



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Riqueza y caracterización de la susceptibilidad a metales pesados de levaduras aisladas de glaciares y lagos cráter del Iztaccíhuatl (México)

TESIS INDIVIDUAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

PAULINA ALCO CER FER EGRINO

DIRIGIDA POR

Dra. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA

Santiago de Querétaro, Querétaro, octubre, 2020

Resumen

En México, se han aislado microorganismos extremófilos de ambientes que presentan condiciones anormales para la vida. Las investigaciones de hábitats glaciales han revelado que las comunidades microbianas son activas en las transformaciones biogeoquímicas con importantes implicaciones globales y locales. El Iztaccíhuatl alberga los glaciares Ayoloco, La Panza y El Pecho siendo un sitio importante para el estudio de los microorganismos adaptados al frío. El objetivo de este trabajo fue rehacer la identificación de hongos levaduriformes recolectados en el Iztaccíhuatl y caracterizar la tolerancia a metales pesados (Cr, Pb y Hg). Las muestras se cultivaron en medio sólido y se realizó la identificación molecular. El ADN fúngico fue aislado mediante el método CTAB y se amplificó el fragmento de rDNA ITS para la identificación de especies por medio de un análisis de inferencia filogenética. Seguido a esto, los aislados fueron caracterizados probando su resistencia a cromo, plomo y mercurio. Las cepas probadas fueron tolerantes a los tres metales, exceptuando a una cepa del género *Naganishia* (IOM 325327). *Leucosporidium* (IOM 325344) resultó ser la más tolerante a cromo, *Phaffia* sp. (IOM325364) y *Tausonia* sp. (IOM325357) fueron las más tolerantes a plomo y *Naganishia* (IOM325360) a Mercurio. Esto nos indica que las levaduras psicrófilas identificadas en este estudio podrían ser recursos biotecnológicos, principalmente para la biorremediación de áreas contaminadas por metales pesados.

Palabras clave: Hongos extremófilos, identificación molecular, tolerancia a metales pesados.

Comité tutorial

Directora:

Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina

Asesores:

Dr. Juan Campos Guillén

Dr. Fidel Landeros Jaime

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme las herramientas necesarias para cursar la Licenciatura en Biología y para poder llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina por ser mi guía en el conocimiento de los hongos, por su entusiasmo, paciencia y dedicación en la revisión de la tesis.

Al Dr. Marco Sánchez por su orientación, sugerencias y revisión de este proyecto.

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. Víctor Manuel Bautista de Lucio por abrimme las puertas de su laboratorio y por permitirme realizar ahí la fase experimental de este proyecto.

Al Lic. Diego Santamaría Tovar por su colaboración.

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

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente durante toda la carrera.

A mi hermano, que me ha enseñado a ser persistente y caminar hacia mis sueños.

A Alberto Nuñez, por acompañarme de principio a fin en este proyecto e impulsarme a siempre ser mejor.

A Nora y a Ale, por ser esa compañía silenciosa que me escucha y enseña.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Glaciares mexicanos.....	3
2.2 Organismos extremófilos.....	4
2.3 Microorganismos psicrófilos.....	5
2.4 El rol de los microorganismos es fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los metales.....	6
3. Justificación.....	9
4. Hipótesis.....	10
5. Objetivos.....	10
5.1 Objetivos generales.....	10
5.2 Objetivos particulares.....	10
6. Metodología.....	11
6.1 Recolección y aislamiento de hongos psico-tolerantes.....	12
6.2 Identificación molecular: extracción de ADN, amplificación y secuenciación de ITS1–5.8S – ITS2.....	12
6.3 Inferencia filogenética.....	13
6.4 Caracterización fúngica: pruebas de resistencia a metales pesados.....	13
6.5 Determinación del índice de tolerancia a hongos y concentraciones mínimas inhibitorias de metales pesados.....	14
7. Resultados.....	15
7.1 Aislamiento de hongos filogenia y diversidad.....	14
7.2 Perfil de tolerancia a metales pesados.....	18
8. Discusión.....	22
9. Conclusión.....	26
10. Referencias.....	27
11. Apéndices.....	35

1. Introducción

El hielo en la naturaleza se ha considerado durante mucho tiempo como un microambiente que tiene características únicas donde los microorganismos que se han depositado aleatoriamente en su superficie pueden permanecer latentes (Delgado-Granados *et al.*, 2015). Sin embargo, la comunidad científica ha descrito a los glaciares como sistemas altamente dinámicos, constantemente equilibrando la acumulación de masa de hielo y la biodiversidad que los habita (Meier 1973). Una parte significativa de la biosfera es permanentemente fría, con temperaturas inferiores a 5 °C donde una gran riqueza de microorganismos predomina ya que están adaptados para sobrevivir a condiciones de baja temperatura (Anesio *et al.*, 2012). En México se reconocen unos pocos glaciares en volcanes de gran altura. El eje volcánico transversal (EVT) es un conjunto de volcanes alineados en una franja que cruza el territorio mexicano de oeste a este, desde Cabo Corrientes, Nayarit hasta la cordillera de Chiconquiaco, Veracruz (Ferrusquia-Villafanca, 2007), este se encuentra principalmente entre 19° y 21° de latitud norte y entre 1500 y 5675 m de altitud (Ferrusquia-Villafanca, 2007). Algunos de los volcanes que componen el EVT todavía presentan actividad. Este eje, se ha formado durante los últimos 19 millones de años, a lo largo de 4 episodios principales de vulcanismo (Espinosa y Ocegueda, 2007). Los volcanes más altos del EVT son el Pico de Orizaba (también conocido como Citlaltepétl, 5675 metros sobre el nivel del mar (msnm), EL Popocatepetl (5452 msnm), y el Iztaccíhuatl (5286 msnm). Este último al igual que Citlaltepétl está cubierto de hielo (Granados, 2007). Sus rocas andesíticas y dacíticas (datan de 12,000-900,000 años) (Nixon, 1989) constituyen la base del sistema de glaciares del volcán. Los glaciares del volcán Iztaccíhuatl perdieron el 43% de su área en solo 30 años (Granados *et al.*, 2015) ya que el hielo de estos glaciares es muy vulnerable a los cambios de temperatura, debido a que su temperatura promedio es de ~ -1.5 °C (Delgado-Granados, 2007; Granados *et al.*, 2015).

Las investigaciones de hábitats glaciales han revelado que las comunidades microbianas son activas en las transformaciones biogeoquímicas, como la fijación de carbono y la respiración, el ciclo del hierro y la metanogénesis, con importantes implicaciones a escala local y global (Hodson *et al.*, 2009; Hood *et al.*, 2009). Además, los microorganismos extremófilos han despertado el interés de varias industrias, debido a sus enzimas,

catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas de la célula, como en el caso de las arqueas extremófilas les permiten colonizar los ambientes más inhóspitos. (Ramirez *et al.*, 2006).

En México, se han aislado microorganismos extremófilos (bacterias y arqueas principalmente) de pozos petroleros. (Miranda *et al.*, 2004), aguas termales (Castro *et al.*, 2005; Pinzón *et al.*, 2010), áreas desérticas (Souza *et al.*, 2006), suelos alcalinos (Valenzuela *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2009), zonas volcánicas (Cavicchioli *et al.*, 2011), entre otros; revelando la gran biodiversidad y el gran potencial biotecnológico de la microbiota mexicana (Oliart *et al.*, 2016).

La presencia de estos microorganismos extremófilos en regiones geográficamente distantes (por ejemplo, montañas altas por encima de 5000 msnm) podría ser el resultado de un proceso ecológico y una adaptación genética que les permitió aumentar y mejorar su supervivencia en estos entornos específicos (Margesin *et al.*, 2007, Rossi *et al.*, 2009). Los microorganismos adaptados al frío y amantes del frío (procariotas y hongos) llamados psicotolerantes y psicrófilos respectivamente, que muestran un metabolismo activo en glaciares y capas de hielo están sujetos a temperaturas extremadamente bajas, desecación y, a menudo, limitación de nutrientes. Dichos organismos tienen una gama de adaptaciones relacionadas con los procesos del metabolismo celular (Cavicchioli, *et al.*, 2002.) Por ejemplo, producen enzimas estables a bajas temperaturas, proteínas anticongelantes y sustancias exopoliméricas que proporcionan protección celular contra los efectos potencialmente dañinos de las bajas temperaturas. (Gilbert *et al.*, 2005; Margesin *et al.*, 2011).

