

Evaluating *Aspergillus terreus* tolerance to toxic metals

Evaluación de la tolerancia de *Aspergillus terreus* a metales tóxicos

Ana G. Villalba-Villalba^{1*} & Blanca González-Méndez²

¹CONACYT-Universidad de Sonora, Departamento de Física. Bulevar Rosales s/n, col. Centro. C. P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

²CONACYT-Estación Regional del Noroeste, IGL, Universidad Nacional Autónoma de México. Colosio y Madrid s/n, Los Arcos. C. P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

*Corresponding author: anagloria.villalba@unison.mx; tel.: +52 662 279 7175.

Abstract

Introduction: Metal pollution is one of the major environmental problems. Some metals are toxic at very low concentrations, bioaccumulate and do not decompose to non-toxic forms.

Objective: To isolate a strain of microscopic fungus in a site contaminated with toxic metals and to evaluate the tolerance to these substances.

Materials and methods: Fungi were isolated from the soil of an abandoned lead mine. Tolerance index of fungi to cadmium, mercury and lead was evaluated individually at concentrations of 50, 100, 250, 350 and 500 ppm; in addition, a multimetal system (mixture) with cadmium, chromium, mercury and lead was evaluated at 4, 8, 16, 64, 80, 120, 200 and 400 ppm. The minimum inhibitory concentration (MIC) was also determined.

Results and discussion: The isolated fungi were identified as *Aspergillus terreus*, which showed high tolerance indices for lead (0.9) at all concentrations tested and indices of 0.8 at most mercury concentrations. Cadmium was the most toxic metal; tolerance indices of 0.56 and 0.2 were observed at 50 ppm and 100 ppm, respectively. High tolerance indices (0.9) were observed in the multimetal system up to 64 ppm. MIC was greater than 500 ppm with lead and mercury, less than 250 ppm with cadmium and greater than 400 ppm with the multimetal system.

Conclusion: *A. terreus* showed high tolerance to lead at all concentrations tested. The level of tolerance is influenced by the type of metal.

Keywords: environmental pollution; lead; cadmium; filamentous fungi; minimum inhibitory concentration.

Resumen

Introducción: La contaminación por metales es uno de los principales problemas ambientales. Algunos metales son tóxicos a concentraciones muy bajas, se bioacumulan y no se descomponen a formas no tóxicas.

Objetivo: Aislar una cepa de hongo microscópico en un sitio contaminado con metales tóxicos y evaluar la tolerancia a dichas sustancias.

Materiales y métodos: El hongo se aisló de suelo de una mina abandonada de extracción de plomo. El índice de tolerancia del hongo al cadmio, mercurio y plomo se evaluó de manera individual a concentraciones de 50, 100, 250, 350 y 500 ppm; además, se evaluó un sistema multimetal (mezcla) con cadmio, cromo, mercurio y plomo a 4, 8, 16, 64, 80, 120, 200 y 400 ppm. También se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Resultados y discusión: El hongo aislado se identificó como *Aspergillus terreus*, el cual mostró índices de tolerancia altos al plomo (0.9) en todas las concentraciones evaluadas e índices de 0.8 en la mayoría de las concentraciones de mercurio. El cadmio fue el metal más tóxico; se observaron índices de tolerancia de 0.56 y 0.2 a 50 ppm y 100 ppm, respectivamente. En el sistema multimetal se observaron índices de tolerancia altos (0.9) hasta los 64 ppm. La CMI fue mayor de 500 ppm con plomo y mercurio, menor de 250 ppm con el cadmio y mayor de 400 ppm con el sistema multimetal.

Conclusión: *A. terreus* mostró alta tolerancia al plomo en todas las concentraciones evaluadas. El nivel de tolerancia se ve influenciado por el tipo de metal.

Palabras clave: contaminación ambiental; plomo; cadmio; hongo filamentoso; concentración mínima inhibitoria.

Introduction

Releasing toxic metals into the environment, due to mismanagement of anthropogenic activities, is an issue of great global concern. Due to the toxic nature of metals, their ability to accumulate, and the fact that they cannot be converted into non-toxic forms, these substances represent a threat to the environment and public health (Desai, Patel, & Joshi, 2016). There are just over 20 toxic metals, but those of highest priority are arsenic, lead, mercury, and cadmium (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2019). Such metals, even at very low concentrations, are cytotoxic, carcinogenic, and mutagenic; recently, they have been studied as potential initiators or promoters of cardiovascular diseases (atherosclerosis, hypertension, and myocardial infarction) (Meng, Wang, Li, Yin, & Zhang, 2017; Sevim, Dogana, & Comakli, 2020; Zolfaghari, 2018). These elements have also been reported to affect reproductive health in men (Tariba, 2020).

Some methods to remove toxic metals include ultrafiltration, reverse osmosis and chemical precipitation. Most of them are very expensive and not very efficient when the concentration of metals is very low; in addition, their process generates by-products that are also toxic (Fu & Wang, 2011; Gunatilake, 2015). Due to the above and combined to a change in awareness of environmental problems, there is a need to look for more environmentally friendly and economically viable alternatives (Dhankhar & Hooda, 2011). For this reason, attention has been focused on the search for microorganisms tolerant to toxic metals and with the capacity to remove these metals.

Among microorganisms, fungi are considered superior to single-celled organisms. In the fungi kingdom, filamentous or also known as microscopic fungi are multifaceted components, ubiquitous in the air and subsoil, and often become a dominant group in metal-contaminated habitats (Zafar, Aqil, & Ahmad, 2007). Studies have shown that fungal strains, isolated from contaminated areas, have potential to tolerate toxic conditions; due to their morphological diversity, they are better able to adapt to extreme values of pH, temperature, and nutrient availability (Iram et al., 2009; Kabata-Pendias, 2010); and develop constitutive and adaptive physiological and genetic mechanisms (Bellion, Courbot, Jacob, Blaudez, & Chalot, 2006; Gadd, 2007; Gube, 2016). Moreover, mycelial growth maximizes mechanical and enzymatic contact with the contaminant due to the increased cell-to-surface ratio. The main advantage of fungal strains isolated from contaminated sites is that they are adapted not only to the presence of contaminants, but also to the environmental conditions of the site. Therefore, the objective of the present study was to isolate a

Introducción

La liberación de metales tóxicos al ambiente, derivada del mal manejo de actividades antropogénicas, es un tema de gran preocupación mundial. Debido a la naturaleza tóxica de los metales, su capacidad de acumulación y a que no pueden convertirse en formas no tóxicas, estas sustancias representan una amenaza para el ambiente y la salud pública (Desai, Patel, & Joshi, 2016). Existen poco más de 20 metales tóxicos, pero los de mayor prioridad son el arsénico, plomo, mercurio y cadmio (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2019). Dichos metales, incluso a concentraciones muy bajas, son citotóxicos, cancerígenos y mutagénicos; recientemente, se ha estudiado su capacidad como iniciadores o promotores potenciales de enfermedades cardiovasculares (arteriosclerosis, hipertensión e infarto al miocardio) (Meng, Wang, Li, Yin, & Zhang, 2017; Sevim, Dogana, & Comakli, 2020; Zolfaghari, 2018). También se ha reportado que estos elementos afectan la salud reproductiva en los hombres (Tariba, 2020).

Algunos métodos de eliminación de los metales tóxicos incluyen la ultrafiltración, ósmosis inversa y precipitación química. En su mayoría son muy costosos y poco eficientes cuando la concentración de metales es muy baja; además, en su proceso se generan subproductos que también son tóxicos (Fu & Wang, 2011; Gunatilake, 2015). Debido a lo anterior, y sumado a un cambio de conciencia sobre los problemas ambientales, surge la necesidad de buscar alternativas más amigables con el ambiente y más viables en términos económicos (Dhankhar & Hooda, 2011). Por esta razón se ha centrado la atención en la búsqueda de microorganismos tolerantes a metales tóxicos y con capacidad de removerlos.

Entre los microorganismos, los hongos se consideran superiores a los organismos unicelulares. En el reino de los hongos, los filamentosos o también conocidos como hongos microscópicos son integrantes multifacéticos, ubicuos en el aire y subsuelo, y a menudo se convierten en un grupo dominante de hábitats contaminados con metales (Zafar, Aqil, & Ahmad, 2007). Los estudios han demostrado que las cepas fúngicas, aisladas de áreas contaminadas, tienen potencial para tolerar condiciones tóxicas; debido a su diversidad morfológica, tienen mejor capacidad de adaptarse a valores extremos de pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes (Iram et al., 2009; Kabata-Pendias, 2010); y desarrollan mecanismos fisiológicos y genéticos constitutivos y adaptativos (Bellion, Courbot, Jacob, Blaudez, & Chalot, 2006; Gadd, 2007; Gube, 2016). Además, el crecimiento de micelios maximiza el contacto mecánico y enzimático con el contaminante, debido al aumento de la relación célula-superficie. La principal ventaja de las cepas fúngicas aisladas de los

microscopic fungal strain from a site with toxic metals and to evaluate the tolerance to these substances as an indicator of the potential for use in removal processes of this type of contaminants.

