
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

**Algunos aspectos fisiológicos de hongos endófitos septados oscuros
cultivados en presencia de plomo y su potencial en biorremediación**

QUE PRESENTA EL ALUMNO

Alfonso Eliseo Morales Mazariegos

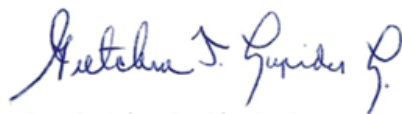
MATRÍCULA

2152032573

ASESORES



Dr. Facundo Rivera Becerril
UAM -XOCHIMILCO



Dra. Gretchen Lapidus Lavine
UAM- IZTAPALAPA

Ciudad de México

Abril de 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mis asesores de proyecto. Al Dr. Facundo Rivera Becerril, por la dedicación y apoyo que me brindó en todo este tiempo, por sus sugerencias e ideas y su dirección; gracias por la confianza ofrecida desde que llegué al laboratorio. Asimismo, a la Dra. Gretchen Lapidus Lavine, por su orientación en el campo de la espectrofotometría de absorción atómica y por haber brindado un gran apoyo para este proyecto, por permitirme trabajar con ella en su laboratorio y por su gran amabilidad, dedicación y confianza ofrecida desde el primer día de trabajo. También, agradezco al Dr. Enrique Barrera Calva, quien brindó el apoyo para llevar a cabo los análisis de difracción de rayos X en su laboratorio.

Del mismo modo, agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio de Micología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. A Penélope Solís Hernández, quien me orientó en diferentes aspectos metodológicos a lo largo de mi estadía en el laboratorio; a mi compañera Andrea Acevedo, por su gran ayuda en el proyecto, que siendo un trabajo conjunto me apoyó de una manera increíble; y a la Dra. Judith Castellanos Moguel, quien también me orientó y asesoró cuando las dudas se presentaban.

Por último, me gustaría dar un agradecimiento especial a mis padres Martha Alicia Mazariegos Duarte y Édgar Javier Morales Reyes, quienes me apoyaron a lo largo de mis estudios de licenciatura. Sin ellos no estaría en donde estoy ahora pues son el pilar más importante en mi vida.

ÍNDICE

PÁGINA

• Resumen.....	2
• Introducción.....	2
• Antecedentes.....	8
• Objetivos.....	9
• Objetivos particulares.....	9
• Metodología.....	9
○ Efecto del plomo en el crecimiento fúngico.....	10
○ Efecto del plomo en la solubilización del fosfato.....	10
○ Producción química de piromorfita en laboratorio.....	11
• Resultados.....	11
○ Crecimiento radial de los hongos en presencia de plomo.....	11
○ Producción de biomasa fúngica.....	13
○ Morfología fúngica.....	13
○ Efecto del plomo en la solubilización del fosfato.....	15
○ Producción de piromorfita en laboratorio.....	16
• Discusión.....	17
• Conclusiones.....	18
• Bibliografía.....	19

Resumen

Los hongos endófitos septados oscuros (ESO), son capaces de mejorar la resistencia contra metales pesados de las plantas, por lo que resultan de gran utilidad en procesos como la revegetación de sitios contaminados. Recientemente, se han hecho estudios sobre el potencial biorremediador de los ESO, por lo que el objetivo fue evaluar dicho potencial estudiando su comportamiento ante el plomo (Pb). Se estudiaron tres especies de hongos ESO, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum spaethianum* y *Acrocalymma vagum* aislados del interior de las raíces de la planta *Asphodelus fistulosus* presente en residuos mineros de Zacatecas. Las tres especies fúngicas fueron cultivadas en medio papa-dextrosa-agar, sometidas a diferentes concentraciones de Pb (300, 400 y 500 mg/L) y se midieron parámetros como el crecimiento radial y la biomasa de las colonias, así como aspectos macro y micromorfológicos. También se realizaron pruebas de solubilización de fosfatos en medio Pikovskaya, adicionado con 500 mg/l de Pb. Los resultados mostraron una tolerancia al Pb de los tres hongos, especialmente de *A. vagum*. Sin embargo, a concentraciones altas de Pb (500 mg/l), dos de las tres especies (*A. alternata* y *C. spaethianum*) presentaron alteraciones en su estructura, así como en la solubilización de fosfatos debido a que este proceso fue inhibido por el metal. Por último, se realizó la síntesis química de la piromorfita en el laboratorio para utilizarla como referencia en evaluaciones de síntesis fúngica.

Introducción

Los suelos están constituidos por roca meteorizada y materia orgánica, acumuladas a lo largo de años. La composición de un suelo varía según el lugar, la naturaleza de la roca madre, el clima y otros factores (Shayler *et al.*, 2009). El suelo es considerado un recurso fundamental que, junto con el agua, el aire y la biota, constituyen los cuatro recursos ambientales básicos que deben ser protegidos y preservados por sistemas legislativos y normas de actuación adecuados (Macías, 2004). Los suelos cumplen con importantes funciones de las que se derivan los servicios ambientales indispensables para el sostén tanto de los ecosistemas como de la vida humana (PNUMA, 2000). Un suelo se considera un sistema abierto a la atmósfera, pues almacena en forma temporal los recursos necesarios para los seres vivos. La disponibilidad de los recursos depende de la intensidad y velocidad de los procesos de intercambio entre el suelo y su entorno, y del comportamiento de los sistemas ecológicos (Jordán, 2006). El suelo también actúa en general como una barrera protectora de otros medios más sensibles, hidrológicos y biológicos: filtra, descompone, neutraliza o almacena contaminantes, y evita en gran parte su disponibilidad (Galán y Romero, 2008).

La degradación del suelo se refiere a la disminución de su productividad biológica y de su capacidad para sustentar cualquier tipo de vida. Esta pérdida es una manifestación de las actividades antrópicas como la deforestación, el sobrepastoreo, el uso de recursos u obras mineras que constituyen un riesgo no solo para el ecosistema, sino para la dinámica de la sociedad (Gómez, 2004).

La concentración nociva de algunos elementos químicos y compuestos en un suelo es un tipo especial de degradación que se denomina contaminación. Para que algunas sustancias, químicas o compuestas puedan ser considerados contaminantes, deben estar siempre en concentraciones mayores a las habituales y en general tener un efecto adverso sobre algunos organismos (Galán y Romero, 2008). Los contaminantes pueden ser de origen geogénico o antropogénico. Los primeros proceden directamente de la propia roca madre en la que se formó el suelo, también de la actividad volcánica o por lixiviados. Por su parte, los contaminantes antropogénicos se producen por los residuos peligrosos derivados de actividades industriales, agroquímicas o mineras, entre otras (Galán y Romero, 2008).

Las actividades mineras tienen como consecuencia la contaminación por metales pesados, la erosión del suelo y, por ende, modifican la estructura química del mismo. Esto tiene un impacto directo en la vegetación y ocasiona una alteración en el ecosistema y en la biodiversidad (SEMARNAT, 2014).