Mantener la fluidez de las membranas celulares es crucial a bajas temperaturas. Esto se logra mediante un aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados y una disminución en la longitud promedio de la cadena de ácidos grasos (Metz *et al.*, 2001). Dichas adaptaciones requiere el desarrollo de mecanismos de protección que alteren la fisiología o mejoran las capacidades de reparación (Deming 2002; Shivaji y Prasad 2009). Muchas de estas propiedades ya han sido explotadas por las industrias biotecnológicas y otras están en desarrollo (Margesin *et al.*, 2007; Shivaji y Prasad 2009).

Debido a su capacidad distintiva de crecer y metabolizar a bajas temperaturas, los hongos psicrófilos, principalmente las levaduras están atrayendo la atención académica e industrial por su enorme potencial biotecnológico. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios publicados hasta el momento, solo unas pocas moléculas producidas por esos organismos están actualmente en el mercado (Margesin & Feller, 2010). A pesar de esto, varios posibles productos aún están confinados al laboratorio y eventualmente se desarrollarán en empresas rentables (Buzzini *et al.*, 2012). Las bacterias y hongos capaces de degradar grandes cantidades de compuestos orgánicos en poco tiempo a bajas temperaturas representan una fuente prometedora como inóculo para el tratamiento acelerado de aguas residuales (Margesin *et al.*, 2010).

2. Antecedentes

2.1 Glaciares Mexicanos

El 10% de la superficie de la Tierra está cubierta de hielo de origen glaciar los cuales almacenan cerca de 33 millones de km³ de agua dulce, esto los convierte en los mayores reservorios de este recurso. (Ramírez *et al.*, 2016). El Centro Nacional de Datos de Hielo y Nieve (NSIDC por sus siglas en inglés) define a un glaciar como una masa de hielo originada en la tierra, la cual se compone de nieve caída. Esta, con el transcurso de muchos años se comprime en grandes masas de hielo. La formación de glaciar sucede cuando la nieve está en el mismo lugar el tiempo suficiente para que suceda la transformación, esta condición les da a los glaciares la capacidad de poder moverse en forma de ríos lentos y ser dinámicos.

Los glaciares en el contexto científico se consideran un residuo de la última Edad de Hielo, cuando las bajas temperaturas permitían que el hielo polar se moviera hacia zonas de altitud baja (Fernández *et al.* 2017). En el Pico de Orizaba, el área glacial hace 10 años era un 30% del área total en 1958 (Delgado-Granados *et al.*, 2015). Álvarez y Delgado-Granados *et al.*, (2005) investigaron acerca del espesor del glaciar de La Panza en el Iztaccíhuatl y continuo a esto, Delgado-Granados *et al.*, (2005) y Schneider *et al.*,

(2008) actualizaron el inventario glacial del volcán Iztaccíhuatl. En el último estudio mencionado, los investigadores realizan una proyección a 10 años acerca de la desaparición de estos glaciares. Se establece una proyección a cerca de la desaparición de estos glaciares debido a causas ambientales (Delgado-Granados *et al.*, 2005). Al día de hoy, ese escenario no está presente.

2.2 Organismos extremófilos

Los microorganismos considerados extremófilos tienen como hábitat natural ambientes que antiguamente se consideraban demasiado hostiles para permitir la supervivencia de organismos vivos. Estos se clasifican con base en la condición física o química extrema del ambiente donde se desarrollan, entre ellos están los termófilos con una temperatura de óptima de crecimiento superior a 45 °C, los acidófilos con un pH de crecimiento por debajo de 5, los alcalófilos con un pH de crecimiento por arriba de 8, los radiófilos los cuales resisten altos niveles de radiación y los psicrófilos con temperatura óptima de crecimiento por debajo de los 10 °C. (Reed *et al.*, 2013, Antranikian *et al.*, 2005, Ferrer 2007, Jia *et al.*, 2013).

Los hábitats donde viven los extremófilos incluyen hábitats abismalmente diferentes. Entre ellos, manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos a sistemas de aberturas termales abisales, tierras y mares polares fríos y glaciares alpinos; lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos como zonas de solfataras, minas, fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos. (Reed *et al.*, 2013, Madigan *et al.*, 1999, Rothschild *et al.*, 2001).

Las condiciones físico-químicas de estos ambientes están alejados de los valores en los comúnmente es posible la vida. El agua líquida, el suministro de energía y el control de la misma y las condiciones de óxido-reducción ambientales son indispensables para la supervivencia, por lo que los extremófilos deben vivir dentro de esos parámetros o bien ser capaces de mantenerlos regulados de forma intracelular (Canganella *et al.*, 2011).

El agua es el disolvente esencial para la vida y debe estar presente en estado líquido para que ésta pueda ocurrir. Esto pone un límite para el desarrollo de organismos por

debajo de los 0°C. Típicamente los organismos psicrófilos pueden crecer en temperaturas por debajo de los 5°C, aunque el rango de temperaturas de desarrollo puede ir desde los 20°C hasta menos de 0°C (Ramirez *et al.*, 2006).

2.3 Microorganismos psicrófilos

La vida a bajas temperaturas representa un reto para las células, estas deben enfrentarse a la disminución de actividad enzimática, difusión de solutos, diferentes cambios en la fluidez de la membrana, conformación de macromoléculas y una disminución en los procesos de traducción y replicación. Dentro de este grupo, también existen los denominados psicrófilos extremos, los cuales tienen temperaturas óptimas de 4° C y no sobreviven en temperaturas mayores a los 14° C. (Ramirez *et al.*, 2006). Los microorganismos que habitan en los glaciares mexicanos tienen que adaptarse a la baja actividad del agua debido a los ciclos de congelación-descongelación, a una amplia gama de temperaturas, a bajas concentraciones de oxígeno, alta radiación UV y solar, baja disponibilidad de nutrientes y desecación debido a fuertes vientos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2003).

Algunas de las estrategias de este grupo de microorganismos a nivel molecular están muy relacionadas con las proteínas chaperonas que conforman el control de calidad de la maquinaria celular las cuales regulan la actividad y la conformación de otras proteínas. (Ramirez *et al.*, 2006). Dentro de este grupo, las proteínas de choque térmico son las que se encuentran en mayor cantidad. La función de estas proteínas es plegar de manera correcta a proteínas que están siendo sintetizadas y a proteínas desnaturalizadas, también responden a diferentes tipos de estrés y participan en la coordinación de complejos macromoleculares (Ramirez *et al.*, 2006). Otra de las estrategias de los organismos psicrófilos es la síntesis de enzimas con modificaciones bioquímicas las cuales permiten la supervivencia a bajas temperaturas, así como moléculas que reducen el punto de congelación del agua en interior de la célula (Alpala- Aguilar 2016).

Los psicrófilos son capaces de degradar sustancias poliméricas tales como: almidón, celulosa, xilano, pectina, quitina, proteínas y lípidos; produciendo enzimas como:

amilasa, celulasa, xilanasas, pectinasas, quitinasas, proteasas y lipasas respectivamente (Ramirez *et al.*, 2006), por lo que representan un interesante recurso con aplicación en la biotecnología industrial, sobre todo el área de la biorremediación. (Moreno, 2017).

2.4 El papel de los microorganismos es fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los metales

Todas las interacciones entre los diferentes microorganismos y los metales u otros elementos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo son parte fundamental de los ciclos biogeoquímicos. Las interacciones metal-microbiota son estudiadas entonces en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos (Rodschild *et al.*, 2001).

Los metales pesados son elementos potencialmente tóxicos y lamentablemente su presencia en el medio ambiente ha incrementado de forma muy notoria en las últimas décadas esto debido en gran parte por actividad humana. La contaminación metálica supone una amenaza medioambiental importante para los seres vivos, ya que diversos metales que son micronutrientes esenciales, como el cobre y el zinc, resultan tóxicos en concentraciones elevadas, mientras que otros como cadmio, plomo mercurio y arsénico, son tóxicos a dosis mínimas (Lovley, 2000).

Dependiendo del estado de oxidación en el cual se encuentre un metal y la especie que esté conformando, un microorganismo posiblemente llegue a realizar dos tipos de transformaciones. Una de ellas es la movilización del metal, es decir el paso de un estado insoluble inicial a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa. A este proceso se le llama lixiviación microbiana. (Rothschild *et al.*, 2001) El segundo proceso es la inmovilización del metal el cual consiste en el paso de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. (Rothschild *et al.*, 2001)

Dentro de la naturaleza existen diferentes mecanismos los cuales la inmovilización del metal puede ocurrir, a continuación, se mencionarán algunos de ellos. La biolixiviación es un proceso de solubilización el cual se utiliza en la industria minera. Por medio de la

acción de microorganismos, los metales que se encuentran en los minerales resultan extraídos en fase acuosa. (Rothschild *et al.*, 2001).

El biolixiviado puede utilizarse dentro del área de la hidrometalurgia, recuperando metales a partir de materiales sólidos altamente contaminados como suelos, cenizas resultantes de quema de desechos, sedimentos acuáticos, etc. (Rothschild *et al.*, 2001).

Existen hongos que pueden realizar este proceso, por ejemplo, *Trichoderma harzianum* que es capaz de solubilizar MnO_2 , Fe_2O_3 y Zn metálico mediante la liberación de agentes quelantes. (Valls *et al.*, 2002). Otro caso bastante interesante consiste en la utilización de una combinación de la solubilización microbiana del Pb de la piromorfita ($Pb_5(PO_4)_3Cl$), mediada por el hongo *Aspergillus niger* con la acumulación del metal disuelto por parte de plantas que crecen en suelos contaminados con dicho mineral. Este último fenómeno es conocido por fitorremediación, donde la retención del metal es mediada por la acumulación en plantas. (Clarke *et al.*, 1987).

La bioacumulación es un mecanismo celular que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular el cual implica un gasto energético. (Gadd, 2000). Este consumo energético se genera a través del sistema H^+ -ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Gadd, 2000).

En la literatura se ha reportado el aislamiento de microorganismos resistentes a metales pesados como: *Cryptococcus albidus* aislada de zonas mineras de Guanajuato resistente a plata (Alonso *et al.*, 2004). *Thiobacillus ferrooxidans* a partir de suelos ricos en azufre (Mendoza *et al.*, 1994) o resistentes a altas concentraciones de arsénico (Espejo *et al.*, 1987). Así como *Aspergillus flavus* tolerante a metales pesados (Orrantia, 1995), entre hongos contaminantes tolerantes a plomo (Diaz *et al.*, 2002) y la acumulación de metales pesados por macromicetos comestibles (Lovley, 2000). Se han aislado, hongos filamentosos tolerantes a metales pesados (Robles-Galán, 1996; Ezzouhri *et al.*, 2009). Algunos estudios al respecto son los de Cárdenas (2010), donde se aislaron 23 hongos

con diferente resistencia a los metales analizados. Los autores mencionan distintos géneros y especies entre ellas: *Alternaria* sp, *Penicillium* sp, *Curvularia* sp, *A. níger*, *Micelio estéril*, *A. flavus*, *Cephalosporium* sp, *Fusarium* sp y *Cladosporium* sp (Shazia, 2009) lo que coincide los estudios de Alonso *et al.*, (2004) y Orrantia *et al.*,(1995). Gran parte de los hongos estudiados toleran plomo y zinc, pocos en mercurio y arsénico, y la mayor sensibilidad encontrada fue a cadmio. Estos hongos se pueden utilizar los metales pesados en solución solos o acompañados de otras biomásas, y contribuir fundamentalmente a los ciclos biogeoquímicos (Kratochvil, 1998). El papel de los microorganismos en los procesos de biorremediación de desechos sólidos y líquidos es esencial para el cuidado del medio ambiente, los hongos representan una alternativa promisoría en este campo de estudio. Muchas de sus aplicaciones aún se están investigando, sin embargo, sus propiedades han resultado altamente efectivas en estos procesos (Volesky, 1995).

Algunos hongos pueden acumular y absorber grandes cantidades de compuestos tóxicos como parte de las adaptaciones a ambientes extremos (Fernández *et al.*, 2017; Perini *et al.*, 2019) y la exposición a metales pesados, esto debido a varios mecanismos como la biosorción en la pared celular, precipitación extra e intracelular y la transformación de compuestos metálicos (Mohammadian *et al.*, 2017). Los hongos extremófilos podrían usarse como agentes de biorremediación en ambientes contaminados con cromo, mercurio o plomo, como se muestra para algunos hongos antárticos (Santiago *et al.*, 2014). Además, representan nuevas e interesantes fuentes de productos naturales, con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, agrícola entre otras (Gomes *et al.*, 2018). Así como influyendo en la formación del suelo y en el crecimiento de plantas pioneras (Ciccazzo *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2017; Barba-Escoto *et al.*, 2019).

3. Justificación

La presencia de concentraciones nocivas de algunos elementos químicos y compuestos contaminantes en los suelos representa un serio problema de contaminación. El contaminante está siempre en concentraciones anómalas (mayores a las habituales). Su toxicidad se define a partir de la capacidad que tiene de afectar adversamente alguna función biológica de los organismos. Dependiendo de su origen puede ser geogénico o antropogénico. Los primeros pueden proceder de la propia roca madre en la que se formó el suelo, de la actividad volcánica o del lixiviado de mineralizaciones. Los antropogénicos son producidos por los residuos sólidos urbanos y derivan de actividades industriales, agrícolas, mineras, entre otras. Las investigaciones acerca de los microorganismos capaces de biorremediar sitios contaminado resulta interesante. En particular la de hongos extremófilos adaptados al frío, pues presentan mecanismos inusuales, entre ellos, diferentes rutas bioquímicas y metabólicas por las cuales degradan y generan compuestos específicos, involucrados en la biorremediación y la adaptación al frío. Se han realizado estudios con hongos aislados de la Antártida donde se demuestra la tolerancia a compuestos tóxicos, entre ellos, metales pesados. Posiblemente, esta capacidad adaptativa esté relacionada con la expresión genómica y proteica involucrada en las adaptaciones al estrés que generan el frío.

Debido a esta capacidad adaptativa resulta interesante identificar levaduras adaptadas a bajas temperaturas recolectadas en el Iztaccíhuatl (México) y con ello, conocer cuáles son tolerantes a la presencia de metales pesados. Lo cual podría ser útil para conocer la riqueza de micromicetos psicrófilos de los glaciares mexicanos y su potencial uso en el área de la biotecnología, principalmente, en el área de la biorremediación.

4. Hipótesis

Las levaduras psicrófilas aisladas de los glaciares y lagos cráter del Iztaccíhuatl, podrán soportar altas concentraciones de mercurio, plomo y cromo debido a las capacidades adaptativas que poseen derivadas de las condiciones extremas donde dichos hongos habitan.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Identificar y caracterizar las levaduras aisladas de lagos cráter y de glaciares para evaluar su tolerancia ante tres diferentes metales.

5.2 Objetivos Particulares

1) Resolver la identificación filogenética de las levaduras aisladas de dos lagos cráter y dos glaciares y determinar cuáles son sus categorizaciones taxonómicas.

2) Caracterizar 14 levaduras por medio de su tolerancia a tres metales pesados (Cr, Hg y Pb) para determinar su capacidad metabólica en presencia de distintas concentraciones de estos elementos.

6. Metodología

6.1 Recolección y aislamiento de hongos psicro-tolerantes.

En febrero 2019, se recibieron 4 muestras tomadas por la Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina en colaboración con el Lic. Diego Santamaria Tovar del volcán Iztaccíhuatl. Las muestras fueron recolectadas en dos glaciares y dos lagos de cráteres del complejo volcánico Iztaccíhuatl (Lago del cráter volcánico "Monte de Venus": N 19°09.810' O 098°38.277' 4950 msnm; Lago del cráter volcánico "La Panza": N 19 ° 10.003' O 098°38.203' 5010 msnm; Glaciar "La Panza": N 19°10.056' W 098°38.327' 5065 msnm; Glaciar "El Pecho": N 19°10.609 'O 098°38.475' 5200 msnm). Se tomaron muestras de los glaciares Pecho y La Panza (Sitio 3 y 4) y dos muestras de dos conos volcánicos (Sitio 1 y 2). (Figura 1)

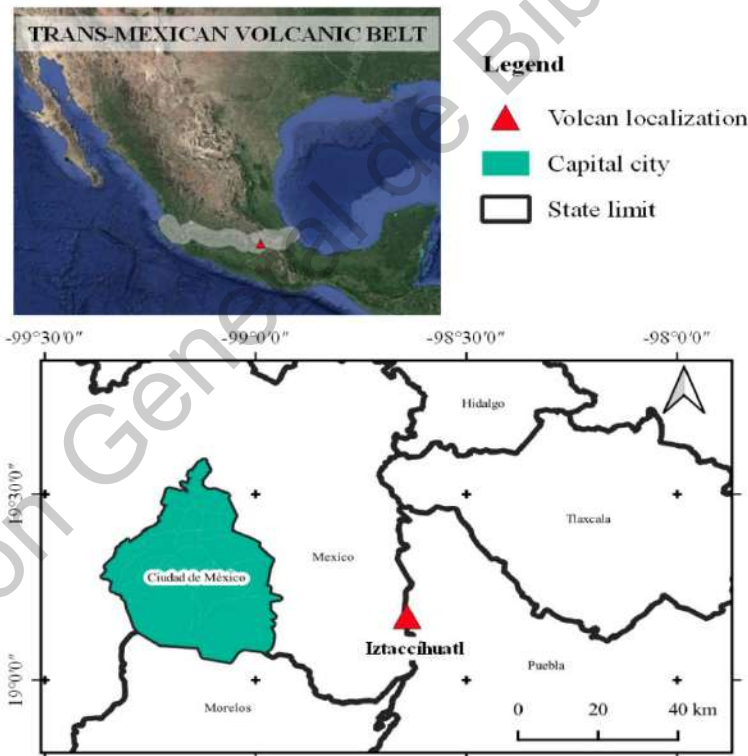


Figura 1. Sitios de colecta de localización del Iztaccíhuatl. El mapa que muestra la localización del Eje Neovolcánico Transversal Mexicano y la posición del volcán donde se realizaron los muestreos de gran altitud (5000 msnm) alrededor de la latitud 19° norte México.

Las muestras se almacenaron en frascos de vidrio estériles. Se usó un piolett esterilizado (mediante flameo) con alcohol de 96 ° (Maquimex®, México), luego se cavó un agujero de 60 cm, los viales estériles de 500 mL se llenaron *in situ* y se transportaron al laboratorio a 4°C (Branda *et al.*, 2010). Para cada punto de recolección, se realizaron tres réplicas técnicas. Las muestras de hielo se descongelaron a 4°C y se filtraron inmediatamente utilizando filtros de membrana Millipore (0,45 mm) (Millipore®, EE. UU.) (Branda *et al.*, 2010). Los filtros se cortaron en trozos pequeños con tijeras y pinzas estériles y se colocaron en la placa de agar de dextrosa Sabouraud (SDA) (Bioxon®, México) con cloranfenicol al 1% (Sigma®, Alemania) para prevenir el crecimiento bacteriano. Del agua obtenida de las muestras, también se colocaron 500 µL en placas de SDA y se extendieron con una varilla codada estéril. Al hacerlo, se obtuvieron un total de 4 réplicas de cada punto. Las placas de agar se incubaron a 28°C y 4°C hasta que se observó el crecimiento de los hongos. Una vez que esto sucedió, se procedió a aislar cultivos axénicos en medio de agar de dextrosa de papa (PDA) (Bioxon®, México). Los cultivos de hongos identificados se depositaron en el Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" IAP, Colección de Cultura de México (IOM) con los números de acceso de IOM325326 a IOM325362; IOM325364 y IOM325365 (holotipo y ex-tipo) y en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) Instituto Politécnico Nacional (IPN), colección de cultivo de México (isotipo).

6. 2. Identificación molecular: extracción de ADN, amplificación y secuenciación de ITS1–5.8S – ITS2.

El ADN fúngico se aisló mediante un método basado en bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) (Sigma®, Alemania) (Möller *et al.*, 1992). Para determinar la calidad del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Para amplificar el fragmento del marcador molecular ribosómico del rARN ITS1-5.8S-ITS4 (ITS), la PCR se realizó en un GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific®, EE. UU.). Usando los cebadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar el ITS (Dyavaiah *et al.*, 2007).

Para la secuenciación se enviaron las secuencias a la empresa MACROGENE (Seul, Corea). Una vez obtenidas dichas secuencias, se compararon a través de BLAST con secuencias de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Todas las secuencias usadas en este trabajo se muestran en los árboles filogenéticos con sus números de acceso de GenBank (Apéndices 1-7). Se usaron secuencias de "Type Material" cuando se lograron encontrar disponibles para cada taxón. Todas las secuencias recién generadas se depositaron en GenBank (números de acceso de GenBank: MH890614 a MH890651) (Tabla 1).

6.3 Inferencia filogenética

Las secuencias se editaron y se alinearon en CLUSTALX (Larkin, 2007), y las alineaciones se editaron y ajustaron manualmente usando SEAVIEW (Galter, 1996). Para estimar las relaciones filogenéticas en el fragmento ribosómico del ARNr ITS15.8S-ITS4. El modelo de sustitución de nucleótidos de mejor ajuste se encontró utilizando jModelTest. (Posada, 2008). La asignación de especies se realizó mediante métodos filogenéticos bayesianos utilizando el grupo super computacional "Kabré" (CNCA-CeNAT). La alineación se realizó utilizando MAFFT v7.397 con la estrategia L-INS-i. Los árboles filogenéticos se infirieron usando ExaBayes (Aberer, 2014) con ncat = 3-4 millones de generaciones y 25% "burning". En Fig Tree V1.4.2.29 (Rambaut, 2006) se visualizó y editó el árbol filogenético, determinando la clasificación taxonómica.

6.4 Caracterización fúngica: pruebas de resistencia a metales pesados.

Para esta caracterización, se analizaron las cepas mediante la técnica de microdiluciones en placas de poliestireno, la cual se describe a continuación. Las levaduras se sembraron en las placas de Petri con PDA las cuales se incubaron por 14 días a 28°C. Se recuperaron las células fúngicas añadiendo 10 mL de 1xPBS (Solución salina tamponada con fosfato) (Thermo Fisher) que contenía 0,01% (v/v) de Tween-20 (Sigma) con una varilla codada estéril. Después se realizó un recuento celular por medio de la cámara Neubauer con una dilución 1:10 de la suspensión celular inicial obtenida.

Posteriormente, se calculó y se inoculó una concentración de 1×10^6 células/mL de cada una de las levaduras en medio de cultivo fosfatado RPMI 1640 (Sigma®). Se evaluó la resistencia a tres metales cromo, mercurio y al plomo usados en su forma de sales (CrCl_3 , HgCl_2 y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ en la concentración 1M. Se realizaron cinco pruebas aumentando gradualmente la cantidad de μl de cada metal (25 μl , 50 μl , 100 μl , 250 μl y 400 μl).

Se hicieron cuatro réplicas por cada prueba de los 3 metales, para cada una de las levaduras. Como control, se realizaron 4 repeticiones técnicas de cada aislado para los 3 metales, así como 4 repeticiones de control para cada levadura con el medio RPMI. Las microplacas se almacenaron a 28°C durante 14 días. Se realizaron tres mediciones para observar si había crecimiento de los organismos, a los 7 días, a los 10 días y finalmente a los 14 días. Utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher) se midieron las densidades ópticas específicas para cada metal, para cromo y plomo de 540 nm (Congeevaram *et al.*, 2007) y para mercurio 620 nm (Ghasemi y Kaykhahi., 2017).

6.5 Determinación del índice de tolerancia a hongos y concentraciones mínimas inhibitorias de metales pesados.

El índice de tolerancia (TI) indica cómo un organismo tolera el estrés. Este se determinó para cada cepa respecto a cada metal, se calculó a partir de los datos medidos de la colonia de crecimiento fúngico expuesta al metal dividida por los datos del crecimiento fúngico en los medios de control. Además, se calculó la concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la concentración más baja del metal que inhibe el crecimiento. Para saber cuál es la levadura más tolerante, se debe evaluar el potencial de resistencia de los hongos combinando los ensayos TI y MIC (Mohammadian Fazli *et al.*, 2015).

7. Resultados

7.1. Aislamiento de hongos, filogenia y diversidad fúngica

De las muestras recolectadas de los diferentes sitios de los glaciares y los lagos, se aislaron 91 hongos en total. En la figura 2 se muestra la relación de los hongos que se pudieron aislar de las muestras recolectadas en los diferentes puntos del volcán Iztaccíhuatl

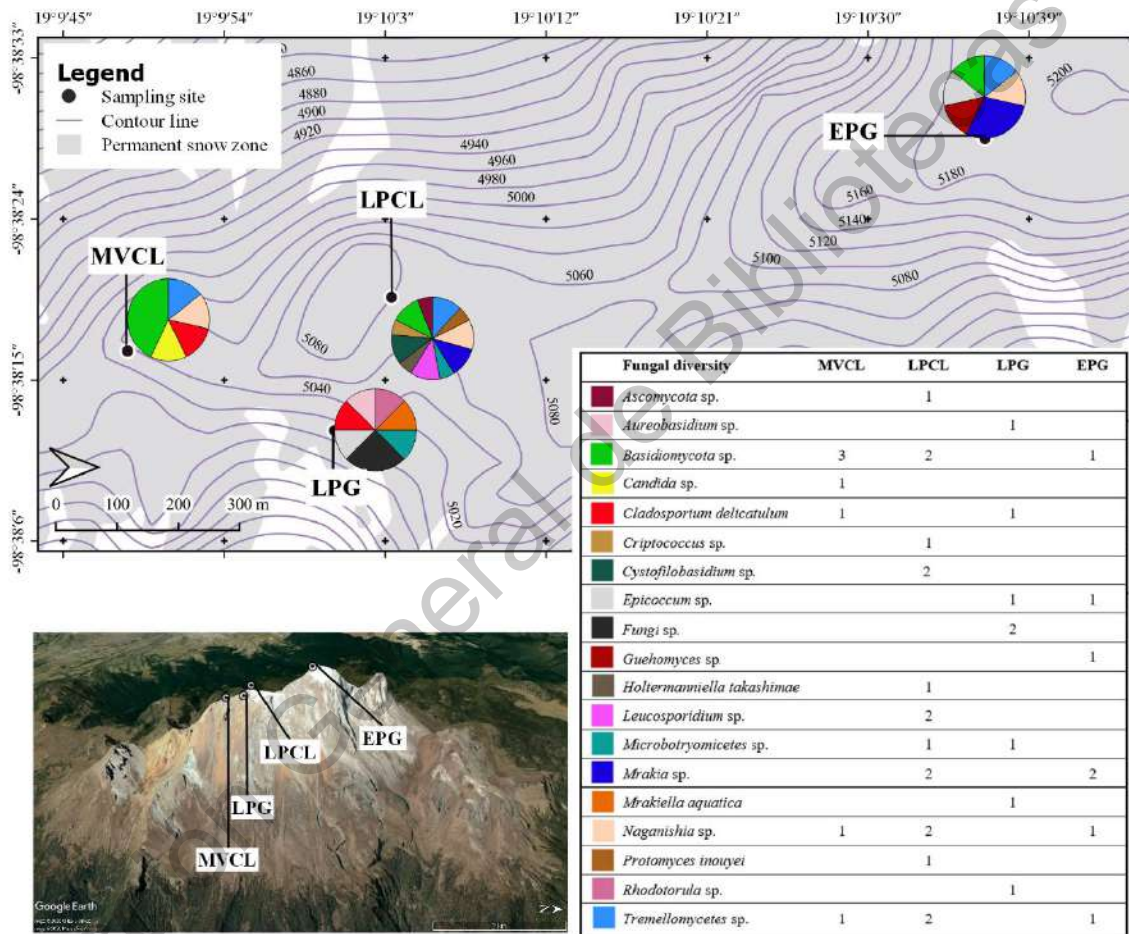


Figura 2 Identificación taxonómica y su relación con los sitios de muestreo en los lagos cráter y los casquetes glaciares. Identificación taxonómica de hongos en los cuatro puntos de muestreo del Iztaccíhuatl. Sitio 1 MVCL (Lago cráter “Monte de Venus”), Sitio 2 LPCL (Lago cráter “La Panza”), Sitio 3 LPG (Glaciar “La Panza”) y Sitio 4 EPG (Glaciar “El Pecho”).

De todas las muestras, 39 se lograron identificar a diferente nivel taxonómico (Figura 2 y Tabla 1) dejando 52 muestras de hongos sin identificar. Cabe mencionar que las muestras del lago del cráter volcánico "La Panza" (sito 2) son las que se identificaron en la gran mayoría con un total de 17 hongos identificados. A diferencia de las muestras que podían aislarse del glaciar "La Panza" (sito 3) y "El Pecho" (sito 4), donde se identificaron en un porcentaje menor que los hongos aislados de los lagos volcánicos En la Tabla 1 puede observarse la categorización taxonómica realizada en este proyecto mediante la resolución de la identificación taxonómica. Los géneros y *phyla* más abundantes fueron: *Naganishia*, *Mrakia* y *Phenolieria* y el grupo Basidiomycota, cada uno incluyendo 5 cepas.

Tabla 1. Aislamientos de hongos identificados en este estudio. Taxones, número de cepas, sitio de aislamiento de números de acceso de GenBank, número de pares de bases analizados, porcentaje de cobertura de la consulta e identificación.

Sitio	Especie fúngica	Número de aislado	Número de acceso	#pb	% cover query	% identify	Similitudes "Top blast"
1	<i>Phaffia</i> sp	IOM 325329	MK045387	577	98%	99.0%	<i>Phaffia</i> sp
1	<i>Candida</i> sp	IOM 325330	MK045388	360	90%	98%	<i>Candida argentea</i>
1	<i>Mrakia</i> sp	IOM 325341	MK045399	476	98%	99%	<i>Mrakia aquatica</i>
1	<i>Naganishia</i> sp	IOM 325352	MK045410	539	100%	100%	<i>Naganishia friedmannii</i>
1	<i>Mrakia</i> sp	IOM 325358	MK045416	442	99%	100%	<i>Mrakia</i> sp
1	<i>Epicoccum</i> sp.	IOM 325359	MK045417	481	96%	99%	<i>Epicoccum</i> sp
1	<i>Naganishia</i> sp.	IOM 325360	MK045418	552	100%	100%	<i>N. friedmannii</i>
1	<i>Cladosporium</i> sp	IOM 325361	MK045419	478	98%	98%	<i>Cladosporium</i>
2	<i>Mrakia</i> sp.	IOM 325326	MK045384	576	98%	100%	<i>Mrakia nivalis</i>
2	<i>Naganishia</i> sp	IOM 325327	MK045385	545	100%	100%	<i>Naganishia diffluens</i>
2	<i>Dioszegia</i> sp	IOM 325328	MK045386	419	97%	98.0%	<i>Dioszegia butyracea</i>
2	<i>Basidiomycota</i> sp	IOM 325331	MK045389	546	98%	86%	<i>Leucosporidium scotti</i>
2	<i>Ascomycota</i> sp	IOM 325332	MK045390	491	98%	99%	<i>Candida davisiana</i>
2	<i>Basidiomycota</i> sp	IOM 325333	MK045391	561	97%	86.0%	<i>N. friedmannii</i>
2	<i>Mrakia</i> sp	IOM 325334	MK045392	576	98%	99%	<i>Mrakia frigida</i>
2	<i>Cystofilobasidium</i> sp	IOM 325335	MK045393	553	95%	100%	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>
2	<i>Holtermanniella</i> sp	IOM 325336	MK045394	484	98%	95%	<i>Holtermanniella wattica</i>
2	<i>Rhodotorula</i> sp	IOM 325338	MK045396	512	100%	100%	<i>Rhodotorula mucilaginosa.</i>
2	<i>Goffeuzima</i> sp	IOM 325339	MK045397	539	100%	100%	<i>N. friedmannii</i>
2	<i>Basidiomycota</i> sp	IOM 325343	MK045401	548	82%	82%	<i>Rhodotorula</i> sp

2	Leucosporidium sp	IOM 325344	MK045402	541	99%	99%	<i>Leucosporidium escuderoi</i>
2	Leucosporidium sp	IOM 325345	MK045403	540	99%	99%	<i>L. escuderoi</i>
2	<i>Aurobasidium</i> sp	IOM 325351	MK045409	515	97%	99%	<i>Aureobasidium</i> sp
2	Phenoliferia sp	IOM 325354	MK045412	414	90%	97%	<i>Phenoliferia glacialis</i>
2	<i>Naganishia</i> sp	IOM 325365	MK045421	551	100%	100%	<i>Naganishia antártica</i>
3	Cystofilobasidium sp	IOM 325337	MK045395	558	96%	100%	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum.</i>
3	Protomyces sp	IOM 325340	MK045398	487	99%	99%	<i>Protomyces inouyei</i>
3	Phenoliferia sp	IOM 325342	MK045400	537	98%	100%	<i>P. glacialis</i>
3	<i>Cladosporium</i> sp	IOM 325348	MK045406	474	99%	100%	<i>Cladosporium</i> sp.
3	<i>Basidiomycota</i> sp	IOM 325349	MK045407	582	76%	91%	<i>Glaciozyma martinii</i>
3	<i>Basidiomycota</i> sp	IOM 325350	MK045408	581	67%	95%	<i>Leucosporidium</i> sp
3	Cystofilobasidium sp	IOM 325337	MK045395	558	96%	100%	<i>C. infirmominiatum.</i>
3	Protomyces sp	IOM 325340	MK045398	487	99%	99%	<i>Protomyces inouyei</i>
4	<i>Phenoliferia</i> sp	IOM 325353	MK045411	538	98%	100%	<i>P. glacialis</i>
4	<i>Phenoliferia</i> sp	IOM 325355	MK045413	537	97%	100%	<i>P. glacialis</i>
4	Mrakia sp	IOM 325356	MK045414	269	94%	98%	<i>Glaucozyma watsonii</i>
4	Phaffia sp	IOM 325364	MK045422	578	98%	98%	<i>Phaffia</i> sp
4	Tausonia sp	IOM 325357	MK045415	555	96%	99%	<i>Tausonia pullulan</i>
4	<i>Phenoliferia</i> sp	IOM 325362	MK045420	280	98%	98%	<i>P. glacialis</i>

En negritas, aislados de hongos utilizados para pruebas de tolerancia a metales pesados. Asignación de sitios de aislamiento: 1; Lago del cráter volcánico "Monte de Venus" (4950 msnm), 2; Lago del Cráter volcánico "La Panza" (5065 msnm), 3 Glaciar La Panza" (5010 msnm) y 4; Glaciar "El Pecho" (5200 msnm).

El total de hongos aislados y cultivados identificados se agrupa en los siguientes grupos taxonómicos: *Phaffia* (5.12 %), *Candida* (2.56%), *Mrakia* (12.82%), *Naganishia* (9.96%), *Epicoccum* (5.12%), *Cladosporium* (5.12%), *Dioszegia* (2.56%), *Basidiomycota* (12.82%), *Ascomycota* (2.56%), *Cystofilobasidium* (5.12 %), *Holtermanniella* (2.56%), *Rhodotorula* (2.56%), *Goffeuzima* (5.12%), *Leucosporidium* (5.12%), *Aurobasidium* (2.56%), *Phenoliferia* (12.82%), *Protomyces* (2.56%) y *Tausonia* (2.56%).

En cuanto a la abundancia según el sitio de aislamiento (Figura 2, Tabla 1) el género más abundante del sitio 1, "Monte de Venus" Lago del cráter volcánico, es *Naganishia*, con dos cepas de *N. friedmannii*. En el sitio 2, El Lago del Cráter volcánico, el grupo con mayor abundancia es *Basidiomycota* con 3 cepas seguido por los géneros *Leucosporidium*, *Mrakia* y *Naganishia* con 2 cepas cada uno. En el sitio 3, El Glaciar La Panza, el grupo con mayor abundancia es *Basidiomycota* con dos cepas de este grupo, Por último, en el sitio 4, Glaciar El Pecho, el género más abundante es *Phenoliferia* con

3 cepas de *P. glacialis*. La diversidad fúngica que se identificó y clasificó en 16 géneros y en los phyla Ascomycota y Basidiomycota. Los géneros con menor abundancia entre los basidiomycota fueron: *Dioszegia*, *Holtermanniella*, *Rhodotorula*, y *Tausonia*. Entre los ascomycota *Aurobasidium*, *Candida* y *Protomyces* (Apéndice 1- 7).

7.2. Perfil de resistencia de metales pesados

En las pruebas de resistencia/sensibilidad el orden de toxicidad encontrado en los metales fue: Hg>Cr >Pb (Tabla 2). Para poder calcular cual levadura fue la más tolerante al cromo, al plomo y al mercurio, se calculó el índice de tolerancia (TI) así como la mínima concentración inhibitoria (MIC) de cada metal para cada levadura el cual se presenta en la tabla 2. Dentro de las cepas destacadas por su capacidad de tolerancia a metales pesados esta: *Naganishia* (IOM 325360) con una MIC de 400 μ L y un índice de tolerancia de .70 en las pruebas realizadas con mercurio. Otra cepa que resalta es *Leucosporidium*. (IOM 325344) la cual muestra una mínima concentración inhibitoria de 400 μ L y un IT de .86 en las pruebas realizadas con cromo, siendo esta cepa la más resistente a este metal. En cuanto a las pruebas realizadas con plomo, *Mrakia* sp. (IOM 325356) fue la más resistente, con una MIC de 400 μ L y un índice de tolerancia de .97, lo que nos dice que esta cepa es altamente resistente al medio de cultivo con 250 μ L de plomo. En la tabla 2 podemos observar, con base en el índice de tolerancia, las cepas más con mayor tolerancia.

Así como las que son más sensibles a cada uno de los metales tomando en cuenta las cinco pruebas realizadas (25 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 250 μ L y 450 μ L). De acuerdo con los resultados que nos muestra el índice de tolerancia en las pruebas con cromo, podemos observar que *Leucosporidium* (IOM 325344) fue la cepa con un índice de tolerancia superior a todas las demás cepas probadas con cromo en relación con la cantidad de metal probado, mostrando un IT de .86 en la prueba con 250 μ L. Después de esta cepa, *Phenoliferia* (IOM 325342) mostró un IT de 1 en la prueba con 100 μ L, seguida por *Cándida* sp (IOM 325330 y Basidiomycota sp (IOM 325333) las cuales obtuvieron un índice de tolerancia de .98 y .90 respectivamente en la concentración de 100 μ L, siendo estas 4 cepas las que mostraron mayor tolerancia al cromo.

Tabla 2. Mínima concentración inhibitoria (MIC) e índice de tolerancia (TI) a la concentración más alta de metales pesados para el crecimiento de aislamientos fúngicos en RPMI.

<u>Especies fúngicas</u>	<u>MIC (µg)</u>			<u>TI</u>		
	Cr	Pb	Hg	Cr	Pb	Hg
<i>Naganishia</i> sp.(IOM 325327)	100	250	25	0.69	0.60	0
<i>Phaffia</i> sp.(IOM 325329)	100	50	50	0.07	0.43	0.67
<i>Candida</i> sp. (IOM 325330)	250	50	50	0.98	0.57	0.88
<i>Basidiomycota</i> sp.(IOM 325333)	250	50	100	0.90	0.94	0.39
<i>Cystofilobasidium</i> sp (IOM 325337)	50	50	50	1	0	0.86
<i>Protomyces</i> sp. (IOM 325340)	50	0	250	1	0	0.92
<i>Phenoliferia</i> sp. (IOM 325342)	250	50	50	1	0.81	0
<i>Leucosporidium</i> sp. (IOM 325344)	400	400	50	0.86	0.87	0
<i>Leucosporidium</i> sp. (IOM 325345)	100	400	50	0.91	0.78	0.93
<i>Phenoliferia</i> sp. (IOM 325354)	100	400	50	0.45	0.43	0.29
<i>Phaffia</i> sp.(IOM 325364)	100	400	50	0.84	1	0.28
<i>Tausonia</i> sp.(IOM 325357)	50	400	50	1	1	1
<i>Mrakia</i> sp.(IOM 325356)	50	400	50	1	0.97	0
<i>Naganishia</i> sp. (IOM 325360)	250	400	400	0.17	0.24	0.70

MIC: Concentración a la que no se produjo crecimiento. TI: El resultado del crecimiento máximo del aislado fúngico en densidad óptica dividido por el promedio de los medios RPMI más los aislamientos fúngicos. En negrita los cuatro aislados fúngicos más resistentes, su MIC; y su TI a diferentes concentraciones de metal.

Las cepas *Leucosporidium* (IOM325345), *Phaffia* sp (IOM325364), *Naganishia*, *Phenoliferia* (IOM325354) y *Phaffia* sp (IOM325329) mostraron tolerancia al cromo hasta la segunda prueba (50µL) con un índice de tolerancia de .91, .84, .69, .45 y .07 respectivamente. Lo que nos indica que dentro de las cepas con MIC de 100µL, *Leucosporidium* (IOM325344) fue la cepa con mayor tolerancia al cromo en la prueba con 50µL. Por último, las cepas más sensibles al cromo fueron: *Cystofilobasidium* sp (IOM 325337), *Protomyces* sp (IOM 325340), *Tausonia* sp (IOM 325357) y *Mrakia* sp (IOM 325356) con una mínima concentración inhibitoria de 50µL de cromo, mostraron un índice de tolerancia de 1, lo que nos dice que son significativamente tolerantes a la prueba con 25µL de cromo y son las cepas más sensibles a este metal.

En el caso del plomo, se observó que el 50% de las cepas tuvieron una MIC de 400 mg. Estas fueron; *Phaffia* sp (IOM325364), *Tausonia* sp (IOM 325357), *Mrakia* sp (IOM 325356), *Leucosporidium* sp (IOM325344), *Leucosporidium* sp (IOM325345),

Phenoliferia sp (IOM 325354) y *Naganishia* sp (IOM 325360). Estas 7 cepas fueron capaces de tolerar la prueba con 250 µL de cromo, con un índice de tolerancia de 1, 1, 0.97, 0.87, 0.78, 0.43 y 0.24, respectivamente. Tomando en cuenta que el valor de 1 en este índice nos indica el valor mayor de tolerancia, *Phaffia* sp. (IOM325364) y *Tausonia* sp (IOM 325357), muestran ser las más tolerantes a este metal seguidas por las cepas restantes, en el orden como fueron mencionadas. Seguido a este grupo, *Naganishia* sp. (IOM 325327) tuvo una mínima concentración inhibitoria de 250µL de plomo y un índice de tolerancia de .60. Las cepas restantes, *Basidiomycota* sp (IOM 325333), *Phenoliferia* (IOM325344) *Candida* sp., *Phaffia* sp. (IOM325329), *Cystofilobasidium* sp (IOM 325337) y *Protomyces* sp (IOM 325340) mostraron una mínima concentración inhibitoria de 50µL de plomo y un índice de tolerancia en 25µL de .94, .81, .57, .43, 0 y 0 lo que indica, en orden ascendente, ser las 6 cepas más sensibles a plomo.

Ahora, como se observa en la tabla 2, el mercurio fue el metal que menos toleraron la mayoría de las levaduras probadas. Sólo *Naganishia* (IOM 325360) pudo tolerar la cuarta prueba realizada en orden ascendente, 250µL, con un índice de tolerancia de .70. Seguida a esta cepa, *Protomyces* sp (IOM 325340) presentó una MIC de 250 µL con un índice de tolerancia de .92. La tercera cepa más tolerante a este metal fue la cepa del grupo *Basidiomycota* sp. (IOM 325333) la cual mostró una mínima concentración inhibitoria de 100µL con un valor de .39 en el índice de tolerancia. *Tausonia* sp (IOM 325357), *Leucosporidium* sp (IOM 325345), *Candida* sp (IOM 325330), *Cystofilobasidium* sp (IOM 325337) , *Phaffia* sp (IOM 325329), *Phenoliferia* sp (IOM 325354) , *Phaffia* sp (IOM 325364), *Phenoliferia* sp (IOM 325342) , *Mrakia* sp (IOM 325356) y *Leucosporidium* (IOM 325344) mostraron una mínima concentración inhibitoria de 50 microgramos, con un índice de tolerancia de 1, .93, .88, .86, .67, .29, .28, 0, 0 y 0, respectivamente en la concentración de 25 microgramos. Por último, la cepa más sensible al mercurio fue *Naganishia* sp (IOM 325327) la cual no mostró crecimiento en ninguna de las concentraciones probadas.

8. Discusión

El Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl Zoquiapan, ubicado en la Sierra Nevada y en la parte de esta conocida como Sierra de Río Frío, representa, a pesar del deterioro creciente de sus recursos, un alto porcentaje de la biodiversidad endémica del Eje Volcánico Trans mexicano, cuya variedad y riqueza de especies son características de la provincia que delimita la zona de transición entre la flora y la fauna Neártica y Neotropical (Hernandez-García, 2006). Existe una gran diversidad de microorganismos fúngicos que logran desarrollarse en el Iztaccíhuatl a pesar de ser un ambiente extremo. En las últimas dos décadas, se han descrito o reemplazado una gran cantidad de microorganismos psicrófilos y levaduras psicotolerantes debido a cambios taxonómicos recientes en levaduras ascomicetos y basidiomicetos (Buzzini *et al.*, 2017). Estos cambios taxonómicos se han visto reflejados en la filogenia fúngica y en los métodos de reconstrucción filogenética usados actualmente. Los cuales se basan en el análisis de marcadores moleculares (secuencias de AND) y caracteres morfológicos. Infiriendo el ancestro común y las divergencias evolutivas dentro de un clado (Germes *et al.*, 2018).

Los árboles filogenéticos, son representaciones, donde a partir de un análisis cuidadoso es posible establecer el parecido entre dos o más secuencias cuyo resultado puede ser expresado en porcentaje de identidad o similitud entre los organismos del estudio. Con esto logramos esclarecer que tan cercana es la relación evolutiva entre las especies y así poder categorizar y nombrar a las especies (Germes *et al.*, 2018). En el presente estudio, la inferencia filogenética fue un elemento esencial ya que a partir del análisis realizado, las cepas fueron clasificadas y emparentadas con las cepas más próximas según sus secuencias moleculares.

En las regiones polares, subpolares y no polares, se ha identificado la comunidad de levaduras mediante estos métodos. Se ha demostrado que está compuesta principalmente por hongos basidiomicetos. Los dos géneros más representados en sitios polares y subpolares son: *Cryptococcus* y sus parientes: *Naganishia spp.*, *Filobasidium spp.*, *Goffeauzyma spp.*, *Papiliotrema spp.* *Solicoccozyma spp.* Y *Vishniacozyma spp.* (Clase Tremellomycetes) y *Rhodotorula spp.* y sus parientes (especies de *Cystobasidium spp.*, *Bannozyma spp.* y *Phenoliferia*) de la clase *Cystobasidiomycetes*. Seguido de

Dioszegia spp., *Glaciozyma* spp., *Leucosporidium* spp. y *Mrakia* spp., y al final de la lista, las levaduras negras: *Elasticomyces* spp., *Recurvomyces mirabilis* y *Cryomyces* spp., que son modelos eucarióticos para la especulación en exobiológica (Buzzini *et al.*, 2017; Buzzini *et al.*, 2018). Los aislados mencionados identificados en sitios polares y subpolares concuerdan con la presente investigación, los géneros *Naganishia*, *Phenoliferia* y *Mrakia* estuvieron presentes siendo parte de los géneros más abundantes, los géneros *Glaciozyma* y *Leucosporidium* también fueron identificados. La Clase Tremellomycetes predominó y se identificaron cepas dentro de la clase Cystobasidiomycetes (*Cystofilobasidium* sp.).

En las regiones no polares, se han descrito los géneros *Holtermanniella* y *Saitozyma* (Sannino *et al.*, 2017). De igual forma, en concordancia a las especies mencionadas, Fernández, 2017, identificó 31 muestras recolectadas en la Antártica, pertenecientes a los géneros; *Candida*, *Cistobasidium*, *Fellomyces*, *Guehomyces*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Nadsonia*, *Phenolifera* y *Pichia*. Estas identificaciones concuerdan con los géneros presentes en este estudio, los cuales fueron *Naganishia*, *Phenoliferia*, *Mrakia* y cepas clasificadas en el grupo de Basidiomycota los cuales fueron los más abundantes representando el 51.28% del total de las cepas identificadas.

Estos microorganismos unicelulares habitan en frío extremo y deben adaptarse a una amplia gama de temperaturas, baja disponibilidad de nutrientes, debido a la alta irradiación solar (UV e infrarroja), baja actividad de agua, desecación y en algunos sitios a la disminución de las concentraciones de oxígeno, debido a los fuertes vientos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2003). En estas condiciones se desarrollan las levaduras, las cuales para sobrevivir, reproducirse y dispersarse presentan adaptaciones genéticas, metabólicas, morfológicas y fisiológicas favorables para existir en condiciones difíciles (Gomes *et al.*, 2018). En un estudio de Buzzini *et al.*, (2012), se mencionan las habilidades biológicas, entre ellas, el aumento en la fluidez de la célula al aumentar la composición de los ácidos grasos de la membrana, la síntesis de proteínas como proteínas de choque frío y térmico, la reducción de cristales de hielo por síntesis de trehalosa y otras macromoléculas como glicoproteínas de unión al hielo extracelular,

reducción de las tasas de crecimiento y aumento de la biomasa y síntesis de enzimas activas en frío. (Buzzini *et al.*, 2012).

Todas estas adaptaciones podrían ser compuestos biotecnológicos útiles en la industria, la agricultura y el sector médico. Rosa *et al.*, (2019), han propuesto el uso de compuestos como antibióticos, pesticidas, antioxidantes, pigmentos fotoprotectores y proteínas *anticongelantes* (Buzzini *et al.*, 2018; Zajc *et al.*, 2019). Entre dichas adaptaciones se encuentran las que les ayudan a tolerar los metales pesados como Cr, Hg y Pb. En esta investigación se demostró que las levaduras psicrófilas probadas con dichos metales, resultan resistentes en mayor o menor medida, únicamente la cepa *Naganishia* sp. (IOM 325327) no mostró tolerancia a las pruebas con mercurio pero si fue resistente a los otros 2 metales mencionados. Las 13 levaduras restantes fueron resistentes a los 3 metales siendo plomo el más tolerado, después el cromo y por último el mercurio. Esto comprueba que las levaduras psicrófilas presentan adaptaciones que les permiten degradar estos metales pesados en medios contaminados.

El cromo se encuentra en el ambiente de forma hexavalente, esta forma es la más soluble, tóxica y de mayor interés ambiental. Se ha demostrado que el Cr₆ causa estrés oxidativo, daño al ADN y perturbación de la expresión genética de las especies asociadas acuáticas (Roling *et al.*, 2006). En el presente estudio, uno de los metales probados fue cromo hexavalente en forma de CrCl₃. En el estudio de Fernandez *et al.*, 2017, Se encontró que las cepas de *Leucosporidium* y *Mrakia* mostraron niveles altos de tolerancia en la concentración de 1mM de CrCl₃, en cuanto a *Phenolifera*, obtuvieron un crecimiento moderado en las pruebas al igual que en el género *Cándida*. El estudio mencionado concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, principalmente con el género *Leucosporidium* ya que *Leucosporidium* sp.(IOM 325344) fue la cepa con mayor tolerancia a este metal. Fernández *et al.*, 2017 describieron que estos géneros de levaduras, sobre todo *Leucosporidium* y *Mrakia*, resultan prometedoras para el uso en el tratamiento de baja temperatura de efluentes que contienen altos niveles de iones metálicos.

A diferencia de los contaminantes de origen orgánico, los metales pesados no se degradan y de esta forma crean un desafío diferente para la remediación. La contaminación medioambiental a causa del mercurio surge de varias actividades antropogénicas, entre ellas, la actividad industrial, la minería, procesos metálicos y derivados del petróleo, uso de fungicidas mercuriales, entre otras (Barkay et al., 2003). Estas actividades han aumentado el nivel de mercurio en la atmósfera por lo que es importante eliminar estos contaminantes (Barkay et al., 2003). En el estudio de Amin A-Latif Z, (2013) , se reportó a *Candida xylopsi* altamente resistente al mercurio ($HgCl_2$) esto se determinó mediante una prueba cualitativa resultando en una coloración oscura por parte de la cepa cultivada en la placa con agar.

En la investigación de Rehman et al., (2010), se demostró que *Candida tropicalis* es resistente a Cd hasta la concentración de 2.800 mg/L y el orden de resistencia con respecto a la tolerancia a distintos metales probados fue; $Zn^{+2} > Ni > Hg > Cu^{+2} > Cr > Pb$. En la misma investigación de Amin A-Latif Z, (2013) , *Candida xylopsi* bioacumula 18 $\mu g/ml$ de mercurio en 36 horas desde el medio de cultivo sintético pero su potencial aumenta cuando se atrapa en alginato de sodio. La resistencia al mercurio ha sido previamente informada en muchas *Candida* spp, Amin A-Latif Z, (2013), sugiere que las células de levadura atrapadas en alginato de sodio tienen más potencial de remediación en comparación con las células libres. Esto puede deberse a la naturaleza polimérica del alginato, que captura metales de forma no específicamente específica para transportar en las celdas. En este proyecto, la cepa de *Candida* probada para medir la tolerancia al mercurio, mostro una mínima concentración inhibitoria de 50 μl y un índice de tolerancia de .88 lo que la posicionó como la sexta cepa más tolerante a este metal.

Se sabe que algunos hongos pertenecientes a los géneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Stemphylium* y *Mucor* pueden reducir y volatilizar el mercurio a bajas temperaturas (Hoque y Fritscher 2016). Sin embargo, en nuestro estudio todos los hongos fueron muy sensibles a mercurio a excepción de *Naganishia* sp (IOM 325360), *Protomyces* (IOM325340) y la cepa *Basidiomycota* sp (IOM 325333). En cuanto a los otros dos metales probados, estos hongos presentan una interesante tolerancia a Cr (III) y Pb (II).

Los géneros mencionados en el estudio de Hoque y Fritscher (2016) no forman parte de los géneros presentes en este estudio, pero pueden funcionar como referencia ya que, en este estudio, se obtuvieron resultados similares. En el estudio de El Khateeb *et al.*, (2012), se aislaron cepas del género *Stemphyllum* de aguas contaminadas por metales pesados, entre ellos plomo. En el trabajo presentado por Shao y Sun (2007), *Cladosporium cladosporioides* no mostró crecimiento en 1 mM Hg (II) y solo crecimiento débil con Pb (III) 1 mM a diferencia del estudio de Calvillo-Medina *et al.*, (2020), donde una cepa de *Cladosporium sp* mostró crecimiento en plomo (IV) de 10 mM y fue una de los más tolerantes a Cromo (20 mM). En el mismo estudio la MIC encontrada para Pb de *Penicillium sp.* fue de 24 mM. En comparación con el estudio anterior, *Penicillium* fue de los más tolerantes al plomo, con una MIC de Pb 20 mM. Sun y Shao (2007), propusieron que estos microorganismos eran capaces de acumular una gran cantidad de gránulos de plomo intracelularmente y en la capa externa de la pared celular. Yan y Viraraghavan (2003), demostraron el potencial de *Mucor* como biorremediador de cromo, mercurio y plomo.

De la misma manera, los aislados de *Alternaria* y *Arthrimum*, mostraron un crecimiento muy sensible a 7.5 mM de cromo y plomo. (Yan y Viraraghavan, 2003). *Curvularia lunata* ha sido documentado como biorremediador ya que su crecimiento no se vio afectado por la presencia de cadmio, zinc y plomo (15 mM) (Paraszkiewicz *et al.*, 2007). En concordancia a las similitudes que existen entre los estudios mencionados, el plomo fue el metal mayormente tolerado. *Leucosporidium* (IOM 325344) fue la cepa más resistente en el estudio con una CMI de 400µl en plomo al igual que en cromo y en mercurio de 50 µl. Seguida a esta cepa, *Naganishia sp.* (IOM 325360) mostró una MIC de 250µl en cromo y 400µl tanto en plomo como en mercurio, siendo la única cepa que toleró el medio con 250 µl de mercurio. Los resultados obtenidos coinciden con la literatura citada cuando hablamos de cromo y plomo, en el caso del mercurio, los resultados de las cepas más tolerantes no se han estudiado anteriormente.

9. Conclusión

Existe poca información acerca de las levaduras psicrófilas que habitan en los glaciares mexicanos, dentro de los organismos aislados, pueden estar representados géneros o especies nuevas, pero aún falta más información para poder describirlos. Se han realizado bastantes estudios acerca de las características con potencial biotecnológico, médico y ambiental de los microorganismos extremófilos. El hecho de que estas levaduras puedan tolerar la presencia de cromo, plomo y mercurio representa una herramienta interesante para la biorremediación de suelos y aguas contaminadas por desechos industriales. Es importante continuar con esta área de investigación ya que se pueden crear soluciones ambientales a partir de estos microorganismos con metabolismo extremófilo. Los glaciares representan uno de los tantos ecosistemas que se ven afectados por el calentamiento global, lo que repercute en el estudio de sus microambientes y de su ecología. El poder estudiar, conocer y comprender estos sitios únicos en el planeta es una oportunidad que no debemos perder.

10. Referencias

Aberer J.A., Kobert K., Stamatakis A (2014) ExaBayes: Massively parallel bayesian tree inference for the whole-genome. *Molecular Biology and Evolution*; (31): 2553-2556.

Alexandre M. Anesio J., Laybourn-Parry J (2012) Glaciers and ice sheets as a biome. *Trends in Ecology & Evolution*; (27)(4):219-225.

Alpala-Aguilar R. L (2016). Evolución del glaciar del volcán Nevado del Huila a través del tratamiento de imágenes satelitales (1987-2016).

Antranikian G., Vorgias C. E., Bertoldo C (2005) Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. (96): 219-262.

Alonso J., García M.A., Pérez-López M. y Melgar M.J (2004) Acumulación de metales pesados en macromicetos comestibles y factores que influyen en su captación. *Revista de Toxicología, España*; (21): 11-15.

Alves I.M.S., Gonçalves V. N., Oliveira F. S., Schaefer C. E. G. R., Rosa C. A., Rosa L. H (2019) The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. *Extremophiles*; (23): 327-336.

Amin A., Latif Z (2013) Detoxification of mercury pollutant by immobilized yeast strain *Candida xylopsi*. *Pak J Bot*; (45):1437-42.

Barkay T., Miller S.M., Summers A.O (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*; (27): 355-384.

Berdicevsky I., Lea D., Marzbach D., Yannai, S (1993) Susceptibility of different yeast species to environmental toxic metals. *Environmental Pollution*; (80): 41-44

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

Barba-Escoto L, Ponce-Mendoza A, García A, Calvillo-Medina RP (2019) Plant community strategies responses to recent eruptions of Popocatepetl volcano Mexico. *J Veg Sci*.

Buzzini P., