



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Identificación filogenética,
diversidad y caracterización de la tolerancia a metales pesados
de hongos extremófilos en los glaciares de los volcanes
Citlaltépetl e Iztaccíhuatl

TESIS INDIVIDUAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

IRMA ELISA FERNÁNDEZ TÉLLEZ

DIRIGIDA POR

Dra. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2020

Resumen

La criósfera se caracteriza por la presencia de hielo en masas extensas, cubren aproximadamente el 10% de la superficie de la Tierra. Se ha encontrado que estos hábitats albergan una gran diversidad de vida microbiana procariota y eucariota. La mayoría de los estudios acerca de este tema, se han realizado en ambientes polares, en los glaciares árticos y antárticos. El Citlaltépetl junto con el Iztaccíhuatl son los dos volcanes que albergan glaciares en México. El primero es un estratovolcán y es el tercer volcán más alto de América del Norte. Alberga nueve glaciares entre ellos el Gran Glaciar Norte, uno de los más importantes en Norteamérica. El Iztaccíhuatl es un complejo de estratovolcanes del pleistoceno. Este posee tres glaciares: Ayoloco, La Panza y El Pecho. El objetivo de este trabajo fue identificar hongos filamentosos adaptados al frío de diferentes puntos del Citlaltépetl y del Iztaccíhuatl, para investigar su tolerancia a metales pesados (Cr, Hg y Pb). Las muestras se cultivaron en agar. Los cultivos axénicos se usaron para la identificación molecular y morfológica. El ADN fúngico fue aislado mediante un método basado CTAB y se amplificó el ITS para la identificación de especies que se realizó mediante un análisis de inferencia filogenética comparando las secuencias obtenidas con las de la base de datos GenBank. Mediante BLAST y usando la plataforma en línea para categorizar los aislados. Por último, se caracterizaron los aislados probando su tolerancia/resistencia a metales pesados (cromo, mercurio y plomo) usando diferentes concentraciones de cada metal.

Palabras clave: Hongos Extremófilos, Identificación fúngica, Tolerancia a metales pesados

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A Irma Téllez Avilés, que decidió seguirme y ser mi compañía durante estos años, a

Reynaldo Fernández Delgado por su insistencia y apoyo siempre.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro donde cursé la Licenciatura en Biología y donde se llevó a cabo parte de este proyecto.

A la Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina por su orientación y revisión en la tesis, pero sobre todo por adentrarme en el mundo de los hongos.

Al Dr. Juan Campos Guillén por su orientación, revisión y apoyo a este proyecto.

Al Dr. Fidel Landeros Jaime por su orientación, sugerencias y revisión de este proyecto.

Al Dr. Carlos Saldaña por su orientación, sugerencias y revisión de este proyecto.

Al Mtro. Luis Barba Escoto por su orientación, sugerencias y revisión de este proyecto.

Al Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio por su apoyo.

Al Lic. Diego Santamaría Tovar por su colaboración.

Al Mtro. Efraín Escudero Leyva por su orientación en la filogenia.

A Cuauhtémoc Téllez Avilés por su apoyo y ponerme en la mesa a Querétaro para continuar mis estudios.

A Esperanza Avilés González por sus consejos.

A José Ángel Carnicero Maldonado por su confianza y sus incesantes preguntas.

A Franco Huerta Padrones por su apoyo en el registro fotográfico de las pruebas.

A Ariadna Medina Téllez por su apoyo y constancia.

Índice

Índice	v
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.2 Glaciares en México	2
2.3 Microorganismos psicrófilos	3
2.4 Diversidad de micromicetos psicrófilos	5
2.5 Caracterización de micromicetos psicrófilos	7
2.6 Bioacumulación de metales pesados en hongos filamentosos	7
3. Justificación	9
4. Hipótesis	10
5. Objetivos	10
5.2 Objetivos Particulares	10
6. Metodología	11
6.1 Colecta de muestras	11
6.2 Métodos de cultivo	12
6.3 Identificación morfológica y molecular	13
6.4 Electroforesis	15
6.5 Inferencia filogenética	16
6.6 Caracterización de micromicetos psicrotolerantes mediante resistencia/sensibilidad a metales pesados	17
7. Resultados	19
8. Discusión	34
9. Conclusiones	41
10. Referencias	42
Apéndice 1	47

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. Introducción

Los glaciares son masas extensas de hielo que se originan por acumulación y compactación de la nieve. Estos forman parte de la criósfera global, la cual también comprende hábitats relacionados como: mares helados, capas de hielo, capas de hielo continentales, y suelo congelado o permafrost (Cameron, Hodson y Osborn, 2012). Los hielos perpetuos cubren 10.8% de la superficie terrestre, la mayor parte se encuentra en Groenlandia y el continente antártico. Se estima que hay 200.000 glaciares en el mundo, aunque estos cubren áreas relativamente pequeñas del paisaje (Marshall, 2011).

Durante muchos años, la Antártida ha sido el área geográfica donde mayor investigación se ha realizado por investigadores para estudiar la diversidad de microorganismos psicrófilos (Buzzini *et al.*, 2011). Sin embargo, las regiones de glaciares se encuentran también en latitudes más bajas, como los Alpes, los Andes o los Himalayas (Frey *et al.*, 2016). Los hábitats de glaciares altitudinales presentan variabilidad espacial y geotérmica extrema, sedimentos gruesos bien drenados en pendientes pronunciadas, redistribución de la nieve por viento y avalanchas, temperaturas medias anuales más cálidas y una menor influencia de la vegetación, lo que hace que estos hábitats sean muy diferentes de glaciares de tierras bajas en latitudes extremas. Los cuales presentan una respuesta al cambio climático diversas de acuerdo al sitio de estudio (Frey *et al.*, 2016).

En México, pequeños glaciares están presentes en los volcanes de mayor altitud en el relieve mexicano: Citlaltépetl (5675 m), Popocatépetl (5452 m) e Iztaccíhuatl (5286 m), todos ellos volcanes, aunque después de la erupción del Popocatépetl en

2003, no se sabe si éste posee glaciare (Álvarez y Delgado, 2002). Los estudios que se han realizado en latitudes más bajas sólo comprenden países como Argentina y Chile. En altitudes mayores como en Nepal y Alaska donde se han reportado una gran diversidad de microorganismos. Por lo tanto, la literatura publicada hasta la fecha da solo una imagen fragmentada de la diversidad de los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes en los hábitats glaciales mundiales, así como de sus características fisiológicas y biotecnológicas.

2. Antecedentes

2.2 Glaciares en México

La máxima extensión glaciare en el centro de México ocurrió entre 21,000 y 18,000 años antes del presente en las montañas de más de 3,800 m, coincidente con el Último Máximo Glacial (UMG). La cronología glaciare mexicana es similar a la de regiones más boreales de Norteamérica (Delgado-Granados *et al.*, 2015). En las últimas décadas, los glaciares mexicanos habían permanecido en las cimas del Citlaltépetl, Iztaccíhuatl y Popocatepetl. Los glaciares de este último, se considera que aceleraron su desaparición debido a la actividad eruptiva, aunque se desconoce si están por completo derretidos debido a la falta de estudios (Delgado-Granado, 2007). En la actualidad, la cobertura de estos glaciares ha disminuido en gran magnitud, los glaciares del Iztaccíhuatl representan sólo el 4% de los que alguna vez hubo al final de la Pequeña Edad de Hielo. En el Pico de Orizaba, el área glaciare en 2010 era un 30% del área total de 1958 (Delgado-Granados *et al.*, 2015). El estudio de los glaciares mexicanos es de gran interés porque están expuestos a los efectos combinados del cambio climático, la actividad volcánica y humana. Por otra

parte, Álvarez y Delgado-Granados (2002) estudian el espesor del glaciar de La Panza en el Iztaccíhuatl y posteriormente Delgado-Granados *et al.* (2005) y Schneider *et al.* (2008) actualizan el inventario glacial del volcán Iztaccíhuatl. En este último se establece una proyección a cerca de la desaparición de estos glaciares hacia el año 2020. Sin embargo, cerca estamos ya de ese año y aún no resulta la desaparición de dicho glaciar.

2.3 Microorganismos psicrófilos

Dentro de las regiones polares, a pesar de temperaturas bajo cero, meses de oscuridad y bajas condiciones de nutrientes, se ha descubierto que la variedad de hábitats fríos alberga comunidades microbianas, como suelos de permafrost y ambientes rocosos (De la Torre *et al.*, 2003), así como en ambientes subglaciales y supraglaciales (Cameron *et al.*, 2012).

Esta gran diversidad de vida microbiana procariota y eucariota psicrófila y/o psicrotolerante, incluye arqueas, bacterias, cianobacterias, levaduras, hongos filamentosos, algas y protozoos (Buzzini *et al.*, 2011). Son microorganismos altamente especializados que han desarrollado estrategias de adaptación para superar la influencia directa e indirecta de las bajas temperaturas (Feller y Gerday, 1997).

Convencionalmente, los microorganismos adaptados al frío se pueden dividir en psicrófilos obligados y facultativos (psicrotolerantes). Los psicrófilos obligados exhiben una temperatura óptima para el crecimiento alrededor de 15°C, una temperatura máxima de 20°C y una temperatura mínima para el crecimiento a -10°C

o menos (Morita, 1975 en Buzzini *et al.*, 2011). Por el contrario, los microorganismos que crecen a 0°C pero exhiben una temperatura óptima para el crecimiento a 20-30 ° C se denominan psicrófilos facultativos o psicrotolerantes (Zupan, 2006).

Los psicrófilos facultativos han evolucionado para tolerar el frío, pero no están tan fisiológicamente especializados como psicrófilos obligados: los primeros son predominantes en ecosistemas expuestos periódicamente a bajas temperaturas mientras que los segundos predominan en hábitats glaciales permanentes. Sin embargo, en algunos casos (por ejemplo, en suelos y rocas antárticas, que están sujetos a amplias fluctuaciones térmicas) dominan los psicrófilos facultativos (Zucconi *et al.*, 1996). Se cree que ambos juegan un papel clave en la biodegradación de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes esenciales a nivel de la criosfera (Shivaji y Prasad, 2009).

La adaptación al frío requiere una gama compleja de adaptaciones estructurales y funcionales. Las temperaturas bajas influyen en la vida de todos los organismos de múltiples maneras, la principal es modificando las tasas de crecimiento (Buzzini *et al.*, 2011). Los microorganismos psicrófilos que comparten entornos naturales oligotróficos están sujetos a condiciones de frío estacional o permanente. Por lo tanto, desarrollaron una serie de estrategias de adaptación: aumento de la fluidez de la membrana a bajas temperaturas (al modificar la composición de los ácidos grasos), síntesis de proteínas protectoras como respuesta a tensiones térmicas, síntesis de macromoléculas crioprotectoras para reducir la presencia de cristales de hielo de citoplasma, cambios subcelulares, moleculares y metabólicos, reducción de las tasas de crecimiento y síntesis de enzimas activas en frío (Buzzini *et al.*, 2011).

2.4 Diversidad de micromicetos psicrófilos

Actualmente se están llevando a cabo una gran cantidad de estudios de levaduras y hongos filamentosos en glaciares. Los hongos psicrófilos se han aislado a partir del hielo supra y subglacial en Svalbard (Butinar *et al.*, 2007), del hielo glacial austriaco; e italiano (Thomas-Hall *et al.*, 2009), hielo supra y subglacial y agua de deshielo de los Alpes (Turchetti *et al.*, 2013), aguas glaciales y subglaciales del noroeste de la Patagonia (Brizzio *et al.*, 2007) y la Antártida (Cameron *et al.*, 2011). Estos microorganismos fúngicos pueden crecer y degradar el fenol así como las macromoléculas orgánicas (Buzzini *et al.*, 2009) a bajas temperaturas (1-4°C), y exhiben actividad celular extracelular (Brizzio *et al.*, 2007). Recientemente, Shivaji y Prasad (2009) subrayan que los hongos son un grupo versátil de microorganismos eucariotas que exhiben perfiles nutricionales heterogéneos y una sorprendente capacidad de sobrevivir en una amplia gama de hábitats naturales y alterados.

Estudios ecológicos y taxonómicos en hongos que habitan en la criosfera se han llevado a cabo durante no más de 60 años, la identificación de cepas se ha realizado utilizando criterios taxonómicos. Por lo tanto, se han caracterizado cientos de aislados y se han descrito varias especies nuevas por primera vez. En general, las levaduras antárticas se identificaron como pertenecientes a 70 especies (13 ascomicetos y 57 basidiomicetos). También se encontraron organismos dimórficos (levaduras/filamentos como *Aureobasidium pullulans*): el principal género representado fue *Cryptococcus* (aproximadamente el 25% del número total de especies) (Buzzini *et al.*, 2011).

Las levaduras aisladas por otros autores se identificaron como pertenecientes tanto a las especies ascomicetas como a las basidiomicetas: el género *Candida*, *Cryptococcus*, *Dioszegia* y *Rhodotorula* fueron los más comúnmente representados (Buzzini *et al.*, 2011). Las variaciones de la temperatura estacional, la disponibilidad esporádica de agua líquida y los cambios de algunas características químicas y físicas (por ejemplo, pH y conductividad eléctrica) aparentemente afectan la distribución de dichos hongos (Buzzini *et al.*, 2011).

Con base en las búsquedas BLASTn en GenBank, se han identificado hongos acuáticos en la Antártida, en diferentes niveles taxonómicos, los cuales, desempeñan un papel importante en la transferencia de materiales y energía inorgánicos y orgánicos en los ambientes acuáticos (Zhang *et al.*, 2014). Estos hongos pertenecientes a los phyla: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota (Zhang *et al.*, 2014).

En Alaska (Panikov y Sizova, 2006), se desarrolló un procedimiento para cultivar microorganismos por debajo del punto de congelación. En medios sólidos (polvo de celulosa o película de plástico) con etanol como única fuente de carbono sin usar anticongelantes artificiales. El enriquecimiento del suelo y el permafrost obtenido en dichos medios sólidos congelados contenía principalmente hongos, y la posterior purificación dio como resultado el aislamiento de los géneros *Mrakia* y *Leucosporidium*, así como hongos ascomicetes del género *Geomyces* y *Cladosporium*.

Un estudio ecológico de hongos asociados a los glaciares de América del Sur llevado a cabo en el área del Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina.

Donde se encontraron 41 especies (cuatro ascomicetos y 37 basidiomicetos) alrededor de un tercio pertenecen al género *Cryptococcus* (De García, Brizzio y Broock, 2012).