Materials and Methods

Samples and reagents

A total of four surface samples (10 cm depth) of Technosols (International Union of Soil Sciences [IUSS], 2015) were collected from an abandoned lead extraction mine, located 2 km to the south of the municipality of San Felipe de Jesús, Sonora, Mexico (29° 50' 58.43" N, 110° 14' 48.85" W). Samples were placed in sterile containers and transported to the laboratory for further analysis. As a source of cadmium (Cd^{2+}), chromium (Cr^{6+}), mercury (Hg^{2+}) and lead (Pb^{2+}) metal salts: CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, HgCl_2 and $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ were used, respectively. Potato dextrose agar (PDA, Difco™) was used as growth medium.

The composition of metals in the soil samples was determined by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) through Transmission Electron Microscopy (TEM).

Isolation of fungal strain

A 1 g soil sample was placed in 100 mL of sterilized distilled water. The mixture was stirred for 20 min at room temperature and serial dilutions (10^{-1} to 10^{-4}) were prepared. Aliquots of 100 μL of each dilution were taken, placed in Petri dishes with PDA and incubated at 28 °C for 7 days. Colonies were randomly selected, and the seeding procedure was repeated until isolation and purification of fungal strain.

Preparation and inoculation of the spore suspension

The purified strain was inoculated into a 250 mL Erlenmeyer flask with 50 mL PDA and incubated at 28 °C for 7 days. A total of 100 mL of distilled water was added and placed on a magnetic stirrer for 5 min at room temperature. Concentration of spores in the suspension was estimated with a Neubauer chamber. A suspension of about 10^8 spores·mL⁻¹ was prepared for inoculation of the culture medium supplemented with toxic metals. Petri dishes with solidified PDA and metals had a hole drilled in the center, where the spore suspension was added to obtain circular-shaped colonies.

Identification of the isolated fungal strain

Fungi were identified based on the main macro and microscopic morphological characteristics in a seven-day culture. Macroscopic characteristics considered

sitios contaminados es que están adaptadas no solo a la presencia de contaminantes, sino también a las condiciones ambientales del lugar. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue aislar una cepa de hongo microscópico de un sitio con metales tóxicos y evaluar la tolerancia a dichas sustancias como un indicador del potencial de uso en procesos de remoción de este tipo de contaminantes.

Materiales y métodos

Muestras y reactivos

Se colectaron cuatro muestras superficiales (10 cm de profundidad) de Tecnosoles (International Union of Soil Sciences [IUSS], 2015) de una mina abandonada de extracción de plomo, localizada a 2 km al sur del municipio de San Felipe de Jesús, Sonora, México (29° 50' 58.43" N, 110° 14' 48.85" O). Las muestras se depositaron en contenedores estériles y se transportaron a laboratorio para su análisis posterior. Como fuente de cadmio (Cd^{2+}), cromo (Cr^{6+}), mercurio (Hg^{2+}) y plomo (Pb^{2+}) se utilizaron las sales metálicas CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, HgCl_2 y $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, respectivamente. Como medio de cultivo se usó agar papa dextrosa (PDA, Difco™).

La composición de metales en las muestras de suelo se determinó por espectrometría de energía dispersiva (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS por sus siglas en inglés) a través de microscopía de transmisión electrónica (Transmission Electron Microscopy, TEM por sus siglas en inglés).

Aislamiento de la cepa fúngica

Muestras de 1 g de suelo se depositaron en 100 mL de agua destilada esterilizada. La mezcla se agitó durante 20 min a temperatura ambiente y se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-4}). Después se tomaron alícuotas de 100 μL de cada dilución, se colocaron en las placas Petri con PDA y se incubaron a 28 °C por 7 días. Se seleccionaron las colonias al azar y el procedimiento de siembra se repitió hasta lograr el aislamiento y la purificación de la cepa fúngica.

Preparación e inoculación de la suspensión de esporas

La cepa purificada se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de PDA y se incubó a 28 °C por 7 días. Se agregaron 100 mL de agua destilada y se colocó en un agitador magnético durante 5 min a temperatura ambiente. La concentración de esporas en la suspensión se estimó con una cámara Neubauer. Se preparó una suspensión de alrededor de 10^8 esporas·mL⁻¹ para la inoculación del medio de cultivo suplementado con los metales tóxicos. A las placas

were color, shape, and colony type. Microscopic characteristics considered were spore morphology and size, conidiophore, and hyphae, which were documented by light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Structures were stained with lactophenol blue for light microscopy. Moisture-free mycelial samples were used for electron microscopy.

Tolerance index

The tolerance index of the isolated strain was evaluated with cadmium, mercury and lead individually at concentrations of 50, 100, 250, 350 and 500 ppm. As and those metals are considered the most toxic by ATSDR (2019); however, no source of As was available so it was not possible to include it in the study. A multimetal system (mixture of metals) of cadmium, chromium, mercury and lead was also evaluated at concentrations of 4, 8, 16, 16, 64, 80, 120, 200 and 400 ppm; the proportion of each metal was equal. In both systems (single and multimetal), Petri dishes with PDA supplemented with metals were inoculated with fungal spores and incubated at 28 °C for 7 days; every 24 h the radius of the developed colonies was measured. PDA inoculated with the fungal strain, but without metals, was considered as the control treatment. All treatments were carried out in triplicate. Tolerance index was calculated by dividing the radius of the metal colony by the radius of the control colony.

Minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration to which a substance inhibits the growth of a microorganism (Ezzouhri, Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009). In this study, the MIC was obtained from the tolerance index experiments.

Statistical analysis

After assessing the normality of the data (Shapiro-Wilk), the differences in the mean values of tolerance indices between metal concentrations were estimated by one-way ANOVA with days as blocks. Significant differences were studied using the Tukey's test ($P < 0.05$). All tests were performed using GenStat v. 20 (VSN International, 2019).

Results and Discussion

Soil elemental composition

The elemental composition derived by TEM-EDS, indicates the presence of 15 elements (O, Si, Al, Mg, S, Ca, P, Fe, Cl, Ni, K, Zn, Pb, As and Mn) in the soil sample, from which the studied strain was isolated. The presence of Al, Pb and As stands out due to their potential toxicity to a great diversity of living

Petri con PDA solidificado y los metales se les hizo un orificio en el centro, donde se depositó la suspensión de esporas para obtener colonias de forma circular.

Identificación de la cepa fúngica aislada

El hongo se identificó con base en las principales características morfológicas macro y microscópicas en un cultivo de siete días. Las características macroscópicas consideradas fueron color, forma y tipo de colonia. Como características microscópicas se consideró la morfología y tamaño de las esporas, conidióforo e hifas, las cuales se documentaron por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Para la microscopía óptica, las estructuras se tiñeron con azul de lactofenol. En el caso de la microscopía electrónica se utilizaron muestras de micelio libres de humedad.

Índice de tolerancia

El índice de tolerancia de la cepa aislada se evaluó con los metales cadmio, mercurio y plomo de manera individual en concentraciones de 50, 100, 250, 350 y 500 ppm. El As y dichos metales son considerados como los más tóxicos por la ATSDR (2019); sin embargo, no se contó con alguna fuente de As por lo que no fue posible incluirlo en el estudio. También se evaluó un sistema multimetal (mezcla de metales) de cadmio, cromo, mercurio y plomo en concentraciones de 4, 8, 16, 64, 80, 120, 200 y 400 ppm; la proporción de cada metal fue equitativa. En ambos sistemas (individual y multimetal), las placas Petri con PDA suplementadas con los metales se inocularon con las esporas fúngicas y se incubaron a 28 °C por 7 días; cada 24 h se midió el radio de las colonias desarrolladas. El PDA inoculado con la cepa fúngica, pero sin metales, se consideró como control. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. El índice de tolerancia se calculó como el cociente del radio de la colonia con metal entre el radio de la colonia control.

Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja a la cual una sustancia inhibe el crecimiento de un microorganismo (Ezzouhri, Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009). En este estudio, la CMI se obtuvo a partir de los experimentos de índice de tolerancia.

Análisis estadístico

Después de evaluar la normalidad de los datos (Shapiro-Wilk), las diferencias de los valores medios de índices de tolerancia entre las concentraciones de los metales se estimaron mediante ANOVA de una vía con los días como bloques. Las diferencias significativas se

organisms, from microorganisms to man; according to TEM-EDS analysis, these elements are found in proportions of 0.1, 0.11 and 0.14 %, respectively (Table 1). ATSDR (2019) rates As as the most toxic substance, followed by Pb.

In addition, the diversity of microorganisms is generally low in stressful environments caused by the presence of toxic substances. Some microorganisms, like plants and animals, have developed strategies that allow them to successfully survive and maintain themselves in stressed communities where other organisms cannot proliferate; for example, *Aspergillus* and *Penicillium* produce abundant quantities of spores that resist dispersal and manage to survive long periods of inactivity (Atlas & Bartha, 2001). This coincides with that found in this study, because the isolated strain corresponds to the genus *Aspergillus*. Limits of tolerance to stressors are what largely determine the inhabitants of stressed environments (toxic compounds, high levels of solar radiation and water scarcity) (Atlas & Bartha, 2001).

Identification of the fungal strain

From its morphology, the isolated microscopic fungal in this study was identified as *Aspergillus terreus* Thom 1918. Fungi showed fast-growing colonies at 28 °C

estudiaron utilizando la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Todas las pruebas se realizaron utilizando el *software* GenStat v. 20 (VSN International, 2019).

Resultados y discusión

Composición elemental del suelo

La composición elemental, obtenida por TEM-EDS, indica la presencia de 15 elementos (O, Si, Al, Mg, S, Ca, P, Fe, Cl, Ni, K, Zn, Pb, As y Mn) en la muestra de suelo, a partir de la cual se aisló la cepa estudiada. Resalta la presencia de Al, Pb y As por su toxicidad potencial a una gran diversidad de organismos vivos, desde microorganismos hasta el hombre; según el análisis TEM-EDS, dichos elementos se encuentran en proporción de 0.1, 0.11 y 0.14 %, respectivamente (Cuadro 1). La ATSDR (2019) clasifica al As como la sustancia más tóxica, seguida por el Pb.

En general, la diversidad de microorganismos es baja en ambientes de estrés causado por la presencia de sustancias tóxicas. Algunos microorganismos, al igual que las plantas y los animales, han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir con éxito y mantenerse en las comunidades estresadas, donde otros organismos no pueden proliferar; por ejemplo, *Aspergillus* y *Penicillium* producen cantidades abundantes

Table 1. Elemental composition of soil from the San Felipe de Jesus mine, Sonora, Mexico, determined by energy dispersive spectrometry analysis by transmission electron microscopy (EDS-TEM).

Cuadro 1. Composición elemental del suelo de la mina de San Felipe de Jesús, Sonora, México, determinada con el análisis de espectrometría de energía dispersiva a través de microscopía de transmisión electrónica (TEM-EDS).

Element / Elemento	Percentage (%) / Proporción (%)
O	33.88
Si	29.78
Al	12.71
Mg	5.33
S	4.77
Ca	4.57
P	3.55
Fe	2.99
Cl	0.80
Ni	0.55
K	0.45
Zn	0.29
Pb	0.14
As	0.11
Mn	0.10

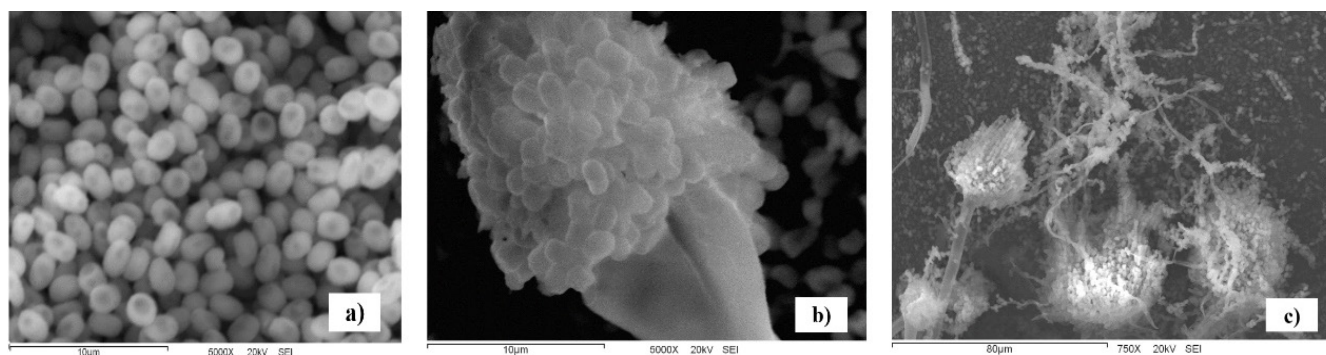


Figure 1. Microscopic features of *Aspergillus terreus* by scanning electron microscopy (JEOL JSM-5410 IV): a) spores, bar indicates 10 µm; b) conidiophore, bar indicates 10 µm; c) hyphae, conidiophore and spores, bar indicates 80 µm.

Figura 1. Características microscópicas de *Aspergillus terreus* por microscopía electrónica de barrido (JEOL JSM-5410 IV): a) esporas, la barra indica 10 µm; b) conidióforo, la barra indica 10 µm; c) hifas, conidióforo y esporas, la barra indica 80 µm.

on PDA, white to light yellow during the first two days of culture, changing to brown on the third day; the colonies on the reverse side were also brown. The mycelium was observed branched with hyaline hyphae greater than 1 µm in diameter. *Aspergillus terreus* produced abundant spores with a diameter of 1.5 µm (Figure 1a), periform vesicles of 10 to 15 µm (Figure 1b) and 150 µm long conidiophores (Figure 1c). These morphological features are consistent with those reported for *A. terreus* by Klich (2002) and Atiqah and Zakaria (2017).

Soil microbial community is usually very diverse, especially the microscopic colony found between 10 and 30 cm depth. The microscopic fungi isolated were mainly from *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Geotrichum*, which have cosmopolitan distribution (Jiang, Wang, Xue, Cao, & Zhang, 2016; Mohammadian, Ahari, Arzanlou, Oustan, & Khazaei, 2017; Oladipo, Awotoye, Olayinka, Bezuidenhout, & Maboeta, 2018). However, mycological diversity in stressful environments, due to the presence of toxic substances such as metals, is usually lower compared to a healthy environment (Dixit et al., 2015). The presence of *Aspergillus* in environments contaminated with toxic metals has been reported in a number of studies (Awasthi, Pandey, & Khan, 2017; Rose & Devi, 2018; Villalba-Villalba, Cruz-Campas, & Azuara-Gómez, 2018; Zafar et al., 2007).

Tolerance index

The tolerance index was used to study the growth performance of *A. terreus* to various concentrations of toxic metals. ANOVA results indicated that days are not significant in the four treatments (Pb, Hg, Cd and mixed metals), but significant differences were found for the

de esporas que resisten la dispersión y logran sobrevivir periodos largos de inactividad (Atlas & Bartha, 2001). Lo anterior coincide con lo encontrado en este estudio, ya que la cepa aislada corresponde al género *Aspergillus*. Los límites de tolerancia a los factores estresantes son los que determinan en gran medida a los habitantes en los ambientes con estrés (compuestos tóxicos, niveles altos de radiación solar y escasez de agua) (Atlas & Bartha, 2001).

Identificación de la cepa fúngica

Por su morfología, el hongo microscópico aislado en este estudio se identificó como *Aspergillus terreus* Thom 1918. El hongo presentó colonias de crecimiento rápido a 28 °C en PDA, de color blanco a amarillo claro durante los primeros dos días de cultivo, cambiando a café al tercer día; las colonias al reverso también fueron color café. El micelio se observó ramificado con hifas hialinas de diámetro mayor de 1 µm. *Aspergillus terreus* produjo abundantes esporas con diámetro de 1.5 µm (Figura 1a), vesículas periformes de 10 a 15 µm (Figura 1b) y conidióforos de 150 µm de largo (Figura 1c). Estas características morfológicas coinciden con las reportadas para *A. terreus* por Klich (2002) y Atiqah y Zakaria (2017).

La comunidad microbiana del suelo suele ser muy diversa, en especial la de los hongos microscópicos encontrados entre 10 y 30 cm de profundidad. Los hongos microscópicos aislados fueron principalmente del género *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Geotrichum*, los cuales presentan distribución cosmopolita (Jiang, Wang, Xue, Cao, & Zhang, 2016; Mohammadian, Ahari, Arzanlou, Oustan, & Khazaei, 2017; Oladipo, Awotoye, Olayinka, Bezuidenhout, & Maboeta, 2018). No obstante, la diversidad micológica

tolerance index in response to metal concentrations, as shown in Table 2. According to Oladipo et al. (2018), the metal tolerance index by fungi can be classified as follows: >1 very high, 0.8 - 0.99 high, 0.6 - 0.79 moderate, 0.4 - 0.59 low, and 0.0 - 0.39 very low.

Figure 2 indicates that *A. terreus* was very tolerant to lead at all concentrations tested, with the lowest average tolerance at 100 ppm, with statistical significance ($P < 0.05$). However, the tolerance index was always greater than 0.9, even at day 7 of growth. Similar results were reported by Sanyal, Rautaray, Bansal, Ahmad, and Sastry (2005), who found that lead was not toxic to *Fusarium oxysporum* Schldl. 1824, which grew without problem after exposure to concentrations similar to those reported in this study. Maini et al. (2019) observed high tolerance to lead in *Penicillium* and *Taloromyces*; however, the concentrations they evaluated were lower (0.5, 1, and 3 ppm) than those reported in this study. Several *Aspergillus* species have been reported to exhibit high tolerance to toxic metals (Mungasavalli, Viraraghavan, & Jin, 2007; Thippeswamy, Shivakumar, & Krishnappa, 2014); such is the case of *A. niger*

en ambientes estresantes, debido a la presencia de sustancias tóxicas como los metales, suele ser más baja comparada con un ambiente sano (Dixit et al., 2015). La presencia del género *Aspergillus* en ambientes contaminados con metales tóxicos se ha reportado en diversos estudios (Awasthi, Pandey, & Khan, 2017; Rose & Devi, 2018; Villalba-Villalba, Cruz-Campas, & Azuara-Gómez, 2018; Zafar et al., 2007).

Índice de tolerancia

El índice de tolerancia se usó para evaluar el comportamiento del crecimiento de *A. terreus* a varias concentraciones de metales tóxicos. Los resultados de ANOVA indicaron que los días no son significativos en los cuatro tratamientos (Pb, Hg, Cd y mezcla de metales), pero sí reveló diferencias significativas en el índice de tolerancia en respuesta a las concentraciones de metales, tal como se muestra en el Cuadro 2. De acuerdo con Oladipo et al. (2018), el índice de tolerancia a metales por los hongos puede clasificarse de la manera siguiente: >1 muy alto, 0.8 - 0.99 alto, 0.6 - 0.79 moderado, 0.4 - 0.59 bajo y 0.0 - 0.39 muy bajo.

Table 2. Effect of metal concentrations on the tolerance index (one-way ANOVA) of *Aspergillus terreus*.

Cuadro 2. Efecto de las concentraciones de los metales en el índice de tolerancia (ANOVA-una vía) de *Aspergillus terreus*.

Metal	gl	F	P
Cd	4	223.55	<0.001
Pb	4	4.2	0.009
Hg	4	4.51	0.007
Multimetal	7	33.41	<0.001

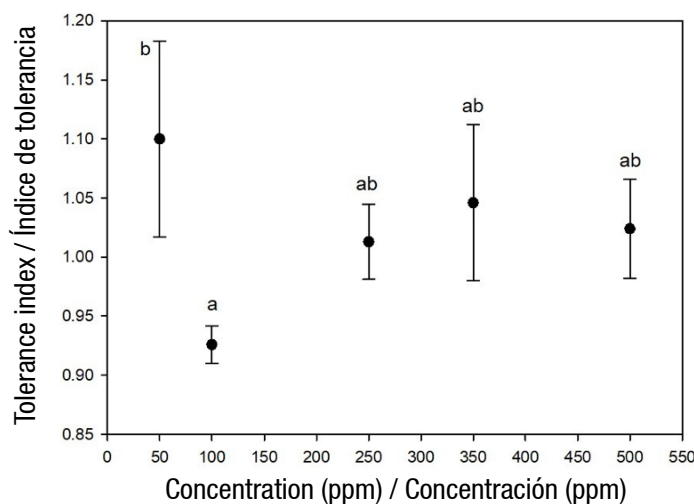


Figure 2. Tolerance index of *Aspergillus terreus* at five concentrations of $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ as a source of lead. Different letters indicate significant differences in tolerance index between concentrations according to the Tukey's test ($P < 0.05$). The bar shows the standard deviation of the mean.

Figura 2. Índice de tolerancia de *Aspergillus terreus* a cinco concentraciones de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como fuente de plomo. Letras diferentes indican diferencias significativas del índice de tolerancia entre concentraciones de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). La barra muestra la desviación estándar de la media.

Tieghem 1867 with the ability to grow at 5 000 ppm lead (Iskandar, Zainudin, & Tan, 2011). High tolerance of *A. terreus* to lead may be due to constant exposure to this metal in its local environment, i.e., in the soil from which fungi were isolated. For certain fungal species, exposure to toxic substances in their habitat can trigger adaptive changes that allow them to remain viable under such stress conditions (Valix, Tang, & Malik 2001). Therefore, the high tolerance of these fungi to lead may be related to the mechanisms developed to manage the influx of lead; moreover, in this study, no lag phase (adaptation phase) delay effect of *A. terreus* was detected due to lead.

On the other hand, Figure 3 shows that *A. terreus* has good growth performance by exposure to mercury, because tolerance indexes ranged from 0.7 and 1.0 in almost all the experiments. At concentrations of 350 ppm and 500 ppm there was effect of elongation on the lag phase of the fungi; despite this, the fungi were able to adapt to the presence of the toxic metal and reach the exponential phase. Kurniati, Arfarita, and Imai (2014) reported that *A. flavus* Link 1809 have a tolerance index of 0.8 at 25 ppm mercury, while Khan et al. (2019) observed that *A. niger* and *A. terreus*, isolated from effluents contaminated with toxic metals, were able to grow in 26.66 ppm mercury and remove more than 90 % of this metal.

Cadmium was the most toxic for *A. terreus*, because all concentrations had a significant effect on tolerance index, as shown in Figure 4. The fungi showed low tolerance at 50 ppm (0.56 ± 0.9) on the seventh day of

La Figura 2 indica que *A. terreus* fue muy tolerante al plomo en todas las concentraciones evaluadas, siendo a 100 ppm donde en promedio se registró la menor tolerancia con significancia estadística ($P < 0.05$). No obstante, el índice de tolerancia siempre fue mayor de 0.9, incluso al día 7 de crecimiento.

Resultados similares fueron reportados por Sanyal, Rautaray, Bansal, Ahmad, y Sastry (2005), quienes encontraron que el plomo no fue tóxico para el hongo *Fusarium oxysporum* Schltdl. 1824, el cual creció sin problema después de la exposición a concentraciones similares a las del presente estudio. Maini et al. (2019) observaron tolerancia alta al plomo en especies de *Penicillium* y *Taloromyces*; sin embargo, las concentraciones que evaluaron fueron menores (0.5, 1 y 3 ppm) que las del presente estudio. Se ha reportado que diversas especies de *Aspergillus* exhiben tolerancia alta a metales tóxicos (Mungasavalli, Viraraghavan, & Jin, 2007; Thippeswamy, Shivakumar, & Krishnappa, 2014); tal es el caso de *A. niger* Tieghem 1867 con capacidad para crecer a 5 000 ppm de plomo (Iskandar, Zainudin, & Tan, 2011). La tolerancia alta de *A. terreus* al plomo puede deberse a la exposición constante a este metal en su entorno local; es decir, en el suelo a partir del cual se aisló el hongo. Para ciertas especies fúngicas, la exposición a sustancias tóxicas en su hábitat puede desencadenar cambios adaptativos que les permiten mantenerse viables en esas condiciones de estrés (Valix, Tang, & Malik 2001). Por tanto, la tolerancia elevada de este hongo al plomo puede estar relacionado con los mecanismos desarrollados para manejar la afluencia de dicho metal; además, en el presente estudio no

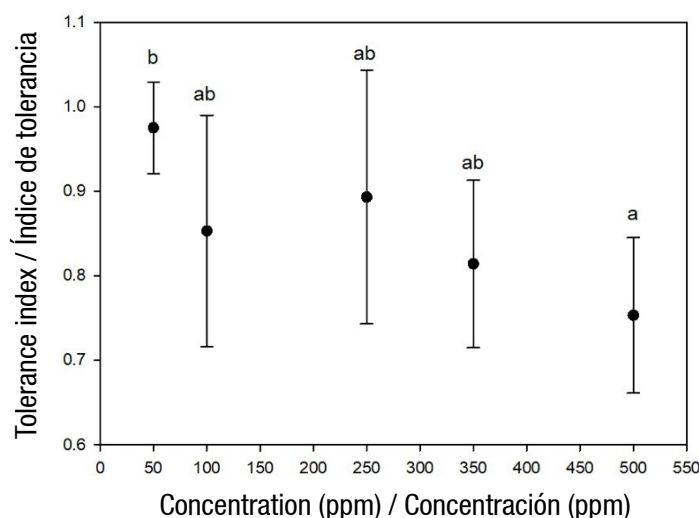


Figure 3. Tolerance index of *Aspergillus terreus* at five concentrations of $HgCl_2$ as a source of mercury. Different letters indicate significant differences in tolerance index between concentrations according to the Tukey's test ($P < 0.05$). The bar shows the standard deviation of the mean.

Figura 3. Índice de tolerancia de *Aspergillus terreus* a cinco concentraciones de $HgCl_2$ como fuente de mercurio. Letras diferentes indican diferencias significativas del índice de tolerancia entre concentraciones de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). La barra muestra la desviación estándar de la media.

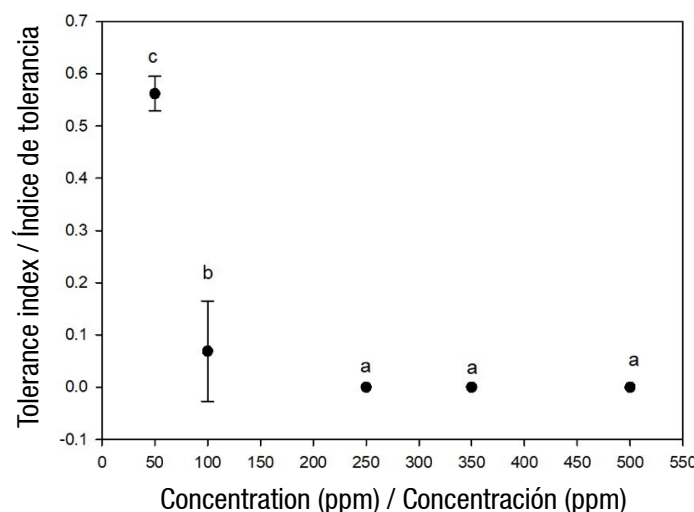


Figure 4. Tolerance index of *Aspergillus terreus* at five concentrations of CdCl_2 as a source of cadmium. Different letters indicate significant differences in tolerance index between concentrations according to the Tukey's test ($P < 0.05$). The bar shows the standard deviation of the mean.

Figura 4. Índice de tolerancia de *Aspergillus terreus* a cinco concentraciones de CdCl_2 como fuente de cadmio. Letras diferentes indican diferencias significativas del índice de tolerancia entre concentraciones de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). La barra muestra la desviación estándar de la media.

growth and very low tolerance at 100 ppm on days 6 (0.17 ± 0.019) and 7 (0.20 ± 0.018). Growth was observed until day 6 for the las concentration, i.e., there was a marked effect of elongation of the lag phase of the fungus due to cadmium. At concentrations of 250 ppm, 350 ppm and 500 ppm, *A. terreus* showed no growth. This high toxicity of cadmium for fungi has also been documented in another research (Joo & Hussein, 2012; Oladipo et al., 2018). Similar to the present study, Dey et al. (2016) reported no growth of *A. terreus* at 500 ppm cadmium.

This study showed tolerance of *A. terreus* in the following order: lead > mercury > cadmium, indicating high cadmium toxicity. Several studies confirm that various fungi isolated from the same source of metal-contaminated sites have demonstrated different levels of resistance (Chakraborty, Mukherjee, & Das, 2012; Gururajan & Belur, 2018; Kumar et al., 2018; Zafar et al., 2007).

In the multimetal system (mixture of cadmium, chrome, mercury and lead) a lag phase elongation effect was observed compared to the control. This could be attributed to the toxicity induced by the mixture of metals on fungi growth. After the adaptation phase to the toxic environment, the fungi resumed its exponential growth. Based on Figure 5, the tolerance index to the metal mixture was very high at 4 ppm (0.9 ± 0.08), 8 ppm (1.0 ± 0.03), 16 ppm (1.2 ± 0.08) and 64 ppm (0.9 ± 0.16) over the seven days of culture;

se observó un efecto de retraso de la fase lag (fase de adaptación) de *A. terreus* a causa del plomo.

Por otro lado, en la Figura 3, se observa que *A. terreus* presenta buen desempeño de crecimiento por exposición al mercurio, ya que los índices de tolerancia variaron entre 0.7 a 1.0 en casi la totalidad de los experimentos. Con las concentraciones de 350 ppm y 500 ppm hubo un efecto de alargamiento en la fase lag del hongo; a pesar de ello, el hongo fue capaz de adaptarse a la presencia del metal tóxico y alcanzar la fase exponencial. Kurniati, Arfarita, e Imai (2014) reportaron que *A. flavus* Link 1809 presenta un índice de tolerancia de 0.8 a 25 ppm de mercurio, mientras que Khan et al. (2019) observaron que *A. niger* y *A. terreus*, aislados de efluentes contaminados con metales tóxicos, fueron capaces de crecer en 26.66 ppm de mercurio y remover más de 90 % de este metal.

En cadmio fue el más tóxico para *A. terreus*, dado que todas las concentraciones tuvieron efecto significativo sobre su índice de tolerancia, tal como se observa en la Figura 4. El hongo presentó baja tolerancia a 50 ppm (0.56 ± 0.9) al séptimo día de crecimiento y muy baja tolerancia a 100 ppm en los días 6 (0.17 ± 0.019) y 7 (0.20 ± 0.018). A esta última concentración, el crecimiento se observó hasta el día 6; es decir, hubo un efecto marcado de alargamiento de la fase lag del hongo por la presencia del cadmio. En las concentraciones de 250 ppm, 350 ppm y 500 ppm, *A. terreus* no presentó crecimiento. Esta alta toxicidad del cadmio hacia un hongo también se ha

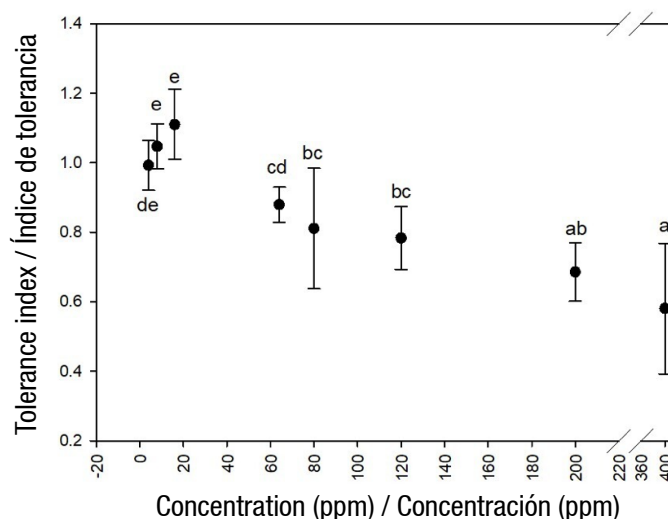


Figure 5. Tolerance index of *Aspergillus terreus* at several concentrations of (4, 8, 16, 64, 80, 120, 200 and 400 ppm) of the mixture of cadmium (CdCl_2), chrome ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), mercury (HgCl_2) and lead $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ in equal proportion of each metal. Different letters indicate significant differences in tolerance index between concentrations according to the Tukey's test ($P < 0.05$). The bar shows the standard deviation of the mean.

Figura 5. Índice de tolerancia de *Aspergillus terreus* a varias concentraciones (4, 8, 16, 64, 80, 120, 200 y 400 ppm) de la mezcla de cadmio (CdCl_2), cromo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), mercurio (HgCl_2) y plomo $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ en proporción equitativa de cada metal. Letras diferentes indican diferencias significativas del índice de tolerancia entre concentraciones de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). La barra muestra la desviación estándar de la media.

moderate at 80 ppm (0.7 ± 0.06), 120 ppm (0.7 ± 0.06) and 200 ppm (0.6 ± 0.08); and low at 400 ppm (0.5 ± 0.01). Dey et al. (2016) studied a multimetal system similar to the one in this study, which consisted of a mixture of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn at concentrations of 6, 12, 18, and 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. These researchers observed that *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1863 showed good adaptability to the growth medium, as well as an effect on the lag phase lasting 6 to 7 h in the metal-free control treatment and 17 to 18 h in the multimetal system.

Minimum inhibitory concentration

In all individual lead and mercury treatments, and the multimetal system, fungi had growth even at the highest concentrations (500 ppm individual treatment and 400 ppm multimetal system). For this reason, the MIC could only be determined in the individual evaluation with cadmium, finding that *A. terreus* no longer grew after supplementation of the growth medium with 100 ppm (Table 3).

Gururajan and Belur (2018) isolated fungal strains from soil samples from a metal-contaminated scrap metal landfill and evaluated the MIC; the strains were reported as "isolates", no genus or species names were mentioned. They found MICs of 50 ppm mercury, 100 ppm cadmium and 400 ppm lead. Several MIC studies have been reported for microscopic fungi, but most are for individual metal exposure. For *Bauveria*

documentado en otras investigaciones (Joo & Hussein, 2012; Oladipo et al., 2018). Similar al presente estudio, Dey et al. (2016) no observaron crecimiento de *A. terreus* a 500 ppm de cadmio.

En general, en este estudio, la tolerancia de *A. terreus* se observó en el orden de plomo > mercurio > cadmio, lo cual indica alta toxicidad del cadmio. Varios estudios confirman que diversos hongos aislados de la misma fuente de sitios contaminados con metales han demostrado niveles distintos de resistencia (Chakraborty, Mukherjee, & Das, 2012; Gururajan & Belur, 2018; Kumar et al., 2018; Zafar et al., 2007).

En el sistema multimetal (mezcla de cadmio, cromo, mercurio y plomo) se observó un efecto de alargamiento de la fase lag en comparación con el control. Esto podría atribuirse a la toxicidad inducida por la mezcla de metales en el perfil de crecimiento de los hongos. Después de la fase de adaptación al ambiente tóxico, el hongo reanudó su crecimiento exponencial. Con base en la Figura 5, el índice de tolerancia a la mezcla de metales fue muy alto a 4 ppm (0.9 ± 0.08), 8 ppm (1.0 ± 0.03), 16 ppm (1.2 ± 0.08) y 64 ppm (0.9 ± 0.16) en los siete días de cultivo; moderado a 80 ppm (0.7 ± 0.06), 120 ppm (0.7 ± 0.06) y 200 ppm (0.6 ± 0.08); y bajo a 400 ppm (0.5 ± 0.01). Dey et al. (2016) estudiaron un sistema multimetal similar al de este estudio, el cual consistía en una mezcla de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en concentraciones de 6, 12, 18 y 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Estos investigadores observaron que *Aspergillus fumigatus*

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Aspergillus terreus* on growth medium supplemented with 50, 250, 350 and 500 ppm cadmium, mercury and lead individually, and with a mixture of cadmium, chrome, mercury and lead in equal proportions at concentrations of 4, 8, 16, 64, 80, 120, 200 and 400 ppm.

Cuadro 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Aspergillus terreus* en medio suplementado con 50, 250, 350 y 500 ppm de cadmio, mercurio y plomo de manera individual, y con una mezcla de cadmio, cromo, mercurio y plomo en proporciones equitativas a concentraciones de 4, 8, 16, 64, 80, 120, 200 y 400 ppm.

Treatment/Tratamiento	MIC (ppm)/CMI (ppm)
Cadmium/Cadmio	100 < MIC < 250
Mercury/Mercurio	MIC > 500
Lead/Plomo	MIC > 500
Multimetal/Multimetal	MIC > 400

bassiana Vuill. 1912, a MIC of 100 ppm was found for Cu II, Ni II and Cd VI individually, 200 ppm for Cd II and 250 ppm for Zn II (Gola et al., 2016). Mishra and Malik (2012) observed that *Aspergillus lentulus* Balajee & K. A. Marr 2005 has MIC >12 000 ppm for Cr III, 5 000 ppm for Pb II, 850 ppm for Cu II, 550 ppm for Cr VI and 300 ppm for Ni II. Variations in survival rates and patterns of tolerance index reinforce studies that propose that tolerance to toxic substances depends on the innate characteristics of each fungal species (Iskandar et al., 2011; Say, Yilmaz, & Denizli, 2003); moreover, constant exposure of fungi to toxic metals may also be implicated in the ability to develop tolerance mechanisms (Gorbushina & Krumbein, 2000).

Microscopic fungi have evolved several adaptive biological strategies or mechanisms to tolerate toxic metals and avoid cellular damage. Such strategies include chelation and cell wall binding (extracellular sequestration) and physical intracellular sequestration of the metal by binding to proteins and other ligands (Pumpel & Paknikar, 2001). Binding to the cell wall is called biosorption. Extracellular mechanisms are mainly involved in preventing the entry of metals into the cell, whereas intracellular mechanisms aim to reduce the action of toxic compounds in the cytosol. In the first case, the fungal cell excretes organic molecules that do not belong to the cell wall matrix for chelation of metal ions (Gadd, 1993). The cell surface of certain filamentous fungi is negatively charged, due to the presence of anionic structures, such as glucan and chitin (Gupta, Nayak, & Agarwall, 2015). This gives the microorganisms the ability to bind metal cations, whereas, in the intracellular mechanism, metal tolerance is apparently determined by transport proteins that remove toxic metal ions from the cytosol out of the cell or sequester metals in the vacuole (Bellion et al., 2006).

It has also been reported that toxic metal stress can be reduced by melanin synthesis. Melanin refers to dark pigments synthesized by organisms of all biological

Fresenius 1863 mostró buena adaptabilidad al medio, así como un efecto en la fase lag con duración de 6 a 7 h en el control sin metales y de 17 a 18 h en el sistema multimetal.

Concentración mínima inhibitoria

En todos los tratamientos con plomo y mercurio individuales, así como en el sistema multimetal, el hongo mostró crecimiento incluso en las concentraciones más altas (500 ppm tratamiento individual y 400 ppm sistema multimetal). Por tal razón, la CMI solo se pudo determinar en la evaluación individual con cadmio, encontrando que *A. terreus* ya no creció a partir de la suplementación del medio con 100 ppm (Cuadro 3).

Gururajan y Belur (2018) aislaron cepas fúngicas de muestras de suelo de un vertedero de chatarra contaminado con metales y evaluaron la CMI; las cepas fueron reportadas como “aislados”, ya que no mencionan nombres de género y especie. Dichos autores encontraron CMI de 50 ppm de mercurio, 100 ppm de cadmio y 400 ppm de plomo. Se han reportado varios estudios de CMI para hongos microscópicos, pero la mayoría son para exposición a metales en forma individual. Para *Bauveria bassiana* Vuill. 1912, se encontró una CMI de 100 ppm para Cu II, Ni II y Cd VI de manera individual, 200 ppm para Cd II y 250 ppm para Zn II (Gola et al., 2016). Mishra y Malik (2012) observaron que *Aspergillus lentulus* Balajee & K. A. Marr 2005 tiene CMI >12 000 ppm para Cr III, 5 000 ppm para Pb II, 850 ppm para Cu II, 550 ppm para Cr VI y 300 ppm para Ni II. Las variaciones en las tasas de supervivencia y los patrones de índices de tolerancia refuerzan los estudios que plantean que la tolerancia a las sustancias tóxicas depende de las características innatas de cada especie fúngica (Iskandar et al., 2011; Say, Yilmaz, & Denizli, 2003); además, la exposición constante de hongos a los metales tóxicos también puede estar implicada en la capacidad de desarrollo de mecanismos de tolerancia (Gorbushina & Krumbein, 2000).

kingdoms, including fungi (Nosanchuk & Casadevall, 2003b). Melanins have been suggested to play several roles in fungal biology (Cordero & Casadevall, 2017) and, with their multiple properties, it seems likely that these help fungi survive various types of stresses, both biotic and abiotic. The latter include high ultraviolet radiation, reactive oxygen species, and toxic metals. Melanins form granules that can accumulate on the cell surface or be released into the extracellular space (Malofe, Solhaug, Minibayera, & Beckett, 2019) and, thanks to their functional groups, exhibit high binding affinity and binding capacity for many metal ions (Cordero & Casadevall, 2017).

The strategies that each species develops may vary depending on the isolation site, type, and metal concentration (Rose & Devi, 2018). *Aspergillus* has the ability to uptake copper through an active process, thanks to metallothionein synthesis (Kermasha, Pellerin, Rovel, Goetghebeur, & Metche, 1993). On the other hand, Chakraborty et al. (2013) found that *Aspergillus foetidus* Thom & Raper 1945 converts soluble Pb to insoluble Pb and could retain it on the mycelial surface. It has also been reported that some *Aspergillus* species have evolved an enzymatic mechanism to reduce chromium toxicity. This mechanism is mediated by an antioxidant enzyme system involving peroxidases, catalases and ascorbate peroxidase (Srivastava & Thakur, 2006). Bůcková, Godočíková, Šimonovičová, and Polek (2005) found a positive relationship between the level of total catalases and increased metal tolerance in cultures of *A. niger* isolated from mining areas. Catalase production is one of the mechanisms that cells use to protect themselves against damage caused by reactive oxygen species. Therefore, these authors concluded that regulation of catalase production by *A. niger* may be an adaptive response to environmental stress generated not only by high metal concentrations, but also by changes in pH and nutrient content, which often follow soils impacted by mining waste. It is likely that *A. terreus*, isolated in the present study, uses adaptive mechanisms similar to those mentioned above.

Changes in morphology

Microscopic fungi with intense green, brown or black mycelium have been found in the Sonoran Desert (Ranzoni, 1968). Figure 6 shows changes in morphology and pigmentation of mycelium by exposure to metal mixture. From 16 ppm, changes in brown coloration are observed compared to the control. Other studies have also recorded this phenomenon when exposing mycelium to metals in growth medium (Yazdani, Yap, Abdullah, & Tan, 2010). Fazli et al. (2015) observed changes in coloration in several fungi due to cadmium exposure: discoloration in *Aspergillus versicolor* Tirab.

Los hongos microscópicos han desarrollado diversas estrategias o mecanismos biológicos de adaptación para tolerar metales tóxicos y evitar el daño celular. Entre tales estrategias se pueden enumerar la quelación y la unión a la pared celular (secuestro extracelular) y el secuestro físico intracelular del metal mediante la unión a proteínas y otros ligandos (Pumpel & Paknikar, 2001). La unión a la pared celular se llama biosorción. Los mecanismos extracelulares están implicados sobre todo en la prevención de la entrada de metales en la célula, mientras que los intracelulares tienen como objetivo reducir la acción de los compuestos tóxicos en el citosol. En el primer caso, la célula fúngica excreta moléculas orgánicas que no pertenecen a la matriz de la pared celular para la quelación de los iones metálicos (Gadd, 1993). La superficie celular de ciertos hongos filamentosos tiene carga negativa, debido a la presencia de estructuras aniónicas, como el glucano y la quitina (Gupta, Nayak, & Agarwall, 2015). Esto les confiere a los microorganismos la capacidad de unir cationes metálicos, mientras que, en el mecanismo intracelular, la tolerancia al metal está determinada, en apariencia, por proteínas de transporte que eliminan iones metálicos tóxicos del citosol fuera de la célula o secuestran metales en la vacuola (Bellion et al., 2006).

También se ha reportado que el estrés por metales tóxicos puede reducirse mediante la síntesis de melanina. En sentido general, la melanina se refiere a los pigmentos oscuros sintetizados por organismos de todos los reinos biológicos, incluidos los hongos (Nosanchuk & Casadevall, 2003b). Se ha sugerido que las melaninas juegan varios papeles en la biología fúngica (Cordero & Casadevall, 2017) y, dadas sus múltiples propiedades, parece probable que estas ayuden a los hongos a sobrevivir a varios tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. Estos últimos incluyen radiación ultravioleta alta, especies reactivas de oxígeno y metales tóxicos. Las melaninas forman gránulos que pueden acumularse en la superficie celular o liberarse en el espacio extracelular (Malofe, Solhaug, Minibayera, & Beckett, 2019) y, gracias a sus grupos funcionales, exhiben una alta afinidad de unión y capacidad de unión para muchos iones metálicos (Cordero & Casadevall, 2017).

Las estrategias que cada especie desarrolle pueden variar en función del lugar de aislamiento, tipo y concentración de metal (Rose & Devi, 2018). *Aspergillus* tiene capacidad de captar el cobre por medio de un proceso activo, gracias a la síntesis de metalotioneína (Kermasha, Pellerin, Rovel, Goetghebeur, & Metche, 1993). Por otro lado, Chakraborty et al. (2013) encontraron que *Aspergillus foetidus* Thom & Raper 1945 convierte el Pb soluble en Pb insoluble y lo podría retener en la superficie del micelio. También se ha reportado que algunas especies de *Aspergillus*

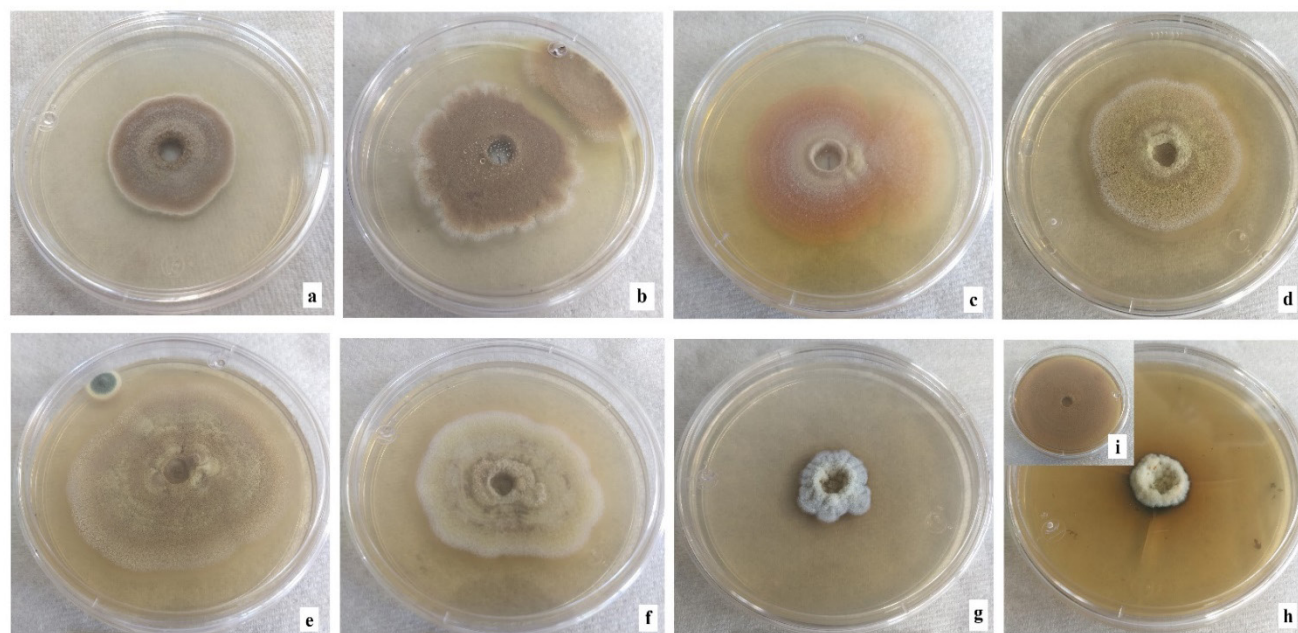


Figure 6. Morphology of *Aspergillus terreus* colonies in multimetal system. (a) 4 ppm, (b) 8 ppm, (c) 16 ppm, (d) 64 ppm, (e) 80 ppm, (f) 120 ppm, (g) 200 ppm and (h) 400 ppm of the mixture of cadmium (CdCl_2), chrome ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), mercury (HgCl_2) and lead $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ in equal proportion of each metal, i) control without metals.

Figura 6. Morfología de las colonias de *Aspergillus terreus* en el sistema multimetal. a) 4 ppm, b) 8 ppm, c) 16 ppm, d) 64 ppm, e) 80 ppm, f) 120 ppm, g) 200 ppm y h) 400 ppm de la mezcla de cadmio (CdCl_2), cromo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), mercurio (HgCl_2) y plomo $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ en proporción equitativa de cada metal, i) control sin metales.

1908 and *Cladosporium* sp., pink color of *Paecilomyces* sp. changed to white, and *Terichoderma* sp. and *A. fumigatus* changed from green to white. Pigmentation of fungal cells ranging from red, yellow, black or other shades may occur in some species. This may be due to the precipitation of metals in the cell wall, in response to fungi producing various extracellular compounds such as complexing agents, precipitating agents, polysaccharides and pigments with the ability to bind metals (Gadd, 2007). In general, the possible explanation for these morphological changes may be due to the vast detoxification/tolerance mechanisms that each strain has evolved. The variation in tolerance to toxic metals may be due to the presence of one or more types of tolerance strategies or resistance mechanisms of fungal species (Zafar et al., 2007); furthermore, alteration of microscopic structure of fungal biomass (rough-looking hyphae and flattened spores) treated with 100 ppm cadmium was observed.

Conclusions

Fungal strain of *A. terreus*, isolated in this study, showed high tolerance to the presence of lead and moderate tolerance to mercury in all the concentrations evaluated, and the multimetal system (cadmium, chrome, mercury and lead). This suggests that microorganisms isolated from soils contaminated

han desarrollado un mecanismo enzimático para reducir la toxicidad del cromo. Este mecanismo está mediado por un sistema de enzimas antioxidantes que involucran peroxidasa, catalasas y ascorbato peroxidasa (Srivastava & Thakur, 2006). Bůcková, Godočiková, Šimonovičová, y Polek (2005) encontraron una relación positiva entre el nivel de catalasas totales y el incremento en la tolerancia de metales en cultivos de *A. niger* aislado de zonas con actividad minera. La producción de catalasas es uno de los mecanismos que las células utilizan para protegerse contra el daño causado por las especies reactivas de oxígeno. Por ello, dichos autores concluyeron que la regulación de la producción de catalasas de *A. niger* pudo ser una respuesta adaptativa al estrés ambiental generado no solo por una concentración alta de metales, sino también por cambios en el pH y contenido de nutrientes, que con frecuencia acompañan a los suelos impactados por residuos mineros. Es probable que *A. terreus*, aislado en el presente estudio, utilice mecanismos adaptativos similares a los mencionados.

Cambios en la morfología

En el desierto de Sonora se han encontrado, en su mayoría, hongos microscópicos con micelio de color verde intenso, café o negro (Ranzoni, 1968). La Figura 6 muestra los cambios en la morfología y pigmentación

with toxic metals develop tolerance mechanisms to these substances; however, the level of tolerance is influenced by the type of metal. According to these results, *A. terreus* may have the potential to remove the toxic metals studied in this research.

End of English version

References / Referencias

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2019). Priority list of hazardous substances. Retrieved March 16, 2020, from <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html/>
- Atiqah, Z. N., & Zakaria, L. (2017). Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. *HAYATI Journal of Bioscience*, 24(1), 26–34. doi: 10.1016/j.hjb.2017.05.002
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2001). *Ecología microbiana y microbiología ambiental* (4.ª ed.). España: Pearson.
- Awasthi, K. A., Pandey, A. K., & Khan, J. (2017). A preliminary report of indigenous fungal isolates from contaminated municipal solid waste site in India. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 8880–8888. doi: 10.1007/s11356-017-8472-0
- Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D., & Chalot, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2), 173–181. doi: 10.1111/j.1574-6968.2005.00044.x
- Bůcková, M., Godočíková, J., Šimonovičová, A., & Polek, B. (2005). Production of catalases by *Aspergillus niger* isolates as a response to pollutant stress by heavy metals. *Current Microbiology*, 50, 175–179. doi: 10.1007/s00284-004-4458-5
- Chakraborty, S., Mukherjee, A., & Das, T. K. (2013). Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: An implication of bioremediation of lead from liquid media. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 134–142. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.05.031
- Cordero, R. J., & Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*, 31(2), 99–112. doi: 10.1016/j.fbr.2016.12.003
- Desai, H., Patel, D., & Joshi, B. (2016). Screening and characterization of heavy metal resistant bacteria for its prospects in bioremediation of contaminated soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 5(4), 652–658. doi: 10.20546/ijcm.2016.504.074
- Dey, P., Gola, D., Mishra, A., Malik, A., Kumar, P., Kumar, S. D., ... Jehmlich N. (2016). Comparative performance evaluation of multi-metal resistant fungal strains for simultaneous removal of multiple hazardous metals. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 679–685. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.025
- Dhankhar, R., & Hooda, A. (2011). Fungal biosorption an alternative to meet the challenges of heavy metal

del micelio por exposición a la mezcla de metales. A partir de 16 ppm se observan cambios en la coloración café en comparación con el control. En otros estudios también se ha documentado este fenómeno al exponer el micelio a metales en medio de cultivo (Yazdani, Yap, Abdullah, & Tan, 2010). Fazli et al. (2015) observaron cambios en la coloración en varios hongos por exposición al cadmio: decoloración en *Aspergillus versicolor* Tirab. 1908 y *Cladosporium* sp., el color rosa de *Paecilomyces* sp. cambió a blanco, y *Terichoderma* sp. y *A. fumigatus* cambiaron de verde a blanco. En algunas especies pueden producirse pigmentaciones en las células fúngicas que van desde rojas, amarillas, negras o de otras tonalidades. Lo anterior puede deberse a la precipitación de los metales en la pared celular, en respuesta a que los hongos producen diversos compuestos extracelulares como agentes complejantes, agentes precipitantes, polisacáridos y pigmentos con capacidad de unir metales (Gadd, 2007). En general, la posible explicación de estos cambios morfológicos puede deberse a los vastos mecanismos de desintoxicación/tolerancia que cada cepa ha desarrollado. La variación en la tolerancia a los metales tóxicos podría deberse a la presencia de uno o más tipos de estrategias de tolerancia o mecanismos de resistencia de las especies de hongos (Zafar et al., 2007); además, se observó alteración de la estructura microscópica de la biomasa fúngica (hifas con aspecto rugoso y esporas aplanadas) tratada con 100 ppm de cadmio.

Conclusiones

La cepa del hongo *A. terreus*, aislada en este trabajo, mostró tolerancia alta a la presencia de plomo y tolerancia moderada al mercurio en todas las concentraciones evaluadas, así como al sistema multimetal (cadmio, cromo, mercurio y plomo). Lo anterior sugiere que los microorganismos aislados de suelos contaminados con metales tóxicos desarrollan mecanismos de tolerancia a dichas sustancias; sin embargo, el nivel de tolerancia se ve influenciado por el tipo de metal. Según estos resultados, *A. terreus* podría tener potencial para remover los metales tóxicos estudiados en esta investigación.

Fin de la versión en español

- pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*, 32(5), 467–491. doi: 10.1080/09593330.2011.572922
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., Shukla, R., ... Lade, H. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7, 2189–2212. doi: 10.3390/su7022189

- Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F., & Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 3(2), 35–48. doi: 10.5897/AJMR.9000354
- Fazli, M., Soleimani, N., Mehraabi, M., Darabian, S., Mohammadi, J., & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 13, Article 19. doi: 10.1186/s40201-015-0176-0
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407–418. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.11.011
- Gadd, G. M. (1993). Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124, 25–60. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03796.x
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycology Research*, 111(1), 3–49. doi: 10.1016/j.mycres.2006.12.001
- Gola, D., Dey, P., Bhattacharya, A., Mishra, A., Malik, A., Namburath, M., & Ahammad, S. Z. (2016). Multiple heavy metal removal using an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Bioresource Technology*, 218, 388–396. doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.096
- Gorbushina, A. A., & Krumbein, W. E. (2000). Subaerial microbial mats and their effects on soil and rock. In R. E. Riding, & S. M. Awramik (Eds.), *Microbial sediments* (pp. 161–170). Berlin, Germany: Springer. doi: 10.1007/978-3-662-04036-218
- Gube, M. (2016). Fungal molecular response to heavy metal stress. In K. Esser, & D. Hoffmeister (Eds.), *Biochemistry and molecular biology. The mycota (A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research)* (pp. 47–68). Cham, Switzerland: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-27790-54
- Gunatilake, S. K. (2015). Methods of removing heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science Studies*, 1(1), 12–18. Retrieved from <http://jmess.org/wp-content/uploads/2015/11/JMESSP13420004.pdf>
- Gupta, V. K., Nayak, A., & Agarwal, S. (2015). Bioadsorbents for remediation of heavy metals: Current status and their future prospects. *Environmental Engineering Research*, 20(1), 1–18. doi: 10.4491/eer.2014.018
- Gururajan, K., & Belur, P. D. (2018). Screening and selection of indigenous metal tolerant fungal isolates for heavy metal removal. *Environmental Technology & Innovation*, 9, 91–99. doi: 10.1016/j.eti.2017.11.001
- International Union of Soil Sciences (IUSS). (2015). *World reference base for soil resources 2014, update 2015 International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World soil resources reports No. 106*. Italy: FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/3/i3794en/I3794en.pdf>
- Iram, S., Ahmad, I., Javed, B., Yaqoob, S., Akhtar, K., & Kazmi, M. R. (2009). Fungal tolerance to heavy metals. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2583–2594. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103010443>
- Iskandar, N. L., Zainudin, N., & Tan, S. G. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Science*, 23(5), 824–830. doi: 10.1016/S1001-0742(10)60475-5
- Jiang, S., Wang, W., Xue, X., Cao, C., & Zhang, Y. (2016). Fungal diversity in major oil-shale mines in China. *Journal of Environmental Science*, 41, 81–89. doi: 10.1016/j.jes.2015.04.032
- Joo, J-H., & Hussein, K. A. (2012). Heavy metal tolerance of fungi isolated from contaminated soil. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 45(4), 565–571. doi: 10.7745/KJSSF.2012.45.4.565
- Kabata-Pendias, A. (2010). *Trace elements in soils and plants* (4th ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Kermasha, S., Pellerin, F., Rovet, B., Goetghebeur, M., & Metche, M. (1993). Purification and characterization of copper-metallothioneins from *Aspergillus niger*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(9), 1420–1423. doi: 10.1271/bbb.57.1420
- Khan, I., Aftab, M., Shakir, S., Ali, M., Qayyum, S., Ur Rehman, M., ... Touseef, I. (2019). Mycoremediation of heavy metal (Cd and Cr)-polluted soil through indigenous metallotolerant fungal isolates. *Environmental Monitoring Assessment*, 191, Article 585. doi: 10.1007/s10661-019-7769-5
- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht, Países Bajos: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Kurniati, E., Arfarita, N., & Imai, T. (2014). Potential use of *Aspergillus flavus* strain KRP1 in utilization of mercury contaminant. *Procedia Environmental Science*, 20, 254–260. doi: 10.1016/j.proenv.2014.03.032
- Maini, Z. A. N., Aribal, K. M. J., Narag, R. M., Melad, J. L., Frejas, J. A. D., Arriola, L. A. M., ... Lopez, C. M. (2019). Lead (II) tolerance and uptake capacities of fungi isolated from a polluted tributary in the Philippines. *Applied Environmental Biotechnology*, 4(1), 18–29. doi: 10.26789/AEB.2019.01.004
- Malofe, T. C., Solhaug, K. A., Minibayera, F. V., & Beckett, R. P. (2019). Occurrence and possible roles of melanin pigments in lichenized ascomycetes. *Fungal Biology Reviews*, 33(3-4), 159–165. doi: 10.1016/j.fbr.2018.10.002
- Meng, J., Wang, W., Li, L., Yin, Q., & Zhang, G. (2017). Cadmium effects on DNA and protein metabolism in oyster (*Crassostrea gigas*) revealed by proteomic analyses. *Scientific Report*, 7, Article 11716. doi: 10.1038/s41598-017-11894-7
- Mishra, A., & Malik, A. (2012). Simultaneous bioaccumulation of multiple metals from electroplating effluent using *Aspergillus lentulus*. *Water Research*, 46(16), 4991–4998. doi: 10.1016/j.watres.2012.06.035

- Mohammadian, E., Ahari, A. B., Arzanlou, M., Oustan, S., & Khazaei, S. H. (2017). Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. *Chemosphere*, 185, 290–296. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.022
- Mungasavalli, D. P., Viraraghavan, T., & Jin, Y.-C. (2007). Biosorption of chromium from aqueous solutions by pretreated *Aspergillus niger*: batch and column studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301(1-3), 214–223. doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.12.060
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2003b). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5(4), 203–223. doi: 10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x
- Oladipo, O. G., Awotoye, O. O., Olayinka, A., Bezuidenhout, C. C., & Maboeta, M. S. (2018). Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 29–37. doi: 10.1016/j.bjm.2017.06.003
- Pumpel, T., & Paknikar, K. (2001). Bioremediation technologies for wastewaters using metabolically active microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 48, 134–169. doi: 10.1016/s0065-2164(01)48002-6
- Ranzoni, F. V. (1968). Fungi isolated in culture from soils of the Sonoran Desert. *Mycologia*, 60(2), 356–371. doi: 10.2307/3757166
- Rose, P. K., & Devi, R. (2018). Heavy metal tolerance and adaptability assessment of indigenous filamentous fungi isolated from industrial wastewater and sludge samples. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4), 688–694. doi: 10.1016/j.bjbas.2018.08.001
- Sanyal, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A., & Sastry, M. (2005). Heavy-metal remediation by a fungus as a means of production of lead and cadmium carbonate crystals. *Langmuir*, 21(16), 7220–7224. doi: 10.1021/la047132g
- Say, R., Yilmaz, N., & Denizli, A. (2003). Biosorption of cadmium, lead, mercury, and arsenic ions by the fungus *Penicillium purpurogenum*. *Separation Science and Technology*, 38(9), 2039–2053. doi: 10.1081/SS-120020133
- Sevim, Ç., Dogana, E., & Comakli, S. (2020). Cardiovascular disease and toxic metals. *Current Opinion in Toxicology*, 19, 88–92. doi: 10.1016/j.cotox.2020.01.004
- Srivastava, S., & Thakur, I. S. (2006). Biosorption potency of *Aspergillus niger* for removal of chromium (VI). *Current Microbiology*, 53, 232–237. doi: 10.1007/s00284-006-0103-9
- Tariba, L. B. (2020). Cadmium, arsenic, and lead: elements affecting male reproductive health. *Current Opinion in Toxicology*, 19, 7–14. doi: 10.1016/j.cotox.2019.09.005
- Thippeswamy, B., Shivakumar, C., & Krishnappa, M. (2014). Studies on heavy metals detoxification biomarkers in fungal consortia. *Caribbean Journal of Science and Technology*, 2, 496–502. Retrieved from <http://www.caribjstech.com/article/studies-heavy-metals-detoxification-biomarkers-fungal-consortia>
- Valix, M., Tang, J. Y., & Malik, R. (2001). Heavy metal tolerance of fungi. *Minerals Engineering*, 14(5), 499–505. doi: 10.1016/S0892-6875(01)00037-1
- Villalba-Villalba, A. G., Cruz-Campas, M. E., & Azuara-Gómez, G. V. (2018). *Aspergillus niger* Tiegh isolated in Sonora, Mexico: metal tolerance evaluation. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 24(2), 131–146. doi: 10.5154/r.rchscfa.2017.03.023
- VSN International. (2019). GenStat for Windows 20 th Edition. Hemel Hempstead, UK: Author.
- Yazdani, M., Yap, C. K., Abdullah, F., & Tan, S. G. (2010). An *in vitro* study on the adsorption, absorption and uptake capacity of Zn by the bioremediator *Trichoderma atroviride*. *Environment Asia*, 3(1), 53–59. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103182204>
- Zafar, S., Aqil, F., & Ahmad, I. (2007). Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 98(13), 2557–2561. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.051
- Zolfaghari, G. (2018). Risk assessment of mercury and lead in fish species from Iranian international wetlands. *MethodsX*, 5, 438–447. doi: 10.1016/j.mex.2018.05.002