. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164: 645-655.
- VOLKE ST, TJA VELASCO, PDA DE LA ROSA. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto de Ecología, 141 p.
- WANG J, C CHEN. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27: 195-226.
- WONG MH. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 6: 775-780.
- WOUDEBERG JHC, JZ GROENEWALD, M BINDER1, PW CROUS. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75: 171-212.
- XU R, T LI, H CUI, J WANG, X YU, Y DING C WANG, Z YANG, Z ZHAO. 2015. Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Applied Soil Ecology*, 93: 11-18.
- YO-YOUNG K, Y YOUNG-YELL, L YOUNG-SOOK. 2002. Pb and Cu uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum*, V (116): 368.
- YUAN ZL, CL ZHANG, FC LIN, CP KUBICEK. 2010. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5): 1642-1652.
- ZABALGOGEAZCOA I. 2008. Review. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultura Research*, 6: 138-146.
- ZHANG YJ, MJ LIU, XD SHI, ZW ZHAO. 2008. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals in vitro. *Journal of Microbiology*, 46(6): 624-632.

ZHANG Y, T LI, Z ZHI-WEI. 2013. Colonization characteristics and composition of dark septate endophytes (DSE) in a lead and zinc slag heap in Southwest China. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22:5: 532-545.



## Capítulo 2

### POTENCIAL DE LOS HONGOS ENDÓFITOS SEPTADOS OSCUROS EN PROCESOS DE FITORREMEDIACIÓN DE SITIOS CONTAMINADOS CON PLOMO

#### Abstract

Mining activity generates high volumes of wastes that are accumulated opencast; these wastes often contain highly toxic heavy metals such as lead (Pb). Plant species established in substrates contaminated with toxic elements are associated with dark septate endophytes (DSE); this fungal group can play a key role in plant protection against metal stress when colonize roots. The objective was to assess the tolerance of DSE fungi against Pb *in vitro*; fungi were previously isolated from *Tagetes lunulata* and *Pennisetum villosum*. All fungal isolates were cultivated on potato dextrose agar (PDA) plates in presence of 100 mg Pb l<sup>-1</sup> and the radial growth rate and biomass production were evaluated; in addition, extracellular protease, phospholipase and lipase enzymatic activities in the presence of 200 mg Pb l<sup>-1</sup> were evaluated. All isolates grew on PDA in the presence of 100 mg Pb l<sup>-1</sup>; the radial growth rate of each fungal isolate exhibited no differences between treatments in the presence and absence of the metal; biomass was significantly reduced in an *Alternaria* isolate ( $p < 0.05$ ) after Pb exposure; no changes attributed to the metal in the colonial morphology of the 18 isolates were observed, however, Pb induced a browning effect following the 200 mg Pb l<sup>-1</sup> treatment. Isolates exhibited different behavior concerning extracellular enzyme activity (protease, phospholipase and lipase) in the presence and the absence of Pb; these activities were activated, induced or suppressed by Pb. In conclusion, all fungal isolates tolerated 100 mg Pb l<sup>-1</sup>; in several of them, Pb at a concentration of 200 mg l<sup>-1</sup> affected protease, lipase and phospholipase enzyme activity, which are involved in degradation of organic matter; phospholipase was the most affected activity. Some of the fungal isolates belonging to *Alternaria* genus are proposed as a tools for application in remediation programs of mine wastes polluted with Pb.

## Resumen

La actividad minera genera elevados volúmenes de desechos que son acumulados a cielo abierto; frecuentemente estos desechos contienen metales pesados altamente tóxicos como plomo (Pb). Las especies vegetales establecidas en sustratos contaminados con elementos tóxicos se asocian con hongos endófitos septados oscuros (ESO); este grupo fúngico puede desempeñar un papel clave en la protección vegetal contra el estrés metálico al colonizar las raíces. El objetivo fue evaluar la tolerancia contra el Pb de los hongos ESO previamente aislados de raíces de *Tagetes lunulata* y *Pennisetum villosum* creciendo en desechos mineros con Pb. Los 18 aislados fúngicos fueron cultivados en medio PDA natural en presencia de 100 mg Pb l<sup>-1</sup> y se evaluó la velocidad de crecimiento radial y la producción de biomasa; asimismo, se evaluó su actividad enzimática extracelular proteasa, fosfolipasa y lipasa en sustratos con inductor, en presencia de 200 mg Pb l<sup>-1</sup>. Todos los aislados crecieron en medio papa-dextrosa-agar en presencia de 100 mg Pb l<sup>-1</sup>; la velocidad de crecimiento radial de cada aislado no exhibió diferencias al cultivarse en presencia y en ausencia del metal; la biomasa se redujo significativamente en un aislado de *Alternaria* ( $p < 0.05$ ) por efecto del Pb; no se observaron modificaciones atribuidas al metal en la morfología colonial de los 18 aislados, sin embargo, el Pb indujo una coloración oscura con las concentraciones 200 mg Pb l<sup>-1</sup>. Se detectó una heterogeneidad por los aislados en cuanto a la actividad enzimática extracelular proteasa, fosfolipasa y lipasa en presencia y en ausencia de Pb; en algunos aislados estas actividades fueron activadas, inducidas o reprimidas por el Pb. En conclusión, todos los aislados fúngicos fueron tolerantes a 100 mg Pb l<sup>-1</sup>; en varios de ellos, el Pb a una concentración de 200 mg l<sup>-1</sup> afectó las actividades enzimáticas fosfolipasa, proteasa y lipasa involucradas en la degradación de la materia orgánica; la actividad fosfolipasa fue la más influenciada por el Pb. Con base en su comportamiento, se proponen algunos aislados de *Alternaria* como herramientas para su aplicación en procesos de biorremediación de desechos mineros con Pb.

## 1. Introducción

La minería es una de las actividades económicas de mayor tradición en México desde la época prehispánica (Hernández *et al.*, 2009); destacan en la actualidad en este rubro los estados de Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Zacatecas, Durango, Sonora, Coahuila, Guanajuato, San Luis Potosí, Hidalgo, Sinaloa, Colima y Guerrero (Carrillo, 2005). Esta industria ha generado por décadas una gran cantidad de desechos mineros o jales, es decir, lodos residuales originados durante el proceso de beneficio del mineral económicamente aprovechable que pueden contener altas cantidades de metales pesados (MP) (González *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2009). El exceso de ciertos MP puede ser perjudicial para los organismos; a este respecto, el plomo (Pb) es reconocido como uno de los contaminantes ecotoxicológicos más importantes (Komarnicki, 2000). La minería promueve el cambio en la concentración de oligoelementos en el suelo; en estos ambientes se instalan comunidades vegetales tolerantes a MP (Prasad y Freitas, 2003).

La mayoría de las plantas están asociadas con una amplia diversidad de microorganismos, particularmente en la rizosfera, que es la zona aledaña a las raíces. El crecimiento, metabolismo y adaptación vegetal al estrés edáfico se encuentran mediados por esta microbiota (Su *et al.*, 2013). El estudio de la interacción entre los hongos y los MP es de interés científico debido a que tienen la capacidad de resistir y adaptarse al estrés metálico (Gadd, 1993); además, los hongos juegan un papel clave en el ciclo de los elementos, las transformaciones minerales y las interacciones con las plantas (Gadd, 2007). Los hongos endófitos septados oscuros (ESO) son ascomicetos que colonizan las raíces de prácticamente todas las plantas (Jumpponen y Trappe, 1998). Mandyam y Jumpponen (2005) mencionan que los ESO en los ecosistemas participan en la absorción de nutrientes minerales por la planta huésped, aumentan la actividad metabólica para combatir el estrés e incrementan la tolerancia contra el exceso de MP en el suelo (Colpaert *et al.*, 2011). Regvar *et al.* (2010) reportaron que la colonización por hongos ESO en el sauce *Salix caprea* podría mejorar la tolerancia vegetal contra la contaminación por Pb y cadmio (Cd). Un estudio realizado por Ban *et al.* (2012) menciona que la colonización de hongos ESO ayuda a *Astragalus adsurgens* a tolerar el Pb y zinc (Zn).

Hoy en día, el interés por aplicar métodos biológicos para la remediación de suelos contaminados por MP está centrado en el uso de plantas y microorganismos rizosféricos, mismos que constituyen una alternativa de bajo costo y con enormes ventajas ambientales. Los hongos ESO incrementan no sólo la tolerancia contra el metal, sino que también ayudan a su absorción por la planta, por lo que pueden considerarse como una herramienta biotecnológica potencial para la restauración de suelos contaminados por MP (González, 2005; Hildebrandt *et al.*, 2006).

## **2. Revisión bibliográfica**

### **2.1. La minería en Zacatecas**

En el estado de Zacatecas se presentan manifestaciones de mineralización, prácticamente en todo el territorio, con áreas donde los eventos metalogénicos se concentraron en mayor intensidad formando yacimientos minerales de oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu) y zinc (Zn) principalmente. Zacatecas tiene 450 años de tradición minera; durante las primeras exploraciones los españoles descubrieron yacimientos argentíferos en Sombrerete y San Martín. Poco después se fundaron los reales de minas de San Martín, Sombrerete, Nieves y Fresnillo; Zacatecas se transformó entonces en uno de los centros económicos más importantes de la Nueva España. La minería en el estado de Zacatecas ha sido el pilar para el desarrollo económico; debido a ello se fundaron las poblaciones de Fresnillo, Concepción del Oro y la capital, entre otras. En todo el estado se presenta una gran diversidad de yacimientos minerales que apoya el desarrollo industrial, destacando minas dentro de los distritos en el estado (SGM, 2011): Concepción del Oro, Fresnillo, Miguel Auza, Ojo Caliente, Zacatecas y Sombrerete (Figura 1).

Hasta el quinto mes de 2014, en Zacatecas se extrajeron 2,669.7 kg de Au (27.4% del total nacional) y 221,215 kg de Ag (45.2% de la producción nacional). En tanto, la extracción de Pb en 2015 en el estado alcanzó 262,722 ton, que correspondieron al 62.7% de la producción total del país (CAMIMEX 2014; CAMIMEZ 2015).

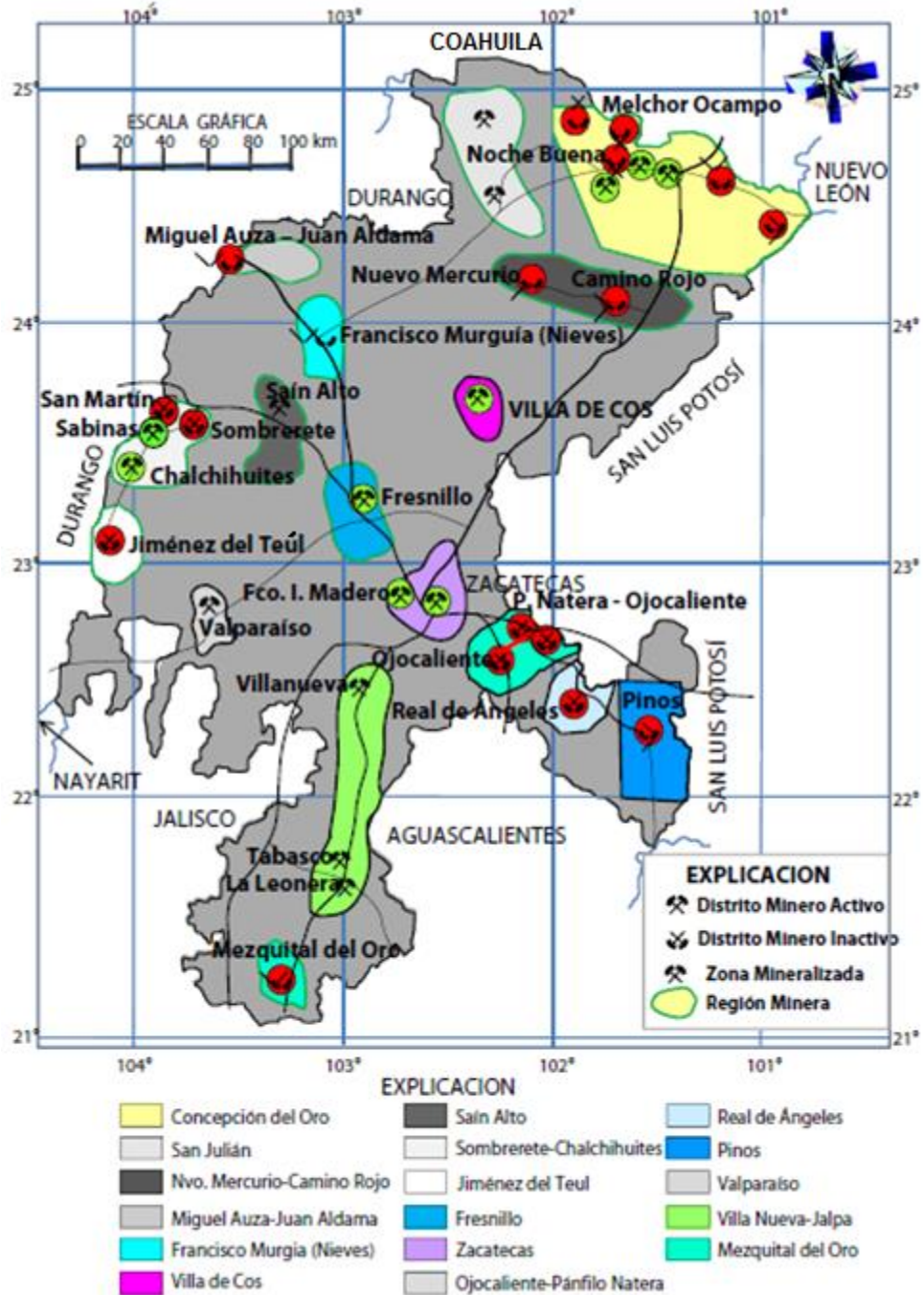


Figura 1. Ubicación de las 17 regiones mineras del estado de Zacatecas (SGM, 2011).

## 2.2. Desechos mineros en Zacatecas

El descubrimiento de los yacimientos de Ag por los conquistadores españoles en las zonas que hoy son el asentamiento de la ciudad de Zacatecas, dio lugar a la explotación de estos

depósitos utilizando el método de fusión directa. Este nuevo proceso de extracción, llamado "proceso de patio", fue descubierto por Bartolomé de Medina en 1555; durante todo el período colonial y hasta finales del año 1800 la Ag se extrajo mediante la formación de una amalgama de Ag/mercurio (Hg) en frío (Bargallo, 1955). Los desechos producidos se fueron colocando al lado de la zona de extracción. Estos residuos, en su mayoría procedentes de las minas de Vetagrande y Zacatecas, aun son arrastrados por las lluvias hacia los arroyos, principalmente al flujo del río La Plata, que desembocaba en el embalse de la presa El Pedernalillo. Los desechos se han dispersado en un área de aproximadamente 18 a 30 km x 2-3 km y han alcanzado las comunidades de Zoquite, Tacoaleche, El Lampotal y El Bordo. Algunas compañías mineras han realizado análisis cuantitativos de los suelos de la zona y han informado que hay grandes cantidades de arsénico (As), Pb y Hg (SERMANAT, 2002; Ogura *et al.*, 2003; Santos-Santos *et al.*, 2006).

### 2.3. Problemática de la contaminación por plomo en zonas mineras y desechos mineros

#### 2.3.1. Impacto en la población humana

El suelo es uno de los mayores reservorios donde se acumula la contaminación ambiental (Alloway, 1995). El riesgo ambiental asociado a la contaminación de suelos se valora a partir de la concurrencia de tres factores: la concentración de contaminantes, la exposición a la contaminación por diferentes vías y la toxicidad de las sustancias. México se encuentra en el decimotercer lugar entre los países productores de Pb, con una producción cercana a las 253,361 ton (CAMIMEX, 2014). Sin embargo, como ya fue abordado, el Pb se considera un contaminante con relevancia ecotoxicológica (Komarnicki, 2000); es un metal carente de valor biológico porque no es requerido para el funcionamiento de los seres vivos. En los desechos mineros el suelo original se degrada o se pierde irreversiblemente como consecuencia de las altas concentraciones de Pb que se depositan (Becerril *et al.*, 2007).

En las inmediaciones de la planta fundidora de Bermejillo, Durango, hay evidencias de contaminación del suelo con Pb a concentraciones máximas de 1,760  $\mu\text{g g}^{-1}$  en los primeros 15 cm de profundidad (Trejo *et al.*, 2007). En este sitio se han documentado serios problemas de salud asociados a la contaminación de los suelos como consecuencia de la actividad industrial. El Pb y otros MP pueden ser absorbidos por las plantas hasta concentrarse en sus tejidos a niveles tóxicos (Chien *et al.*, 2003; Rodríguez-Ortíz *et al.*, 2006; Codling y Ritchie,

2005). Los suelos no contaminados tienen concentraciones de Pb inferiores a  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ; los suelos contaminados en muchas áreas urbanas exceden los  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ , mientras que las zonas próximas a las minas de Pb, a las industrias que emplean este metal y a las fundidoras pueden tener niveles superiores a  $60,000 \text{ mg kg}^{-1}$  (Sosa *et al.*, 2008). La normatividad de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) establece que los niveles máximos permitidos de Pb son: aire,  $0.15 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ ; suelo,  $400\text{-}1200 \text{ mg kg}^{-1}$ ; agua,  $15 \text{ } \mu\text{l l}^{-1}$ .

La exposición al Pb y la consecuente intoxicación han sido de los principales problemas de salud ambiental en el mundo, particularmente en los países en desarrollo como México (Schnaas *et al.*, 2004; Komarnicki, 2000). El Pb puede afectar casi todos los órganos y sistemas del cuerpo humano debido a su tamaño molecular y carga; el Pb tiende a sustituir el calcio, por lo que su área de acumulación es el tejido óseo, causando pérdida de los reflejos, anemia, presión sanguínea alta, trastornos digestivos, dolor en los músculos y en las coyunturas, problemas en el sistema nervioso, daños al cerebro y envenenamiento cuando los niveles en la sangre alcanzan  $40 \text{ } \mu\text{g dl}^{-1}$ . Debido a que se absorbe con mayor facilidad, los efectos del Pb en la salud de los niños incluyen problemas en el sistema nervioso central, deficiencias de hierro, proteínas, calcio y/o zinc (Puga *et al.*, 2006; Sosa *et al.*, 2008; Buka, 2001; Matte, 2003). En el caso de las mujeres embarazadas que laboran en ambientes expuestos a la contaminación por Pb, como es la minería, el Pb puede entrar en el feto a través de la placenta y causar daños en el sistema nervioso y en el cerebro (Järup, 2003; Meyer *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008; Sosa *et al.*, 2008; Salas-Luevano *et al.*, 2011).

Las actividades mineras y metalúrgicas practicadas en la Comarca Lagunera han contaminado el suelo, el aire y el agua de la región con Pb, Cd, As y Zn. El diagnóstico más reciente en la ciudad de Torreón, Coahuila, en el área donde opera una planta fundidora, indica altos niveles de contaminación. Las concentraciones de Pb se encuentran en un intervalo de 389 a  $8,060 \text{ mg kg}^{-1}$  a la profundidad de suelo de 0.0254 m. En el aire, la concentración de Pb fue de  $0.1 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ , mientras que en la sangre de niños de uno y dos años de edad viviendo en los alrededores de la planta industrial fue de 5.3 a  $16.4 \text{ } \mu\text{g dl}^{-1}$  (Ortiz-Cano *et al.*, 2009). González *et al.* (2008) reportaron que en Vetagrande, Zacatecas, los niveles de Pb en la sangre de los niños se consideraron entre las categorías II y III, es decir, tóxicas o de envenenamiento de acuerdo con la NOM-199-SSA1-2002; este hallazgo



representa un riesgo serio para la salud y se atribuye a las altas concentraciones de Pb en el suelo. De igual manera, Salas-Luevano *et al.* (2011) mencionan que el suelo de Vetagrande tiene niveles elevados de Pb (8-7,730  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Pb), lo que representa riesgos para la salud humana si se considera que están por encima de los 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Pb señalados por la EPA, por lo que el suelo de la localidad no se considera apto para uso residencial.

#### 2.4. Plomo

El Pb es un elemento químico de número atómico 82, peso atómico 207.19 y valencias químicas 2 y 4, con punto de fusión a 327°C y de ebullición a 1,744°C. El Pb elemental es de color azul grisáceo, se encuentra naturalmente en la corteza terrestre en pequeñas cantidades (0.002%). El Pb es resistente a la corrosión; cuando se expone al aire es anfótero debido a que forma sales de Pb de los ácidos, así como sales metálicas del ácido plúmbico, además de que forma óxidos y compuestos organometálicos (ATSDR, 2007). El Pb es un MP en el suelo donde se encuentra principalmente en forma de  $\text{Pb}^{+2}$ ; también es conocido su estado de oxidación  $\text{Pb}^{+4}$ ; tiene un tiempo de residencia en el suelo de mil años (Ragsdale y Berish, 1988). Algunos de los compuestos insolubles son  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ ,  $\text{PbCO}_3$ ,  $\text{PbS}$  y  $\text{PbSO}_4$ . La velocidad de oxidación depende de factores como la humedad, la temperatura, el pH, el potencial redox, la cantidad de materia orgánica o la roturación de los suelos (Guitart *et al.*, 2002). El material particulado de Pb (<10  $\mu\text{m}$ ) puede ser peligroso, ya que se adhiere más fuertemente a la piel, es más soluble en el tracto gastrointestinal y es fácilmente absorbible a través del sistema respiratorio. En el ambiente el Pb se encuentra en forma natural, proviene principalmente de fuentes minerales; tiende a acumularse en los suelos donde permanece inmóvil durante largo tiempo; los niveles altos del metal en el ambiente se originan de actividades humanas (ATSDR, 2010).

#### 2.5. Remediación de suelos contaminados por metales pesados

En la actualidad la contaminación de los suelos por MP es mayor debido a las actividades de minería y fundición, a la aplicación de fertilizantes químicos y plaguicidas, a la deposición de lodos y al riego con aguas residuales (Cheng, 2003). Esto ha supuesto una importante amenaza para el ecosistema suelo, la cadena alimenticia y la salud humana (Ming *et al.*, 2014). El término “remediación” se entiende como el conjunto de acciones necesarias (químicas, físicas o biológicas) que implican el uso de cualquier operación unitaria o en

conjunto para alterar la composición de un contaminante peligroso de manera que se reduzca su toxicidad, movilidad o volumen en la matriz o material contaminado. El término remediación se utiliza como sinónimo de restauración, reversión, saneamiento, limpieza, rehabilitación y regeneración (US EPA 2001; NOM-138-SEMARNAT-2003).

Las tecnologías de remediación representan una alternativa para la disposición de residuos peligrosos sin tratamiento en la corteza terrestre; sus posibilidades de éxito bajo las condiciones específicas de un sitio, pueden variar ampliamente (Ming *et al.*, 2014). Por lo tanto, las estrategias para la remediación de los suelos contaminados se han convertido en un asunto de creciente interés y preocupación. Recientemente, la inmovilización *in situ* de MP ha recibido mucha atención por su menor costo y por su bajo impacto ambiental (Kumpiene *et al.*, 2008; Ming *et al.*, 2014). Para la aplicación de cualquier tecnología de remediación es primordial conocer ciertas características del suelo, del contaminante y de los organismos (plantas, hongos, bacterias) presentes en el sitio, con potencial metabólico para degradar el o los contaminantes (Van Deuren *et al.*, 2002; Beaudette *et al.*, 2002).

#### 2.5.1. Biorremediación

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan el potencial metabólico de organismos (plantas, hongos y bacterias, entre otros) para degradar, transformar o eliminar sustancias peligrosas orgánicas e inorgánicas presentes en los suelos, agua y aire (Van Deuren *et al.*, 2002; Watanabe 2001). En el caso de sitios contaminados con metales, los microorganismos pueden modificar su movilidad en el ambiente edáfico, a través de cambios en las características físicas o químicas (Batista y Sanchez, 2009). Esta tecnología permitiría que las concentraciones del contaminante estén por debajo de los límites establecidos como aceptables por alguna instancia gubernamental como la EPA, con el objetivo de recuperar los sitios contaminados y de proteger el entorno (Mallick, 2003; De Olivera, 2004; Audet y Charest, 2007).

### 2.5.2. Fitorremediación

El término fitorremediación se refiere a una tecnología innovadora que utiliza plantas vivas y los microorganismos asociados a su rizosfera para la remediación *in situ* y *ex situ* de suelos, lodos, sedimentos y aguas contaminados a través de la remoción, degradación o estabilización de los contaminantes (Le Duc y Terry, 2005). La fitorremediación puede considerarse como una tecnología alternativa rentable y sostenible (Kramer, 2005; Robinson *et al.*, 2006).

La fitorremediación aplicada a suelos contaminados con elementos o compuestos inorgánicos incluye, básicamente, tres mecanismos: la fitoextracción o fitoacumulación, la fitoestabilización y la fitovolatilización (Singh *et al.*, 2003; Prasad y Freitas 2003; Robinson *et al.*, 2006; Jing *et al.*, 2007).

- *Fitoextracción o fitoacumulación*: se refiere a la acumulación y traslocación, a través de las raíces, de contaminantes metálicos presentes en el suelo hacia diferentes tejidos de la planta, dando como resultado la limpieza permanente del sitio. Algunas plantas llamadas hiperacumuladoras tienen la capacidad para acumular concentraciones de metales 10 a 500 veces mayores que otras especies.
- *Fitoestabilización*: utiliza ciertas especies vegetales para inmovilizar contaminantes presentes en suelos a través de su absorción y adsorción en las raíces o precipitación por la presencia de exudados liberados al ambiente. Estos mecanismos conducen a la estabilización física de los suelos a través de una reducción en la movilidad, toxicidad y biodisponibilidad de los contaminantes.
- *Fitovolatilización*: implica la captación de contaminantes volátiles (como Se y Hg) por las plantas y su posterior volatilización o liberación en su forma original o modificada a la atmósfera. Aunque es una tecnología con potencial para la remediación de suelos contaminados con los elementos antes mencionados, es indispensable considerar el empleo de sistemas para la captura de emisiones.

La aplicación de métodos de remediación de suelos contaminados por MP es relevante; la mayoría de las plantas participan parcialmente en el control de la erosión por viento y lluvia y, por otro lado, contribuyen con el establecimiento de vegetación secundaria en dichas áreas (Beesley *et al.*, 2011). La inmovilización de metales se puede lograr mediante la aplicación

de microorganismos exógenos, enmiendas orgánicas e inorgánicas para reducir su disponibilidad en los suelos, fitotoxicidad y transporte a los mantos freáticos (Liu *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012).

#### 2.5.2.1 Fitorremediación de suelos contaminados por MP con ayuda de comunidades fúngicas

La fitoextracción de contaminantes metálicos de suelos es uno de los campos con mayor avance científico y tecnológico. Plantas y hongos (Figura 2) han desarrollado estrategias para la obtención de nutrientes del suelo con variada composición. Existen dos mecanismos para el proceso de tolerancia contra los MP: 1) el secuestro extracelular (quelación y la pared celular vinculante) y 2) el secuestro intracelular mediante la unión a proteínas u otros compuestos (Colanguelo y Guerinot, 2006; Anahid, 2011). Altas cantidades de metales pueden ser acumuladas gracias a la participación de diferentes procesos independientemente de la ruta metabólica asociada, usando biomasa (viva-muerta), así como productos celulares (polisacáridos) en la remoción de MP (Andrade *et al.*, 2010). El genoma de eucariontes codifica varias familias de transportadores metálicos que dirigen el proceso de translocación al interior de plantas y hongos, diferenciándose en ubicación a nivel celular, sustrato específico sobre el que actúan y patrones de expresión (Colanguelo y Guerinot, 2006).

Las raíces de las plantas modifican su entorno mediante la excreción de compuestos orgánicos como sustrato rico para la comunidad microbiana. Lo anterior facilita la actividad en el microambiente y aumenta la disponibilidad de ciertos nutrientes en el suelo (Sylvia *et al.*, 2005); esto involucra acciones que disminuyen la movilidad de MP, como la quelación y la acidificación de la rizosfera (González-Guerrero, 2004).

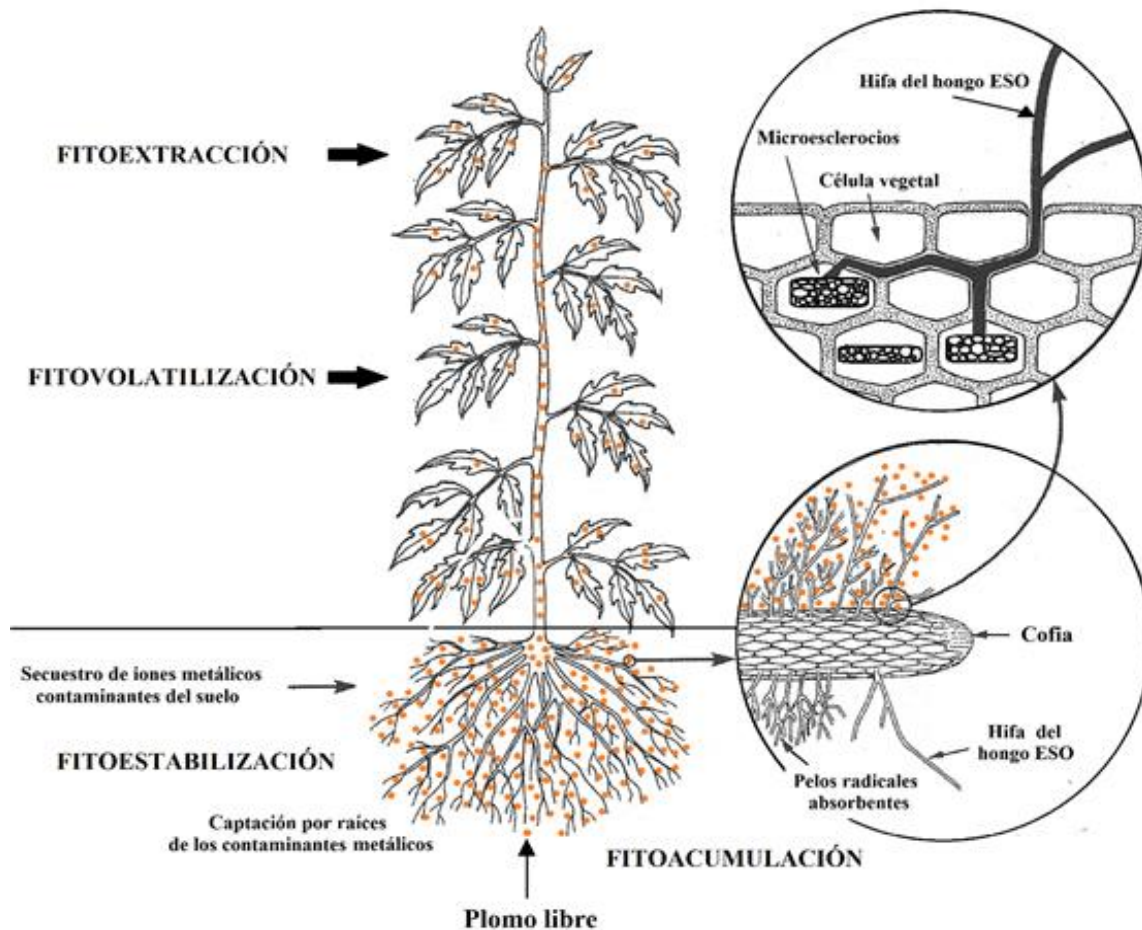


Figura 2. Papel de plantas y hongos endófitos en la captación de metales pesados (modificado de [www.google.com.mx/search?q=fitorremediacion+microorganismos+rizosfericos](http://www.google.com.mx/search?q=fitorremediacion+microorganismos+rizosfericos)).

La pared celular constituye la primer barrera que debe atravesar cualquier compuesto para ingresar y su composición química varía de célula a célula (Wang y Chen, 2009); posee elevada afinidad por cationes (alta densidad de cargas positivas), lo que favorece la retención de algunos MP. Cuando se carece de pared celular, la membrana plasmática constituye la frontera para el intercambio; allí existen un gran número de transportadores encargados de controlar el ingreso y salida de diversas sustancias, con un alto grado de especificidad. Los transportadores ZIP (*zinc iron regulated transported-like protein*) introducen cationes divalentes en el citoplasma; la naturaleza del ion transportado es muy variada. Su función, orientada en la absorción de micronutrientes esenciales del medio exterior, moviliza al mismo tiempo las reservas presentes en el interior de la célula. Los transportadores NRAMP (*natural resistance associated macrophage protein*) aumentan los cationes divalentes en el

citoplasma, en especial Fe y Mn, pero también pueden transportar otros metales. Los transportadores Ctr (*Cu transporter*) introducen Cu a la célula; forman una zona de baja densidad de electrones que actúa como poro específico para Cu y también influyen en su movilización desde la vacuola al citosol (Byung-Eun *et al.*, 2008). Los transportadores CDF (*cation diffusion facilitator*) reducen la concentración de cationes divalentes en el citoplasma, los exportan al exterior de la célula o al interior de organelos, y transportan también Zn, Co, Mn y Cd. Los transportadores de tipo primario ABC (*ATP binding cassette*) utilizan la hidrólisis de ATP para movilizar sustancias que incluyen lípidos, péptidos, azúcares y complejos de glutatión, donde la sub-familia MRP es la encargada del transporte de MP a la vacuola o al exterior de la célula, a partir de los complejos que forman los MP con el glutatión o los complejos formados con fitoquelatinas (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2008). Las ATPasas del tipo P, superfamilia de transportadores primarios de cationes, especialmente H, Ca, Mg, Na, Pb, Zn, o Cu, transportan activamente el Cu, disminuyendo los niveles del metal en el citosol (Colanguelo y Guerinot, 2006). Los transportadores YSL (*yellow stripe1-like protein*), los más recientemente identificados, están encargados del transporte de metales que han formado complejos a través de fitometalóforos y de la movilización de Fe, Zn, Mn y Cu, especialmente. A nivel citoplasmático, la quelación prima en el papel de la retención de MP, ya sea para direccionamiento o reserva, mediante el uso de péptidos o proteínas (Colanguelo y Guerinot, 2006). El glutatión asociado al potencial redox del citoplasma es fundamental para la eliminación de compuestos tóxicos mediante el proceso de conjugación. Posee la capacidad de unirse a cationes divalentes como el  $Cd^{2+}$  para formar complejos que son retirados del citoplasma a través de transportadores específicos. A partir del glutatión son sintetizadas fitoquelatinas (en plantas, hongos y animales) que, reguladas por los MP, permiten que en el citoplasma se empleen transportadores específicos para retirar la fitoquelatina unida al metal (Yadav, 2010).

Los mecanismos de captación de Pb por el micelio externo de algunos hongos han sido poco estudiados; sin embargo, existen datos que sugieren que esto podría ser a través del P. El P en los hongos micorrízico arbusculares (HMA) es transportado del micelio externo al interno principalmente en forma de polifosfato (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001). La unión del Pb al polifosfato ha sido observada como un mecanismo de estabilización del metal en el suelo; por lo tanto, existe la posibilidad de que el metal sea transportado a la raíz colonizada vía el

micelio externo. Se requiere conocer los mecanismos de transporte de Pb a través del micelio de los hongos ESO, aunque esto pudiera llevarse a cabo en una forma semejante a como ocurre en los HMA. Entre las posibles estrategias de inmovilización de Pb por los hongos micorrízicos se encuentran la inmovilización del Pb soluble mediante glicoproteínas secretadas por el hongo, la adsorción del Pb en las paredes celulares y la quelación en el interior de la célula fúngica; estas estrategias son similares a las que existen en las plantas (Gaur y Andholeya, 2004). La glomalina es una glicoproteína insoluble secretada al suelo por los HMA y está ligada a los MP. En suelos contaminados con Pb se ha logrado extraer hasta 1.12 mg Pb g<sup>-1</sup> de glomalina (González-Chávez *et al.*, 2004); recientemente se observó que la concentración de Pb en la glomalina varía entre 0.8 y 15.5% del total de Pb en el suelo (Vodnik *et al.* 2008). Otros agentes de retención del Pb en el micelio fúngico son las metalotioneínas; estas moléculas son de tamaño pequeño (6-7 kDa), poseen un alto contenido de cisteínas, protegen la célula contra agentes oxidantes y quelan iones metálicos. Al parecer, su acción sólo se regula transcripcionalmente en presencia de varios estímulos como los MP (Aguirre, 2010). En plantas acumuladoras de metales (Clemens, 2001) y en hongos ectomicorrízicos (Morselt *et al.*, 1986; Galli *et al.*, 1994) se han detectado estos polipéptidos capaces de quelar MP. Aunque estos compuestos no han sido aún observados en unión con el Pb, en el micelio de algunos hongos en presencia de MP se ha detectado una alta expresión del gen que codifica para una metalotioneína (Lanfranco *et al.*, 2002). Los hongos producen habitualmente una gran cantidad de micelio externo. La pared celular de este micelio está compuesta mayormente por quitina, misma que provee una eficiente superficie para la adsorción de MP (Galli *et al.* 1994). Este potencial de adsorción se debe a que las hifas presentan una mayor afinidad metálica que las raíces (Joner *et al.*, 2000); por tanto, la inoculación de plantas tolerantes con hongos ESO podría incrementar significativamente la estabilización de MP en el suelo.

Los hongos ESO pueden desempeñar un papel clave en la protección de las plantas contra el estrés por MP. Regvar *et al.* (2010) reportaron que la colonización por hongos ESO en el sauce *Salix caprea* mejora la tolerancia vegetal contra el Pb y Cd, en tanto que Ban *et al.* (2012) observaron un efecto positivo similar en *Astragalus adsurgens* en presencia de Pb y Zn. Los hongos ESO *Exophiala* spp. y *Phialophora* spp. pueden desempeñar un papel funcional en el crecimiento vegetal y mejorar la resistencia vegetal contra metales como el

Cd, Zn y Pb (Vrålstad *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2011). En suelos contaminados por Pb, Cd y Zn los hongos ESO fueron dominantes entre los hongos aislados de las raíces de *Erica herbacea* (Cevnik *et al.*, 2000). La melanina en las hifas de los hongos ESO se considera el componente más importante de la pared celular; disminuye la toxicidad de los MP debido a que se une a diferentes iones (Ban *et al.*, 2012). Los síntomas más evidentes de toxicidad en los hongos son la inhibición del crecimiento, el engrosamiento irregular de la pared celular (Venkateswarlu *et al.*, 1989) y las aberraciones morfológicas como hifas muy gruesas con ramificaciones (Cortés-Penagos *et al.*, 1994).

### **3. Objetivo**

Evaluar la tolerancia contra el plomo de los hongos endófitos septados oscuros.



## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Tolerancia hacia el plomo por los hongos endófitos septados oscuros

Los 18 aislados de hongos endófitos septados oscuros (ESO) identificados morfológica y molecularmente en la primera parte de la investigación, constituyeron el objeto de estudio de esta segunda parte. Se evaluó la tolerancia al Pb de todos los aislados *in vitro*, en medio PDA, al que se agregaron 100 mg Pb l<sup>-1</sup> considerando que en un estudio previo en desechos de la mina El Bote, los niveles del metal fluctuaron entre 56 y 188.6 mg Pb kg<sup>-1</sup> de sustrato (Flores-Torres, 2015), es decir, alcanzaron concentraciones tóxicas según la EPA (Carrillo-González y González-Chávez, 2006). El Pb fue adicionado en forma de PbCl<sub>2</sub>; como testigo se incluyó un tratamiento sin Pb. Para obtener discos de micelio para la inoculación, primeramente, los aislados fúngicos fueron sembrados en PDA natural a 28°C durante 10 días; a partir de estos cultivos se elaboró una suspensión de propágulos en tween 20 al 0.05%, en el centro de cajas con PDA natural se depositaron 500 µl de la misma y se esparcieron con un rastrillo de vidrio estéril; se incubó a 28°C, 11 días. Obtenido ya un césped homogéneo de micelio se llevaron a cabo 30 cortes circulares, por aislado. Cada disco se utilizó para inocular cada caja del experimento con y sin Pb; se incubó a 28±1°C durante 6 días. En cada unidad experimental se evaluaron las siguientes variables:

A) macro y micromorfología (Mier *et al.*, 2013): color del anverso y reverso; aspecto de la superficie (algodonoso, aterciopelado, pulverulento, zonado); consistencia (blanda o dura); superficie (convexa, elevada, plana); liberación de exudados al medio de cultivo. La caracterización micromorfológica consideró la observación de las estructuras reproductoras en un microscopio óptico con los objetivos 40x y 100x (Mier *et al.*, 2013). Se consultaron claves dicotómicas para identificar los hongos ESO, los cuales presentan en su mayoría pigmentos de color oscuro, una estructura hifal apretada y sinuosa, hifas hialinas y delgadas con cuerpos lipídicos en su interior, además de conidios pigmentados de color oscuro (Jumpponen y Trappe, 1998; Barrow y Aaltonen, 2001; Barrow, 2003).

B) crecimiento radial (Mier *et al.*, 2013): se registró el crecimiento radial de las colonias durante seis días en el sitio de cruce de los ejes perpendiculares del diámetro 1 (D1) y del diámetro 2 (D2) de cada colonia; se registró el crecimiento radial de las colonias a partir del tercer día.

C) producción de biomasa (Mier *et al.*, 2002): con una espátula flameada se tomó cada colonia fúngica completa a los seis días de incubación, se depositó en una charola de papel aluminio previamente pesada para secarse en un horno a 90°C, durante 4 días, y hasta lograr peso constante; se calculó el peso seco de la biomasa por la diferencia entre el peso inicial y el final.

#### 4.2. Perfil enzimático de los aislados fúngicos

Las fosfolipasas son enzimas hidrolíticas de lípidos que transforman los fosfolípidos en ácidos grasos libres, lipofosfato, mono y diglicéridos, glicerolfosfátidos y materiales más sencillos. Diversas fosfolipasas están implicadas en la hidrólisis de enlaces específicos de la lecitina, un fosfolípido con nitrógeno. La lecitina del huevo tiene un 73% de fosfatidilcolina y un 3% de esfingomielina, por lo que la yema de huevo es un buen inductor para la actividad de las fosfolipasas. La prueba de actividad fosfolipasa fue inducida en el medio de peptona 20 g, fosfato disódico 2.5 g, cloruro de sodio 1 g, solución al 0.5 % p/v de sulfato de magnesio 0.1 ml, glucosa 1 g, agar 12.5 g y agua destilada 500 ml; esta solución fue enriquecida con yema de huevo y se ajustó a un pH de 7.3.

Las proteasas son excretadas al medio para la degradación de proteínas; la caseína es la proteína de la leche que confiere el color blanco, por lo que es muy útil para detectar proteasas de origen microbiano. En el caso de los hongos, cuando la caseína es hidrolizada desaparece el color blanco alrededor del crecimiento fúngico, o bien se forma un precipitado más oscuro, dependiendo del tipo de proteasa que se esté expresando. Para inducir la actividad de estas enzimas se empleó el medio de cultivo agar leche descremada con leche Svelty 20 g, agar 16 g, regulador de fosfatos 1 M (fosfato sódico monobásico 27.8 g; fosfato sódico dibásico 71.1 g); esta solución se ajustó a un pH de 7.0.

Las lipasas son producidas ampliamente por bacterias, levaduras y hongos; son enzimas que catalizan la hidrólisis de gliceroles de acilo de ácidos grasos, di-acilo gliceroles, gliceroles mono-acilo y glicerol; bajo ciertas condiciones también catalizan la síntesis de ésteres por transesterificación, tioesterificación y aminólisis (Ferreira *et al.*, 1999; Mahadik *et al.*, 2002). El tween ha sido probado como sustrato para lipasas, es altamente soluble, es un éster de ácidos grasos de un polioxialquileno derivado de sorbitán; el tween es estable en diluciones alcalinas y en soluciones ácidas minerales, además de ser neutro y no volátil tanto como

estable al calor. Si los hongos son probados con el tween como sustrato y tienen una actividad lipolítica, entonces un halo opaco puede ser observado alrededor de la colonia. Por tanto, la actividad lipasa fue inducida con el medio de cultivo descrito por Hankin y Anagnostakis (1975) formado con base en peptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, cloruro de calcio-2H<sub>2</sub>O 0.1 g, agar 20 g y tween 20. La mezcla fue ajustada a pH 6.0, utilizando HCL 0.5 M y se esterilizó durante 20 min. El tween fue esterilizado por separado durante 20 min y se adicionó 1 ml por cada 100 ml de medio de cultivo estéril frío.

La concentración de Pb utilizada en cada uno de los tres medios de inducción enzimática fue de 200 mg Pb l<sup>-1</sup> (Cuadro 1), considerada con base en el estudio previo en la presa de desechos de la mina El Bote, donde las concentraciones de Pb fluctuaron entre 56 y 188.6 mg Pb kg<sup>-1</sup> sustrato (Flores-Torres, 2015), lo que supera los límites permitidos en suelos por la EPA (Carrillo-González y González-Chávez, 2006; Rodríguez-Elizalde *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Tratamientos del ensayo de evaluación *in vitro* de la actividad enzimática de los hongos endófitos septados oscuros.

<b>Actividad enzimática</b>	<b>Tratamientos</b>
Fosfolipasas	T1: Hongo + medio de cultivo sin Pb
Medio con yema de huevo	T2: Hongo + medio de cultivo con 200 mg Pb
Proteasas	T1: Hongo + medio de cultivo sin Pb
Medio con leche descremada	T2: Hongo + medio de cultivo con 200 mg Pb
Lipasas	T1: Hongo + medio de cultivo sin Pb
Medio con tween	T2: Hongo + medio de cultivo con 200 mg Pb

Para obtener discos de micelio para la inoculación, primeramente, los aislados fúngicos fueron sembrados en PDA natural a 28°C durante 10 días; a partir de estos cultivos se elaboró una suspensión de propágulos en tween 20 al 0.05%, en el centro de cajas con PDA natural se depositaron 500 µl de la misma y se esparcieron con un rastrillo de vidrio estéril; se incubó a 28°C, 11 días. Obtenido ya un césped homogéneo de micelio se llevaron a cabo 30 cortes circulares, por aislado. Cada disco se utilizó para inocular cada caja del experimento con y sin Pb; se incubó a 28±1°C. Las cajas fueron examinadas a las 24 h, 48 h y 72 h para medir el diámetro de la colonia (DC), así como el diámetro del halo (DH) de la actividad enzimática.

La actividad enzimática de los aislados se calculó con base en el índice enzimático (IE: DH /DC), el cual indica la relación halo/colonia. Si el IE es cercano a 1, la cantidad y difusibilidad de la enzima es baja y si el IE es mayor a 1, entonces es alta (St. Leger *et al.*, 1997; Carrillo-Pérez *et al.*, 2013).

#### 4.3. Análisis estadístico de datos

Los resultados fueron sometidos a estadística descriptiva. Para identificar diferencias significativas entre los tratamientos del ensayo de tolerancia, después de normalizar los resultados se aplicó una prueba *t*-student. Respecto al ensayo de la actividad enzimática, para identificar diferencias significativas entre tratamientos, una vez normalizados los datos se aplicó un análisis de varianza de una sola vía y una prueba de medias de Tukey. Todos los análisis se realizaron con el programa OriginPro versión 8.6.

### 5. Resultados

#### 5.1. Tolerancia hacia el plomo por los aislados fúngicos *in vitro*

El cuadro 2 muestra la velocidad de crecimiento radial y la producción de biomasa de los 18 aislados fúngicos cultivados en PDA en presencia y en ausencia de 100 mg Pb l<sup>-1</sup> a pH 6.0. Los 18 aislados crecieron en ambos tratamientos; la velocidad de crecimiento radial de cada aislado, en presencia y en ausencia del metal, no presentó diferencias significativas. La biomasa se redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) en el aislado A5 TAG por efecto del Pb; en los demás aislados no hubo diferencias significativas en la producción de biomasa entre los dos tratamientos. No se observaron modificaciones atribuidas al metal en la macromorfología colonial de los 18 aislados; sin embargo, en presencia de Pb las hifas presentaron una coloración más oscura que en su ausencia (Figura 3).

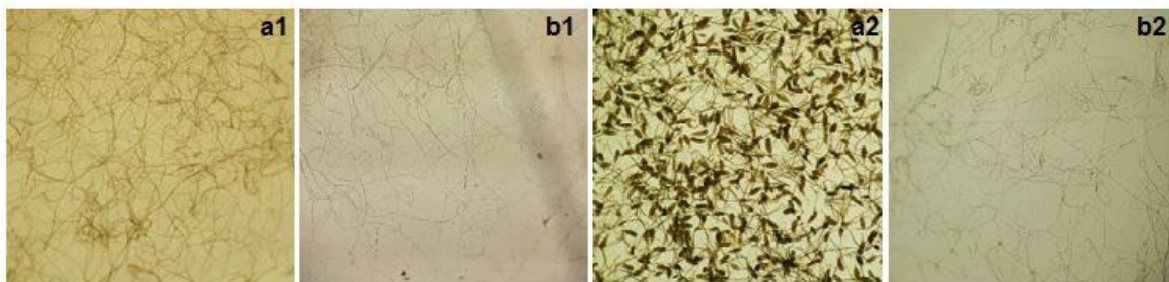


Figura 3. Pigmentación más oscura de hifas septadas y conidios en presencia de Pb en medio PDA (a1-a2); pigmentación clara de hifas septadas en ausencia de Pb en medio PDA (b1-b2).

Cuadro 2. Velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa (media  $\pm$  DS;  $n = 7$ ) de los aislados fúngicos en presencia ( $100 \text{ mg Pb l}^{-1}$ ) y en ausencia de Pb en medio de cultivo PDA.

Aislado	Velocidad de crecimiento (cm)		Producción de biomasa (g)	
	Sin Pb	Con Pb	Sin Pb	Con Pb
A1 TAG <sup>a</sup>	6.19 $\pm$ 0.60	6.06 $\pm$ 0.84	0.39 $\pm$ 0.11	0.41 $\pm$ 0.11
A2 TAG <sup>a</sup>	7.71 $\pm$ 0.23	7.69 $\pm$ 0.29	0.82 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.04
A4 TAG <sup>a</sup>	7.35 $\pm$ 0.42	7.26 $\pm$ 0.77	0.71 $\pm$ 0.11	0.68 $\pm$ 0.10
A5 TAG <sup>a</sup>	7.26 $\pm$ 0.26	6.91 $\pm$ 0.42	0.65 $\pm$ 0.07*	0.84 $\pm$ 0.19*
A6A TAG <sup>a</sup>	5.74 $\pm$ 0.22	5.8 $\pm$ 0.51	0.36 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.13
A6B TAG <sup>a</sup>	6.88 $\pm$ 0.88	7.18 $\pm$ 0.35	0.71 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.11
A6C TAG <sup>a</sup>	6.47 $\pm$ 0.39	6.6 $\pm$ 0.49	0.68 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.05
A6D TAG <sup>a</sup>	5.52 $\pm$ 0.26	5.37 $\pm$ 0.27	0.34 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.06
A7 TAG <sup>a</sup>	7 $\pm$ 0.43	6.62 $\pm$ 0.34	0.69 $\pm$ 0.15	0.6 $\pm$ 0.21
A8 TAG <sup>a</sup>	6.81 $\pm$ 0.59	6.89 $\pm$ 0.30	0.56 $\pm$ 0.09	0.51 $\pm$ 0.07
A9 TAG <sup>a</sup>	7.56 $\pm$ 0.29	7.51 $\pm$ 0.18	0.69 $\pm$ 0.08	0.8 $\pm$ 0.10
A10A TAG <sup>a</sup>	7.28 $\pm$ 0.12	7.06 $\pm$ 0.26	0.73 $\pm$ 0.13	0.74 $\pm$ 0.07
A10B TAG <sup>a</sup>	7.13 $\pm$ 0.45	7.44 $\pm$ 0.51	0.77 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.09
A11 TAG <sup>a</sup>	7.62 $\pm$ 0.28	7.65 $\pm$ 0.35	0.74 $\pm$ 0.10	0.71 $\pm$ 0.09
A2 PEV <sup>b</sup>	2.74 $\pm$ 0.06	2.71 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.01
A3 PEV <sup>b</sup>	2.66 $\pm$ 0.08	2.65 $\pm$ 0.13	0.12 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01
A4A PEV <sup>c</sup>	5.23 $\pm$ 0.19	5.23 $\pm$ 0.16	0.31 $\pm$ 0.31	0.33 $\pm$ 0.05
A4B PEV <sup>c</sup>	5.39 $\pm$ 0.28	5.3 $\pm$ 0.25	0.35 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.05

\*Diferencias significativas entre ambos tratamientos. El valor de significancia fue de  $p < 0.05$ . Identidad: <sup>a</sup>, aislados pertenecientes al género *Alternaria*; <sup>b</sup>, aislados pertenecientes al Orden *Pleosporales*; <sup>c</sup>, aislados pertenecientes al género *Periconia*.

## 5.2. Perfil enzimático de los aislados fúngicos

En la figura 4 se aprecian los halos de degradación típicos de las actividades enzimáticas fosfolipasa, proteasa y lipasa en los hongos ESO cultivados en medio con inductor. Los aislados fúngicos presentaron una heterogeneidad en su respuesta frente al Pb; la mayoría de ellos exhibieron halos de hidrólisis en las tres actividades, tanto alrededor como dentro de las colonias. Los halos de hidrólisis observados en ausencia de Pb fueron pequeños, de color translúcido; las colonias de los aislados en ausencia de Pb mostraron colores más claros que en su presencia. Los halos en presencia de Pb fueron más grandes y con tonalidades más oscuras que sin el metal.

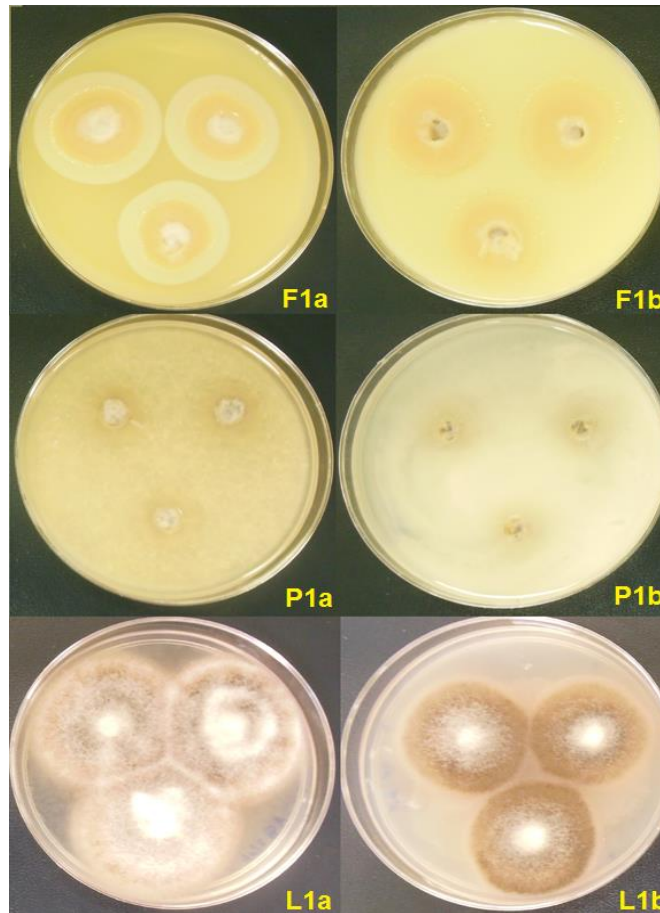


Figura 4. Halo de degradación de las enzimas fosfolipasas (F1), proteasas (P1) y lipasas (L1) en ausencia (a) y en presencia (b) de Pb.

En los aislados A1 TAG, A4 TAG, A5 TAG, A6D TAG, A8 TAG, A10A TAG y A11 TAG la actividad fosfolipasa fue significativamente mayor en presencia que en ausencia de Pb; en el aislado A6A TAG esta actividad se indujo, mientras que en el aislado A7 TAG se reprimió por exposición al metal. Las proteasas fueron activadas significativamente en presencia de Pb sólo en los aislados A6C TAG y A3 PEV, mientras que en el aislado A10A TAG el metal indujo esta actividad. Finalmente, la actividad lipasa fue inducida significativamente por el Pb en los aislados A5 TAG y A6D TAG, en tanto que fue reprimida en el aislado A2 TAG (Cuadro 3).

Cuadro 3. Actividad enzimática (media  $\pm$  DS;  $n = 9$ ) de los aislados fúngicos en presencia (200 mg Pb l<sup>-1</sup>) y en ausencia de Pb.

AISLADO	FOSFOLIPASAS		PROTEASAS		LIPASAS	
	Sin Pb	Con Pb	Sin Pb	Con Pb	Sin Pb	Con Pb
A1 TAG <sup>a</sup>	3.04 $\pm$ 0.15*	3.33 $\pm$ 0.19*	0.55 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.06	0.97 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.06
A2 TAG <sup>a</sup>	2.88 $\pm$ 0.75	2.42 $\pm$ 0.14	1.58 $\pm$ 0.38	1.02 $\pm$ 0.12	3.57 $\pm$ 0.23	0
A4 TAG <sup>a</sup>	2.45 $\pm$ 0.15*	3.50 $\pm$ 0.16*	0.76 $\pm$ 0.05	0.79 $\pm$ 0.05	0.98 $\pm$ 0	0.97 $\pm$ 0
A5 TAG <sup>a</sup>	2.86 $\pm$ 0.37*	4.09 $\pm$ 0.27*	1.30 $\pm$ 0.10	1.16 $\pm$ 0.06	0	0.97 $\pm$ 0.02
A6A TAG <sup>a</sup>	0	1.74 $\pm$ 1.11	0.82 $\pm$ 0.18	0.80 $\pm$ 0.04	0	0
A6B TAG <sup>a</sup>	0	0	0.69 $\pm$ 0.08	0.63 $\pm$ 0.08	0	0
A6C TAG <sup>a</sup>	0	0	0.36 $\pm$ 0.06*	0.48 $\pm$ 0.07*	0	0
A6D TAG <sup>a</sup>	2.94 $\pm$ 0.17*	3.11 $\pm$ 0.19*	0.57 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.09	0	2.50 $\pm$ 0.25
A7 TAG <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.07	0	1.21 $\pm$ 0.24	1.10 $\pm$ 0.12	3.76 $\pm$ 0.38	3.21 $\pm$ 0.23
A8 TAG <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.25*	3.40 $\pm$ 0.27*	0.92 $\pm$ 0.08	0.89 $\pm$ 0.11	3.63 $\pm$ 0.69	3.85 $\pm$ 1.00
A9 TAG <sup>a</sup>	0	0	0.61 $\pm$ 0.05	0.67 $\pm$ 0.11	2.77 $\pm$ 0.26	2.08 $\pm$ 1.25
A10ATAG <sup>a</sup>	2.59 $\pm$ 0.09*	3.33 $\pm$ 0.22*	0	0.92 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0	0.97 $\pm$ 0.01
A10BTAG <sup>a</sup>	0	0	0.99 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.86	3.12 $\pm$ 0.36	2.79 $\pm$ 0.32
A11 TAG <sup>a</sup>	2.76 $\pm$ 0.32*	3.76 $\pm$ 0.42*	0	0	0	0
A2 PEV <sup>b</sup>	0	0	0.59 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.07	0	0
A3 PEV <sup>b</sup>	0	0	0.49 $\pm$ 0.07*	0.65 $\pm$ 0.20*	0	0
A4A PEV <sup>c</sup>	1.95 $\pm$ 0.23	1.99 $\pm$ 0.35	0.64 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 0.02	0	0
A4B PEV <sup>c</sup>	0	0	1.18 $\pm$ 0.11	1.73 $\pm$ 1.91	0	0

\*Diferencias significativas entre ambos tratamientos. El valor de significancia fue de  $p < 0.05$ . Identidad: <sup>a</sup>, aislados pertenecientes al género *Alternaria*; <sup>b</sup>, aislados pertenecientes al Orden *Pleosporales*; <sup>c</sup>, aislados pertenecientes al género *Periconia*.

La capacidad metabólica de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos e incluso mineralizarlos, ya sea a través de enzimas intracelulares o excretadas al medio, ofrece un gran potencial en la descontaminación de suelos. La actividad fosfolipasa es considerada uno de los requisitos que los microorganismos idóneos deben reunir para su uso en procesos de biorremediación de hidrocarburos y MP. Por lo anterior, para seleccionar los aislados fúngicos candidatos para evaluar el efecto de su inoculación *in planta*, serán considerados aquellos que presentaron diferencias significativas en el índice enzimático de la actividad fosfolipasa; además, se midió el crecimiento radial durante el ensayo enzimático para conocer la relación halo/colonia. La relación de la actividad fosfolipasa entre los aislados fúngicos se muestra en la figura 6.

El aislado que mostró la mayor actividad fosfolipasa fue el A5 TAG y el segundo fue el A11 TAG; ambos fueron estadísticamente semejantes a los aislados A1 TAG, A4 TAG, A6D TAG, A8 TAG y A10A TAG. La mínima actividad fosfolipasa se presentó en el aislado A6A TAG, que fue significativamente diferente de los demás. Todos los aislados tuvieron un índice enzimático mayor a 1, lo cual se considera como una actividad enzimática alta.

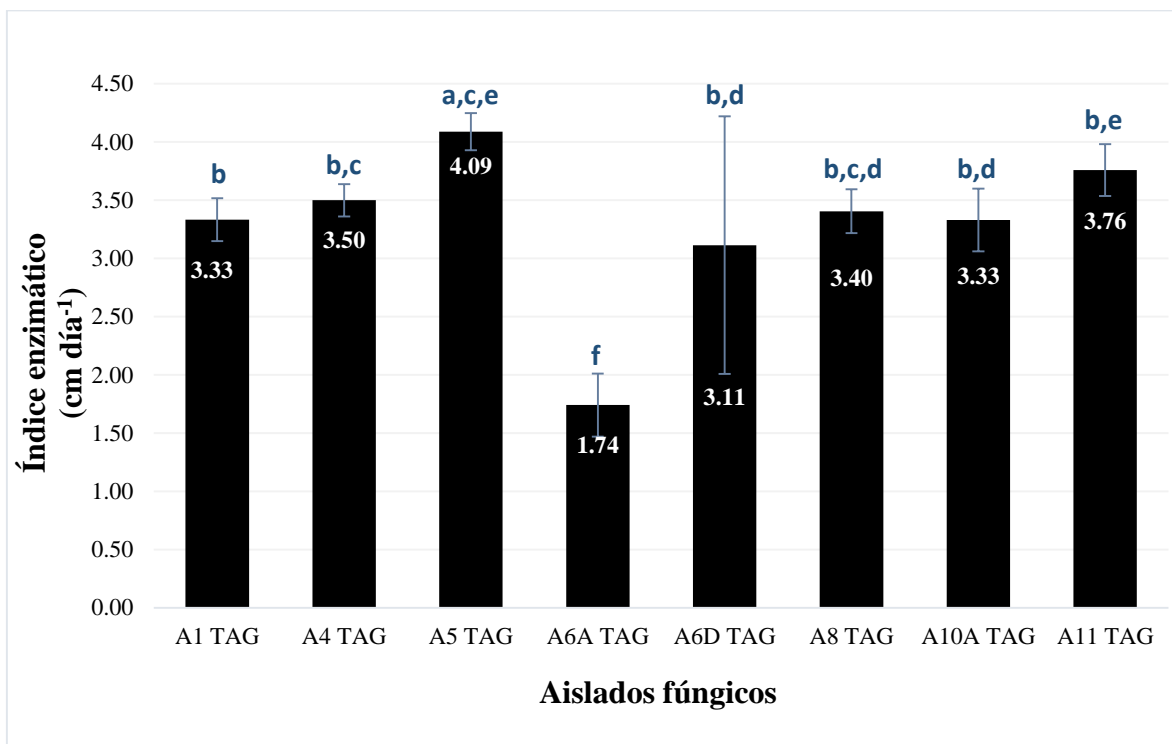


Figura 6. Análisis de varianza (ANOVA) del índice enzimático de fosfolipasas de los aislados fúngicos en presencia de Pb (media  $\pm$  DS;  $n=5$ ).

En la figura 7 se observa que la velocidad de crecimiento radial en la actividad fosfolipasa de los aislados A1 TAG, A4 TAG, A6D TAG, A8 TAG, A10A TAG y A11 TAG no exhibió diferencias significativas. El aislado A5 TAG presentó la velocidad de crecimiento radial más elevada y el aislado A6A TAG la más baja ( $p<0.05$ ), ambos en presencia de Pb.



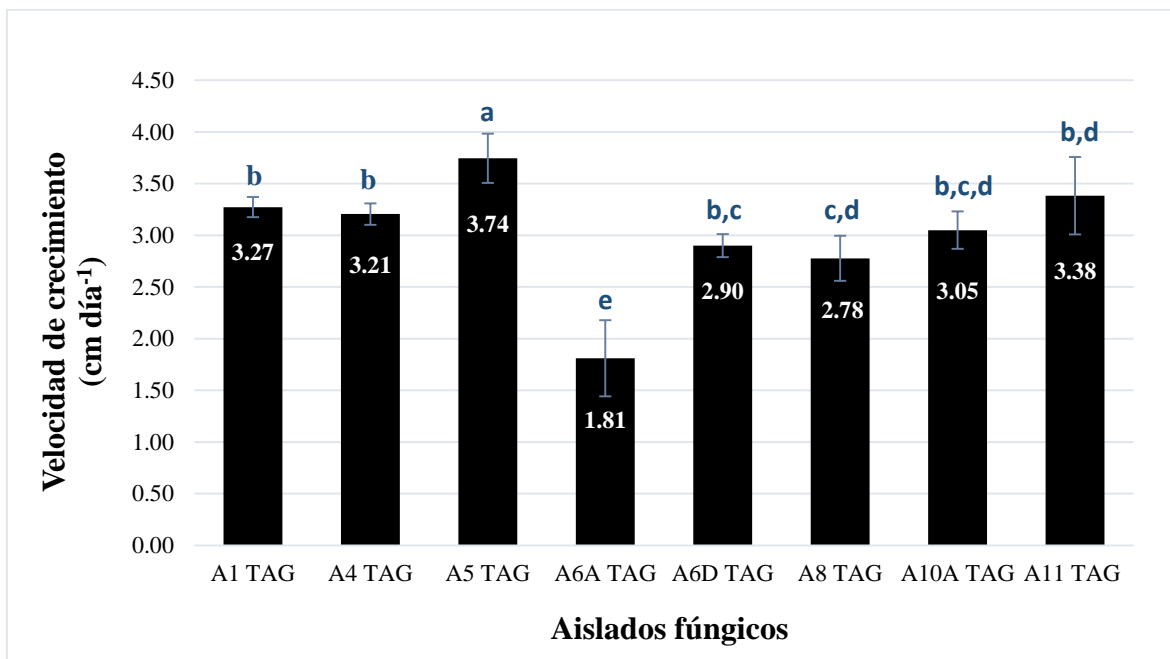


Figura 7. Análisis de varianza (ANOVA) de la velocidad de crecimiento radial de los aislados fúngicos en presencia de Pb (media  $\pm$  DS;  $n=5$ ).

Como resultado de ambas figuras, se desprende que el aislado A5 TAG, de *Alternaria*, es el mejor candidato para evaluar el efecto de su inoculación *in planta* bajo estrés por Pb, debido a que presentó significativamente el índice enzimático más elevado y la velocidad de crecimiento más alta. De los aislados restantes, el A1 TAG, el A4 TAG y el A11 TAG, todos de *Alternaria*, podrían ser también considerados para ensayos futuros, según los resultados observados.

## 6. Discusión

Los 18 aislados de los hongos ESO procedentes de las raíces de *T. lunulata* y *P. villosum* mostraron una tolerancia a  $100 \text{ mg Pb l}^{-1}$ , al observar la misma velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa en presencia y en ausencia del metal. Li *et al.* (2012) sugieren que los hongos nativos sometidos a estrés metálico constante durante un largo periodo tienen una adaptación marcada que los hace tolerantes a altas concentraciones de MP; esto es posible apreciar en los hongos de los desechos mineros de El Bote. Xu *et al.* (2015) aislaron 13 hongos ESO de *Alnus nepalensis* establecida en una mina fuertemente contaminada con Cd; los aislados tuvieron una alta tolerancia al metal a una concentración de  $600 \text{ mg Cd l}^{-1}$ . De igual manera, Regvar *et al.* (2010) mostraron que la colonización por hongos ESO de los órdenes *Helotiales* y *Leotiomycetes* en las raíces de *Salix caprea* se incrementó a concentraciones altas de Pb ( $7,157\text{-}51,400 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Los hongos ESO pertenecen al grupo de hongos altamente tolerantes al Pb, Cd y Zn (Gadd, 1993); esto puede deberse a que los iones metálicos se unen a la melanina de la pared celular. Sin embargo, cada especie de hongo ESO, e incluso cada aislado, es probable exhiba estrategias específicas para tolerar los MP, como paredes impermeables, pigmentación celular, producción de polisacáridos extracelulares, metabolitos y enzimas (Gadd, 1993; Zhang *et al.*, 2008).

En el ensayo a una concentración de  $100 \text{ mg Pb kg}^{-1}$  no hubo cambios notables en la morfología de los aislados fúngicos atribuidos al Pb; en contraste, en presencia de  $200 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ , algunos aislados sí mostraron modificaciones en la coloración y en la macromorfología colonial. La morfogénesis de las colonias de hongos e hifas podría estar influenciada por los MP; las razones de los cambios de coloración colonial son difíciles de explicar pero pueden ser un indicador de la formación de complejos de metal (Ban *et al.*, 2012). La melanina conduce al ennegrecimiento de las colonias, al ser un componente característico de los hongos ESO. Baldrian (2003) propuso que la pared celular de los hongos tiene una alta capacidad para absorber iones metálicos; la melanina situada en el interior y exterior de la pared celular podría reducir la toxicidad del Cu, Zn, Cd y Pb (Fogarty y Tobin, 1996). Gadd (1993), Guille'n y Machuca (2008) han indicado que la melanina es responsable de los cambios de color en el micelio, y se ha relacionado con mecanismos de supervivencia que pueden moderar o disminuir la toxicidad por los MP.

Los ambientes contaminados con Pb son desfavorables para el crecimiento y sobrevivencia de comunidades microbianas debido a que este metal causa daño en el DNA, en lípidos y proteínas, además de remplazar iones metálicos esenciales de las proteínas como el Zn, Ca y Fe (Pérez-Cordero *et al.*, 2015). La actividad enzimática fúngica es uno de los aspectos que involucran los mecanismos de susceptibilidad o tolerancia al metal (Zhang *et al.*, 2008). En este trabajo se evaluó la actividad enzimática extracelular de fosfolipasas, proteasas y lipasas a una concentración de 200 mg Pb l<sup>-1</sup>. Se ha documentado que la concentración de iones metálicos puede modificar o inactivar la actividad enzimática de los hongos (Ernst *et al.*, 1992). A este respecto, en la presente investigación fueron identificadas modificaciones en las tres actividades: siete de los aislados incrementaron la actividad fosfolipasa y dos la actividad proteasa; en un aislado se indujo la actividad fosfolipasa, en otro la actividad proteasa y en dos más la actividad lipasa. Por último, las actividades fosfolipasa y lipasa fueron reprimidas en un aislado en cada caso. La fosfolipasa fue la actividad más impactada por el Pb.

Los MP pueden ejercer efectos tóxicos de muchas maneras, por ejemplo, mediante el bloqueo de los grupos funcionales de las enzimas (Gadd, 1993; Gadd y Griffiths, 1977). El Cd, Cu, Pb, Mn, Ni y Co disminuyeron la producción de celulasa y amilasa en varios hongos (Gadd, 2007). La falta de actividad enzimática de las lacasas de *Pycnoporus cinnabarinus* hacia los hidrocarburos se debió a los MP (Mougin *et al.*, 2002). Asimismo, la actividad enzimática puede estimularse por los MP; en una investigación la actividad lacasa se estimuló marcadamente por el Cd en los basidiomicetos de podredumbre blanca (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002; Baldrian y Gabriel 2003). En otro ejemplo, la adición de Zn y Cd a *Oidiodendrum maius* activó la actividad enzimática; las mismas concentraciones metálicas no afectaron o sólo inhibieron ligeramente la actividad enzimática extracelular en un cultivo fúngico no tolerante (Martino *et al.*, 2000).

Los hongos han demostrado tolerar los MP por medio de dos mecanismos: el secuestro extracelular y el secuestro intracelular (Yagn *et al.*, 2009). El primero evita la entrada del metal mediante moléculas orgánicas que son excretadas para quelar los iones; el segundo reduce la carga del metal en el citosol. La superficie celular está cargada negativamente debido a la presencia de estructuras aniónicas, lo que permite la unión de los cationes

metálicos. El mecanismo intracelular involucra la expulsión de metales desde el citosol y su secuestro en la vacuola (Bellion *et al.*, 2006; Maghsoodi *et al.*, 2007; Abdul *et al.*, 2007).

La elevada tolerancia fúngica contra los MP, así como la presencia de los hongos ESO en los desechos mineros, sugieren que estos microorganismos cumplen funciones clave para la supervivencia vegetal en esos ecosistemas extremos. Las interacciones entre los hongos ESO y sus plantas hospederas pueden ser diversas y no siempre bien definidas (Jumpponen y Trappe, 1998; Li *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Los ESO producen paredes celulares melanizadas al colonizar el huésped, lo que tiende a formar complejos con radicales de oxígeno formados durante el estrés, y ser favorables para la supervivencia y el crecimiento vegetal en ambientes estresantes (Redman *et al.*, 2002). Los hongos ESO pueden mejorar la ecofisiología de la planta huésped y permitir que contrarresten las tensiones abióticas como la sequía y la contaminación de metales (Rodríguez *et al.*, 2009). En algunos casos, los ESO estimulan la producción de pelos largos de las raíces y aumentan la exudación de compuestos fenólicos en la rizosfera, lo que da como resultado una absorción más eficiente del P del suelo y una mayor tolerancia al Al mediante quelación (Malinowski y Belesky, 2000). De igual manera, los ESO pueden aumentar la biomasa de los brotes y/o raíces del huésped, posiblemente como resultado de la inducción de síntesis de hormonas vegetales por el huésped o por los hongos (Tudzynski y Sharon, 2002). Se ha documentado que también muchos ESO protegen a sus huéspedes de patógenos fúngicos (Schulz, 2006).

Los hongos ESO son los huéspedes más frecuentes en las raíces de *Deschampsia cespitosa* que crece en las inmediaciones de una antigua fundidora de Pb-Zn (Gucwa-Przepióra *et al.*, 2013). Entre los hongos ESO más comunes están miembros de *Exophiala* y *Phialophora*, los cuales pueden desempeñar un papel funcional en el crecimiento de las plantas para mejorar la resistencia al estrés ambiental (Vrälstad *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2011). Zhang *et al.* (2008) observaron que *Exophiala pisciphila*, el ESO más común en un sitio contaminado, mostró una tolerancia inherente a los MP *in vitro*. Se cree que los ESO forman asociaciones para sobrevivir en entornos estresantes (Li *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2013). Algunos autores mencionan que los ESO forma asociaciones mutualistas con la planta huésped, funcionando como reemplazo o complemento de hongos micorrízicos en ciertos ambientes estresantes

(Beauchamp *et al.*, 2005; Schulz y Boyle, 2005; Weishampel y Bedford, 2006), por lo que pueden ser parte integrante de la función de los ecosistemas contaminados con MP.

Análisis más detallados sobre los mecanismos de tolerancia fúngica a los metales y sus efectos en la supervivencia de la planta huésped en suelos con MP, conducirán finalmente a su empleo conjunto en programas de biorremediación (Khan, 2005). Los hongos ESO podrían estar determinando el establecimiento vegetal en el sitio minero y es muy posible que tengan un potencial relevante en los procesos de fitoextracción del Pb.

Como investigación a futuro, es necesario evaluar la tolerancia de los diferentes aislados de hongos ESO de Zacatecas, a diferentes concentraciones de Pb *in vitro* e *in planta*, con el objetivo de analizar la fisiología del sistema con vistas a utilizarse para transformar los desechos mineros. Los hongos ESO todavía son un grupo poco estudiado en el ámbito de la fitorremediación pero poco a poco está surgiendo el interés científico sobre ellos.

## 7. Conclusiones

- La capacidad de los 18 aislados de hongos ESO para crecer a 100 y a 200 mg Pb l<sup>-1</sup> sugiere una adaptación que han adquirido como organismos nativos de desechos mineros con altos niveles de ese metal.
- Los 18 aislados de hongos ESO cultivados a una concentración de 100 mg Pb l<sup>-1</sup> no modificaron la morfología, el crecimiento radial y la producción de biomasa.
- A una concentración de 200 mg Pb l<sup>-1</sup>, los 18 aislados exhibieron modificaciones en su macromorfología como el cambio de coloración probablemente atribuido a la acumulación de melanina y/o de complejos del metal.
- Las actividades enzimáticas fosfolipasa, proteasa y lipasa se vieron afectadas por la presencia del Pb a 200 mg l<sup>-1</sup>. En algunos aislados el metal incrementó la actividad, mientras que en otros se indujo o se reprimió.
- La actividad fosfolipasa fue la más afectada por el Pb al incrementarse en 7 aislados, reprimirse en uno e inducirse en otro más.
- Con base en su más alto índice enzimático de fosfolipasa y en la velocidad de crecimiento radial, los aislados A5 TAG, A1 TAG, A4 TAG, A11 TAG, todos pertenecientes al género *Alternaria*, son candidatos para utilizarse en ensayos de tolerancia en plantas seleccionadas para vegetar desechos mineros contaminados con Pb.

## 8. Literatura citada

- ABDUL T, I KHAN, ZT MAQSOOD. 2007. Critical behavior of Iron (III) with a typical catecholate siderophore. *Iranian Journal of Science and Technology*, 14(2): 106-111.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). 2007. Reseña toxicológica del plomo. [http://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/plomo/es\\_pb-portada.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/plomo/es_pb-portada.html)
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). 2010. Public Health Statement for Chlorine, Lead, Vanadium, Manganese, Copper and Zinc. <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/indexAZ.asp>.
- AGUIRRE W. 2010. Tolerancia a metales pesados a través del uso de micorrizas arbusculares en plantas cultivadas. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- ALLOWAY BJ. 1995. Soil processes and the behaviour of metals. In: Alloway BJ. Ed. *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic and Professional, London, p 38-57.
- ANAHID S, S YAGHMAEI, Z GHOBADINEJAD. 2011. Research note: Heavy metal tolerance of fungi. *Transactions C. Chemistry and Chemical Engineering*, 18: 502-508.
- ANDRADE S, P GRATÃO, R AZEVEDO, A SILVEIRA, M SCHIAVINATO, P MAZZAFERA. 2010. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, 68: 198-207.
- AUDET P, C CHAREST. 2007. Heavy metal phytoremediation from a metal-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147: 231-237.
- BALDRIAN P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 78-91.
- BAN Y, M TANG, H CHEN, Z XU, H ZHANG, Y YANG. 2012. The response of dark septate endophytes (ESO) to heavy metals in pure culture. *PLoS ONE*, 7(10): 1-11.
- BARGALLÓ M. 1955. La minería y la metalurgia en la América Española durante la época colonial. Fondo de Cultura Económica. 115 pp.
- BATISTA RA, A SANCHEZ. 2009. Heavy metals phytoremediation and microorganisms. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente: Medio Ambiente y Desarrollo*, 9(16): 1-6.
- BEAUCHAMP VB, JC STROMBERG, JC STUTZ. 2005. Interactions between *Tamarix ramosissima* (saltcedar), *Populus fremontii* (cottonwood), and mycorrhizal fungi: Effects on seedling growth and plant species coexistence. *Plant Soil*, 275: 221-231.
- BEAUDETTE LA, MB CASSIDY, L ENGLAND, JL KIRK, M HABASH, H LEE, JT TREVORS. 2002. Bioremediation of soils. In: Bitton G, J Wiley. Ed. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Interscience, New York, 722-737
- BECERRIL JM, O BARRUTIA, JL GARCÍA, A HERNÁNDEZ, JM OLANO, C GARBISU. 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas*, 16(2): 50-55.
- BEESEY L, E MORENO, JL GÓMEZ, E HARRIS, B ROBINSON, T SIZMUR. 2011. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Journal Environmental Pollution*, 159: 3269-3282.
- BELLION M, M COURBOT, C JACOB, D BLAUDEZ, M CHALOT. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 254: 173-181.

- BELTRÁN-GARCÍA MJ, T OGURA-FUJI, G Manzo-Sánchez, C Arias-Castro. 2006. Catalasas de Hongos Fitopatógenos: ¿Factores de Virulencia y Resistencia a los Fungicidas? *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1): 50-58.
- BOUSSAMA N, A OUARITI, A SUZUKI, MH GHORBAL. 1999. Cd-stress on nitrogen assimilation. *Journal of Plant Physiology*. 155: 310-317.
- BRAMBIL-COLOBRES EM, P LOZANO-ZARAIN. 1999. Metalotioneínas, bioquímica y funciones propuestas. *Boletín de educación bioquímica*, 18(1): 21-22.
- BUKA I. 2001. Plomo y Salud Infantil. Boletín de la Comisión para la Cooperación Ambiental de América Del Norte.
- BYUNG-EUN K., T NEVITT, D THIELE. 2008. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology*, 4(3): 176-185.
- CÁMARA MINERA DE MÉXICO (CAMIMEX). 2014. Informe anual.
- CARRILLO-GONZÁLEZ R. 2005. Niveles de contaminación de los suelos y las plantas. En: GONZÁLEZ-CHÁVEZ MC, J PÉREZ-MORENO, R CARRILLO-GONZÁLEZ. (eds.). El sistema planta-microorganismo-suelo en áreas contaminadas con residuos de minas. Colegio de Postgraduados, Montecillo Estado de México, 161 p.
- CARRILLO-GONZÁLEZ R, GONZÁLEZ-CHÁVEZ MC. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environmental Pollution*, 144: 84-92.
- CARRILLO-PÉREZ E. E ACOSTA-SMITH, MONTESINOS-CISNEROS RM, DE LA TORRE M. 2013. Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propagules. *World Journal Microbiol Biotechnol*, 29: 309-317.
- CEVNIK M, M JURC, D VODNIK. 2000. Filamentous fungi associated with the fine roots of *Erica herbacea* L. from the area influenced by the Zerjav lead smelter (Slovenia). *Phyton; annales rei botanicae*, 40: 61-64.
- CHENG S. 2003. Heavy metal pollution in China: Origin, pattern and control. *Environmental Science and Pollution Research*, 10: 192-198.
- CHEN HS, QY HUANG, LN LIU, P CAI, W LIANG, M LI. 2010. Poultry manure compost alleviates the phytotoxicity of soil cadmium: Influence on growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.). *Pedosphere*, 20: 63-70.
- CHIEN SH, G CARMONA, LI PROCHNOW, ER AUSTIN. 2003. Cadmium availability from granulated and bulk-blended phosphate- potassium fertilizers. *Journal of Environmental Quality*, 32: 1911-1914.
- CHOUHDURY S, SK PANDA. 2004. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. Under lead and arsenic phytotoxicity. *Current Science*. 87(3): 342-348.
- CLEMENS S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486.
- CODLING EE, JC RITCHIE. 2005. Eastern gamagrass uptake of lead and arsenic from lead arsenate contaminated soil amended with lime and phosphorus. *Soil Science*, 170 (6): 413-423.
- COLANGUELO E, M GUERINOT. 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Plant Biology*, 9: 322-330
- COLPAERT JV, JHL WEVERS, E KRZARNIC, K ADRIAENSEN. 2011. How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Annals of Forest Science*, 68: 17-24.



CORTÉS-PENAGOS C, C GRADUEÑAS-PIÑA, S CARACHEO-AGUILAR, A OBREGÓN-HERRERA, P RAMÍREZ-SALGADO, F AMÉZQUITA-LÓPEZ, M HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, C CANO-CANCHOLA, L SOSA-LUNA, F GUTIÉRREZ-CORONA. 1994. Tolerancia a metales en hongos: mecanismos y aplicaciones. En: la Importancia Biológica de los Iones Inorgánicos. CERVANTES C, A SAAVEDRA-MOLINA, R FARIAS RODRÍGUEZ. (eds). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, p: 118-32.

CUYPERS A, J VANGRONSVELD, H CLIJSTERS. 1999. The chemical behaviour of heavy metals plays a prominent role in the induction of oxidative stress. *Free Radical Research*, 31: 539-543.

DE OLIVERA L. 2004. Heavy metal biosorption by chitin and chitosin isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 243-247.

EPSTEIN E, A BLOOM. 2004. Nutrición mineral de plantas. Trad Tenório ME, 2da Edición. Editora Planta. Brasil, p 112-115.

ERNST W, J VERKLEIJ, J SCHAT. 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 41: 229-248.

FERREIRA C, A MARIA, RM PEROLTA. 1999. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strains (*Penicillium wortmanii*). *Journal Basic Microbiol*, 39: 11-5.

FLORES-TORRES G. 2015. Colonización de hongos micorrízicos arbusculares y endófitos septados oscuros en raíces de plantas establecidas en desechos mineros. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Ciudad de México. 58 p.

FOGARTY RV, JM TOBIN. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Tech*, 19: 311-317.

GADD GM. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124: 25-60.

GADD GM, AJ GRIFFITHS. 1977. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4: 303-317.

GADD GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111(1): 3-49.

GALLI U, H SCHÜEPP, C BRUNOLD. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*. 926: 364-368.

GAUR A, A ADHOLEYA. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metals contaminated soils. *Current Science*, 86 (4): 528-534.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ MC, R CARRILLO-GONZÁLEZ, SF WRIGHT, KA NICHOLS. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*. 130, 317-323.

GONZÁLEZ E, E GONZÁLEZ, C BEDOLLA, E ARROLLO, E MANZANARES. 2008. Niveles de plomo en sangre y factores de riesgo por envenenamiento de plomo en niños mexicanos. Universidad de Antioquia, *Revista Facultad de Ingeniería*, 43: 114-119.

GONZÁLEZ MC. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23: 29-37.

Ewa Gucwa-Przepióra, J Błaszczkowski, R Kurtyka, Ł Małkowski, E Małkowski. 2013. Arbuscular mycorrhiza of *Deschampsia cespitosa* (Poaceae) at different soil depths in highly metal-contaminated site in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 82 (4): 251-258.

- GUILLEN Y, A MACHUCA. 2008. The effect of copper on the growth of wood-rotting fungi and a blue-stain fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 31-37.
- GUITART R, J SERRATOSA, VG THOMAS. 2002. Lead-poisoned wildfowl in Spain: A significant threat for human consumers. *International Journal of Environmental Health Research*, 12: 301-9.
- HANKIN L, SL ANAGNOSTAKIS.1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597-607.
- HERNÁNDEZ E, E MONDRAGÓN, D CRISTOBAL, JE RUBIÑOS, S ROBLEDO. 2009. Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Forestal y del Ambiente*, 15: 109-14.
- HILDEBRANDT U, M REGVAR, H BOTHE. 2006. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68(1): 139-146.
- JÄRUP L.2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167-182.
- JING Y, Z HE, X YANG. 2007. Role rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8: 192-207.
- JONER EJ, R BRIONES, C LEYVAL. 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil*, 226: 227-234.
- JOHNSON MS, MT NEILY, PO PUTWAIN.1977. Revegetation of metaliferous mine soil contaminated with lead and zinc. *Environmental Pollution*, 12: 261-277.
- JUMPPONEN A, JM TRAPPE. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi. *New Phytologist*, 140: 295-310.
- KHAN AG. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18: 355-364.
- KRAMER V. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current opinions in Biotechnology*, 16: 133-141.
- KOMARNICKI GJK. 2000. Tissue, sex and age specific accumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) by populations of the mole (*Talpa europaea* L.) in a central urban area. *Chemosphere*, 41: 1593-1602.
- KUMPIENE J, A LAGERKVIST, C MAURICE. 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments: A review. *Waste Management*, 28: 215-225.
- KUREPA J, M VAN MONTAGU, D INZE. 1997. Expression of sodCp and sodB genes in *Nicotiana tabacum*: Effects of light and copper excess. *Journal of Experimental Botany*, 48: 2007-2014.
- LANFRANCO L, A BOLCHI, EC ROS, S OTTONELLO, P BONFANTE. 2002. Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiol*, 130: 58-67.
- LE DUC D, N TERRY. 2005. Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32: 514-520.
- LI T, MJ LIU, XT ZHANG, HB ZHANG, T SHA, ZW ZHAO. 2011. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment*, 409: 1069-1074.
- LI HY, DW LI, CM HE, ZP ZHOU, T MEI, HM XU. 2012. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*, 5: 309-315.

- LIU L, HS CHEN, P CAI, W LIANG, QY HUANG. 2009. Immobilization and phytotoxicity of Cd in contaminated soil amended with chicken manure compost. *Journal of Hazardous Materials*, 163: 563-567.
- MAGHSOODI V, J RAZAVI, S YAGHMAEI. 2007. Production of Chitosan by submerged fermentation from *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Journal*, 16(2): 180-184.
- MAHADIK ND, US PUNTAMBEKAR, KB BASTAWDE, JM KHIRE, DV GOKHALE. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38: 715-721.
- MALDONADO-MENDOZA IE, GR DEWBRE, MJ HARRISON. 2001. A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 14: 1140-1148.
- MALINOWSKI DP, BELESKY DP. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40: 923-940.
- MALLICK N. 2003. Biotechnological potential of *Chlorella vulgaris* for accumulation of Co and Ni from single and metal solution. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 695-701.
- MANDYAM K, A JUMPPONEN. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, 53: 173-189.
- MIER T, C TORIELLO, M ULLOA. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. 90 p.
- MIER T, F RIVERA-BECERRIL, MA AYALA-ZERMEÑO, C TORIELLO, S AGUILAR, M ULLOA. 2013. Métodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. 103 p.
- MATTE TD. 2003. Efectos del plomo en la salud de la niñez. *Revista Salud Pública de México*, 45: 220-224.
- MEYER PA, F STALEY, P STALEY, J CURTIS, C BLANTON, MJ BROWN. 2005. Improving strategies to prevent childhood lead poisoning using local data. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 208: 15-20.
- MING LI, XUE TIAN, LIU RONG-ZI, CHEN WEN-LI, PENG CAI, RONG XING-MIN, KE DAI, HUANG QIAO-YUN. 2014. Combined application of rice straw and fungus *Penicillium Chrysogenum* to remediate heavy-metal-contaminated soil. *Soil and sediment contamination: An International Journal*, 23: 328-338.
- MOLLER P, L KNUDSEN, S LOFT, H WALLIN. 2000. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9: 1005-1015.
- MORSELT AFW, WTM SMITS, T LIMONARD. 1986. Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 96: 417-420.
- NORMA OFICIAL MEXICANA (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003). 2003. Límites máximos permisibles de Hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y Remediación. D. O. F. 29 de marzo de 2005.
- OGURA T, J RAMÍREZ-ORTIZ, ZM ARROYO-VILLASEÑOR, S HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, JP PALAFOX-HERNÁNDEZ, LH GARCÍA DE ALBA, Q FERNANDO. 2003. Zacatecas (México) companies extract Hg from surface soil contaminated by ancient mining industries. *Water Air Soil Pollut*, 148: 167-177.

- ORTIZ-CANO HC, R TREJO-CALZADA, RD VALDEZ-CEPEDA, JG ARREOLA-ÁVILA, A FLORES-HERNÁNDEZ, B LÓPEZ-ARIZA. 2009. Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y micorrizas. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 15(2): 161-168.
- PANDA SK, I CHAUDHURY, MH KHAN. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, 46: 289-294.
- PÉREZ-CORDERO A, Z BARRAZA-ROMAN, D MARTÍNEZ-PACHECO. 2015. Identificación de bacterias endófitas resistentes a plomo, aislados de plantas de arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2): 267-276.
- PONTÓN J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 78-82.
- PRASAD MN, HM FREITAS. 2003. Metal hyperaccumulation in plants biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3): 285-321.
- PUGA S, M SOSA, T LEBGUE, C QUINTANA, A CAMPOS. 2006. Contaminación por metales pesados en el suelo provocado por la industria minera. *Ecología Aplicada*, 5(1-2): 149-155.
- RAGSDALE HL, CW BERISH. 1988. The decline of lead in tree rings of *Carya* spp. in urban Atlanta, GA, USA. *Biogeochemistry*, 6: 21-29.
- REDMAN RS, KB SHEEHAN, RG STOUT, RJ RODRIGUEZ, JM HENSON. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298 (5598): 1581.
- REGVAR M, M LIKAR, A PILTAVER, N KUGONIC, JE SMITH. 2010. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant Soil*, 330: 345-356.
- ROBINSON B, R SCHULIN, B NOWACK, S ROULIER, M MENON, B CLOTHIER, S GREEN, T MILLS. 2006. Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated site. *Forest Snow and Landscape Research*, 80: 221-234.
- RODRÍGUEZ-ELIZALDE MÁ, A DELGADO-ALVARADO, MCA GONZÁLEZ-CHÁVEZ, R CARRILLO-GONZÁLEZ, JM MEJÍA-MUÑOZ, M VARGAS-HERNÁNDEZ. 2010. Emergencia y crecimiento de plantas ornamentales en sustratos contaminados con residuos de mina. *Interciencia*, 35(1): 26-32.
- RODRÍGUEZ-ORTÍZ JC, RD VALDEZ-CEPEDA, JL LARA-MIRELES, H RODRÍGUEZ-FUENTES, RE VÁZQUEZ-ALVARADO, R MAGALLANES-QUINTANAR, JL GARCÍA HERNÁNDEZ. 2006. Soil nitrogen fertilization effects on phytoextraction of Cd and Pb by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bioremediation Journal*, 10(3): 105-114.
- RODRIGUEZ RJ, JR WHITE, AE ARNOLD, RS REDMAN. 2009. Fungal endophyte: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182 (2): 314-30.
- RODRÍGUEZ-SERRANO, M., N. MARTÍNEZ DE LA CASA, M.ROMERO-PUERTAS, L.A. DEL RÍO, L.M. SANDALIO.2008. Toxicidad del Cadmio en Plantas. *Ecosistemas*, 17(3): 139-146.
- RUOTSALAINEN AL, A MARKKOLA, MV KOZLOV. 2007. Root fungal colonisation in *Deschampsia flexuosa*: effects of pollution and neighbouring trees. *Environmental Pollution*, 147: 723-728.
- SALAS-LUEVANO MA, E MANZANARES-ACUÑA, C LETECHIPIA-DE LEON, VM HERNÁNDEZ-DAVILA, HR VEGA-CARRILLO. 2011. Lead concentration in soil from an old mining town. *Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 289 (1): 35-39.

- SANTOS-SANTOS E, M YARTO-RAMÍREZ, I GAVILÁN-GARCÍA, J CASTRO-DÍAZ, A GAVILÁN-GARCÍA, R ROSILES, S SUAREZ, T LÓPEZ-VILLEGAS. 2006. Analysis of arsenic, lead and mercury in farming areas with mining contaminated soils at Zacatecas, México. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50: 57-63.
- SCHNAAS L, SJ ROTHENBERG, MF FLORES, S MARTÍNEZ, H CARMEN, E OSORIO, E PERRONI. 2004. Blood lead secular trend in a cohort of children in Mexico City. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1110-1115.
- SCHULZ B. 2006. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In: Schulz BJE, CJC Boyle, TN Sieber (eds.). *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag, Berlin, Germany p: 261-280.
- SCHULZ B, C BOYLE. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109: 661-686.
- SCHÜTZENDÜBEL A, POLLE A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stresses and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365.
- SEMARNAT. 2002. Action plan for La Zacatecana dam for the contention of heavy metals. México.
- SERVICIO GEOLÓGICO MEXICANO (SGM). 2011. Panorama minero del estado de Zacatecas. Coordinación general de Minería. Disponible en Internet en: [www.sgm.gob.mx](http://www.sgm.gob.mx)
- SINGH OV, S LABANA, G PANDEY, R BUDHIRAJA, RK JAIN. 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 405-412.
- SOSA M, B REYES, M MORENO, S MIRANDO, J ALCALÁ, C QUINTANA, S PUGA. 2008. Evaluación del impacto ambiental en suelo contaminado con Pb y Cd provocado por una empresa minera en la Ciudad de Chihuahua. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 4 (2): 155-161.
- ST. LEGER RJ, L JOSHI, DW ROBERTS. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to their requirements of their ecological niches. *Microbiology*, 143: 1983-1992.
- SU Z-Z, L-J MAO, N LI, X-X FENG, Z-L YUAN, L-W WANG, F-C LIN, C-L ZHANG. 2013. Evidence for biotrophic lifestyle and biocontrol potential of dark septate endophyte *Harpophora oryzae* to rice Blast disease. *PLoS ONE*, 8(4): 1-14.
- SYLVIA D, J FUHRMANN, P HARTEL, D ZUBERER. 2005. Principles and applications of soil microbiology. Pearson-Prentice Hall, New Jersey, NJ.
- TREJO-CALZADA R, NC GARCÍA, RD VALDEZ-CEPEDA, A FLORES-HERNÁNDEZ, ARREOLA-ÁVILA JG. 2007. Análisis de la variación espacial de plomo en suelos del área de Bermejillo, Durango. Memorias del Congreso de la Asociación Mexicana de Ingeniería Agrícola. Bermejillo, Durango, México, p: 120-129.
- TUDZYNSKI B, SHARON A. 2002. Biosynthesis, biological role and application of fungal phyto-hormones. In: Osiewacz HD (ed.) *The mycota X: industrial applications*. Springer-Verlag, Berlin, Germany p: 183-212.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2001. Treatment technologies for site cleanup: annual status report. 10th Edition. Office of Solid Waste and Emergency Response. Disponible en Internet en: <http://www.epa.gov/TIO>
- VAN DEUREN J, T LLOYD, S CHETRY, R LIOU, J PECK. 2002. Remediation technologies screening matrix and reference guide, 4th edition. Technology innovation office,

EPA Platinum International, Inc. Disponible en Internet en: [http://www.frtr.gov/matrix2/top\\_page.html](http://www.frtr.gov/matrix2/top_page.html).

VENKATESWARLU B, M MAHESWARI, N SAHARAN. 1989. Effects of water deficit on N<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) fixation in cowpea and groundnut. *Plant Soil*, 114: 69-74.

VERMA, S, RS DUBEY. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164: 645-655.

VRÅLSTAD T, E MYHRE, T SCHUMACHER. 2002. Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytologist*, 155: 131-148.

VODNIK D, H GRČMAN, I MAČEK, JT VAN ELTEREN, M KOVAČEVIČ. 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*, 392: 130-136.

WATANABE K. 2001. Microorganisms relevant for bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 12: 237-241.

WANG J, C CHEN. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27: 195-226.

WEISHAMPEL PA, BL BEDFORD. 2006. Wetland dicots and monocots differ in colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Mycorrhiza*, 16: 495-502.

XU X, Q HUANG, Q HUANG, W CHEN. 2012. Soil microbial augmentation by an EGFP-tagged *Pseudomonas putida* X4 to reduce phytoavailable cadmium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 71: 55-60.

XU R, T LI, H CUI, J WANG, X YU, Y DING, C WANG, Z YANG, Z ZHAO. 2015. Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Applied Soil Ecology*, 93: 11-18.

YADAV, S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76: 167-179.

YANG J, QU WANG, Q WANG, T WU. 2009. Heavy metals extraction from municipal solid waste incineration fly ash using adapted metal tolerant *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 100(1): 254-260.

ZHANG YJ, MJ LIU, XD SHI, ZW ZHAO. 2008. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals in vitro. *Journal of Microbiology*, 46(6): 624-632.

ZHANG Y, T LI, ZW ZHAO. 2013. Colonization Characteristics and Composition of Dark Septate Endophytes (DSE) in a Lead and Zinc Slag Heap in Southwest China. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22: 532-545.

ZHANG X, H WANG, L HE, L LU, A SARMAH, J LI, NS BOLAN, J PEI, H HUANG. 2013. Using biochar for remediation of soils contaminated with heavy metals and organic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 8472-8483.

### Capítulo 3

#### TRANSFERENCIA DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL PAPEL QUE DESEMPEÑAN LAS PLANTAS Y LOS HONGOS ENDÓFITOS SEPTADOS OSCUROS EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PLOMO

##### Abstract

Mining in Mexico is an important economic activity; however, it generates large volumes of solid wastes with high contents of lead (Pb) which are deposited on the surface of the environment, causing the burial of large areas of soil and vegetation. Today, the interest in remediate soils polluted with heavy metals (HM) is extremely necessary to minimize their impact on ecosystems. In general, the physical and chemical remediation methods cause irreversible changes on soil properties and disrupt the native soil microbiota; in addition, they are expensive and labor is intensive. In this regard, phytoremediation is an alternative biological method to address HM contamination; it is cost effective, efficient and environmentally friendly. The aim of this work was to disseminate information about the role of plants and root fungi in the remediation processes of soils contaminated with Pb. Knowledge transfer took place at two stages: firstly, by a seminar presentation and discussion, given to members of the Academic Body on Radiobiology of the Autonomous University of Zacatecas, Zacatecas, and through a presentation to specialists attending the Eighth National Symposium and V Iberoamerican Meeting of Mycorrhizal Symbiosis. The information was released at both sessions focused on DSE fungi associated to *Tagetes lunulata* and *Pennisetum villosum* roots in the tailings dam El Bote, in Zacatecas City, as well as on the methodological procedure for isolation and microbiological analysis of fungi associated to these plant species. Moreover, the benefits of transforming the conditions of the mining substrate in order to recover vital ecological soil processes with environmental regulation and provision services were reported. Based on the NOM-141-SEMARNAT-2013 it was proposed to use the plant species *Muhlenbergia emersleyi*, *Dasyochloa pulchella* and/or *Paspalum convexum* as strategy for vegetation of mine wastes in Zacatecas City. It was highlighted the importance of DSE fungi as a tool in phytoremediation programs, along with plant species and other groups of microorganisms. The plant-DSE fungi proposed system can be used in the early stages of phytoremediation of mine tailings; fungi are

biotechnological tools, inexpensive, with interesting environmental, economic and social benefits.

## **Resumen**

La minería en México es una actividad económica relevante; sin embargo, genera grandes volúmenes de residuos con altos contenidos de plomo (Pb) que son depositados en la superficie del entorno, causando el enterramiento de grandes áreas de suelo y vegetación. Hoy en día, el interés por remediar suelos contaminados con metales pesados (MP) es sumamente necesario para minimizar su impacto en los ecosistemas. En general, los métodos físicos y químicos de remediación ocasionan cambios irreversibles en las propiedades del suelo y perturban la microbiota nativa del suelo, además de que son de alto costo y la mano de obra es intensiva. A este respecto, la fitorremediación es un método biológico alternativo para enfrentar la contaminación por MP; es rentable, eficiente y amigable con el ambiente. El objetivo fue divulgar información sobre el papel de las plantas y hongos habitantes de raíz en la remediación de suelos contaminados con Pb. La transferencia de conocimientos se dio en dos fases: mediante un seminario con exposición y discusión, impartido a los miembros del Cuerpo Académico de Radiobiología de la Universidad Autónoma de Zacatecas, en Zacatecas, y a través de una ponencia a especialistas asistentes al VIII Simposio Nacional y V Reunión Iberoamericana de la Simbiosis Micorrícica. La información que se dio a conocer en ambos casos estuvo centrada en los hongos ESO asociados a las raíces de las plantas *Tagetes lunulata* y *Pennisetum villosum* establecidas en la presa de jales El Bote de la ciudad de Zacatecas, así como en divulgar el procedimiento metodológico para el aislamiento y análisis microbiológico de los hongos asociados a las plantas mencionadas. Además, se relataron los beneficios de transformar las condiciones del sustrato minero para recuperar los procesos ecológicos vitales del suelo junto con los servicios ambientales de regulación y provisión. Con base en la NOM-141-SEMARNAT-2013 se propuso utilizar las plantas *Muhlenbergia emersleyi*, *Dasyochloa pulchella* y/o *Paspalum convexum* en una estrategia de vegetación del jal minero en Zacatecas. Lo más relevante es haber resaltado a los hongos ESO como una herramienta en programas de fitorremediación, junto con especies vegetales y otros grupos de microorganismos. El sistema planta-hongo ESO propuesto puede utilizarse en las primeras etapas del proceso de fitorremediación de jales mineros; los hongos son



herramienta biotecnológica de bajo costo y con enormes ventajas ambientales, económicas y sociales.

## **1. Introducción**

La fitorremediación es una tecnología innovadora que utiliza plantas y los microorganismos asociados a su rizosfera para la remediación *in situ* y *ex situ* de suelos, lodos, sedimentos y aguas contaminados, a través de la remoción, degradación o estabilización de los contaminantes (Van Deuren *et al.*, 2002; Le Duc y Terry, 2005).

Uno de los grupos microbianos que participan en el proceso de fitorremediación son los hongos; estos organismos son heterótrofos, están presentes en todos los ambientes, son de vida libre o simbioses mutualistas de plantas y patógenos, y descomponedores de materiales naturales y manufacturados (Burford *et al.*, 2003). También tienen una función en el mantenimiento de la estructura del suelo. El papel de los hongos en los ciclos biogeoquímicos de los elementos (carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, metales) es fundamental y está basado en su capacidad para adoptar una variedad de sistemas de crecimiento, metabolismos y estrategias morfológicas, en su capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas y, así como en sus asociaciones mutualistas con los animales, las plantas, las algas y las cianobacterias. La adaptabilidad a diferentes ambientes permite a los hongos tener estrategias flexibles de crecimiento y de resistencia contra factores extremos, incluyendo la radiación, la desecación y la toxicidad por metales (Gadd, 2004; Braissant *et al.*, 2004; Fomina *et al.*, 2005; Gadd, 2007). Dentro del universo de los hongos se encuentran los endófitos septados oscuros (ESO), los cuales se asocian con las plantas durante al menos una fracción de su historia de vida (Kusari *et al.*, 2012); pertenecen a un grupo diverso de los Ascomycetes anamórficos dematiáceos que colonizan intra e intercelularmente las raíces y los tejidos aéreos vegetales; forman asociaciones desde el mutualismo hasta el parasitismo en sitios con estrés ambiental (Jumpponen, 2001; Grünig *et al.*, 2008). Jumpponen y Trappe (1998) mencionan que los hongos ESO colonizan las raíces de una gran cantidad de especies vegetales, desde los trópicos hasta el ártico (Yuan *et al.*, 2010; Newsham *et al.*, 2009), especialmente en ambientes estresantes tales como los sitios contaminados por metales pesados (MP) (Mandyam y Jumpponen, 2005; Zhang *et al.*, 2008).

## **2. Objetivo**

Divulgar información sobre el papel que algunas plantas y microorganismos habitantes de raíz representan en la remediación de suelos contaminados con plomo

### 3. Propuesta de transferencia de tecnología

La transferencia alcanzada con la presente investigación fue una transferencia de conocimiento, llevada a cabo en dos fases:

Fase 1: Transferencia del conocimiento mediante un seminario con exposición y discusión, impartido a los miembros del Cuerpo Académico de Radiobiología de la Universidad Autónoma de Zacatecas, en la ciudad de Zacatecas (Figura 1). Este grupo de investigación estudia desde hace varios años la interacción entre metales y metaloides con distintas especies vegetales en presas de jales del estado de Zacatecas. La información que se dio a conocer estuvo centrada en los hongos ESO asociados a las raíces de la planta nativa *Tagetes lunulata* y de la planta exótica *Pennisetum villosum*, establecidas en la presa de jales El Bote, en la ciudad de Zacatecas (Capítulos 1 y 2 de esta Idónea Comunicación de Resultados). Es la primera vez que se genera información micológica en los desechos mineros del estado, situación que despertó interés y retroalimentó las investigaciones llevadas a cabo por los miembros del Cuerpo Académico de Radiobiología; los hongos ESO fueron aislados, caracterizados fenotípicamente e identificados molecularmente, además de conocer su potencial para tolerar el Pb *in vitro*. De igual manera, se informó sobre el beneficio de utilizar los hongos ESO en conjunto con las plantas para los procesos de fitorremediación de desechos mineros.



Figura 1. Constancia de presentación de un seminario a miembros del Cuerpo Académico de Radiobiología de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Fase 2: Transferencia del conocimiento a estudiantes y profesionales asistentes al VIII Simposio Nacional y V Reunión Iberoamericana de la Simbiosis Micorrízica, con la ponencia “Aislamiento y caracterización de hongos endófitos septados oscuros procedentes de desechos mineros”, dentro de la sesión Biotecnología y Restauración Ambiental (Figura 2). La información dada a conocer se enfocó en el procedimiento metodológico para el aislamiento y el análisis microbiológico en cultivo puro de los hongos ESO presentes en el interior de las raíces de las plantas *T. lunulata* y *P. villosum*, procedentes de la presa de jales El Bote, en la ciudad de Zacatecas. Es la primera vez en México que se aíslan hongos ESO en cultivo puro a partir de desechos mineros y se proponen como herramientas en fitorremediación; por tanto, durante la presentación se subrayó el potencial de este grupo de hongos, en conjunto con las plantas, en estrategias de fitorremediación de sustratos o suelos con problemas de contaminación metálica.



Figura 2. Constancia de presentación oral dentro del VIII Simposio Nacional y V Reunión Iberoamericana de la Simbiosis Micorrízica.

En ambas sesiones fueron resaltados los beneficios de transformar las condiciones del sustrato minero para recuperar los procesos ecológicos vitales del suelo, junto con los servicios ambientales de regulación y de provisión. Además, el uso conjunto de plantas y microorganismos conlleva un potencial económico en fitominería, que para el suelo y el entorno es un proceso menos agresivo donde las plantas poseen la facultad de acumular en sus tejidos los metales pesados de los sitios contaminados. Las especies vegetales

seleccionadas serían especies originarias de la región a remediar, lo cual garantizaría la sucesión y permanencia con un mínimo de conservación; la NOM-141-SEMARNAT-2013 resalta el utilizar especies nativas para la reforestación de jales en recuperación. Por lo anterior, las plantas consideradas para utilizar en un proceso de vegetación del jal minero en Zacatecas son:

- **CAMBRAY**

***Muhlenbergia emersleyi* Vasey**

Es un zacatón perenne que forma macollos duros; tallos de 80 a 150 cm de alto, gruesos y duros; hojas de 20 a 50 cm de largo y de 2 a 6 mm de ancho, aplanadas o dobladas, abundantes; panícula densa, de 20 a 50 cm; florecillas de 2 a 3 mm; semillas con cascarillas de color blanco, translúcidas; es común en bosques de encino y bosques bajos abiertos, y escaso en matorrales y pastizales cercanos al bosque; altitud: de 1,750 a 2,500 m. Condición: planta nativa, citada desde el sur de Estados Unidos hasta Oaxaca. Preferencia forrajera: mala a regular por sus hojas abundantes pero correosas, lo que evita que el metal acumulado en su sistema foliar pudiera pasar a algún eslabón de la cadena trófica.

- **ZACATE BORREGUERO**

***Dasyochloa pulchella* (Kunth) Willd. ex Rydb.**

Es un zacate perenne, con tallos de 4 a 10 cm de alto, con estolones; hojas de 2 a 7 cm de largo y de 3 a 5 mm de ancho, con el ápice agudo, involutas; panícula de 1 a 2.5 cm de largo y de 1 a 1.5 cm de ancho, de color verde pálido a púrpura, blanco lanosa; ramas con 2 a 4 espiguillas, de 6 a 9 mm de largo. Es común en sitios pobres y secos del pastizal, matorral xerófilo y matorral subtropical, a una altitud de 1,158 a 2,050 m. Condición: planta nativa del suroeste de Estados Unidos al norte de México. Preferencia forrajera: mala, es indicadora de disturbio, lo que evita que el metal acumulado pudiera pasar a algún eslabón de la cadena trófica.

- **ZACATE CAMELOTE**

***Paspalum convexum* Humb. & Bonpl. ex Flugge**

Es una planta anual, cespitosa; tallos de 10 a 60 cm de alto, simples, erectos o decumbentes; hojas de 5 a 25 cm de largo y de 5 a 7 mm de ancho, apiculadas, aplanadas; inflorescencia de 4 a 14 cm de largo, solitaria, terminal, con 2 a 5 racimos, de 3 a 7 cm de largo; espiguillas de 2 a 2.5 mm, dispuestas en 2 a 4 filas, de color olivo, suborbiculares. Es común en pastizales, matorrales xerófilos, bosques bajos de encino o de pino y encino, y en la orilla de arroyos; altitud: de 1,900 a 2,150 m. Condición: planta nativa, conocida desde el sur de Estados Unidos hasta Sudamérica. Preferencia forrajera: mala; se encuentra intacta en todas las épocas del año.

Los pastos por ser cosmopolitas son los más adecuados para la fitorremediación de formas orgánicas e inorgánicas con metales, por su hábitat de crecimiento y adaptabilidad a una variedad de condiciones edáficas y climáticas. Se ha reportado una gran diversidad de especies de pastos, probadas en campo y en laboratorio con potencial para ser utilizadas en fitorremediación. Además de proporcionar materia orgánica al suelo, los pastos permiten la fijación de nitrógeno atmosférico, mejoran la absorción de agua y la asimilación de nutrimentos del suelo, lo que ayuda a su conservación; también protegen los suelos de la erosión y conservan la humedad, por lo que pueden restaurar la fertilidad (Singh *et al.*, 2003).

#### **4. Factibilidad**

##### **4. 1. Ambiental**

El papel que juegan los ESO en los ecosistemas es clave en el ciclo de los elementos. Además, impactan localmente en la concentración de oxígeno, el pH, la producción de enzimas extracelulares y la liberación de metabolitos. Con respecto a las interacciones con las plantas, aumentan la biodisponibilidad de los nutrimentos y de metales no esenciales, favorecen el flujo de carbono y la productividad vegetal; modifican el funcionamiento biogeoquímico del sistema raíz-suelo-planta, propician el aumento de la actividad metabólica para combatir el estrés e incrementan la tolerancia contra el exceso de MP (Mandyam y Jumpponen, 2005; Gadd, 2007; Colpaert *et al.*, 2011). Los hongos han sido de interés científico debido a que resisten y se adaptan a los MP (Gadd, 1993). Las interfases formadas por los ESO difieren

de aquellas observadas en las micorrizas; los ESO son capaces de formar las interfases específicas y estructuras que permiten una asociación mutualista con los hospederos autótrofos (Barrow y Aaltonen, 2001). Los hongos ESO, bajo ciertas condiciones ambientales o experimentales, estimulan el crecimiento del hospedero y la absorción de nutrimentos, por lo que funcionan de una manera similar a los hongos de las asociaciones micorrízicas. Newsham (2011) menciona que los hongos ESO mejoran el rendimiento de la planta en condiciones controladas, sobre todo cuando el N está disponible en forma orgánica. También se ha observado que la asociación planta-hongo ESO está relacionada con un aumento de la resistencia vegetal contra herbívoros o patógenos. La presencia de este grupo de hongos podría alterar las poblaciones de herbívoros cercanas a las plantas infectadas, por lo que existe un interés en la utilización de hongos ESO como agentes de control biológico. El aumento de la resistencia contra nemátodos y hongos en plantas colonizadas por endófitos puede atribuirse a tres condiciones: inducción de los mecanismos de defensa, producción de sustancias antibióticas o competencia por el espacio o por nutrimentos de la planta (Zabalgogea, 2008). Son relativamente comunes los ejemplos de ESO productores de sustancias antibióticas (Kim *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Otro caso es la competencia directa del endófito al tener la capacidad de parasitar otros hongos (Rivera-Varas *et al.*, 2007).

La aplicación de estrategias de fitorremediación en jales mineros es relevante. Las plantas participan en (Valdés, 2010):

- El control de la erosión por viento y lluvia.
- El establecimiento de vegetación secundaria en dichas áreas.

Los microorganismos, como los hongos ESO, participan en:

- La inmovilización de metales.
- La transformación del entorno local (concentración de oxígeno, pH, producción de enzimas extracelulares y liberación de metabolitos orgánicos e inorgánicos).
- La interacción con las plantas (aumentan la biodisponibilidad de los nutrimentos, favorecen el flujo de carbono y la productividad vegetal; modifican el funcionamiento biogeoquímico del sistema raíz-suelo-planta; propician el incremento de la actividad metabólica para combatir el estrés y favorecen la tolerancia contra el exceso de MP).

## 4.2. Tecnológica-Económica

En el mercado ambiental de nuestro país existen diferentes empresas que ofrecen tecnologías para la remediación de sitios contaminados. Las tecnologías que aplican las empresas autorizadas están enfocadas exclusivamente en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, lodos aceitosos, lodos de perforación y recortes de perforación (INE, 2002). De un total de 57 empresas, ninguna ofrece servicios para la restauración de suelos contaminados con MP.

La fitorremediación de suelos contaminados se basa en el uso conjunto de plantas, en la transformación del suelo y en técnicas agronómicas para eliminar, retener o disminuir la toxicidad de los contaminantes, entre ellos los MP (Chaney *et al.*, 1997). Esta tecnología es especialmente útil para su aplicación en grandes superficies, con contaminantes relativamente inmóviles o con niveles bajos de contaminación, y deben considerarse procesos de recuperación a largo plazo. Entre las ventajas que presentan estas técnicas destacan: (1) que se pueden aplicar *in situ*, (2) son de bajo coste, (3) permiten su aplicación, tanto en suelos como en aguas, (4) sólo requieren prácticas agronómicas convencionales, (5) actúan positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas y, (6) son ambientalmente aceptables, debido a que se basan en la formación de una cubierta vegetal (Carpena y Bernal, 2007; Hazrat *et al.*, 2013).

## 4.3. Social

El suelo es uno de los mayores reservorios de contaminación ambiental (Alloway, 1995). El riesgo ambiental asociado con la contaminación de suelos se valora a partir de la concurrencia de tres factores: la concentración de contaminantes, la exposición a la contaminación por diferentes vías y la toxicidad de las sustancias. El Pb se considera un contaminante con relevancia ecotoxicológica (Komarnicki, 2000); es un metal carente de valor biológico debido a que no es requerido para el funcionamiento de los seres vivos. En los desechos mineros el suelo original se degrada o se pierde irreversiblemente por las altas concentraciones de Pb que se depositan (Becerril *et al.*, 2007). México se encuentra en el decimotercer lugar entre los países productores de Pb con 253,361 ton (CAMIMEX, 2014). La exposición al Pb y la consecuente intoxicación han sido de los principales problemas de salud ambiental en todo el mundo, particularmente en los países en desarrollo como México



(Schnaas *et al.*, 2004; Komarnicki, 2000). El Pb puede afectar casi todos los órganos y sistemas del cuerpo humano debido a su tamaño molecular y carga; puede sustituir el calcio, por lo que su área de acumulación es el tejido óseo; ocasiona pérdida de los reflejos, anemia, presión sanguínea alta, trastornos digestivos, dolor en los músculos y en las coyunturas, problemas en el sistema nervioso, daños al cerebro y envenenamiento cuando los niveles en la sangre alcanzan  $40 \mu\text{g dl}^{-1}$ . Los efectos del Pb en la salud de los niños incluyen problemas en el sistema nervioso central, y deficiencias de hierro, proteínas, calcio y/o zinc, ya que se absorbe con mayor facilidad (Puga *et al.*, 2006; Sosa *et al.*, 2008; Buka, 2001; Matte, 2003). En las mujeres embarazadas que laboran en ambientes expuestos a la contaminación, como es la minería, el Pb tiende a entrar al feto a través de la placenta y causar daños en el sistema nervioso y en el cerebro (Järup, 2003; Meyer *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008; Sosa *et al.*, 2008; Salas-Luevano *et al.*, 2011). González *et al.* (2008) reportaron que en Vetagrande, Zacatecas, los niveles de Pb en la sangre de los niños se ubican entre las categorías II y III, es decir, de envenenamiento según la NOM-199-SSA1-2002. Esta problemática se atribuye a las altas concentraciones del metal en el suelo ( $8.0\text{-}7,730 \mu\text{g g}^{-1}$  de Pb), que están por encima de los  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  establecidos por la EPA, por lo que el suelo de Vetagrande no es apto para uso residencial (Salas-Luevano *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, la propuesta de transferencia tecnológica que se presentó implica un beneficio social al impactar en la calidad de vida de la población cercana a los jales mineros, además de evitar que zonas agrícolas se contaminen debido a la dispersión del Pb.

#### 4. 4. Político-Legal

La Constitución es la vía de expresión de los valores fundamentales vigentes en la sociedad; de sus disposiciones se deriva la legislación secundaria que de forma específica regula la protección del suelo. Los principios de la Constitución Federal que tienen relación con el ambiente y por ende con el suelo, son los siguientes (Moreno, 2010):

- Derecho a un ambiente sano (Artículo 4)
- Derecho al desarrollo sustentable (Artículo 25)
- Principio de modalidades a la actividad industrial (Artículo 25)
- Principio de conservación de los recursos naturales (Artículo 27)
- Principio de conservación y restauración del equilibrio ecológico (Artículo 27)

- Sistema de concurrencias en materia ambiental (Artículo 73)

Según Cotler *et al.* (2007) existen dos perspectivas sobre el suelo. La primera es aquella que considera el suelo desde la perspectiva de apropiación, soporte de las actividades productivas y de los asentamientos humanos. La segunda es la perspectiva ambiental; considera el suelo como un recurso natural con un uso de explotación racional y como un elemento ambiental que debe ser protegido para preservar su salud ecológica a largo plazo en relación con los otros elementos naturales, como el agua, la biodiversidad y la atmósfera. Las perspectivas en la regulación jurídica del suelo engloban la siguiente legislación:

#### 1. Perspectiva del suelo como recurso natural:

- **Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente:** exige que para la realización de las actividades productivas se cuiden las funciones que realiza el suelo, y constituye con ello una limitación al uso irracional de este recurso (**Arts. 134 a 142**).
- **Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable:** busca conciliar la conservación de los recursos forestales con su aprovechamiento sustentable. Establece lineamientos que regulan el manejo del suelo como parte de los ecosistemas forestales.

#### 2. Perspectiva del suelo como elemento ambiental:

- **Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente:** aprovechamiento sustentable de los elementos naturales. Preservación y aprovechamiento sustentable del suelo y sus recursos.
- **Ley General de Vida Silvestre:** el suelo tiene metas de conservación, mantenimiento, mejoramiento o restauración.
- **Ley de Aguas Nacionales:** reparación del daño ambiental cuando se puedan contaminar los suelos (**Art. 96 BIS-1**).
- **Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos:** atiende la problemática de los suelos contaminados (**Art. 6**).
- **Ley General de Cambio Climático:** acciones de adaptación al cambio climático como el manejo, protección, conservación y restauración de los ecosistemas, recursos forestales y suelos.

- **Ley Federal de Responsabilidad Ambiental:** prescribe la compensación ambiental en los cambios de uso de suelo y la reparación del daño ambiental (**Arts. 2, 6**).

Otro de los instrumentos fundamentales son las Normas Oficiales Mexicanas (NOMs) en materia ambiental que permiten a la autoridad establecer los requisitos, especificaciones, condiciones, procedimientos, metas, parámetros y límites permisibles que deberán observarse en regiones, zonas, cuencas o ecosistemas para el aprovechamiento de recursos naturales, en el desarrollo de actividades económicas, en el uso y destino de bienes e insumos y en procesos. Además, las NOMs desempeñan un papel esencial en la generación de una atmósfera de certidumbre jurídica y promueven el cambio tecnológico con la finalidad de lograr una protección más eficiente del ambiente. En el cuadro 1 se mencionan las NOMs en materia de suelo (Brañes, 2000).

**Cuadro 1. Normas y regulaciones para la remediación del suelo**

NORMAS	REGULACIÓN
<b>NOM-052-SEMARNAT-2005</b>	Establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de residuos peligrosos. Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) el 23 de junio de 2006.
<b>NOM-055-SEMARNAT-2003</b>	Establece los requisitos que deben reunir los sitios que se destinarán para un confinamiento controlado de residuos peligrosos previamente estabilizados. D.O.F. el 3 de noviembre de 2004.
<b>NOM-056-ECOL-1993</b>	Establece los requisitos para el diseño y construcción de las obras complementarias de un confinamiento controlado para residuos peligrosos. D.O.F. el 22 de octubre de 1993.
<b>NOM-058-SEMARNAT-1993</b>	Establece los requisitos para la operación de un confinamiento controlado para residuos peligrosos. D.O.F. el 10 de diciembre de 2001.
<b>NOM-098-SEMARNAT-2002</b>	Protección ambiental-incineración de residuos, especificaciones de operación y límites de emisión de contaminantes. D.O.F. el 1 de octubre de 2004.
<b>NOM-157-SEMARNAT-2009</b>	Establece los elementos y procedimientos para instrumentar planes de manejo de residuos mineros. D.O.F. el 30 de agosto de 2011.

La minería en México toma en cuenta principalmente las siguientes tres normas:

**NOM-120-SEMARNAT-1997.-** Que establece las especificaciones de protección ambiental para las actividades de exploración minera directa, en zonas agrícolas, ganaderas o eriales y en zonas con climas secos y templados en donde se desarrolle vegetación de matorral xerófilo, bosque tropical caducifolio, bosques de coníferas o encinos.

**NOM-141-SEMARNAT-2003.-** Establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales.

**NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.-** Establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plomo, selenio, talio y vanadio.

Con respecto a los sitios contaminados y su remediación, acciones en materia de inspección y vigilancia, se encuentra el Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados (PNRSC), el cual es un instrumento estratégico y operativo formulado por la Federación a través de la SEMARNAT que se desarrolla a partir de dos ejes principales:

- **La prevención**, es decir, el manejo integral de materiales peligrosos a lo largo de todo su ciclo de vida.
- **La remediación de sitios contaminados**, que consiste en la reparación de los daños que se hubieren ocasionado por un inadecuado manejo de materiales y residuos peligrosos.

El propósito general del PNRSC es reducir el número de sitios contaminados para prevenir y disminuir los riesgos en la salud y el ambiente, así como prevenir la generación de los mismos. Tiene como visión del país en materia de remediación de sitios contaminados la gestión de sitios contaminados y la prevención de la generación de sitios contaminados; como misión, el PNRSC busca contar con un documento que guíe, direcciona y ordene las acciones que el gobierno federal y los actores públicos y privados involucrados emprendan para identificar, prevenir y revertir la contaminación de los recursos naturales en el país (SEMARNAT, 2008). La Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal (EMCV 2012-2030) menciona en su línea de acción 4.3 Reducción y prevención de contaminantes: 4.3.1

Promover la reducción o sustitución de agentes contaminantes como agroquímicos, metales pesados, entre otros, dañinos a la diversidad vegetal. Las instituciones encargadas al respecto son la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y el Instituto Nacional de Ecología (INE).

Es necesario considerar el Plan Estatal de Desarrollo de Zacatecas (2011-2016), que consta de cinco ejes de desarrollo, entre ellos el de Zacatecas Moderno. En este eje se hace énfasis en que se reducirán los riesgos ambientales como parte integral de las políticas públicas y el diseño de esquemas de regulación. El principio de sustentabilidad ambiental no será aislado; se considera fundamental reducir el ritmo de la deforestación y de la desertificación, hacer uso racional de los recursos naturales, así como enfrentar desafíos en materia de administración sustentable del agua. Entre los puntos a resaltar están el impulso a la ciencia, la tecnología y la innovación, la conservación de ecosistemas y el cuidado del medio ambiente, así como la cultura ambiental y la vinculación sectorial.

## **5. Conclusión**

La contaminación de suelos por MP es un problema ambiental muy grave; los métodos físicos y químicos de remediación son de alto costo y generan cambios irreversibles en las propiedades del suelo como la eliminación de la microbiota.

La fitorremediación de sitios contaminados con Pb como los desechos mineros, es una práctica favorable para el ambiente y ecológicamente responsable. Esta estrategia está centrada en la capacidad de las plantas para tolerar y/o acumular MP, en conjunto con los microorganismos rizosféricos, los cuales modifican la fisiología vegetal. Durante las dos fases de transferencia del conocimiento en la presente investigación, se resaltó el potencial de los hongos ESO como herramientas fundamentales para el establecimiento vegetal en sitios contaminados con MP. Los resultados son novedosos y constituyen el primer avance en el país de este grupo de hongos en desechos mineros; asimismo, se logró retroalimentar el trabajo desarrollado por otros grupos de investigación, a quienes fue planteado este grupo fúngico como nueva perspectiva. El sistema planta-hongo ESO propuesto en esta investigación podrá utilizarse en las primeras etapas del proceso de fitorremediación de jales mineros para transformar las condiciones del sustrato, con la finalidad de que otras especies vegetales puedan establecerse. Los hongos son herramienta biotecnológica de bajo costo y con enormes ventajas ambientales, económicas y sociales.

Antes de liberar en un sitio contaminado los hongos ESO junto con las plantas, es necesario llevar a cabo pruebas de compatibilidad entre ambos, así como descartar potencial fitopatogenicidad o alergenicidad de los hongos en humanos. Los 18 aislados de hongos ESO procedentes de los desechos mineros de Zacatecas, se encuentran depositados en un cepario para incrementar el conocimiento de su fisiología, y ser producidos y utilizados en procesos de remediación en un futuro cercano.

## 6. Literatura citada

- ALI H, E KHAN, M ANWAR. 2013. Review. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91: 869-881.
- ALLOWAY BJ. 1995. Soil processes and the behaviour of metals. In: Alloway BJ. Ed. Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and Professional, London, p 38-57.
- BARROW JR, RE AALTONEN. 2001. A method evaluating internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. Roots by dark septate fungi and how they are influenced by physiological activity. *Mycorrhiza*, 11: 199-205.
- BECERRIL JM, O BARRUTIA, JL GARCÍA, A HERNÁNDEZ, JM OLANO, C GARBISU. 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas*, 16(2): 50-55.
- BRAISSANT O, G CAILLEAU, M ARAGNO, EP VERRECCHIA. 2004. Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment. *Geobiology*, 2: 59-66.
- BRAÑES R. 2000. Manual de Derecho Ambiental Mexicano. Editorial Fondo de Cultura Económica, 2ª edición, México, p 68.
- BUKA I. 2001. Plomo y Salud Infantil. Boletín de la Comisión para la Cooperación Ambiental de América Del Norte.
- BURFORD EP, M KIERANS, GM GADD. 2003. Geomycology: fungal growth in mineral substrata. *Mycologist*, 17: 98-107.
- CÁMARA MINERA DE MÉXICO (CAMIMEX). 2014. Informe anual. Consultado en Junio 2015. Disponible en internet: <https://www.camimex.org.mx/index.php/secciones1/publicaciones/informe-anual/informe-anual-2014/>
- CARPENA RO, MP BERNAL. 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*, 16(2): 1-3.
- CHANEY RL, M MALIK, YM LI, SL BROWN, EP BREWER, JS ANGLE, AJ BAKER. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 279-284.
- COLPAERT JV, JHL WEVERS, E KRZARNIC, K ADRIAENSEN. 2011. How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Annals of Forest Science*, 68: 17-24.
- COTLER HELENA, E SOTELO, J DOMÍNGUEZ, ZORRILLA MARÍA, S CORTINA, L QUIÑONES. 2007. La conservación de suelos: un asunto de interés público, México, Gaceta Ecológica, 83: 6.
- FOMINA M, S HILLIER, JM CHARNOCK, K MELVILLE, IJ ALEXANDER, GM GADD. 2005. Role of oxalic acid over-excretion in toxic metal mineral transformations by *Beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 371-381.
- GADD GM. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124: 25-60.
- GADD GM, 2004. Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist*, 18: 60-70.
- GADD GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111(1): 3-49.
- GONZÁLEZ E, E GONZÁLEZ, C BEDOLLA, E ARROLLO, E MANZANARES. 2008. Niveles de plomo en sangre y factores de riesgo por envenenamiento de plomo en niños mexicanos. Universidad de Antioquia. *Revista Facultad de Ingeniería*, 43: 114-119.

- GRÜNIG CR, V QUELOZ, TN SIEBER, O HOLDENRIEDER. 2008. Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l.- *Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. *Botany*, 86: 1355-1369.
- HAZRAT A, E KHAN, MA SAJAD. 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91: 869-881.
- INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA (INE) 2002. Consultado en Junio 2015. Disponible en internet: <http://www.ine.gob.mx>
- JÄRUP L.2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167-182.
- JUMPPONEN A, JM TRAPPE. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi. *New Phytologist*, 140: 295-310.
- JUMPPONEN A. 2001. Dark septate endophytes are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza*, 11: 207-211.
- KIM HY, GJ CHOI, HB LEE, SW LEE, HK KIM, KS JANG, SW SON, SO LEE, KY CHO, ND SUNG, JC KIM. 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 332-337.
- KOMARNICKI GJK. 2000. Tissue, sex and age specific accumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) by populations of the mole (*Talpa europaea* L.) in a central urban area. *Chemosphere*, 41: 1593-1602.
- KUSARI S, VCVERMA, M LAMSHOFT, M SPITELLER. 2012. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1287-1294.
- LE DUC D, N TERRY. 2005. Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32: 514-520.
- MANDYAM K, A JUMPPONEN. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, 53: 173-189.
- MATTE TD. 2003. Efectos del plomo en la salud de la niñez. *Revista Salud Pública de México*, 45: 220-224.
- MEYER PA, F STALEY, P STALEY, J CURTIS, C BLANTON, MJ BROWN.2005. Improving strategies to prevent childhood lead poisoning using local data. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 208: 15-20.
- MORENO PM. 2010. Génesis, evolución y tendencias del paradigma del desarrollo sostenible, Miguel Ángel Porrúa, México, p 572.
- NEWSHAM KK, R UPSON, DJ READ. 2009. Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology*, 2(1): 10-20.
- NEWSHAM KK. 2011. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, 190: 783-793.
- PUGA S, M SOSA, T LEBGUE, C QUINTANA, A CAMPOS. 2006. Contaminación por metales pesados en el suelo provocado por la industria minera. *Ecología Aplicada*, 5(1-2): 149-155.
- RIVERA-VARAS VV, TA FREEMAN, NC GUSMESTAD, GA SECOR. 2007. Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. *Phytopathology*, 97: 1331-1337.
- SALAS-LUEVANO MA, E MANZANARES-ACUÑA, C LETECHIPIA-DE LEON, VM HERNÁNDEZ-DAVILA, HR VEGA-CARRILLO. 2011. Lead concentration in soil from an old mining town. *Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 289 (1): 35-39.



- SCHNAAS L, SJ ROTHENBERG, MF FLORES, S MARTÍNEZ, H CARMEN, E OSORIO, E PERRONI. 2004. Blood lead secular trend in a cohort of children in Mexico City. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1110-1115.
- SEMARNAT. 2008. Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados. Consultado en Junio 2015. Disponible en internet: [http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/programas/Documents/Programa\\_Nacional\\_Remediacion\\_Sitios.pdf](http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/programas/Documents/Programa_Nacional_Remediacion_Sitios.pdf)
- SINGH OV, S LABANA, G PANDEY, R BUDHIRAJA, RK JAIN. 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 405-412.
- SOSA M, B REYES, M MORENO, S MIRANDO, J ALCALÁ, C QUINTANA, S PUGA. 2008. Evaluación de impacto ambiental en suelo contaminado con Pb y Cd provocado por una empresa minera en la ciudad de Chihuahua. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 4(2): 155-161.
- VALDÉS A. 2010. Cómo controlan la erosión las raíces de las plantas. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana, XXIII (2). Consultado en Junio 2015. Disponible en internet: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol23num2/articulos/erosion/>
- VAN DEUREN J, T LLOYD, S CHETRY, R LIOU, J PECK. 2002. Remediation technologies screening matrix and reference guide, 4th edition. Technology innovation office, EPA Platinum International, Inc. Consultado en Junio 2015. Disponible en Internet: [http://www.frtr.gov/matrix2/top\\_page.html](http://www.frtr.gov/matrix2/top_page.html).
- WANG FW, RH JIAO, AB CHENG, SH TAN, YC SONG. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and *brefeldin a* obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 79-83.
- YUAN ZL, CL ZHANG, FC LIN, CP KUBICEK. 2010. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5): 1642-1652.
- ZABALGOGEAZCOA I. 2008. Review. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultura Research*, 6: 138-146.
- ZHANG YJ, MJ LIU, XD SHI, ZW ZHAO. 2008. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals in vitro. *Journal of Microbiology*, 46(6): 624-632.