La extracción minera ha provocado disturbios en el ambiente y ha generado suelos con limitaciones físicas, químicas y biológicas para el establecimiento de la vegetación, así como riesgos para la salud humana (Puga *et al.*, 2006). En suelos contaminados con metales pesados tales como cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb), níquel (Ni) y zinc (Zn), se restringe el crecimiento de la mayoría de las plantas, excepto de aquellas que son tolerantes. Este tipo de contaminación afecta también la abundancia, diversidad y actividad de los organismos del suelo, inhibiendo así la descomposición y mineralización de la materia orgánica (Wong, 2003).

El Pb es uno de los metales pesados más tóxicos; puede acumularse en los organismos por no tener una función biológica definida y contaminar todos los niveles tróficos (Mercado *et al.*, 2009). Otro de los efectos del Pb sobre el ambiente es la degradación del paisaje, la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, y la alteración de la estructura y función del ecosistema. Las fuentes más importantes de exposición al Pb para los seres humanos son los alimentos, el aire y el agua. La mayoría del Pb presente en el cuerpo humano proviene de la alimentación (Mercado *et al.*, 2009). Este contaminante, una vez ingerido, llega al intestino en donde es absorbido y es distribuido a todo el cuerpo mediante el torrente sanguíneo (Mercado *et al.*, 2009). Los efectos toxicológicos del Pb son diversos, e incluyen: 1) contaminación de fetos e incremento de abortos, 2) aumento de muerte perinatal, 3) experimentalmente produce cáncer en animales. Adicionalmente, diferentes

estudios han reportado un aumento significativo de varios tipos de cáncer (estómago, pulmón y vejiga) relacionados a las altas concentraciones de metales pesados, pero aún no hay nada definitivo respecto a eventuales acciones cancerígenas o mutagénicas del Pb en el hombre (Ramírez, 2005).

En el suelo se encuentran las raíces de las plantas, las madrigueras de algunos mamíferos, los insectos y otros animales, así como las bacterias y los hongos en innumerables cantidades. Los hongos a menudo inician el proceso de descomposición de la materia orgánica y continúan en el suelo prosperando después de su muerte (Gilman, 1957).

Los hongos son organismos con su estructura absorbitiva formada por un sistema muy ramificado, el micelio, que crece generalmente de manera radial desde el punto de origen si las condiciones son iguales en ese punto (Gilman, 1957). En muchos suelos cultivados los hongos constituyen gran parte de la población microbiana total. Aunque los hongos parecen estar en menor proporción en comparación con las bacterias, aportan una parte significativa de la biomasa por el diámetro de sus filamentos y la extensa red que forma sus micelios (Alexander, 1980). Los hongos obtienen el carbono para la síntesis celular a partir de moléculas orgánicas. Entre las fuentes de carbono que utilizan se encuentran azúcares, ácidos orgánicos, disacáridos, almidón, pectina, celulosa, grasas y lignina resistente a la degradación bacteriana (Alexander, 1980).

No se tienen estimaciones cuantitativas exactas del número de hongos que se encuentra en el suelo, pero su función está bien establecida. En condiciones miceliales, su principal función es la degradación de moléculas complejas; dicha función se acelera con la adición de materia orgánica y esto suele ser más notorio en suelos con pH ácido pues la población fúngica aumenta. Algunos hongos pueden realizar transformaciones inorgánicas e influyen sobre la formación de agregados estables mediante la penetración de sus hifas y uniendo mecánicamente las películas del suelo (Alexander, 1980).

Los hongos tienen propiedades naturales especiales, tales como sus estrategias morfológicas, fisiológicas y reproductivas que los convierten en candidatos ideales para ser utilizados en la limpieza del aire, suelos y cuerpos de agua contaminados con metales tóxicos. En la actualidad estas propiedades son aprovechadas en un tipo de tecnología verde denominada biorremediación (Sánchez *et al.*, 2014; Gadd, 2001). Las plantas y los hongos que interactúan con ellas pueden aprovecharse en conjunto en estrategias de remediación de sitios contaminados con metales pesados. Asimismo, diversos hongos filamentosos se han estudiado para la eliminación de iones metálicos en efluentes industriales, por ejemplo, *Aspergillus niger*, Basidiomycetes, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium* y *Mucor* (Sánchez *et al.*, 2014).

Las relaciones simbióticas entre las plantas y los hongos tienen un efecto determinante en la ecología del suelo. Las plantas interactúan con hongos micorrízicos y endófitos. El grupo de los hongos endófitos septados oscuros (ESO) es uno de los más abundantes colonizadores de las raíces. Son hongos con hifas estériles, oscuras, septadas, que están presentes en una gran diversidad de especies vegetales (Gruning *et al.*, 2008) y en todos los ecosistemas terrestres desde los trópicos hasta la tundra, incluyendo los suelos agrícolas (Rodríguez *et al.*, 2008). Los hongos ESO, a diferencia de los micorrízicos que únicamente habitan las raíces, se encuentran también dentro de los tallos y las hojas. Son hongos muy diversos y representan un grupo polifilético, principalmente ascomicetos y distintos órdenes, con varios papeles ecológicos que aún no se han descrito (Rodríguez *et al.*, 2008). En una revisión, Jumpponen y Trappe (1998) determinaron que los hongos ESO se han asociado con aproximadamente 600 especies de plantas en todo el mundo, inclusive en plantas no micorrizadas. Los hongos ESO son capaces de mejorar la resistencia de las plantas a metales pesados, por lo que resultan de gran utilidad en procesos como la revegetación; muchas especies de hongos ESO son de vital importancia ya que son clave en los procesos de absorción de nutrientes por las plantas (Likar *et al.*, 2009; Porrás-Alfaro *et al.*, 2011).

A lo largo de la historia la minería ha sido el pilar de la economía de algunas naciones, pero también ha dejado una considerable cantidad de sitios perturbados, lo que confirma que es una de las principales causas de contaminación ambiental. Dicha actividad se ha realizado principalmente en zonas desérticas (Salas-Luévano *et al.*, 2017). La historia de la minería en Zacatecas comienza en la época prehispánica con el establecimiento de diversos grupos étnicos. Chalchihuites, al oeste del estado, fue uno de los asentamientos prehispánicos y arqueológicos más importantes de Mesoamérica y tuvo una economía basada en la minería, principalmente en la extracción de turquesas. La extracción de plata en Zacatecas fue uno de los principales impulsos que marcaron la expansión española hacia el norte de la Nueva España (Mexicano, 2017).

El Estado de Zacatecas se localiza en la región centro-norte del país, a una altitud promedio de 2,100 msnm. Tiene una superficie de 74,669 km², equivalente al 3.7% de la superficie del país, ocupa el octavo lugar nacional en extensión. Las coordenadas del estado son: latitud norte 25°08' y 21°03', longitud oeste 100°48' y 104°21'. Su clima es semiseco en la mayor parte del territorio, y en el noroeste es seco y árido. La temperatura media anual es de 16°C, con precipitación pluvial de 510 mm anuales. El sistema hidrográfico está formado por dos cuencas: la del Pacífico, integrada por el sistema Chapala-Río Grande de Santiago, y la cuenca interior endorreica (Mexicano, 2017).

En Zacatecas se presenta una gran diversidad de yacimientos minerales que apoyan el desarrollo industrial. Como consecuencia del incremento en la cotización de los metales se ha impulsado aún más la actividad minera en los años recientes. Actualmente destacan

importantes minas localizadas dentro de los distritos mineros de Concepción del Oro, Mazapil, Miguel Auza, Ojocaliente, Sombrerete, Zacatecas, Fresnillo y Vetagrande (Mexicano, 2017).

Todo lo anterior ha traído como consecuencia la acumulación de residuos mineros o jales, que son altamente abundantes debido a la explotación de dicha actividad industrial (Salas, 2009). En general, estos desechos se encuentran depositados a cielo abierto por lo que afectan negativamente la diversidad y actividad de los organismos del suelo (Wong, 2003).

Antecedentes

Li *et al.* (2011) inocularon plantas de maíz (*Zea mays*) con el hongo ESO *Exophiala pisciphila* en presencia de Pb, Zn y Cd. *E. pisciphila* logró colonizar y formó las típicas estructuras de los hongos ESO en las raíces de maíz inoculadas. La colonización fúngica mitigó los efectos nocivos del exceso de contaminantes y promovió el crecimiento de raíces y brotes vegetales. Un análisis más detallado mostró que la colonización de *E. pisciphila* mejoró la tolerancia del maíz a los metales pesados al restringir la translocación de los iones de las raíces a los brotes. Este estudio sugiere que bajo un estrés por metales pesados la interacción entre *E. pisciphila* y el maíz podría ser una estrategia eficiente para sobrevivir en ambientes contaminados.

Young *et al.* (2012) examinaron la actividad fúngica en presencia de Pb e identificaron la formación de cloropiromorfita, el mineral de Pb más estable que existe. De esta manera, se describió por primera vez la formación de cloropiromorfita micogénica a partir del Pb y se destacó la importancia de este fenómeno como un componente biótico de la biogeoquímica del metal. Lo anterior tiene repercusiones para la supervivencia microbiana y para la generación de tratamientos de micorremediación en ambientes contaminados con Pb.

Por su parte, Cervantes *et al.* (2006) mencionan que algunos sistemas microbianos como los hongos exhiben tolerancia contra metales y tienen el potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos, como la biorremediación de ambientes contaminados con metales tóxicos, o la recuperación de metales valiosos (fitominería).

Sánchez *et al.* (2014) refirieron que *Penicillium* es un potencial biosorbente de metales pesados. Este hongo colectado en una zona de estudio demostró la capacidad de eliminar Pb, Cd y Hg en solución acuosa. Al ser un hongo que se encuentra en las zonas contaminadas, se propone como un potencial biorremediador rentable para eliminar iones metálicos.

Yihui *et al.* (2012) realizaron estudios de la respuesta de hongos ESO inoculados en la planta *Astragalus adsurgens* en suelos contaminados con Pb y Zn. Al cultivar estos hongos

en medios líquidos con un aumento en la concentración de Pb, los cambios morfológicos como el ensanchamiento de las hifas estuvieron relacionados con modificaciones en la pared celular; hubo un aumento en la síntesis de melanina como respuesta antioxidante debido a la presencia de metales pesados. Lo anterior demostró que los hongos implementan mecanismos para reducir la absorción de metales y aumentar la inmovilización de los mismos.

Por otra parte, Akar *et al.* (2005) realizaron un estudio en donde el objetivo fue evaluar la capacidad bioabsorbente de la biomasa de *Aspergillus flavus* para la remoción de Pb y Cu de una solución acuosa. La biosorción de iones de metales pesados en la superficie de un microorganismo se vio afectada por varios factores como el pH, la concentración de iones, la temperatura y la concentración de biomasa. Los resultados indicaron que *A. flavus* puede usarse como un biosorbente económico, eficaz y fácilmente cultivable para la eliminación de iones de Pb y Cu en soluciones acuosas.

Iskandar *et al.* (2010) estudiaron hongos filamentosos aislados del sedimento de un río, en presencia de diferentes concentraciones de Cu (II) y Pb (II). La capacidad máxima de biosorción, basada en el peso seco, se determinó variando las concentraciones de iones en una solución acuosa. Los resultados arrojaron que *Aspergillus niger* y *Penicillium simplicissimum* fueron las dos especies con una mejor absorción de Pb (II), en comparación con el Cu (II). Sin embargo, la eficiencia de la absorción de metales disminuyó cuando el medio alcanzó una etapa de saturación del soluto.

Por su parte, Qing Jin *et al.* (2017) aislaron una especie de hongo ESO, *Acrocalymma vagum*, y estudiaron su efecto en el crecimiento de la planta de tabaco y la reducción de metales pesados en sus hojas. La biomasa total, la biomasa de raíces y brotes, así como el contenido de nitrógeno y fósforo en los brotes, tuvieron un aumento significativo en las plantas inoculadas en contraste con las no inoculadas. Las plantas inoculadas mostraron una disminución significativa de metales pesados en sus hojas.

Objetivo

Evaluar algunos aspectos fisiológicos de hongos endófitos septados oscuros en presencia de plomo.

Objetivos particulares

- Evaluar el impacto del plomo en la morfología, en el crecimiento radial, la esporulación y la producción de biomasa de los hongos endófitos septados oscuros.

- Analizar la capacidad de solubilización de fosfatos de los hongos endófitos septados oscuros en presencia de plomo.
- Estandarizar una metodología para evaluar la potencial producción fúngica de piromorfita.

Metodología

El presente trabajo tuvo como objeto de estudio tres especies de hongos ESO, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum spaethianum* y *Acrocalymma vagum*, previamente aislados del interior de las raíces de la planta *Asphodelus fistulosus*, proveniente de un jal abandonado en Vetagrande, Zacatecas, contaminado con Cd y Pb (Flores-Torres *et al.*, 2021). Los hongos fueron purificados y cultivados en medio papa-dextrosa-agar (PDA, 300 g de papa, 20 g de dextrosa, 15 g de agar, 1,000 ml de agua destilada), utilizando un tampón fosfato Sörensen (87.7 ml NaH_2PO_4 y 12.3 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) para ajustar el pH a 6.

Efecto del plomo en el crecimiento fúngico

Los hongos ESO fueron sometidos a diferentes tratamientos de Pb (300, 400 y 500 mg/l) utilizando $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, además de un tratamiento testigo sin el metal. Las concentraciones de Pb se basaron en la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-200 con respecto a los niveles de metales pesados en suelos agrícolas. Como medio de cultivo se utilizó el PDA siguiendo las indicaciones del manual de Mier *et al.* (2002). Previo a la inoculación del medio en los diferentes tratamientos, se cultivaron las tres especies fúngicas en PDA; después de dos semanas de desarrollo, se tomaron fragmentos circulares del cultivo con la boquilla de una pipeta Pasteur. Un fragmento circular se colocó en el centro de cada caja de cultivo a modo de inóculo. Cada tratamiento tuvo un total de seis réplicas. A continuación, se incubó a una temperatura de 25°C. Las variables de respuesta tomadas en cuenta fueron el crecimiento radial, la morfología colonial, la micromorfología, la esporulación y la producción de biomasa en peso fresco y peso seco. El crecimiento radial de cada colonia se midió diariamente durante siete días, para lo cual se dibujaron dos ejes debajo de la caja de cultivo y se registró el diámetro de ambos para así posteriormente obtener un promedio diario.

La caracterización de la morfología colonial consideró los aspectos mencionados en el manual de Mier *et al.* (2002) al séptimo día de incubación, al igual que la micromorfología y la esporulación, observadas al microscopio compuesto con el objetivo 40X. Por último, al día siete se extrajeron las colonias fúngicas del medio de cultivo y se secaron en el horno a 80°C por dos días, se pesaron en una balanza analítica y se obtuvo la biomasa en peso seco de todos los tratamientos.

Efecto del plomo en la solubilización de fosfato

Se utilizó el medio de cultivo Pikovskaya con las modificaciones sugeridas por Hernández-Leal *et al.* (2011), en donde en 1 l de agua se diluyeron 0.2 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0.1 g de KCl, 0.005 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de NaCl, 5 g de *D*-glucosa, 0.001 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g de extracto de levadura y 4.5 g de PDA. Posteriormente, la solución se ajustó a un pH de 6. Por otra parte, se realizó una solución de PO_4 . En 25 ml de agua destilada se diluyeron 0.25 g de goma arábica y 0.25 de $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$. Ambas soluciones se esterilizaron por separado en un autoclave, para después ser mezcladas momentos antes del vaciado en las cajas Petri. Por último, a una fracción del medio de cultivo se adicionaron 500 mg/l de Pb con el fin de estudiar la actividad solubilizadora de fosfatos de los hongos en un medio contaminado. Se incluyeron cinco repeticiones por tratamiento sin y con Pb por cada hongo; el método de inoculación fue el mismo mencionando previamente. A continuación se incubó a una temperatura de 25 °C durante 7 días. La medición del halo de solubilización se hizo a partir del día 2 de incubación, hasta el día 7 en donde el halo dejó de ser visible. La actividad solubilizadora se registró en porcentaje, según lo sugerido por Hernández-Leal *et al.* (2011), en donde se dividió el diámetro del halo de solubilización entre el diámetro colonial y se multiplicó por 100.

Producción química de piromorfita en laboratorio

La síntesis de piromorfita se realizó con base en una adaptación del método descrito por Topolska *et al.* (2016) a las condiciones del laboratorio. Se realizó una mezcla de soluciones acuosas de 3 M $\text{Pb} (\text{NO}_3)_2$, 0.14 M K_2HPO_4 y 0.05 M NaCl a volúmenes iguales de 500 ml a temperatura ambiente, por goteo, en forma sincronizada entre las tres soluciones en un matraz con 1 l de agua destilada y en agitación constante. El producto resultante se cubrió y fue puesto en reposo por dos semanas a temperatura ambiente. Después del periodo indicado, el producto fue separado por precipitación a través de un papel filtro y para medirlo se colocó en un desecador a 100°C durante 15 min y se pesó hasta peso constante. Posteriormente, en el Laboratorio de Rayos X a cargo del Dr. Enrique Barrera Calva (UAM-Iztapalapa), se realizó la caracterización estructural de la muestra con un difractómetro de rayos X, Bruker D8 Advance, con una radiación de $\text{Cu K}\alpha$. Finalmente, en el Laboratorio de Hidrometalurgia, a cargo de la Dra. Gretchen Lapidus Lavine, mediante espectrofotometría de absorción atómica con el equipo Varian SpectrAA 220 fs fue corroborada la pureza de la piromorfita.

Resultados

Crecimiento radial de los hongos en presencia de plomo

Después de siete días de incubación se observó que *C. spaethianum* no fue afectado al mostrar crecimientos similares en los cuatro tratamientos (Figura 1). Por su parte, *A. vagum* presentó una menor velocidad de crecimiento en el tratamiento con mayor concentración de Pb (500 mg/l). Sin embargo, en los tratamientos con cantidades inferiores de Pb (300 mg/l y 400 mg/l) no hubo diferencias en el crecimiento (Figura 2). Por su parte, en *A. alternata* se apreció un comportamiento diferente en el crecimiento radial, ya que a diferencia de las especies anteriores se observó una velocidad de crecimiento más elevada en el tratamiento con 300 mg/l de Pb que en el testigo. En cambio, los tratamientos con 400 mg/l y 500 mg/l de Pb presentaron un comportamiento semejante en el crecimiento, siendo estos visiblemente inferiores al apreciado en ausencia de Pb (Figura 3).

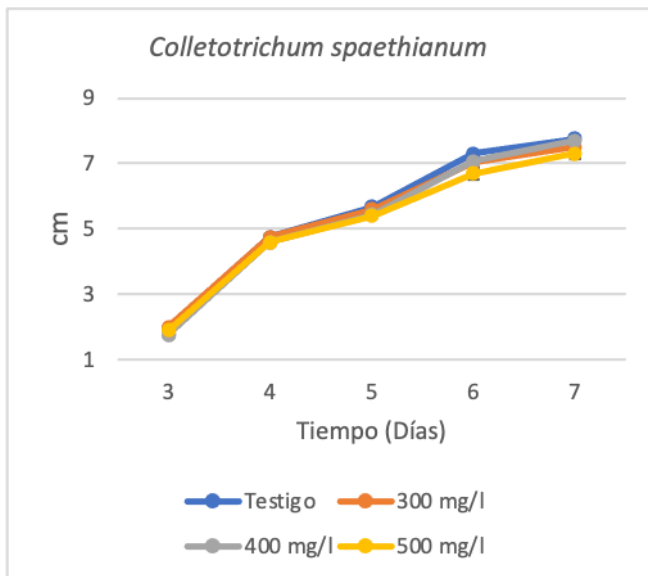


Figura 1. Curva de crecimiento de *Colletotrichum spaethianum* en presencia y en ausencia de Pb ($n=5$; las barras indican el ES).

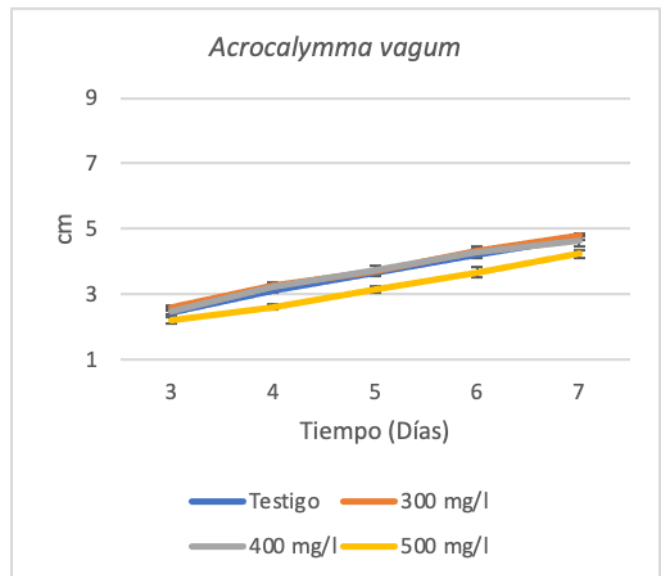


Figura 2. Curva de crecimiento de *Acrocalymma vagum* en presencia y en ausencia de Pb ($n=5$; las barras indican el ES).

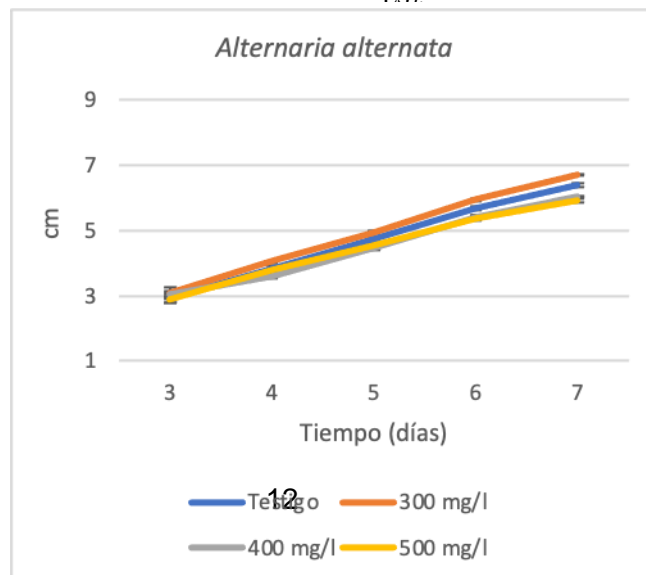


Figura 3. Curva de crecimiento de *Alternaria alternata* en presencia y en ausencia de Pb ($n=5$; las barras indican el ES).

Producción de biomasa fúngica

Con relación a la producción de biomasa, *C. spaethianum* mostró una disminución consistente en el peso fresco y seco a medida que se incrementó la concentración del metal y en comparación con el testigo. Por su parte, en *A. vagum* la menor producción de biomasa en peso fresco se apreció en el tratamiento 500 mg/l, pero al comparar la biomasa en peso seco no se identificaron diferencias entre tratamientos. Por otra parte, en *A. alternata* los valores menores tanto en peso fresco como en peso seco se observaron en los tratamientos con 300 mg/l y 500 mg/l de Pb, en contraste con el testigo y con 400 mg/l (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de biomasa de *Colletotrichum spaethianum*, *Acrocalymma vagum* y *Alternaria alternata* en presencia y en ausencia de Pb ($n=5 \pm ES$).

	Testigo	300 mg/l	400 mg/l	500 mg/l
Peso fresco (g)				
<i>C. spaethianum</i>	7.73 \pm 0.40	7.05 \pm 0.90	6.25 \pm 0.57	5.30 \pm 0.82
<i>A. vagum</i>	2.27 \pm 0.18	2.15 \pm 0.14	2.42 \pm 0.28	2.02 \pm 0.18
<i>A. alternata</i>	6.85 \pm 0.50	4.94 \pm 0.34	5.99 \pm 0.18	5.64 \pm 0.46
Peso seco (g)				
<i>C. spaethianum</i>	0.50 \pm 0.02	0.47 \pm 0.04	0.42 \pm 0.01	0.39 \pm 0.05
<i>A. vagum</i>	0.14 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02
<i>A. alternata</i>	0.40 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	0.30 \pm 0.03

Morfología fúngica

En medio PDA sin Pb la colonia de *C. spaethianum* presentó una morfología convexa con una coloración verdosa oscura, con una apariencia polvosa y una sectorización uniforme y definida; se observaron hifas en forma de bastón y septadas. No hubo estructuras reproductivas.

C. spaethianum mostró diferencias relevantes a nivel macro y micromorfológico al ser expuesto a ciertas concentraciones de Pb; se apreciaron modificaciones en la sectorización de la colonia, así como en las hifas y el micelio. Se observó una alteración morfológica en

las colonias e hifas en los tratamientos con mayor concentración de plomo (400 y 500 mg/l). En el caso de las hifas, se observó un engrosamiento globular en algunas de ellas y el estrechamiento de otras, tomando la forma de reloj de arena (Figura 4). Por otra parte, tampoco presentó conidios.

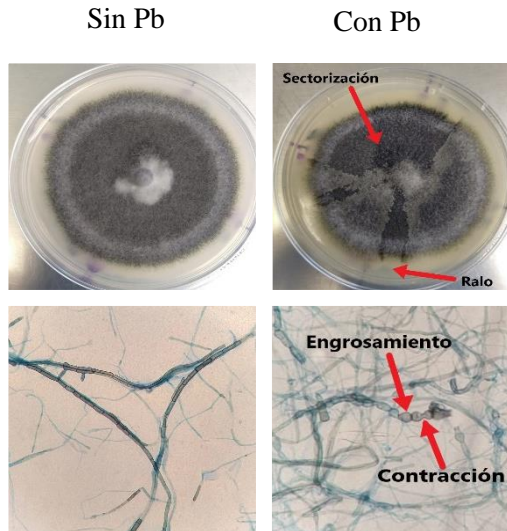


Figura 4. Observaciones macro y micromorfológicas de *Colletotrichum spaethianum* en ausencia y en presencia de Pb. Sectorización prominente y engrosamiento de hifas en presencia de Pb.

En medio PDA sin Pb la colonia de *A. vagum* exhibió una morfología convexa, un color verde grisáceo y una sectorización bien definida con un centro color blanco. Presentó un aspecto algodonoso y una pigmentación de color rojiza en el perímetro de la misma.

Al exponer *A. vagum* al Pb, presentó alteraciones mínimas en la morfología, como una forma irregular en el crecimiento radial y una pigmentación ligeramente más intensa que el testigo (Figura 5). En lo que a micromorfología se refiere, no hubo diferencias al microscopio compuesto y tanto en el testigo como en los demás tratamientos, fueron micelios estériles.

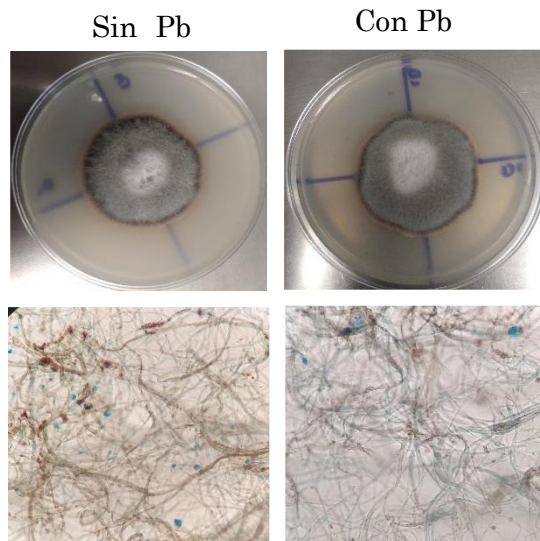


Figura 5. Observaciones macro y micromorfológicas de *Acrocalymma vagum*. No se apreciaron diferencias a nivel morfológico entre el testigo y los tratamientos con Pb.

A. alternata tuvo un crecimiento relativamente rápido en el medio PDA sin Pb, con una colonia convexa, de aspecto algodonoso y una coloración blanca en el reverso y gris en el anverso, con una sectorización en forma de anillos exteriores bien definida. A diferencia de *C. spaethianum* y *A. vagum*, esta especie presentó estructuras reproductivas, es decir, conidios en forma globular pero estrecha de un extremo.

A. alternata no presentó diferencias en la macro y micromorfología en presencia de Pb respecto al tratamiento sin Pb. Sin embargo, se detectó una ausencia de conidios en el tratamiento con mayor concentración de Pb (500 mg/l) (Figura 6).

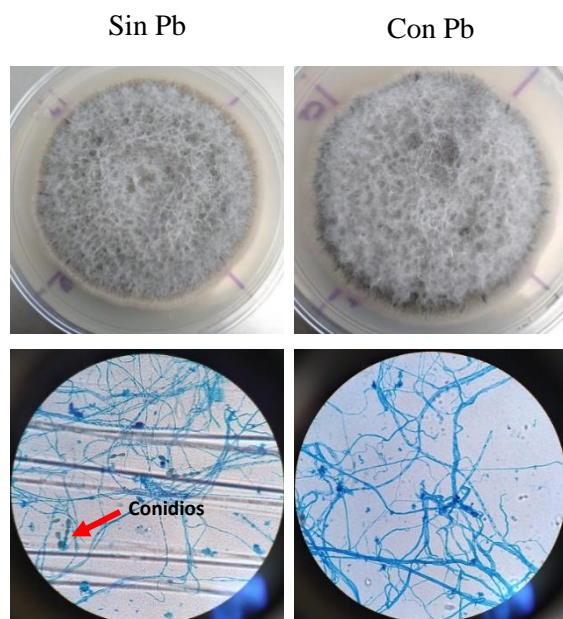


Figura 6. Observaciones macro y micromorfológicas de *Alternaria alternata* sin diferencias aparentes entre tratamientos. No se formaron conidios en el tratamiento con mayor concentración de Pb (500 mg/l).

Efecto del plomo en la solubilización de fosfato

Las tres especies de hongos ESO presentaron una actividad solubilizadora en ausencia de Pb, con un halo de solubilización transparente alrededor de la colonia a partir del día 2 de incubación en el caso de *A. alternata* y *C. spaethianum*, mientras que en *A. vagum* el halo de degradación comenzó a ser visible a partir del día 3 de incubación (Tabla 5; Figura 7). Todos los tratamientos en presencia de Pb no presentaron el halo de solubilización en ningún momento, lo que sugiere una inhibición de esta actividad por el metal. La morfología, el crecimiento, la coloración y el aspecto general de las colonias de las tres

especies en medio Pikovskaya fueron distintos a los observados en ausencia y en presencia de Pb en PDA. Con excepción de *C. spaethianum* cuyo aspecto fue polvoso, en los demás casos se apreció una coloración grisácea, sin sectorización y de aspecto algodonoso.

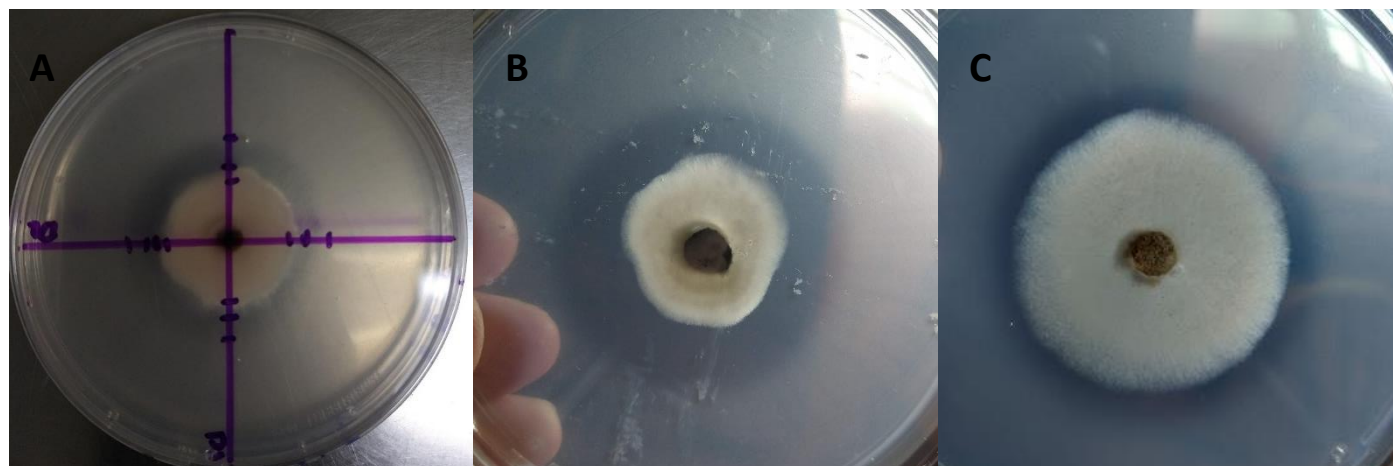


Figura 7. Halo de solubilización de fosfatos de tres especies de hongos ESO (**A:** *Acrocalymma vagum*, **B:** *Colletotrichum spaethianum*, **C:** *Alternaria alternata*) el día 4 de incubación. Las diferencias morfológicas de las colonias entre las tres especies fueron mínimas.

Tabla 5. Eficiencia de solubilización (ES) de *Colletotrichum spaethianum* (C.s.), *Acrocalymma vagum* (A.v.) y *Alternaria alternata* (A.a.) ($n=6 \pm ES$).

Día de incubación	Especie	Diámetro del micelio cm	Diámetro del halo cm	ESR%
2	<u>C.s.</u>	0.62 ± 0.19	1.39 ± 0.06	224
	<u>A.v.</u>	2.74 ± 0.07	0.58 ± 0.58	21
	<u>A.a.</u>	2.25 ± 0.09	3.09 ± 0.16	137
3	<u>C.s.</u>	1.48 ± 0.12	2.05 ± 0.07	138
	<u>A.v.</u>	3.31 ± 0.10	3.88 ± 0.03	117
	<u>A.a.</u>	2.67 ± 0.20	4.01 ± 0.14	150
4	<u>C.s.</u>	2.39 ± 0.07	2.97 ± 0.07	124
	<u>A.v.</u>	4.35 ± 0.13	5.61 ± 0.13	128
	<u>A.a.</u>	3.51 ± 0.15	5.85 ± 0.03	166
5	<u>C.s.</u>	3.28 ± 0.28	4.50 ± 0.07	137
	<u>A.v.</u>	4.65 ± 0.18	6.31 ± 0.18	135
	<u>A.a.</u>	3.77 ± 0.16	6.18 ± 0.10	163
6	<u>C.s.</u>	4.00 ± 0.38	5.56 ± 0.08	139
	<u>A.v.</u>	4.90 ± 0.15	6.37 ± 0.17	130
	<u>A.a.</u>	3.96 ± 0.22	6.78 ± 0.13	171
7	<u>C.s.</u>	4.31 ± 0.46	6.43 ± 0.09	149

Piromorfita (Acoplamiento 2Theta/Theta)

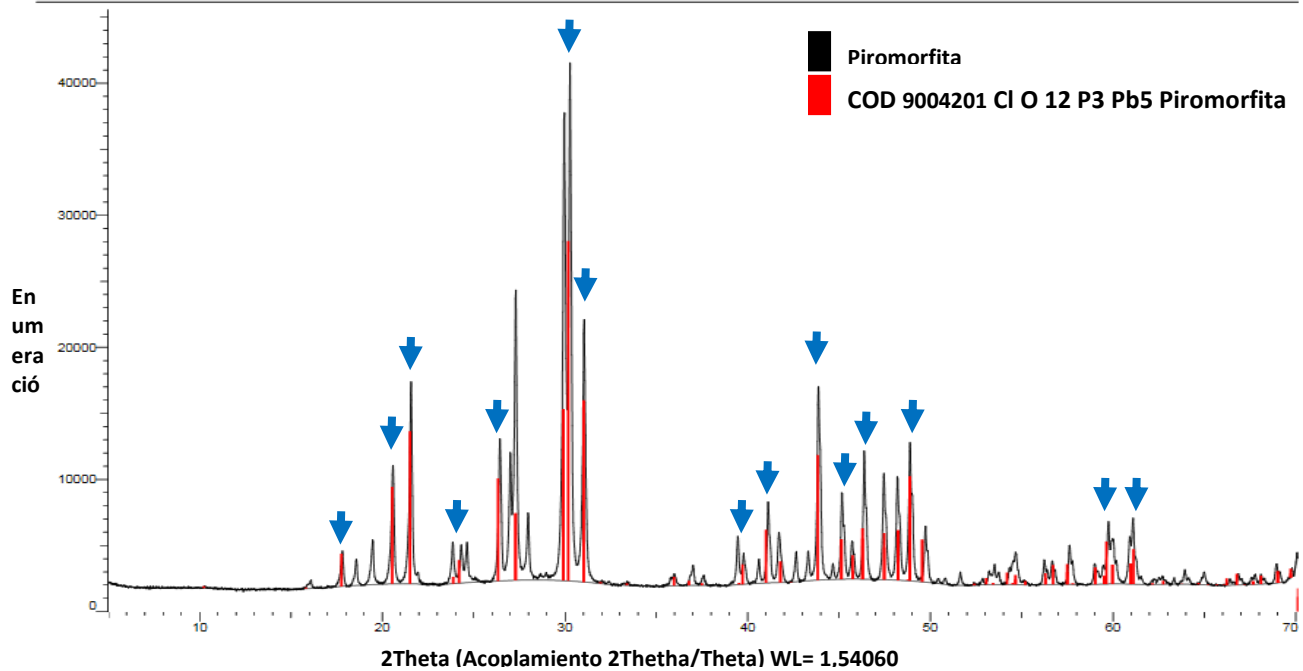


Figura 8. Cromatograma de la difracción de rayos X de la piromorfita. Las flechas en azul señalan cada uno de los elementos que componen la piromorfita.

Discusión

La problemática de la contaminación por Pb en los suelos de México se ha ido agravando poco a poco en los últimos años. Romieu *et al.* (1994) mencionan que muchos países incluido México, comenzaron a enfrentarse a una epidemia en gran parte no reconocida de intoxicación por Pb en comunidades vulnerables. Por otra parte, Salas *et al.* (2016) reportan que en una comunidad conocida como San Ignacio hay una importante contaminación por Pb producida por la planta de reciclaje, la cual ha almacenado en forma inapropiada grandes cantidades de desechos de Pb. En ese trabajo se reportó que varias especies de plantas silvestres mostraron una acumulación de Pb muy alta, especialmente *Acacia schaffneri*, *Buddleja scordioides*, *Tillandsia recurvata*, *Opuntia streptacantha* y *Amaranthus hybridus*. Por su parte, Flores-Torres *et al.* (2021) mencionan que a consecuencia de la actividad minera industrial se han reportado altos volúmenes de jales

que se encuentran dispersos en México, y que contienen metales pesados, incluido el Pb, lo que implica una amenaza contra todos los organismos.

Los resultados reportados en el presente estudio demostraron que *A. alternata*, *C. spaethianum* y *A. vagum* presentaron tolerancia contra diferentes concentraciones de Pb (300, 400 y 500 mg/l). Sin embargo, se apreciaron alteraciones en la morfología y fisiología a partir de concentraciones elevadas de Pb con 500 mg/l. Likar *et al.* (2009) mencionan que los hongos ESO poseen una gran tolerancia a ambientes extremos, al ser capaces de sobrevivir incluso en sitios con altas concentraciones de metales pesados. Según Zhang *et al.* (2013), gran parte de las especies de ESO se distribuyen en la mayoría de los ecosistemas, teniendo así una amplia gama de hábitats, incluso en entornos extremos, ya que poseen una gran adaptabilidad a condiciones adversas y nichos más amplios. Zhang *et al.* (2013) resaltan que las especies de ESO suelen ser dominantes en suelos contaminados con Pb, Cd y Zn.

Por otra parte, Ban *et al.* (2012) mencionan que los metales pesados ejercen efectos nocivos en la morfogénesis de las colonias de hongos, por ejemplo, hinchamiento y deformación de las hifas. Los mismos autores reportan cambios notables en la morfología de las colonias de diferentes especies de hongos ESO sometidos al Pb (*Gaeumannomyces cylindrosporus*, *Paraphoma chrysanthemicola*, *Phialophora mustea*, *Exophiala salmonis* y *Cladosporium cladosporioides*), como el incremento de melanina y la alteración en el crecimiento radial. En el presente estudio se reportaron modificaciones a nivel macro y micromorfológico, agudizadas en los tratamientos con una mayor concentración de Pb; las hifas mostraron alteraciones en su grosor y en su forma, así como en el color de las colonias y la forma de las mismas (colonias amorfas). Ello concuerda con lo reportado por Ban *et al.* (2012), en donde los hongos ESO sometidos a estrés por Pb mostraron las mismas alteraciones a nivel micro y macromorfológico; estos cambios pueden deberse a la variación de los componentes de la pared celular de los hongos.

Por otra parte, en el presente estudio también se reportó la actividad solubilizadora de fosfato de las tres especies fúngicas, al mostrar una eficiencia relativamente alta, donde *C. spaethianum* fue la especie con una mayor velocidad de solubilización. Sin embargo, al realizar los ensayos con Pb, ninguna de las tres especies fue capaz de realizar la actividad solubilizadora. Lo anterior concuerda con lo reportado por Ban *et al.* (2012), en donde mencionan que los procesos bioquímicos de los hongos tales como la actividad enzimática y el metabolismo disminuyen según se incrementa la concentración de Pb. Barrow y Osuna (2002) mencionan que los hongos forman asociaciones con las raíces de las plantas y mejoran la nutrición de las mismas a cambio de carbono fotosintético. Se estima que la población fúngica es la encargada de aportar hasta el 80% del fósforo biodisponible. Barrow y Osuna (2002) también mencionan que los hongos aumentan la disponibilidad de fósforo al secretar enzimas (fosfatasas) que hidrolizan el P orgánico, o liberan ácidos

orgánicos que solubilizan el P inorgánico. Teniendo esto en cuenta, y considerando los resultados en el presente estudio, el impacto ecológico causado por el Pb es relevante ya que se pudo observar una inhibición total de los procesos de solubilización de fosfatos por las tres especies de hongos estudiadas.

Por último, Young *et al.* (2012) examinaron la influencia de la actividad de los hongos en el Pb metálico y descubrieron que lo pueden utilizar para sintetizar cloropiromorfita o piromorfita, los cuales son los minerales de Pb más estables que existen. Esto es de importancia geoquímica no solo con respecto al destino del Pb y su ciclo en el ambiente, sino también en relación con el fósforo y las relaciones microbianas de transformación del mismo. En principio, en este estudio se sintetizó químicamente la piromorfita para ser utilizada como una referencia a comparar con la piromorfita que sintetizan los hongos ESO en experimentos futuros en un ambiente controlado.

Conclusiones

- Las tres especies de hongos ESO *Alternaria alternata*, *Colletotrichum spaethianum* y *Acrocalymma vagum* demostraron una notable tolerancia al Pb hasta concentraciones superiores a 300 mg/l. Sin embargo, *C. spaethianum* y *A. alternata* fueron las especies que más alteraciones presentaron a concentraciones de 400 y 500 mg/l de Pb, entre las que destacaron el hinchamiento y deformación de las hifas, y la inhibición de la esporulación en el caso de *A. alternata*.
- La especie más resistente fue *Acrocalymma vagum* al presentar una mejor respuesta ante el estrés por Pb, con mínimas alteraciones en concentraciones por encima de los 400 mg/l de Pb.
- Los tres hongos presentaron actividad solubilizadora de fosfatos en ausencia del metal, pero esta se vio inhibida totalmente en presencia de Pb. Ello sugiere un impacto negativo del metal en procesos ecológicos clave de los ecosistemas, como lo es la solubilización de fosfatos.
- La producción de piromorfita en laboratorio fue exitosa. La piromorfita sintetizada podrá ser utilizada como referencia para análisis posteriores de síntesis fúngica de piromorfita.

Bibliografía

- Akar D. y Tunali S. (2006). Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb (II) and Cu (II) ions from an aqueous solution. *Bioresource Technology*, 97(15). 1780–1787.
- Alexander M. (1994). *Introducción a la microbiología del suelo*. México, D.F. AGT Editor, S.A.
- Ban Y., Tang M., Chen H., Xu Z., Zhang H., y Yang Y. (2012). The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. *PLoS ONE*, 7(10). 3-4.
- Barrow, J. R., y Osuna, P. (2002). Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Journal of Arid Environments*, 51(3). 449–459.
- Castillo R., Roldán R., Blasco, P., Huertas R., Caballero D. y Moreno-Vivián, C. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid, España. Tébar, S.L.
- Cervantes C., Espino-Saldaña A., Acevedo A., León R., Rivera C., Avila R., Wróbel K., Wróbel Z., Gutiérrez C., Rodríguez Z. y Moreno S. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2). 203-210.
- Flores-Torres, G., Solis-Hernández, A. P., Vela-Correa, G., Rodríguez-Tovar, A. V., Cano-Flores, O., Castellanos-Moguel, J.,... Rivera-Becerril, F. (2021). Pioneer plant species and fungal root endophytes in metal-polluted tailings deposited near human populations and agricultural areas in Northern Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(1). 55072–55088.
- Gadd GM. *Fungi in bioremediation*. (2001). Nueva York, British Mycological Society.
- Galán H. y Romero B. (2008). Contaminación de suelos por metales pesados. *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*, 10(1). 48-60.
- Gilman, C. (1957). *A manual of soil fungi*. Iowa, The Iowa State University Press.
- Gómez OD. (2004). *Recuperación de espacios degradados*. México, D.F., Mundi-Prensa México, S.A. de C.V.

- Grunig C., Queloz V., Sieber T. y Holdenrieder O. (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.
- Iskandar N., Zainudin N., y Tan SG. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 23(5). 824–830.
- Jordán, L. (2006). Manual de edafología. Sevilla, Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla.
- Li, T., Liu, M. J., Zhang, X. T., Zhang, H. B., Sha, T., y Zhao, Z. W. (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(6). 1069–1074.
- Likar M. y Regvar M. (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(1). 6179–6187.
- Macías F. (2004). Recuperación de suelos degradados, reutilización de residuos y secuestro de carbono. Una alternativa integral de mejora de la calidad ambiental. *Recursos Rurais*, 1. 49-56.
- Mercado M., García M. y Quinatilla J. (2009). Evaluación de los niveles de contaminación por plomo y arsénico en muestras de suelos y productos agrícolas procedentes de la región cercana al complejo metalúrgico Vinto. *Revista Boliviana de Química*, 26(2). 101-110.
- Mexicano, S. G. (2017). Panorama minero del Estado de Zacatecas. México: Secretaría de Economía.
- PNUMA. (2000). Tierra y alimentos. In *GEO América Latina y el Caribe. Perspectivas del medio ambiente*. (pp. 21-25). Costa Rica: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- Porrás-Alfaro A., Herrera J., Natvig D. y Lipinski K. (2011) Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia* 103. 10–21.

- Puga S., Sosa M., Lebgue T. Quintana C. y Campos A. (2006) Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada* 5(1-2). 149-155.
- Ramírez, V. A. (2005). El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *Anales de la Facultad de Medicina*. 66(1). 57-70.
- Rhee, Y. J., Hillier, S., y Gadd, G. M. (2012). Lead transformation to pyromorphite by fungi. *Current Biology*, 22(3). 237–241
- Rodriguez, R. J., White Jr. J., Arnold A.E. y Redman R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314-330.
- Salas M., Manzanares E. y Letechipía C. (2009) Tolerante and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian Journal of Experimental Science*, 23(1). 27-32.
- Salas M., González R., Vega, C. y Salas, M. (2017). Accumulation and phytostabilization of As, Pb and Cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas, México. *Environmental Earth Sciences*, 76(23). 806.
- Sánchez C., Marrugo N. y Urango C. (2014). Remoción de plomo, cadmio y mercurio en un efluente minero por medio de biomasa de hongos *Penicillium* sp. *Memorias del II Seminario de Ciencias Ambientales Sue-Caribe & VII Seminario Internacional de Gestión Ambiental, 2014., Colombia*. 151-154.
- SEMARNAT. (2014). Suelos. El medio ambiente en México. Ciudad de México, SEMARNAT.
- Shayler H., McBride M. y Harrison E. (2009). Sources and impacts of contaminants in soils. Department of Crop & Soil Sciences. Cornell Waste Management Institute.
- Topolska, J., Manecki, M., Bajda, T., Borkiewicz, O., y Budzewski, P. (2016). Solubility of pyromorphite $Pb_5(PO_4)_3Cl$ at 5–65°C and its experimentally determined thermodynamic parameters. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 98, 282–287.

Wong, M. H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50 775-780.

Yihui B., Tang M., Hui C., Zhouying X., Haihan Z. y Yurong Y. (2012). The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. *Plos One*, 7(10). 1-11.