2.5 Caracterización de micromicetos psicrófilos

Recientemente, la investigación se ha centrado en la caracterización detallada de las comunidades microbianas que residen en el permafrost, ya que estos hábitats podrían encerrar una diversidad microbiana viable, adaptada al frío y novedosa que albergue recursos genéticos ambiental y biotecnológicamente interesantes con un potencial metabólico novedoso (Ozerskaya, Kochkina e Ivanushkina, 2009). También resulta de alto interés científico las especies potencialmente patógenas de preocupación ambiental que se liberarán en áreas pobladas debido al derretimiento de los glaciares y a la sobrepoblación mundial (Frey *et al.*, 2016). Los enfoques dependientes del cultivo se han dirigido a seleccionar aislamientos de estas comunidades para actividades de interés, incluidas nuevas vías de degradación, actividades antimicrobianas o resistencias a antibióticos. Sin embargo, sabemos que solo una pequeña minoría de la comunidad, menos del 1% del recuento total de células, puede cultivarse fácilmente en condiciones estándar de laboratorio (Frey *et al.*, 2016).

2.6 Bioacumulación de metales pesados en hongos filamentosos

Los compuestos tóxicos, tales como metales pesados, antibióticos, pesticidas y otros contaminantes persistentes, pueden ser transferidos a sitios donde habitan los hongos psicrófilos a través de procesos naturales en masa en la atmósfera y los océanos. Aunque existe un protocolo de protección ambiental, se producen varios

eventos de contaminación por prácticas inadecuadas de eliminación e incineración de desechos en las estaciones de investigación (De Souza *et al.*, 2006). Los fenoles y sus derivados son contaminantes ambientales problemáticos que se encuentran comúnmente en muchos productos industriales. A pesar de ser tóxicos, los microbios pueden utilizar el fenol como fuente de carbono y energía. Se conoce que los miembros de algunos géneros de levaduras como: *Rhodotorula*, *Trichosporon* y *Candida*, pueden metabolizar compuestos fenólicos como única fuente de carbono y energía (Santos y Linardi, 2001). La biodegradación aeróbica a bajas temperaturas de muchos componentes de los hidrocarburos del petróleo, incluidos los n-alcanos, los aromáticos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Se ha descrito una gran variedad de bacterias, hongos y algas que pueden metabolizar hidrocarburos alifáticos y aromáticos aisladas del Ártico y ambientes antárticos (Alexander, 1999 en Fernández *et al.*, 2017). Los hongos filamentosos son conocidos por su potencial para degradar los HAP. Sin embargo, hay poca información sobre el potencial de degradación de hidrocarburos de las levaduras. Debido a que la exposición a metales pesados representa una condición de estrés, la mayor capacidad de algunos aislados adaptados al frío para la tolerancia del metal puede atribuirse a su capacidad para sobrevivir bajo temperaturas extremas, ya que la expresión de algunos genes podría estar involucrada en mecanismos que combaten el estrés (Abe y Minegishi, 2008).

3. Justificación

El estudio y descripción de los hongos extremófilos adaptados al frío, resulta interesante, ya que presentan rutas metabólicas y bioquímicas inusuales para generar compuestos específicos a las condiciones extremas en las que habitan (metabolitos secundarios en la mayoría de los casos). Los cuales podrían estar involucrados como degradadores de compuestos tóxicos de ambientes extremos contaminados. La capacidad para tolerar compuestos tóxicos, incluidos los metales pesados, se ha demostrado en algunos hongos aislados de la Antártida. Esto puede estar relacionado con la expresión de algunos genes y enzimas que participan tanto en las adaptaciones al estrés de los climas extremos en los que habitan. Esta expresión genómica y proteica les ayudaría a mantenerse vivos ante la exposición a metales pesados.

Por lo tanto, el interés en los hongos extremófilos como fuentes potenciales de nuevos productos ha aumentado, especialmente en moléculas bioactivas la cuales representan un reservorio químico para descubrir nuevos compuestos con aplicaciones como podrían ser: antibióticos, antioxidantes, inmunomoduladores, anticarcinogénicos y antiparasitarios. Los cuales podrían tener aplicaciones en la industria farmacéutica, la agrícola, y en la biorremediación de compuestos tóxicos como los metales pesados.

4. Hipótesis

Por las condiciones extremas, como la latitud y la incidencia elevada de radiación UV, los hongos filamentosos encontrados en los glaciares del volcán Citlaltépetl e Iztaccíhuatl podrán soportar altas concentraciones de cromo, mercurio y plomo por su capacidad adaptativa.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Identificar por inferencia filogenética, describir parte de la diversidad fúngica y caracterizar la resistencia a tres metales pesados de hongos extremófilos aislados del Gran Glaciar Norte del Citlaltépetl y los glaciares El Pecho y La Panza del Iztaccíhuatl.

5.2 Objetivos Particulares

- 1) Identificar fenotípica y genotípicamente los hongos filamentosos y categorizarlos por medio de inferencia filogenética.
- 2) Describir parte de la diversidad fúngica encontrada en los glaciares de los volcanes mexicanos.
- 3) Caracterizar los hongos identificados por medio de pruebas químicas la tolerancia/sensibilidad a dos metales pesados (cromo, mercurio y plomo).

6. Metodología

6.1 Colecta de muestras

En México, dos volcanes de gran altitud, Citlaltépetl (5675 msnm) e Iztaccíhuatl (5286 msnm) (Fig. 1), albergan cuerpos de hielo. Estos están ubicados respectivamente en la parte oriental y central del Cinturón Volcánico Transmexicano. El Citlaltépetl (El cerro de la estrella en náhuatl) es un estratovolcán y es el tercer volcán más alto de América del Norte. Este entró en erupción durante el Pleistoceno tardío y el Holoceno, la erupción más reciente ocurrió en 1687. El avance máximo de los glaciares del Citlaltépetl ocurrió entre 10 000 y 8500 años antes del presente. Un segundo avance ocurrió en la Pequeña Edad de Hielo en México (Álvarez y Delgado, 2002). El Iztaccíhuatl (5230 msnm) que significa Mujer blanca en náhuatl, es un complejo de estratovolcanes del Pleistoceno. Hasta la fecha, es un volcán con actividad sísmica (Delgado-Granado et al., 2005). Es la tercera cima más alta del país después del Pico de Orizaba (5,610 msnm) y el Popocatepetl (5,520 msnm). Se localiza en los límites territoriales de los estados de México y Puebla. La superposición del material volcánico y desarrollo de los diferentes volcanes que formaron el complejo resultaron en una morfología muy particular. Debido a esto los nombres de los sitios geográficos se refieren como partes de un cuerpo femenino (Álvarez y Delgado, 2002). Este posee tres glaciares: Ayoloco, La Panza y El Pecho.

En febrero 2019, se recibieron 7 muestras tomadas por la Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina en colaboración con el Lic. Diego Santamaria Tovar de los glaciares: Gran Glaciar Norte en el Citlaltépetl y en La Panza y El Pecho del Iztaccíhuatl como parte de un proyecto generado en el Laboratorio de Microbiología y Proteómica Ocular de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia

Privada Conde de Valenciana® Sede Centro ubicado Chimalpopoca 14, Centro, 06800 Ciudad de México, CDMX. De acuerdo con el protocolo realizado por la Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina, se cavaron agujeros de 60 cm de profundidad utilizando un piolet estéril (flameado tres veces *in situ* con etanol 96°) para obtener las muestras. Fueron colocadas en recipientes de vidrio estériles por triplicados. Una vez en el laboratorio, las muestras se almacenaron durante la noche a 4°C para su derretimiento y su posterior traslado y procesamiento al laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química de la UAQ.

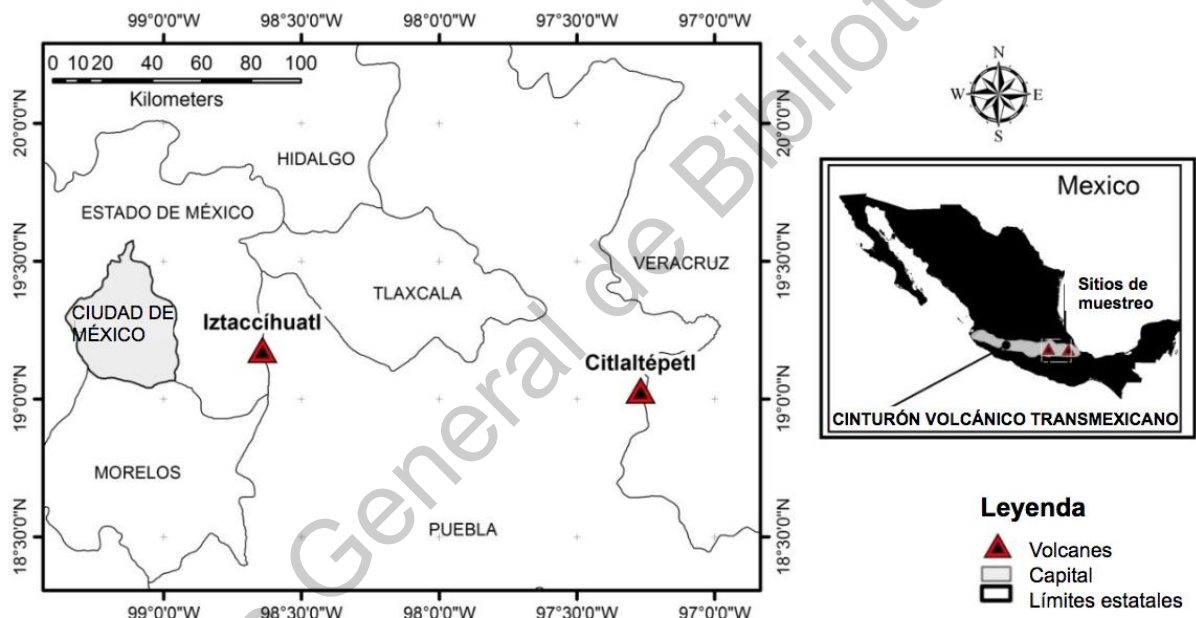


Figura 1. Ubicación de los volcanes Citlaltépetl e Iztaccihuatl respecto a la Ciudad de México.

6.2 Métodos de cultivo

El agua derretida del glaciar se filtró a través de filtros de 0,22 mm (Millipore) (Branda *et al*, 2010), los filtros se cortaron en trozos pequeños con tijeras estériles y se colocaron en placas de Petri en condiciones estériles. Los aislamientos se cultivaron en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) y Agar Sangre de Cordero (BSA)

suplementado con cloranfenicol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a diferentes temperaturas (4°C y 28°C) en la oscuridad hasta que las colonias fúngicas fueron evidentes, vistas en el estereoscopio. Para evitar contaminaciones, se observaron las placas inoculadas todos los días para realizar subcultivos axénicos. Esto, se hizo con todas las colonias morfológicamente distintas. Los cultivos axénicos se obtuvieron mediante un corte de agar con el cultivo elegido y este fue cultivado en Agar Papa Dextrosa (PDA) suplementado con una infusión de papa (100 g por litro). Las papas se cortaron en trozos finos y la infusión se hirvió durante 30 minutos, después el líquido fue filtrado con gasa y se ajustó al volumen deseado para preparar agar.

Todos los residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) se procesaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995 y a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Todos los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo al manual de “Las buenas prácticas de laboratorio” establecido por la Food and Drug Administration (FDA) y La Agencia de Protección Ambiental (EPA).

6.3 Identificación morfológica y molecular

Las características morfológicas macroscópicas se observaron directamente en placas de Petri de medios sólidos PDA suplementado. Se observaron características microscópicas en un portaobjetos con la tinción de azul de algodón Lactofenol bajo el microscopio. Se hicieron microcultivo para tener una mejor evidencia de características micro morfológicas. Los microcultivos se realizaron en cajas de Petri estériles usando dos portaobjetos estériles con un pedazo de PDA entre los dos, añadiendo glicerol al 40% en una placa de Petri estéril para evitar la deshidratación del PDA según lo informado por Deacon (1997).

El ADN fúngico fue aislado mediante un método basado en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Möller *et al.*, 1992). Se agregaron 10 mL de nitrógeno líquido y macerado en un mortero estéril, hasta la obtención de un polvo fino para realizar la extracción de ADN. Se añadirá 1 mL de bromuro de cetiltrimetilamonio nuclear (CTAB) al 2%, EDTA 50 mM, Tris base 200 mM, pH 8.0, NaCl 2 M y polivinil pirrolidona al 0.5%. Se mezclaron para obtener una suspensión homogénea. La suspensión se dividió en microtubos de 1.5 mL (0.5 mL en cada uno), se agregaron 2 µL de RNAasa (10 mg/mL) y se incubaron 1 h a 65°C, la muestra se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó un volumen de 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló en vortex hasta formar una emulsión. Se centrifugaron a 13 000 g por 10 min a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se adicionó 1/10 de volumen de CTAB al 10% (CTAB al 10% y NaCl 0.7 M) y se hicieron tres extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), conservando la fase acuosa. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio, adicionando un volumen de isopropanol para mezclarlo por inversión. Las muestras se mantuvieron a -20°C toda la noche. El DNA se recuperó por centrifugación a 13 000 g por 10 min a 4°C. Se lavó la pastilla con etanol al 70% dos veces y se centrifugó a 13 000 g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió el DNA en 50µL de agua desionizada estéril. Para determinar la calidad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Dyavaiah *et al.*, 2007).

En el estudio fue amplificado: el espaciador transcrito interno 1, 5.8S rDNA y espaciador transcrito interno 2 del DNA ribosomal (ITS). Para amplificar el marcador

molecular ITS se realizó PCR (agregando 1µL del ADN obtenido). En un tubo se agregó la cantidad de reactivo para el número de muestras con el que se trabajó como se indica más adelante, adicionando al final los dNTPs (deoxinucleótidos), primers (cebadores) y la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus* polimerasa), se homogeneizó la mezcla con vórtex. Finalmente se tomaron 24µL del Master Mix en cada tubo de 200 µL, en el cual, se agregó 1µL de cada muestra de hongo. Estas, se hicieron adicionando 50µL de H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato) en un microtubo. Para la secuenciación, se utilizaron los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para poder amplificar el fragmento ribosomal del rRNA ITS1-5.8S-ITS4 (Dyavaiah y col., 2007). El proceso se realizó en el Termociclador, donde se colocaron los microtubos de manera ordenada y se corrió el programa siguiendo las siguientes condiciones: Muestra 1µL, iniciador FW ITS1 a 20 pM en 1µL, iniciador RV ITS4 20 pM en 1µL, dNTP'S 0.2 pM en 1µL, taq polimerasa 2.5 U/µL 0.5 µL, MgCl₂ 3 mM en 3 µL, Regulador 10X en 5 µL y H₂O DEPC 12.5 µL; con un volumen final de 25µL. Las condiciones de los ciclos son las siguientes a (temperatura y tiempo determinados): 1 ciclo a 95°C durante 5 min, 35 ciclos a 95°C, 54°C y 72°C durante 1 minuto c/u, 1 ciclo a 72°C durante 10 min y mantener a 4°C hasta su uso (Dyavaiah *et al.*, 2007).

6.4 Electroforesis

Se usaron geles al 1% de agarosa diluida en TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 11.42 mL/L-EDTA 2 mM). La mezcla de agarosa y TAE se calentó en un microondas hasta ver una disolución clara y sin grumos. Se dejó enfriar hasta llegar a una temperatura de aproximadamente 40°C y se vació la solución en un molde retirando todas las burbujas que pudieran afectar la porosidad del gel. Antes de que la solución polimerizará, se colocó una plantilla en forma de peineta con el fin de

formar pozos rectangulares y donde se agregaron las muestras. Una vez polimerizado el gel, se acomodó en el equipo de electroforesis (apagado) cubriéndolo con una solución de TAE 1X.

Se colocaron en los pocillos 3 μ L de la muestra y 3 μ L de buffer de carga con GelRed (Biotium) (3 μ L de GelRed más 997 μ L de buffer de carga: 60% glicerol, 0.05% de azul de bromofenol), se homogeneizó la muestra con ayuda de una micropipeta y se colocaron en el pocillo. Se utilizó un marcador de peso molecular para corroborar el peso de las muestras. Se colocó 1 μ L de 100 Kpb. Las muestras migraron a través del gel mediante una corriente de 80 voltios y 400 miliamperios por 30 minutos. Las muestras de ADN se observaron con ayuda del transiluminador. Los productos de PCR que se lograron amplificar, se almacenaron a -20°C . Los fragmentos de PCR fueron secuenciados por Magrogen Inc. Company (Seul, Corea).

6.5 Inferencia filogenética

Para los análisis filogenéticos bayesianos, el manejo de la secuencia se realizó utilizando el grupo supercomputacional "Kabré" (CNCA-CeNAT) en colaboración con el Dr. Efraín Escudero Leiva del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas, Centro Nacional de Computación Avanzada y el Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica. La alineación se realizó utilizando MAFFT v7.397 con la estrategia L-INS-i. La longitud de la secuencia del algoritmo BLASTn se estableció en ~ 500 pb y la cobertura mínima en 90%. Las coincidencias se consideraron confiables a partir del 90% de la similitud de ITS según la base de datos y se aceptó el 98-100% de similitud para cada taxón. Los criterios para el análisis bayesiano se establecieron utilizando

PartitionFinder2 (Lanfear et al.2016). El modelo seleccionado fue GTR + I + G y nst = 6. Los árboles filogenéticos bayesianos se infirieron utilizando ExaBayes (Aberer et al. 2014), bajo los valores del criterio de información de Akaike (AIC). La cadena de Markov / Monte Carlo (MCMC) se realizó con cuatro cadenas y 1×10^6 generaciones de una topología de árbol aleatoria y luego se tomaron muestras cada 1000 generaciones. La desviación estándar obtenida fue inferior a 0.01. Las probabilidades bayesianas posteriores se calcularon a partir de un árbol en el que se descartaron el 25% de las generaciones. Los árboles filogenéticos se visualizaron con FigTree v.1.4.3 (Rambaut, 2006) y se editaron con InkScape 0.92 (www.inkscape.org).

6.6 Caracterización de micromicetos psicrotolerantes mediante resistencia/sensibilidad a metales pesados

La resistencia a metales pesados de los aislados fue determinada por el método de dilución en placa. Los metales fueron añadidos por separado al medio PDA a las concentraciones que van de 2.5 a 20 mM. Las cajas Petri fueron inoculadas con un círculo de agar de 0.5 cm de diámetro de las colonias fúngicas previamente crecidas en PDA a 28°C por 14 días. Se hicieron 2 replicados de cada concentración y los respectivos controles sin metal. Después, se calculó la concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la concentración más baja del metal que inhibe el crecimiento visible del aislado.

Los aislados de crecimiento más rápido, fueron sometidos a pruebas de tolerancia. Las cajas que fueron suplementadas con distintas concentraciones de HgCl_2 , CrCl_3 y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, inoculadas e incubadas y después medidas. El efecto de cada

concentración de metal pesado en el crecimiento de los 11 aislados fue estimado individualmente, midiendo el crecimiento de la colonia y comparado con el control. El Índice de Tolerancia (Ti) fue calculado según la metodología de Muhammad *et al.*, (2013) por medio de la relación de los diámetros: la medida de la colonia suplementada con el metal entre los milímetros de la colonia control. A estas medidas se les restó los 0.25 cm del radio de cada inóculo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7. Resultados

La diversidad fúngica encontrada en los glaciares de los volcanes Citlaltépetl e Iztaccíhuatl a partir de los muestreos de febrero de 2019, fue de 38 especies en total, repartidas en 9 géneros (Tabla 1), un taxón identificado hasta la división Ascomycota y otro hasta la clase *Sordariomycetes* (Apéndice 1). De estas especies, 28 pertenecen a los 4 sitios muestreados en el Citlaltépetl (Fig. 3) (Cit 1 [5700 msnm], Cit 2 [5300 msnm], Cit 3 [5100 msnm] y Cit 4 [4900 msnm]) y las 10 especies restantes, del volcán Iztaccíhuatl, a partir de las muestras tomadas en los sitios (Izt 1 [5200 msnm], Izt 2 [5100 msnm], Izt 3 [5010 msnm] e Izt 4 [5065 msnm]) (Fig. 3). De estos volcanes, el Citlaltépetl resultó con mayor riqueza: en el sitio Cit 3 fue en el que se encontraron más especies. En el Iztaccíhuatl, se identificó que tres de los cuatro sitios de colecta (Izt1, Izt3 e Izt4) poseen especies de *Sordariomycetes*. Esta clase, fue encontrada en las dos zonas geográficas, así como los géneros *Cladosporium* y *Penicillium*. El género predominante fue *Cladosporium* con 10 especies, seguido por *Alternaria* representado por 7 cepas.

Se observó que las características morfológicas y las estructuras fúngicas, incluidos los conidios y/o conidióforos de un cultivo representativo de cada taxón, corroboran y complementan la identificación filogenética, con excepción de *Sordariomycetes* y Ascomycota, donde las características no fueron suficientes para llegar a la identificación a nivel de género. El caso particular de *Alternaria* sp. nos mostró que el hongo molecularmente se identificó en dicho género pero morfológicamente es coherente con las estructuras de *Ulocladium* (Fig. 2.1). A continuación, se describen las características morfológicas de los aislados tipo usados en este trabajo. Todos los hongos presentaron conidióforos excepto *Arthrinium* (Fig. 2.1 b2 y b3) y

Aureobasidium (Fig. 2.1 d2 y d3). *Alternaria* sp. presentaba una colonia grisácea, de aspecto suave.

Tabla 1. Hongos identificados en el estudio: taxones, número de cepa, número de acceso GenBank, sitio del aislado.

Taxones fúngicos	Número de cepa/ Aislado	Número de acceso GenBank	Sitio de muestreo
<i>Alternaria</i> sp.	IOM 325288	MH890614	Cit 3
<i>Alternaria</i> sp.	IOM 325289	MH890615	Cit 3
<i>Alternaria</i> sp.	IOM 325290	MH890616	Cit 3
<i>Alternaria</i> sp.	IOM 325291	MH890617	Cit 3
<i>Alternaria</i> sp.	IOM 325292	MH890618	Cit 3
<i>Alternaria</i> sp.	IOM 325293	MH890619	Cit 3
<i>Alternaria</i> sp.	IOM 325294	MH890620	Cit 4
<i>Arthrinium</i> sp.	IOM 325295	MH890621	Izt 3
<i>Aureobasidium</i> sp.	IOM 325296	MH890622	Cit 3
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325297	MH890623	Cit 4
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325298	MH890624	Cit 3
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325299	MH890625	Cit 4
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325300	MH890626	Cit 3
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325301	MH890627	Cit 4
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325302	MH890628	Cit 4
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325303	MH890629	Cit 3
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325304	MH890630	Cit 4
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325305	MH890631	Cit 3
<i>Cladosporium</i> sp.	IOM 325306	MH890632	Izt 2
<i>Curvularia</i> sp.	IOM 325307	MH890633	Cit 3
<i>Curvularia</i> sp.	IOM 325308	MH890634	Cit 3
<i>Curvularia</i> sp.	IOM 325309	MH890635	Cit 3
<i>Stemphylium</i> sp.	IOM 325310	MH890636	Cit 4
<i>Ascomycota</i> sp	IOM 325311	MH890637	Cit 3
<i>Mucor</i> sp.	IOM 325312	MH890638	Cit 1
<i>Mucor</i> sp.	IOM 325313	MH890639	Cit 1
<i>Mucor</i> sp.	IOM 325314	MH890640	Cit 1
<i>Penicillium</i> sp.	IOM 325315	MH890641	Izt 1
<i>Penicillium</i> sp.	IOM 325316	MH890642	Izt 4
<i>Penicillium</i> sp.	IOM 325317	MH890643	Izt 1
<i>Penicillium</i> sp.	IOM 325318	MH890644	Cit 2
<i>Periconia</i> sp.	IOM 325319	MH890645	Cit 3
<i>Sordariomycetes</i> sp.	IOM 325320	MH890646	Izt 1
<i>Sordariomycetes</i> sp.	IOM 325321	MH890647	Izt 3
<i>Sordariomycetes</i> sp.	IOM 325322	MH890648	Izt 3
<i>Sordariomycetes</i> sp.	IOM 325323	MH890649	Izt 4
<i>Sordariomycetes</i> sp.	IOM 325324	MH890650	Izt 4
<i>Sordariomycetes</i> sp.	IOM 325325	MH890651	Cit 3

En negritas, los aislados usados para observaciones morfológicas y experimentos de tolerancia a metales pesados. Números designados a los sitios de aislamientos: Cit 1, Cit 2, Cit, 3, Cit 4, glaciar *Jamapa* (5700 msnm; 5300 msnm; 5100 msnm y 4900 msnm). Izt 1, glaciar *El Pecho* (5200 msnm), Izt 2, Izt 3, Izt 4, glaciar *La panza* (5100 msnm; 5010 msnm y 5065 msnm).

El conidióforo fue ramificado, marrón, geniculado, conidios en cadenas acropetales, marrón, verrucosa (Figura 2.1 a1-a3). *Arthrinium* sp. mostró una colonia blanca a amarilla clara. Conidióforos hialinos a marrón. Conidios, aseptados, principalmente

redondeados no ornamentados (Figura 2.1 b1-b3). El aislado nombrado como *Ascomycota* sp. por el marcador ITS, presentaban colonias pequeñas y oscuras, con bordes irregulares y una consistencia similar a la corteza. Conidios de color marrón claro, ovalados (Figura 2.1 c1-c3). *Aureobasidium* sp. mostró colonias de textura cremosa y oscurecidas en los bordes, viscosas. Conidióforo de color marrón, pequeño, endógeno y conidios levaduriformes a ovalados, hialinos (Figura 2.1 d1-d3). La superficie generalmente se vuelve negra debido a la producción de clamidosporas (Ashengroph, 2017).

Cladosporium, mostró una colonia de color negro a verde oscuro, con bordes tenues, conidióforos ramificados, marrones y ramoconidios ramificados en cadenas acropétalas y marrones (Figura 2.1 e1-e3). La *Curvularia* presentó una colonia gris a negra en los bordes, superficie pubescente, conidióforos ramificados, marrón, células conidiógenas geniculadas, terminales e intercalares, en el conidióforo y los conidios no fueron vistos (Figura 2.1 f1-f3). *Mucor* mostró una colonia de color amarillo claro a blanco, algodonosa y húmeda en la superficie. Los esporangios columelados. El género se caracteriza por presentar esporangios columelados de múltiples esporas (Figura 2.2 g1-g3). *Penicillium* presentaba una colonia verde oscuro, superficie velutinosa. Conidióforo, terveticilado y biveticilado. Fialides, de forma cilíndrica a matraz y conidios, globosas a subglobosas, de color verde claro, lisas, de paredes gruesas. Estípote cilíndrico, recto, con pared gruesa y lisa (Figura 2.2 h1-h3). *Periconia* mostró una colonia de color rosa claro, presentando menor cantidad de pigmento en los bordes. Conidióforo, penicilado, holoblástico, estípote recto, marrón, células conideogénicas, globosas, rugosas, oscuras. Conidios, en

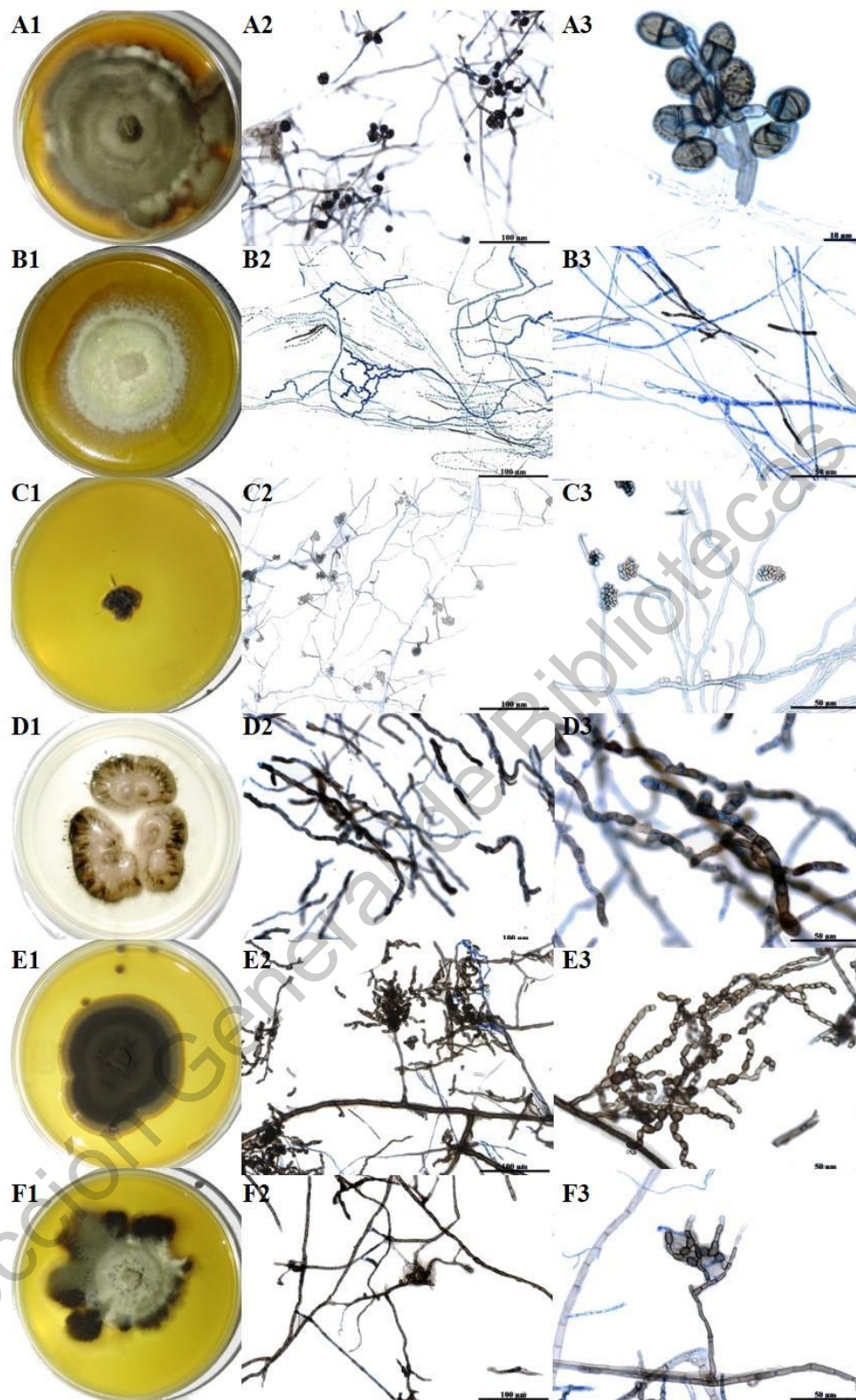


Figura 2.1 Identificación morfológica. Se muestra la morfología colonial con tinción de algodón, las estructuras reproductoras con aumentos de 40x y 100x en orden de aparición: *Alternaria* sp. **A1**(colonia), **A2**(conidióforos), **A3**(conidios); *Arthrinium* sp. **B1** (colonia), **B2-B3**(sin conidióforos); Ascomycota sp. **C1**(colonia), **C2**(conidióforos), **C3**(conidios); *Aureobasidium* sp. **D1**(colonia), **D2-D3** (sin conidióforos); *Cladosporium* sp. **E1** (colonia), **E2** (conidióforos), **E3** (conidios); *Curvularia* sp. **F1**(colonia), **F2**(conidióforos), **F3**(conidios).

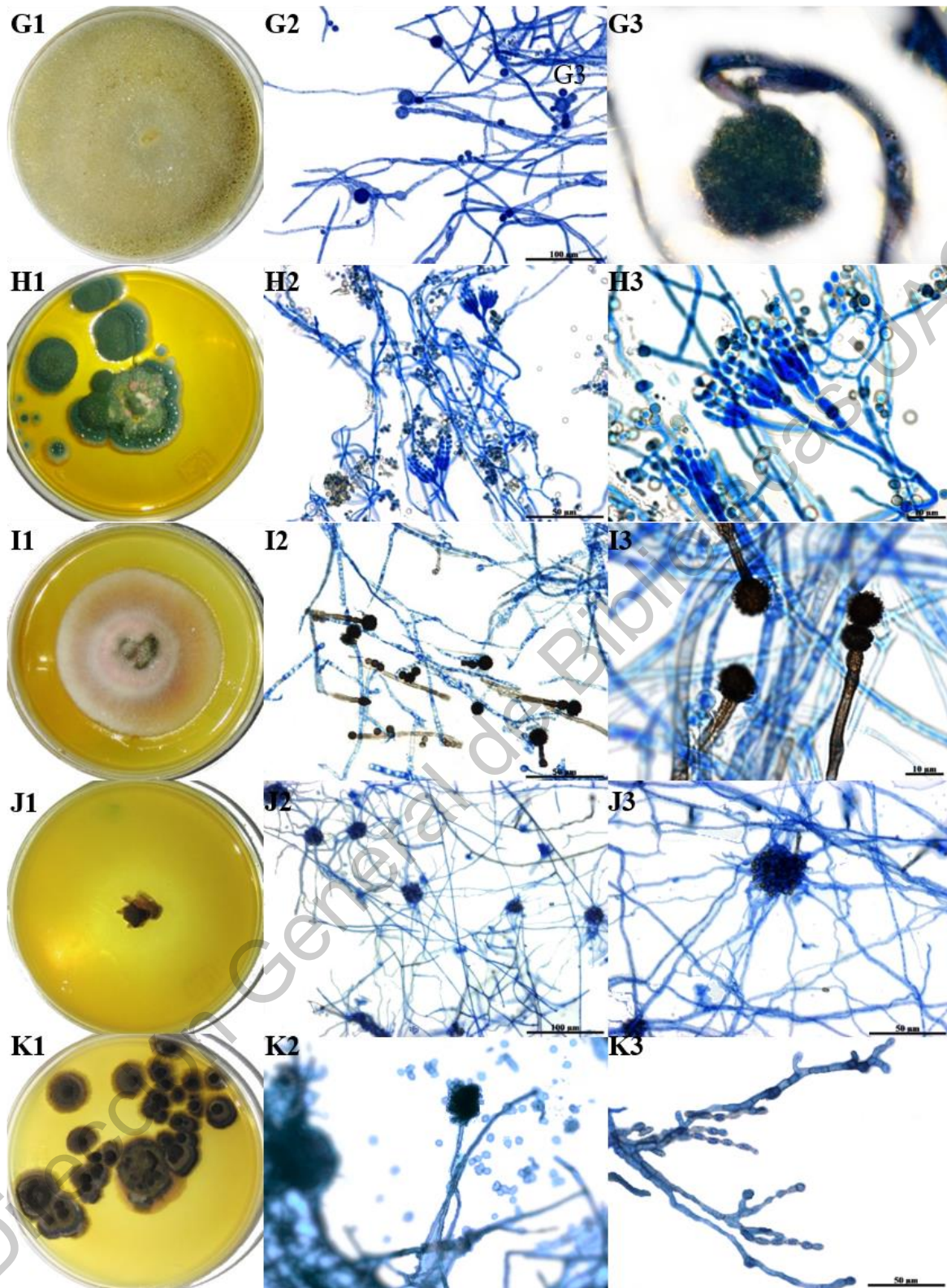


Figura 2.2 Identificación morfológica. Se muestra la morfología colonial con tinción de algodón, las estructuras reproductoras con aumentos de 40x y 100x en orden de aparición: *Mucor* sp. **G1**(colonia), **G2**(conidióforos), **G3**(conidios); *Penicillium* sp. **H1** (colonia), **H2** (conidióforos), **H3**(conidios); *Periconia* sp. **I1**(colonia), **I2**(conidióforos), **I3**(conidios); *Sordariomycetes* sp. **J1**(colonia), **J2** (colonia), **J3** (conidios); *Stemphylium* sp. **K1** (colonia), **K2** (conidióforos), **K3** (conidios).

cadenas ramificadas, de globosas a subglobosas, ligeramente rugosas y de color marrón oscuro (Figura 2.2 i1-i3).

En las pruebas de resistencia/sensibilidad el orden de toxicidad encontrado en los metales fue: Hg>Cr >Pb (Tabla 2). Se observó que en los medios con mercurio no hubo crecimiento de ninguna cepa, cabe mencionar que también se probó la concentración de 1mM en la cual tampoco hubo crecimiento. Para poder calcular cual hongo resultó ser más tolerante al cromo y al plomo se calculó el Ti.

En las Fig. 4 y 5, se mencionan los datos en términos de tolerancia: *Arthrinium* sp. (IOM 325295), *Mucor* sp. (IOM 325312) y *Penicillium* sp. (IOM 325315) obtuvieron el máximo valor (1) como Índice de Tolerancia en el medio suplementado con Cr (Fig.4) a 2.5mM, así como *Arthrinium* sp. (IOM 325295) en la concentración 5mM.

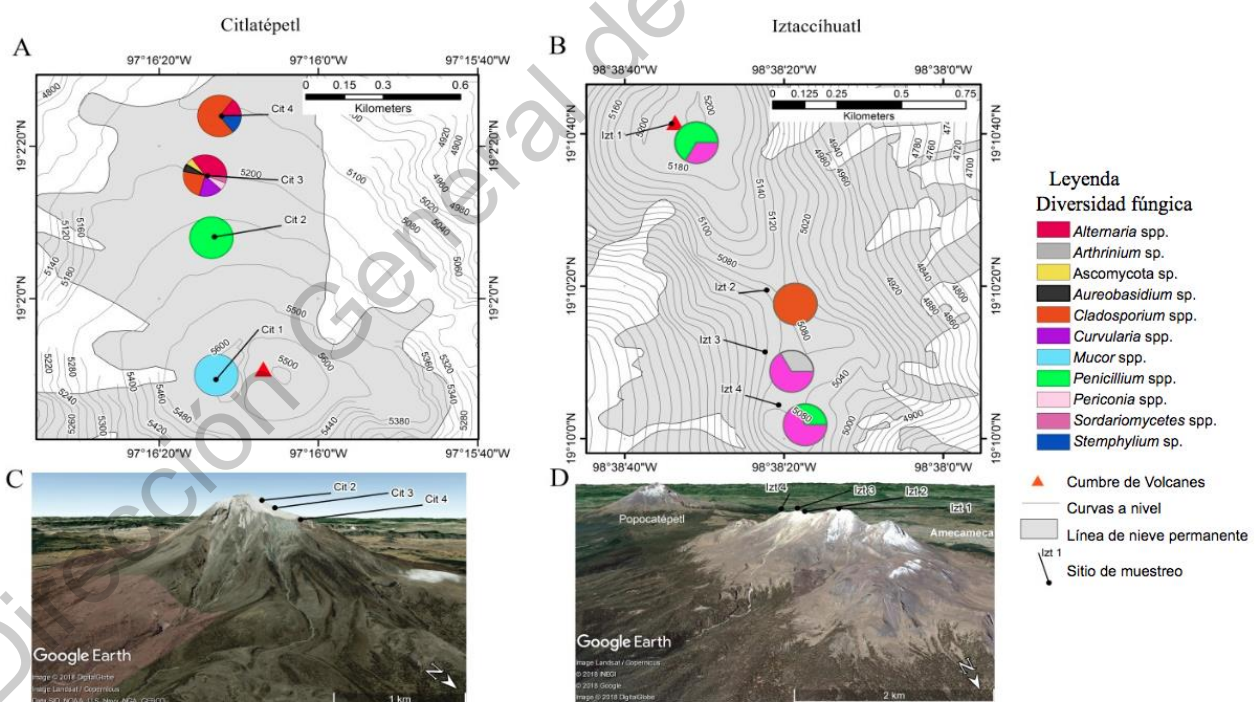


Figura 3. Se muestran los 4 sitios de colecta en cada volcán: A) Cit 1, Cit 2, Cit 3, Cit 4, glaciar *Jamapa* (5700 msnm; 5300 msnm; 5100 msnm y 4900 msnm) .B) Izt 1, glaciar *El Pecho* (5200 msnm), Izt 2, Izt 3, Izt 4, glaciar *La panza* (5100 msnm; 5010 msnm y 5065 msnm). En cada sitio, se observa la diversidad fúngica en gráficas de pastel con la abundancia de cada especie en colores. C) Vista panorámicas de la cumbre del volcán Citlaltépetl con los puntos de muestreo señalados. D) Vista panorámica de la cumbre del volcán Iztaccihuatl con los puntos de muestreo señalados.

También se destaca *Mucor* sp. (IOM 325312) con un índice de 0.99 en esta última concentración. En adelante, los valores de tolerancia van decayendo drásticamente. A pesar de esto, *Stemphylium* sp. (IOM 325310) y *Cladosporium* sp. (IOM 325298) destacan por mantenerse en las concentraciones siguientes con los valores más altos. En la concentración 7.5mM, *Mucor* sp. (IOM 325312) tiene 0.36 Ti pero disminuye su crecimiento en la concentración siguiente (10mM). Por el contrario, *Stemphylium* sp. (IOM 325310) y *Cladosporium* sp. (IOM 325298) se mantienen con valores 0.12 y 0.11 respectivamente en tal concentración (Fig. 4).

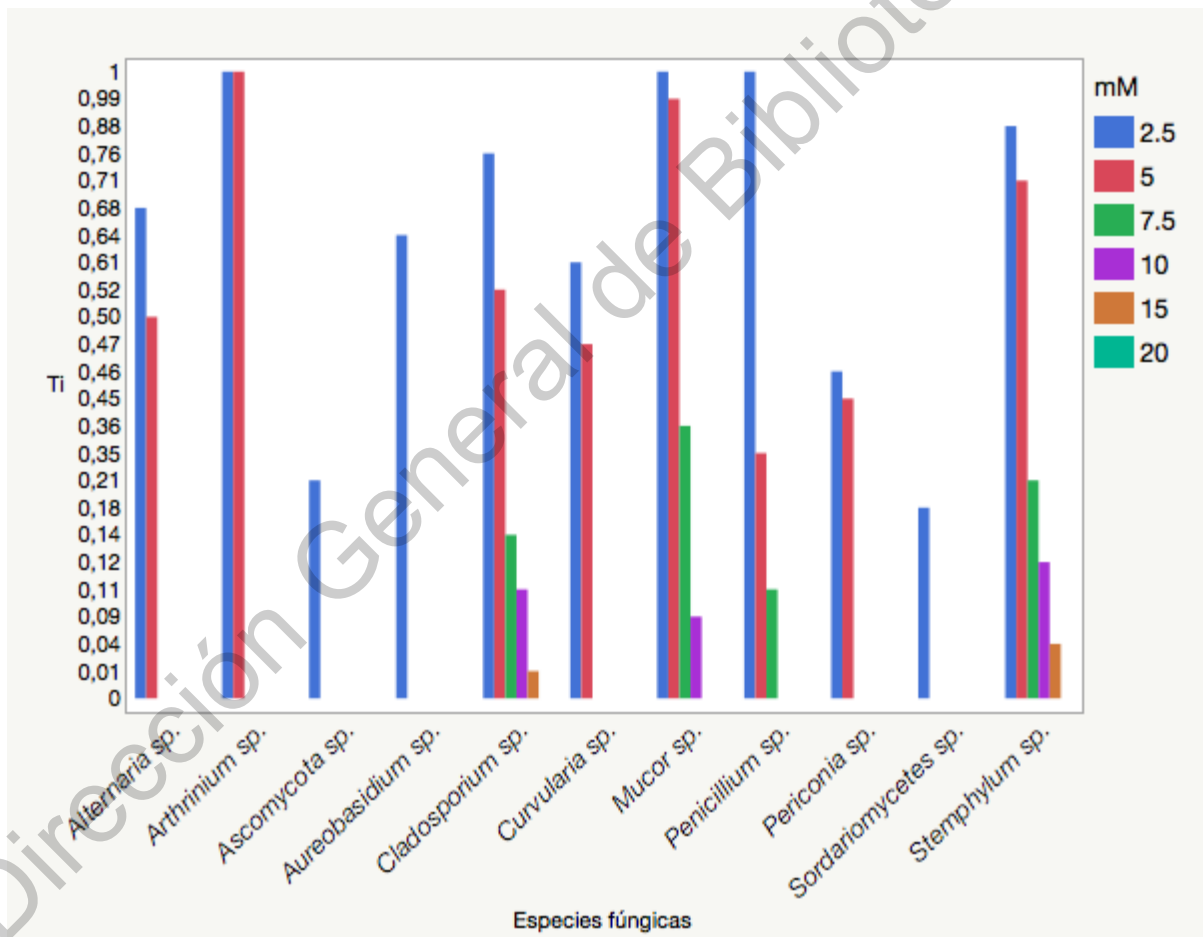


Figura 4. Gráfica de valores del Índice de Tolerancia por especie y concentración de Cr.

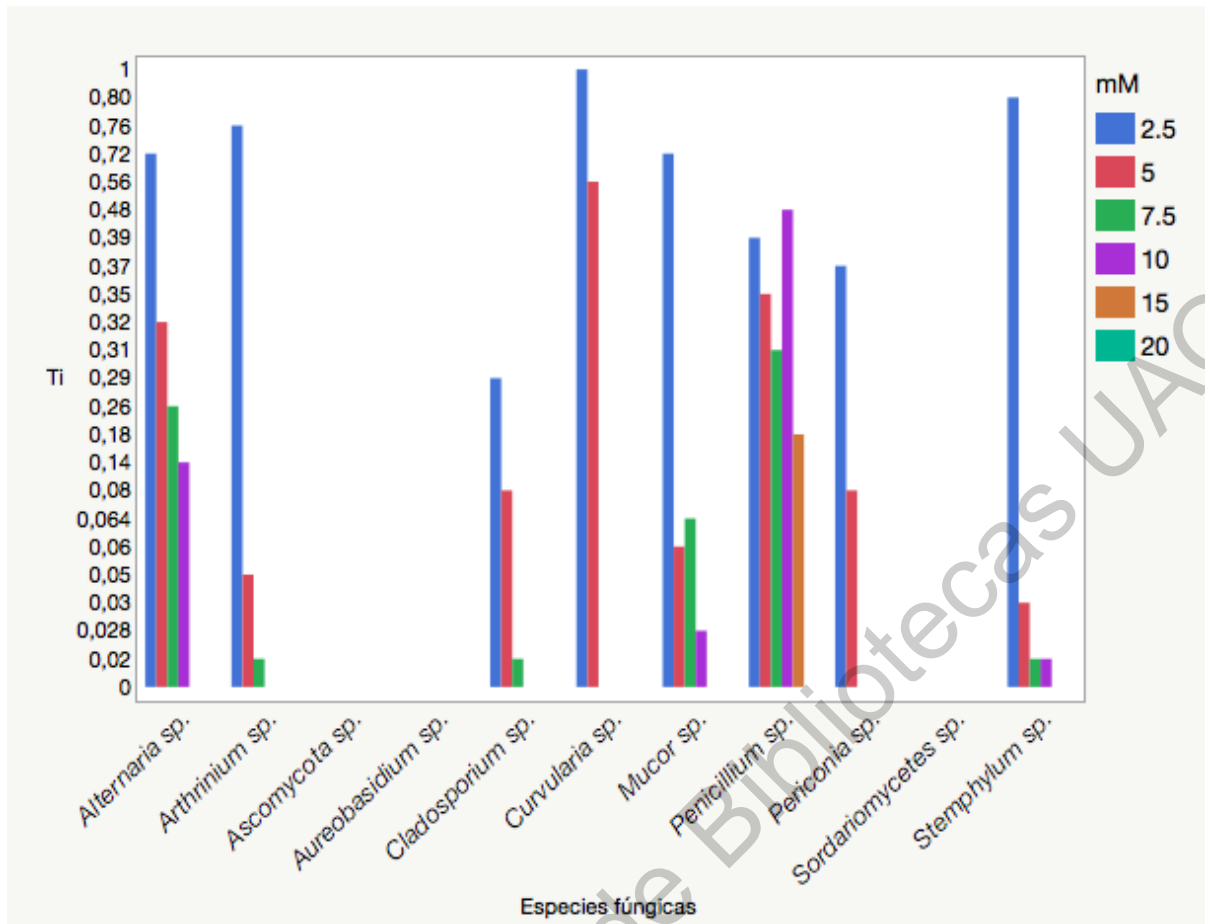


Figura 5. Gráfica de valores del Índice de Tolerancia por especie y concentración de Pb.

Estos últimos mencionados, fueron los únicos taxones que obtuvieron un Índice de Tolerancia en la prueba a 15mM (0.045 y 0.01, en el orden mencionado) (Fig. 4).

Día 7						
Especies fúngicas	Cr (mM)					
	Ctrl	2.5	5	7.5	10	15
<i>Ascomycota</i> sp.						
<i>Alternaria</i> sp.						
<i>Arthrinium</i> sp.						
<i>Aureobasidium</i> sp.						
<i>Cladosporium</i> sp.						
<i>Curvularia</i> sp.						
<i>Mucor</i> sp.						
<i>Penicillium</i> sp.						
<i>Periconia</i> sp.						
<i>Stemphylium</i> sp.						
<i>Sordariomycetes</i> sp.						

Figura 6. Crecimiento fúngico en diferentes concentraciones de cromo. Se observa la secuencia del crecimiento fúngico de las cepas en cada concentración de Cloruro de cromo. Primer registro fotográfico del experimento.

Penicillium sp. (IOM 325315) fue sensible a 7.5mM con 0.14 Ti *Alternaria* sp. (IOM 325288), *Curvularia* sp. (IOM 325307) y *Periconia* sp. (IOM 325319) obtuvieron un Ti (0.50, 0.47 y 0.45) en 5mM (Fig. 4). Los más sensibles a la prueba fueron *Aureobasidium* sp. (IOM 325296), Ascomycota sp. (IOM 325311) y *Sordariomycetes* sp. (IOM 325320) con 0.64, 0.21 y 0.18 Ti en 2.5mM respectivamente (Fig. 6 y 7).

En las pruebas de tolerancia a plomo (Fig. 8 y 9) los hongos más resistentes en relación a la concentración, fueron: *Curvularia* sp. (IOM 325307) con 1 (Ti) en 2.5mM y en la siguiente concentración (5mM) con 0.56 (Fig. 5). De esta concentración en adelante, *Penicillium* sp. (IOM 325315) destacó con el índice más alto de tolerancia (0.31) en 7.5mM, así como un valor que incrementó en la concentración siguiente (10mM) obteniendo un Índice de Tolerancia de 0.49. Esta especie fue la más tolerante, ya que obtuvo un valor de 0.18 en la concentración de 15mM. *Alternaria* sp. (IOM 325288) también resistió con un Ti de 0.14 en 10mM, al igual que *Mucor* sp. (IOM 325312) y *Stemphylium* sp. (IOM 325310) con 0.02 Ti por igual. Con esta misma cifra, *Arthrimum* sp. (IOM 325295) y *Cladosporium* sp. (IOM 325298) en la concentración 7.5mM. *Curvularia* sp. (IOM 325207) obtuvo 0.56 Ti y *Periconia* sp. (IOM 325319) 0.08 Ti en 5mM. Las cepas más sensibles resultaron Ascomycota sp. (IOM 325311), *Aureobasidium* sp. (IOM 325296) y *Sordariomycetes* sp. (IOM 325320) con crecimiento nulo (Fig. 5).

Día 14						
Especies fúngicas	Cr (mM)					
	Ctrl	2.5	5	7.5	10	15
<i>Ascomycota</i> sp.						
<i>Alternaria</i> sp.						
<i>Arthrinium</i> sp.						
<i>Aureobasidium</i> sp.						
<i>Cladosporium</i> sp.						
<i>Curvularia</i> sp.						
<i>Mucor</i> sp.						
<i>Penicillium</i> sp.						
<i>Periconia</i> sp.						
<i>Stemphylium</i> sp.						
<i>Sordariomycetes</i> sp.						

Figura 7. Crecimiento fúngico en diferentes concentraciones de cromo. Se observa la secuencia del crecimiento fúngico de las cepas en cada concentración de Cloruro de cromo. Segundo registro fotográfico del experimento.

Día 7						
Especies fúngicas	Pb (mM)					
	Ctrl	2.5	5	7.5	10	15
<i>Ascomycota</i> sp.						
<i>Alternaria</i> sp.						
<i>Arthriniium</i> sp.						
<i>Aureobasidium</i> sp.						
<i>Cladosporium</i> sp.						
<i>Curvularia</i> sp.						
<i>Mucor</i> sp.						
<i>Penicillium</i> sp.						
<i>Periconia</i> sp.						
<i>Stemphylium</i> sp.						
<i>Sordariomycetes</i> sp.						

Figura 8. Crecimiento fúngico en diferentes concentraciones de plomo. En la figura se observa la secuencia del crecimiento fúngico de las cepas en cada concentración de Acetato de plomo. Primer registro fotográfico del experimento.

Día 14						
Especies fúngicas	Pb (mM)					
	Ctrl	2.5	5	7.5	10	15
<i>Ascomycota</i> sp.						
<i>Alternaria</i> sp.						
<i>Arthrinium</i> sp.						
<i>Aureobasidium</i> sp.						
<i>Cladosporium</i> sp.						
<i>Curvularia</i> sp.						
<i>Mucor</i> sp.						
<i>Penicillium</i> sp.						
<i>Periconia</i> sp.						
<i>Stemphylium</i> sp.						
<i>Sordariomycetes</i> sp.						

Figura 9. Crecimiento fúngico en diferentes concentraciones de plomo. En la figura se observa la secuencia del crecimiento fúngico de las cepas en cada concentración de Acetato de plomo. Segundo registro fotográfico del experimento.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) por metal, de cada cepa tolerada, se encuentra en la Tabla 2. Respecto a lo anterior, en el caso del cromo *Cladosporium* sp. (IOM 325298) resultó el más tolerante (Fig. 4 y 7), comparando con los demás a una concentración de 20µM. Seguido por *Stemphylium* sp. (IOM 325310) y *Mucor* sp. (IOM 325312) con una concentración de 15mM y *Penicillium* sp. (IOM 325315) con 10mM. Para el plomo, el más tolerante fue *Penicillium* sp. (IOM 325315) con 20mM (Fig. 5 y 9), seguido por *Alternaria* sp. (IOM 325288), *Mucor* sp. (IOM 325312) y *Stemphylium* sp. (IOM 325210) con 15mM. *Arthrinium* sp. (IOM 325295) y *Cladosporium* sp. (IOM 325298) obtuvieron 10mM como concentración mínima inhibitoria.

Tabla 2. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria por especie.

Especies Fúngicas	Concentración Mínima Inhibitoria		
	Cromo	(mM)	Plomo
<i>Alternaria</i> sp.	7.5		15
<i>Arthrinium</i> sp.	7.5		10
Ascomycota sp.	5		2.5
<i>Aureobasidium</i> sp.	5		2.5
<i>Cladosporium</i> sp.	20		10
<i>Curvularia</i> sp.	7.5		7.5
<i>Mucor</i> sp.	15		15
<i>Penicillium</i> sp.	10		20
<i>Periconia</i> sp.	7.5		7.5
<i>Sordariomycetes</i> sp.	5		2.5
<i>Stemphylium</i> sp.	20		15

Por último, las cepas de Ascomycota sp. (IOM 325311), *Aureobasidium* sp. (IOM 325296) y *Sordariomycetes* sp. (IOM 325320) tuvieron las mismas MICs en ambos tratamientos, 5µM en cromo y 2.5µM en plomo (Fig. 4 y 5) . De estas cepas, *Aureobasidium* sp. (IOM 325296) resultó el más tolerante con un índice de 0.64 (TI) en Cr.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8. Discusión

El Pico de Orizaba y el parque nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl, fueron nombrados Área Natural Protegida (ANP) desde hace más de 30 años. Además de ser las cumbres más altas de la nación, son reconocidas por los servicios ambientales y bienes minerales que ofrecen, así como la riqueza de sus ecosistemas (López, 2004). Estas ANP tienen características únicas por su confluencia geográfica; poseen un alto índice de endemismos y funcionan como reservorios de diferentes especies animales, plantas y hongos (SEMARNAT, 2016). Especialmente, los organismos fúngicos están altamente adaptados a su hábitat. En estos sitios son capaces de sobrevivir a las bajas temperaturas y a la alta irradiación solar.

Los hongos extremófilos, se adaptan mediante cambios en su fisiología y morfología usualmente con la producción de enzimas, melanina y micosporinas (Gostincar *et al.* 2012). De acuerdo con los estudios realizados por Buford *et al.*, (2003) el crecimiento fúngico en este tipo de ambientes promueve la degradación de minerales. En concordancia con lo anterior, Gonçalves *et al.*, (2017) reportó comunidades fúngicas asociadas a las rocas, a pesar de las condiciones extremas de la Antártida continental. En estos microambientes se encontró dominancia de taxones de *Eurotiomycetes* (*Penicillium*), seguido de las clases de *Sordariomycetes* y *Dothideomycetes* (*Cladosporium*), al igual que en presente estudio. Las especies de *Cladosporium* y *Alternaria* fueron las más abundantes como en otras investigaciones en la Patagonia (Temperini *et al.*, 2019). En otro trabajo, Gonçalves y su equipo (2017) mencionan que de 36 muestras de agua de mar tomadas a diferentes profundidades, las especies más frecuentes fueron de *Cladosporium* y *Penicillium*.

En otros ambientes con condiciones adversas, tales como suelos contaminados con desechos industriales, también se han encontrado ascomicetos como *Penicillium*, *Alternaria* y *Curvularia* (Iram *et al.*, 2012). En un estudio de suelos mineros en Irán se identificaron 145 cepas de *Penicillium simplicissimum* y 135 cepas de *Alternaria chlamydosporigena* (Mohammadian *et al.*, 2017). Otro género de resaltar en el estudio es *Mucor* que también fue aislado por Arifa Tahir (2012), a partir de muestras tomadas de un efluente de la industria del curtido, con 9 cepas identificadas.

Los estudios de filogenia molecular han adquirido gran auge e importancia en los últimos años por sus aportaciones en la determinación de nuevas especies. El método de Inferencia Bayesiana nos permite obtener un rango de certeza con el que los árboles filogenéticos son explicados por los datos probabilísticos. En el presente estudio fue una herramienta basal con la que se pudo determinar los diferentes clados y llegar a una identificación más cercana, que se complementa con las características morfológicas. Estas por sí solas, particularmente hubieran resultados insuficientes para la identificación de Ascomycota sp. (IOM 325311), *Alternaria* sp. (IOM 325288) y *Sordariomycetes* sp. (IOM 325320).

El cromo, es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, se encuentra en la naturaleza en la forma trivalente como Cr y se le encuentra en la mayoría de los materiales biológicos, asociado fuertemente con proteínas y ácidos nucleicos. Por el contrario, el cromo hexavalente Cr, es altamente tóxico y mutagénico para distintas formas de vida (Tchounwou *et al.*, 2012). Al igual que el plomo que es un metal pesado, indispensable en muchas instancias industriales, es en consecuencia, conocida su toxicidad en humanos y las afecciones que causa. A

pesar del grado de contaminación en ciertos sitios, se han descrito diferentes aislados fúngicos nativos tolerantes a metales pesados. En este estudio, se caracterizaron 11 cepas fúngicas mediante su exposición a metales pesados. El valor del índice de los taxones resistentes a metales pesados generalmente está por debajo de uno, sin embargo, *Arthrimum sp.* (IOM 325295) y *Penicillium sp.* (IOM 325315) mostraron cierto aumento en este valor en cromo, así como en la investigación realizada por Joo y Hussein (2012), como las especies: *Penicillium verrucosum* y *P. funiculosum*, lo que sugiere que algunos metales pesados en ciertas concentraciones bajas pueden aumentar el crecimiento de las especies resistentes. En otro estudio, *Penicillium chrysogenum* se encontró resistente al cromo pero sensible al plomo (Iram *et al.*, 2013B), al igual que los experimentos con cepas pertenecientes al género realizados por Ezzouhri (2009), que resultaron muy tolerantes al cromo, hasta 10mM. Contrariamente a los resultados de este estudio, ya que esta cepa de *Penicillium sp.* (IOM 325315) fue la más tolerante al plomo, lo que coincide con un estudio de biorremediación: *Penicillium oxalicum* toleró una solución con una concentración de plomo de ~1700 mg/L. Además, se demostró que ~ 98% de los cationes de plomo fueron removidos mientras el hongo se cultivó con el metal y fluorapatita. El mecanismo es que el fósforo es liberado de la fluorapatita por el descenso del pH debido a la secreción de ácidos orgánicos de *P. oxalicum*, de esta forma reacciona con el plomo para formar el mineral de piromorfita estable $[Pb_5 (PO_4)_3F]$, permitiendo así la inmovilización del Pb. (Tian *et al.*, 2018). También, la fabricación de biomasa seca e inactiva de *Arthrimum malaysianum* para fines de biorremediación por Majumder *et al.*, (2017), resultó con una eficiencia de eliminación óptima de Cr(VI) (~ 67%) con 4 g L⁻¹ de biomasa en 20h a pH 3.0.

La concentración 2.5mM, tanto de cromo, mejoró el crecimiento de *Arthrimum sp.* (IOM 325295) y *Penicillium sp.* (IOM 325315) como el plomo el de *Curvularia sp.* (IOM 325307) y se pueden llamar cepas tolerantes a esta molaridad. En los trabajos de (Abu-Elreesh *et al.*, 2011) se examinaron restos de pared celular deshidratados de *Curvularia sp.* Este derivado se probó para determinar la bioadsorción de Cd(II) y Zn(II) a partir de aguas residuales a una concentración de 100 mg L⁻¹. Los restos celulares *Curvularia sp.* (DFH1), eliminaron el 85% de Cd(II) y el 15% de Zn(II) después de 1 hora en solución. También, se ha demostrado que *Curvularia lonarensis* y otra cepa aisladas del Lago Soda, en el desierto de Mojave, en Estados Unidos, producían fenoloxidasa en condiciones alcalinas. Esta producción de fenoloxidasa es única y de importancia ecológica por lo que se sugiere que estas especies de *Curvularia* podrían usarse para biorremediar problemas agronómicos extremos tales como alcalinidad y salinidad del suelo (Bengyella *et al.*, 2019). En el presente estudio, las cepas mencionadas con anterioridad son resistentes a la primer molaridad del experimento. Sin embargo, la concentración 7.5mM de ambos metales suprimió el crecimiento por completo de la mayoría de las cepas.

En el caso del género *Cladosporium*, se ha demostrado que *C. herbarum* creció en un medio líquido mineral que contenía hasta 200 µg/mL de As y generó un nivel de acumulación alto. También mencionan que fue aislado del suelo y se ha utilizado para estudiar el efecto de 25 µg/mL de Hg. El hongo creció y pudo acumular los metales (Binsadiq, 2015). En la presente investigación, la cepa *Cladosporium sp.* (IOM 325298) fue la segunda más resistente al cromo con una MIC de 20mM, al igual que *Stemphylium sp.* (IOM 325310) con un TI más alto en esta prueba y una MIC más alta en presencia de plomo. Puig *et al.* (2016), reportaron que MIC de

BP15, un fungicida, contra *Stemphylium vesicarium* en su crecimiento y la esporulación fueron de 10 y 50mM, respectivamente. Los conidios de *S. vesicarium* son multicelulares, de pigmentación oscura y tienen una pared externa gruesa densamente verrugosa. Estas características podrían desempeñar un papel en la resistencia de la acción directa de BP15.

En este proyecto también destacó la cepa IOM 325312 de *Mucor* sp. por sus valores altos de MIC en ambos metales (15mM). Se demostró que un hongo perteneciente a este género, al interactuar con *Arabidopsis thaliana*, aceleró el crecimiento de la planta bajo estrés por metales tóxicos. *Mucor* sp. demostró ser altamente tolerante a niveles elevados de Zn, Cd y Pb. En el tratamiento con Pb no se vio afectado su crecimiento en el rango de 483 a 9652mM. Sin embargo, se observó la inhibición de la formación de esporas para todas las concentraciones utilizadas (Domka *et al.*, 2018). En otro estudio, Yan y Viraraghavan (2003) calcularon la capacidad de biosorción de Pb en medio acuoso de *Mucor Rouxii*, la cual resultó en 3.47 μ M por gramo de biomasa. Otra cepa que resultó con alta capacidad de tolerancia al plomo fue *Alternaria* sp. (IOM 325288), con una concentración mínima inhibitoria de 15 μ M. Ezzouhri *et al.*, (2009) informaron que los iones de plomo parecían menos tóxicos en comparación con los otros metales estudiados que mermaron el crecimiento de *Alternaria alternata*. La exposición in vitro de *Alternaria brassicicola* a concentraciones crecientes de Zn reveló que el crecimiento del patógeno se redujo en un 50% en 0.44mM, la inhibición completa se logró con ≥ 2 mM (Martos *et al.*, 2016). Al igual que la última cepa mencionada, *Periconia* sp. (IOM 325319) tuvo una MIC en cromo de 7.5mM como también en el plomo. Verma y Verma (2018) detectaron gran actividad amilolítica de cepas aisladas a partir de muestra de suelo

sobrecargado de desecho minero, de las cuales destacó *Periconia hispidula*. También se han aislado metabolitos antitumorales como pericosinas, producidos por una cepa de *P. byssoides* (Yamada *et al.*, 2007).

Por último, las cepas de Ascomycota sp. (IOM 325311), *Aureobasidium* sp. (IOM 325296) y *Sordariomycetes* sp. (IOM 325320) resultaron ser los más sensibles en ambos tratamientos. De estas, *Aureobasidium* sp. resultó el más tolerante en Cr. Este género fue mencionado dentro de los aislados con mayor frecuencia en los primeros años después del accidente de Chernobyl junto especies melanizadas de *Alternaria* y *Cladosporium* (Zhdanova *et al.*, 2000).

Estas cepas fúngicas pueden tolerar concentraciones altas de metales pesados debido a que poseen mecanismos para contrarrestar diferentes tipos de estrés: como la melanización de las paredes celulares, donde el gen PKS codifica la policétido sintasa, responsable de la biosíntesis de melanina. La cepa XJ5-1 de *Aureobasidium melanogenum*, un aislado del desierto de Taklamakán en China, resultó ser más tolerante a la radiación UV, oxidación (200 mM H₂O₂) y desecación que las células no melanizadas de la misma cepa (Jiang *et al.*, 2016). En el trabajo de Mohammadian- Fazli *et al.*, 2015 se observó que el micelio sufría cambios en su coloración ante la exposición de cadmio, debido a la producción de pigmentos acompañada por la precipitación de iones metálicos. También, es sabido que las células fúngicas pueden reducir y oxidar compuestos metálicos y eliminar su toxicidad. Los resultados de Majumder *et al.*, 2017 confirmaron que los principales grupos funcionales involucrados en la bioadsorción de iones metálicos de Cr en *Arthrimum malaysianum* fueron aminas, fosfatos, hidroxilos y carbonilos. El

mecanismo muestra que Cr(IV), inicialmente se une a los grupos protonados y luego se reduce a Cr(III) y en consecuencia se une a los grupos carboxilo disponibles en el micelio. En otro caso, *Mucor hiemalis* EH8 tiene la capacidad de incorporar mercurio iónico mediante su reducción intracelular en mercurio metálico durante la fase de germinación (Hoque y Fritscher, 2016). Otros mecanismos como la solubilización de nutrientes vía ácidos orgánicos y sideróforos han promovido el crecimiento de plantas en condiciones marginales, como *Miscanthus × giganteus*, donde su crecimiento se vio favorecido en el sitio contaminado con metales pesados gracias a los inóculos de cepas productoras de sideróforos (Schmidt *et al.*, 2018). Estos, son compuestos quelantes que pueden acumular metales, facilitando su transporte. En la planta podría mejorar la biodisponibilidad del metal, como en el experimento realizado por Sun *et al.*, 2017 donde se deduce que la eliminación de Pb a partir de la remediación planta-microorganismo se debe a la relación mutua entre *M. circinelloides* y *Solanum nigrum*.

9. Conclusiones

La mayoría de los micromicetos encontrados en el presente estudio corresponden a géneros ya identificados dentro del grupo extremófilo. De igual forma, cabe destacar a las que se identificaron hasta niveles taxonómicos más basales como *Sordariomycetes* y *Ascomycota*, lo que podría implicar nuevos organismos; especies no descritas hasta la fecha. Esto se pudo visualizar gracias a la Inferencia Bayesiana, que permite la determinación del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajuste a los datos.

Los once taxones caracterizados mostraron diferente sensibilidad a los metales (Tabla 2). La tolerancia de estos hongos psicrófilos varió dependiendo de la concentración y el metal. Esta diferencia en tolerancia a metales pesados puede ser el resultado de diferente mecanismo de acción por lo que se necesita más investigación respecto a las proteínas involucradas, siendo una de las vertientes que le podría dar continuidad al presente trabajo. Así también, dentro de la micorremediación y el aprovechamiento de sus complejos enzimáticos.

10. Referencias

Abu-Elreesh G, S. Zaki, S. Farag, M. F. Elkady, D. Abd-El-Haleem (2011) Exobiopolymer from polyhydroxyalkanoate-producing transgenic yeast. *Afr J Biotechnol* 10(34):6558–6563.

Abe F., H. Minegishi (2008) Global screening of genes essential for growth in high-pressure and cold environments: searching for basic adaptive strategies using a yeast deletion library. *Genetics* 178:851–872.

Akhtar S., M. Mahmood-ul-Hassan, R. Ahmad, V. Suthor and M. Yasin (2013) Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. *Soil Environ.* 32(1):55-62.

Alvarez R., H. Delgado (2002) Characterization of a tropical ice body on Iztaccihuatl volcano, Mexico, Gpr 2002 Ninth Int. Conf. Gr. Penetrating Radar. 4758 438–442. doi:10.1117/12.462267.

Bengyella L., S. Iftikhar, K. Nawaz, D. J. Fonmboh, E. L. Yekwa, R. C. Jones, Y. M. T. Njanu, P. Roy (2019) Biotechnological application of endophytic filamentous bipolaris and curvularia: a review on bioeconomy impact. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35:69.

Binsadiq, Abdulwahab (2015) Fungal Absorption and Tolerance of Heavy Metals. *Journal of Agricultural Science and Technology B* 5(2).

Branda E., B. Turchetti, G. Diolaiuti, M. Pecci, C. Smiraglia, P. Buzzini (2010) Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy), 72 354–369.

Brizzio S., D. Libkind, P. Buzzini, M. van Broock (2007) Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 331–341.

Burford E.P., M. Kierans, G. M. Gadd (2003b) Geomycology: fungal growth in mineral substrata. *Mycologist* 17:98–107

Butinar L, Spencer-Martins I & Gunde-Cimerman N (2007) Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91: 277–289.

Buzzini P., E. Branda, M. Goretti, B.Turchetti (2011) Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol* 82 (2012) 217–241.

Cameron K. A., J. Hodson, A. Osborn (2012) Structure and diversity of bacterial, eukaryotic and archaeal communities in glacial cryoconite holes from the Arctic and the Antarctic. *FEMS Microbiol Ecol* 82 (2012) 254–267.

De García V., S. Brizzio, M. R. Broock (2012) Yeasts from glacial ice of Patagonian Andes, Argentina. *FEMS Microbiol Ecol* 82 (2012) 540–550.

De la Torre J. R., B. M. Goebel, E. I. Friedmann, N. R. Pace (2003) Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 69: 3858–3867.

Delgado Granados H., P. Julio Miranda, R. Álvarez, E. Cabral-Cano, L. Cárdenas González, F. Correa Mora, M. Luna Alonso, C. Huggel (2005) Study of Ayoloco glacier at Iztaccíhuatl volcano (Mexico): Hazards related to volcanic activity - Ice cover interactions, *Zeitschrift Fur Geomorphol. Suppl.* 140.

Delgado-Granados, H., Vázquez, J., Cortés, P., Julio, G., Ontiveros, V., Soto, H. La Criósfera en México. Reporte Mexicano de Cambio Climático. Primera Edición. CONACyT, México. 2015:79-111.

Delgado-Granados, Hugo. Climate Change Vs. Volcanic Activity: Forcing Mexican Glaciers to Extinguish and Related Hazards, Proc. First Intern. Conf. on the Impact of Climate Change on High-Mountain Systems, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, Bogotá, Colombia. 2007:153-16.

De Souza MJ, Nair S, LokaBharathi PA, Chandramohan D (2006) Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic marine waters. *Ecotoxicology* 15:379–384.

Domka A., P. Rozpadek, R. Ważny, K. Turnau (2018) *Mucor* sp.—An endophyte of Brassicaceae capable of surviving in toxic metal-rich sites. *Basic Microbiol.*59:24–37.

Domka A.M., Rozpadek P. and Turnau K. (2019) Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Adaptation of Plants to Metal Toxicity. *Front. Microbiol.* 10:371.

Ezzouhri L., E. Castro, M. Moya, F. Espinola, K. Lairini (2009) Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 3 (2) pp. 035-048.

Feller G., C. Gerday (1997) Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *CMLS, Cell. mol. life sci.* 53: 830.

Fernández PM, Cabral ME, Delgado OD, Fariña JI, Figueroa LIC (2013) Textile dye polluted waters as an unusual source for selecting chromate-reducing yeasts through Cr(VI)-enriched microcosms. *Int Biodeterior Biodegradation* 79:28–35

Fernández P. M., M. Martorell, M. G. Blaser, L. A. Ruberto (2017) Phenol degradation and heavy metal tolerance of Antarctic yeasts. DOI 10.1007/s00792-017-0915-5.

Frey B., T. Rime, M. Philips, B. Stierli, I. Hajdas (2016) Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 2016, w018.

Gonçalves V. N., F. S. Oliveira, C. R. Carvalho, C. E. G. R. Schaefer, C. A. Rosa, L. H. Rosa (2017a) Antarctic rocks from continental Antarctica as source of potential human opportunistic fungi. *Extremophiles* 21:851–860.

Gonçalves V. N., G. A. Vitoreli, G. C. A. de Menezes, C. R. B. Mendes, E. R. Secchi, C. A. Rosa, L. H. Rosa (2017b) Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula. *Extremophiles* 21:1005–1015.

Gostincar C., L. Muggia, M. Grube (2012) Polyextremotolerant black fungi: oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses. *Front Microbiol* 3:390

Guindon S., O. Gascuel (2003) PhyML: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biology*. 52: 696-704.

Hoque E., J. Fritscher (2016) A new mercury accumulating *Mucor hiemalis* strain EH8 from cold sulfidic spring water biofilms. *Microbiologyopen* 5:763–781.

Iram, S., A. Arooj, K. Parveen (2012) Tolerance potential of fungi isolated from polluted soil of Multan, Pakistan. *J. Biodivers. Environ. Sci.* 2, 27-34.

Iram S., A. Zaman, Z. Iqbal, R. Shabbir (2013) Heavy Metal Tolerance of Fungus Isolated from Soil Contaminated with Sewage and Industrial Wastewater. *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 22, No. 3, 691-697.

Jiang H., N. Nan, L. Guang, L. Liu, Z. Chi, J. Ming (2016) Melanin production by a yeast strain XJ5-1 of *Aureobasidium melanogenum* isolated from the Taklimakan desert and its role in the yeast survival in stress environments. *Extremophiles* 20:567–577.

Joo J. H., K. A. Hussein (2012) Heavy Metal Tolerance of Fungi Isolated from Contaminated Soil. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 45(4), 565-571.

López López, H. A., 2004. Fábrica de agua en la región del Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. BQ010. México D. F. (Edición digital: CONABIO 2006).

Majumder R., L. Sheikh, A. Naskar, Vineeta, M. Mukherjee, S. Tripathy (2017) Depletion of Cr(VI) from aqueous solution by heat dried biomass of a newly isolated fungus *Arthrinium malaysianum*: A mechanistic approach *Scientific Reports* 7:11254.

Martos S., B. Gallego, C. Cabot, M. Llugany, J. Barceló, C. Poschenrieder (2016) Zinc triggers signaling mechanisms and defense responses promoting resistance to *Alternaria brassicicola* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 249:13-24.

Marshall S. J (2011) *The Cryosphere*. United Kingdom: Princeton University Press.

Mohammadian E., A. B. Ahari, M. Arzanlou, S. Oustan, S. H. Khazaei (2017) Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. *Chemosphere* 185:290-296.

Mohammadian-Fazli M.M., N. Soleimani, M. Mehrasbi, S. Darabian, J. Mohammadi, A. Ramazani (2015) Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *J Environ Health Sci Eng* 13:19.

Möller E.M., G. Bahnweg, H. Sandermann, H. H. Geiger (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 20: 6115–6.

Ozerskaya S., G. Kochkina, N. Ivanushkina (2010) Fungi in permafrost. In: Margesin R (ed.). *Permafrost Soils*, Vol. 16. 85–96.

Panikov N. S., M. V. Sizova (2006) Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to 35 °C. *FEMS Microbiol Ecol* 59 (2007)500–51.

Puig M., C. Moragrega, L. Ruz, C. E. Calderon, F. M. Cazorla, E. Montesinos, I. Llorente (2016) Interaction of antifungal peptide BP15 with *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear. *Fungal Biology* 120:61-71.

Rambaut A. 2006–2014. FigTree Tree Figure Drawing Tool, Version 1.4.2. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Schmidt C.S., L. Mrnka, T. Frantík, P. Lovecká, M. Vosátka (2018) Plant growth promotion of *Miscanthus x giganteus* by endophytic bacteria and fungi on non-polluted and polluted soils. *World J Microbiol Biotechnol* 34:1–20.

Shivaji S., G. S. Prasad (2009) Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (Satyanarayana T & Kunze G, eds), pp. 3–16.

Sun L., X. Cao, M. Li, X. Zhang, X. Li, Z. Cui (2017) Enhanced bioremediation of lead-contaminated soil by *Solanum nigrum* L. with *Mucor circinelloides*. *Environ Sci Pollut Res* 24:9681–9689.

Tahir, Arifa (2012). Resistant Fungal Biodiversity of Electroplating Effluent and Their Metal Tolerance Index, Electroplating, Prof. Darwin Sebayang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0471-1, InTech.

Tchounwou P.B., C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, D. J. Sutton (2012) Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: Luch A. (eds) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. *Experientia Supplementum*, vol 101. Springer, Basel

Temperini C. V., M. L. Franchi, M. E. Benavides Rozo, M. Greco, A. G. Pardo, G. N. Pose (2019) Diversity and abundance of airborne fungal spores in a rural cold dry desert environment in Argentinean Patagonia. *Science of the Total Environment* 665:513-520.

Thomas-Hall S. R., B. Turchetti, P. Buzzini, E. Branda, T. Boekhout, B. Theelen (2009) Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles* (2010) 14:47–59.

Tian D., Z. Jiang, L. Jiang, M. Su, Z. Feng, L. Zhang, S. Wang, Z. Li, S. Hu (2019) A new insight into lead (II) tolerance of environmental fungi based on a study of *Aspergillus niger* and *Penicillium oxalicum*. *Environmental Microbiology* 21(1), 471–479.

Tian D., W. Wang, M. Su, J. Zheng, Y. Wu, S. Wang, Z Li, S. Hu (2018) Remediation of lead-contaminated water by geological fluorapatite and fungus *Penicillium oxalicum*. *Environmental Science and Pollution Research* 25:21118–21126.

Yamada T., M. Iritani, H. Ohishi, K. Tanaka, K. Minoura, M. Doi, A. Numata (2007) Pericosines, antitumour metabolites from the sea hare-derived fungus *Periconia byssoides*. Structures and biological activities. *Org. Biomol. Chem.* 5, 3979–3986.

Yan G., T. Viraraghavan (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research* 37:4486–4496.

Zhang T, Zhang YQ, Liu HY, Su J, Zhao LX, Yu LY (2014) *Cryptococcus Idesensis* sp. nov., a psychrophilic basidiomycetous yeast isolated from Antarctic moss. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(2):675–679

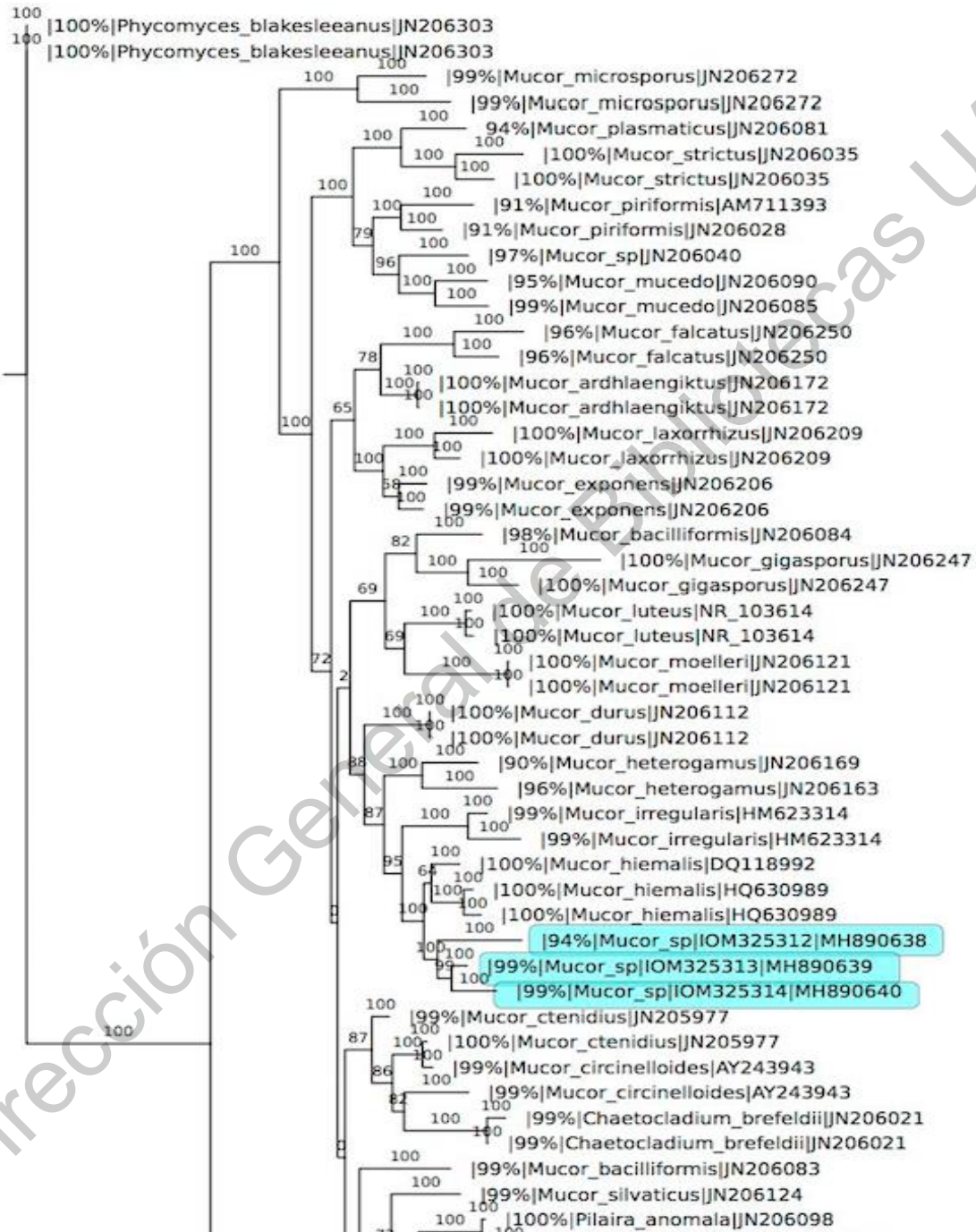
Zhdanova NN, Zakharchenko VA, Vember VV, Nakonechnaya LT, 2000. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research* 104: 1421–1426.

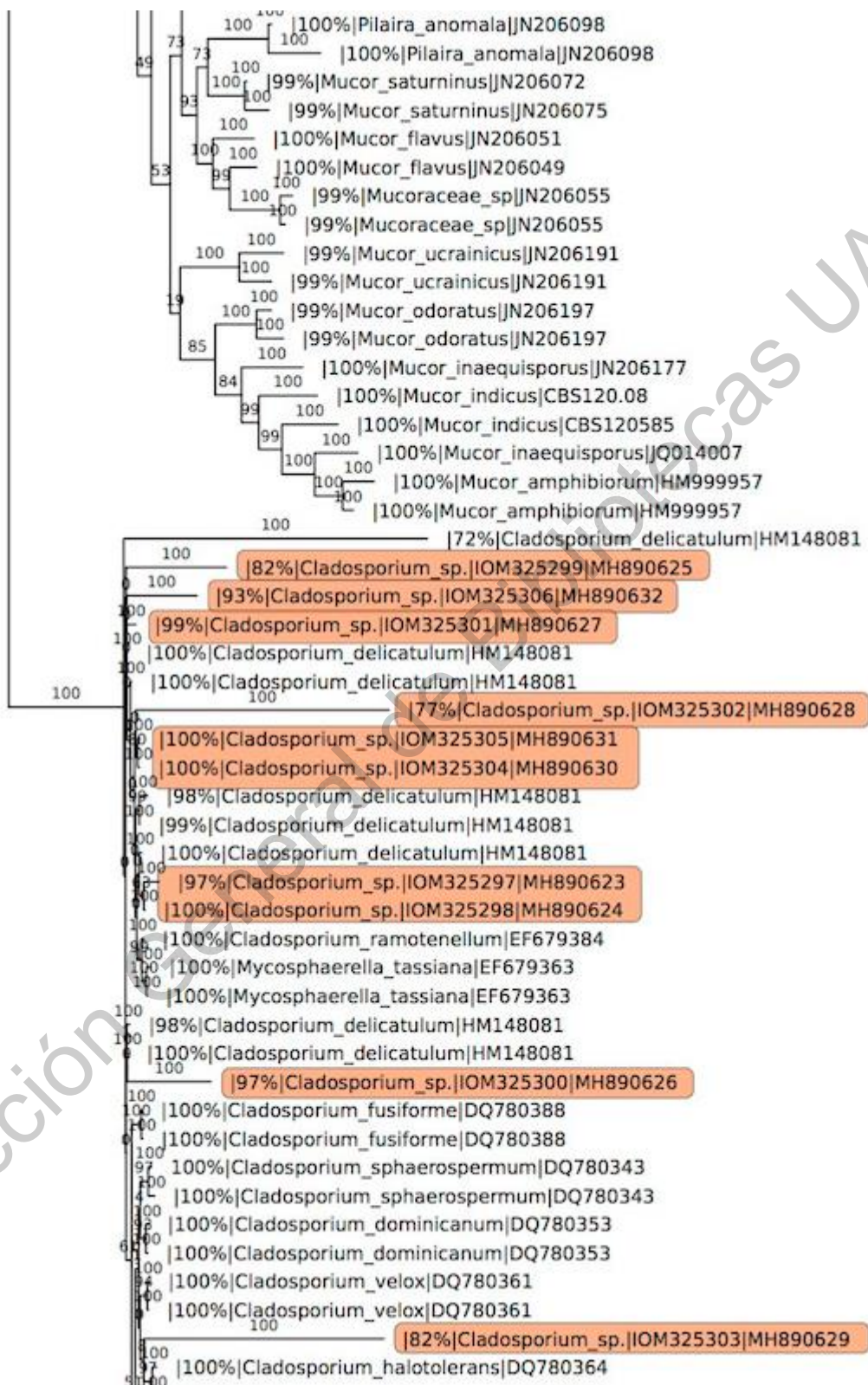
Zuconi L, S. Pagano, M. Fenice, L. Selbmann, S. Tosi, S. Onofri (1996) Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica. *Polar Biol* 16: 53–61.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

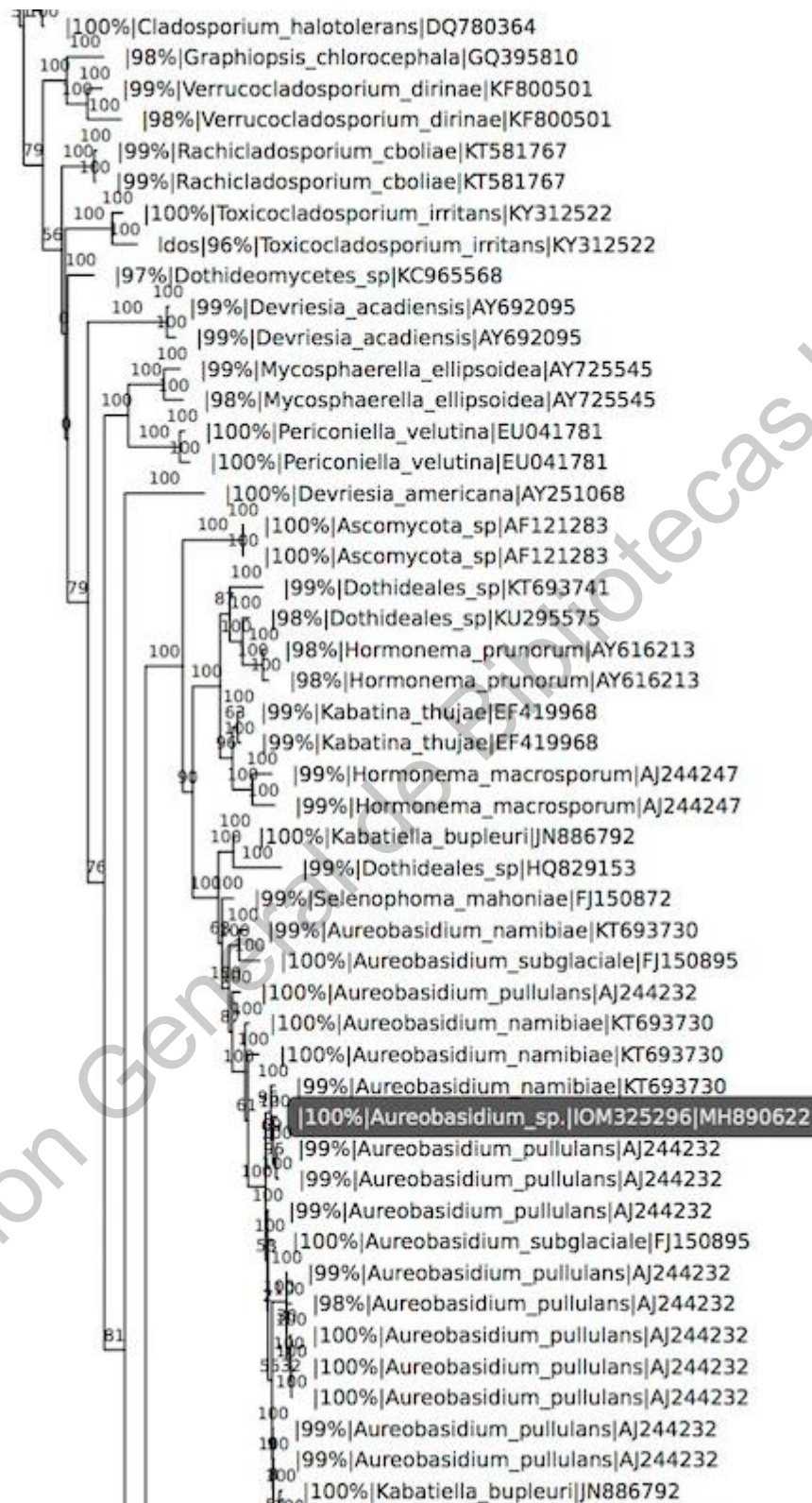
Apéndice 1.

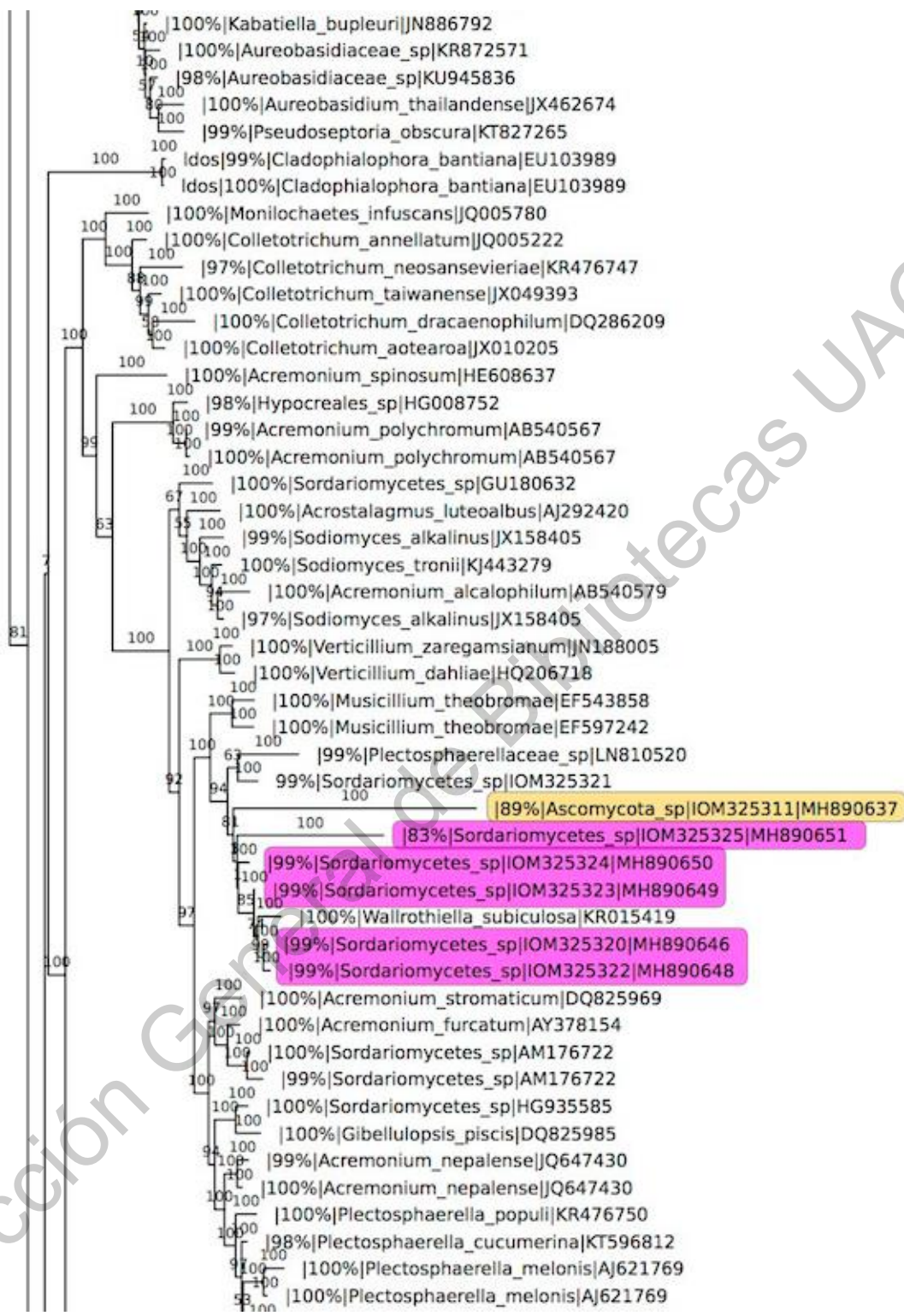
Árbol filogenético. Se observa la relación filogenética entre especies de hongos psicrófilos mediante el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS). Se infirieron utilizando ExaBayes (Aberer *et al.* 2014).

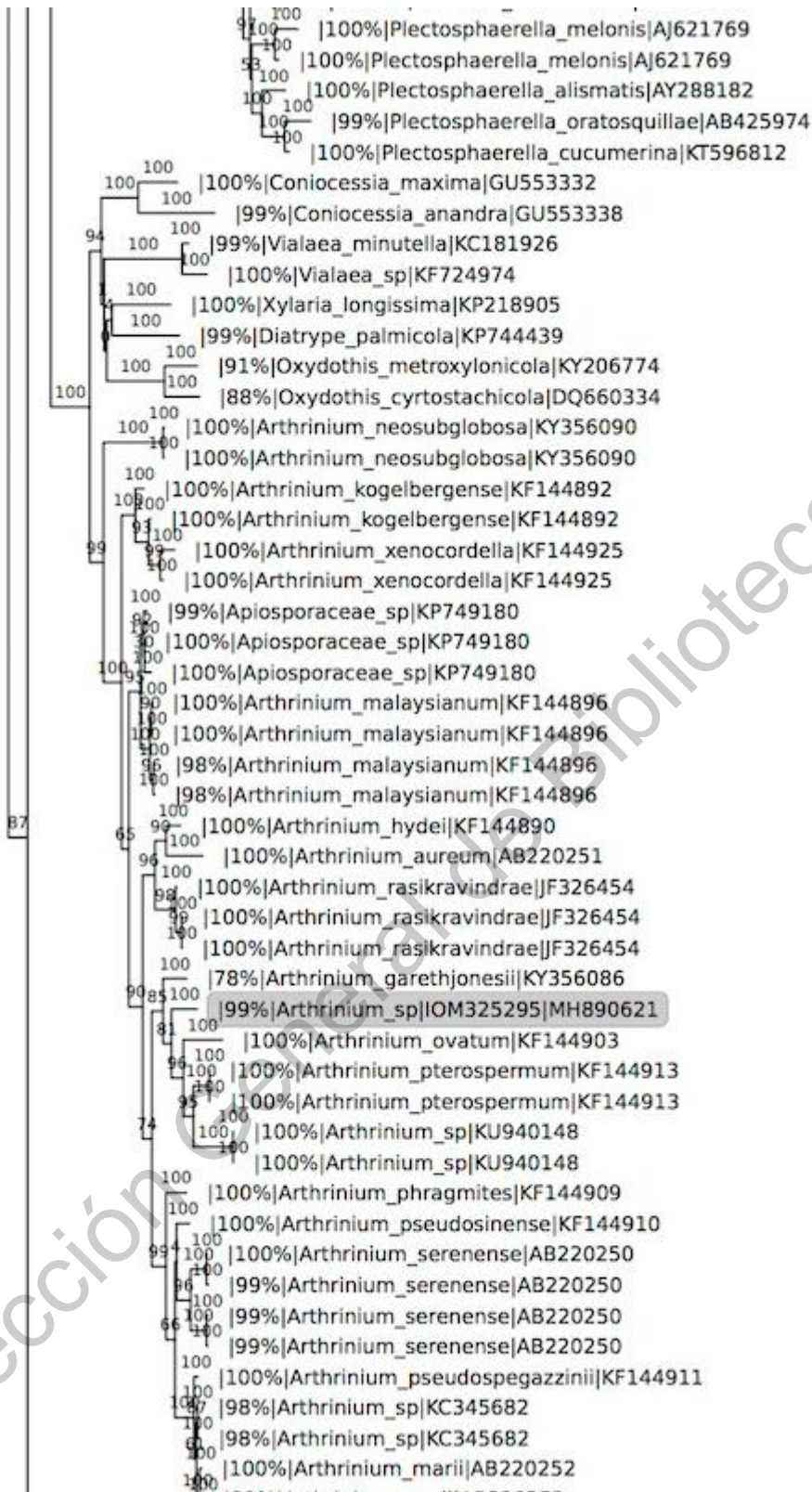




Dirección de Cas UAQ





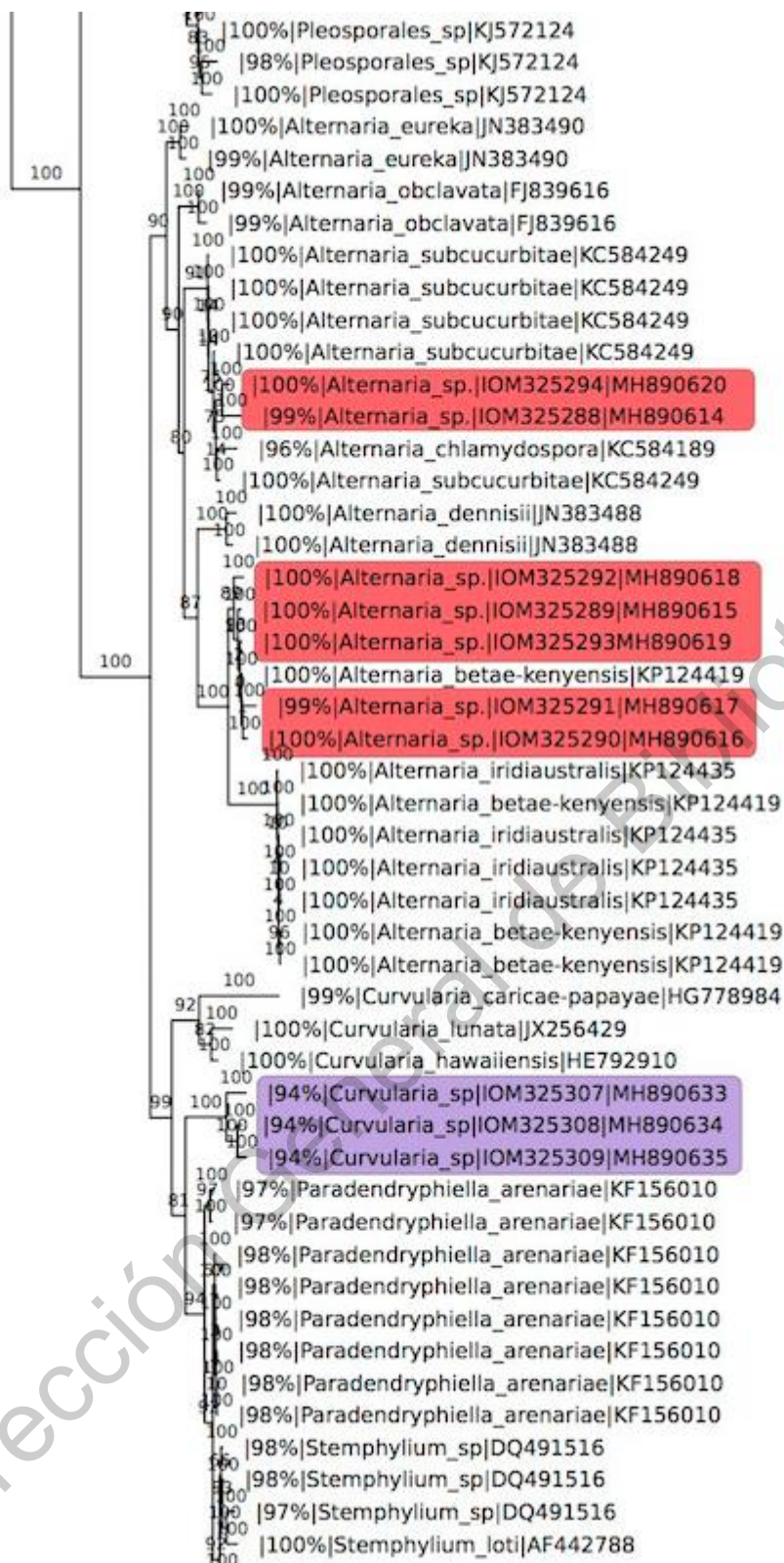


Dirección de Bibliotecas UAQ

Cont...



Dirección de Bibliotecas UAQ



100 |100%|Stemphylium_lot|AF442788
100 |100%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |100%|Stemphylium_sp|DQ491516
99 |99%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |100%|Stemphylium_sp|DQ491516
99 |99%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |99%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |98%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |98%|Stemphylium_sp|DQ491516
98 |98%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |98%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |99%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |100%|Stemphylium_vesicarium|EF452449
100 |100%|Stemphylium_vesicarium|EF452449
100 |100%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |100%|Stemphylium_sp|IOM325310|MH890636
100 |100%|Stemphylium_sp|DQ491516
100 |100%|Stemphylium_sp|DQ491516

0.4

Dirección General de Bibliotecas UAQ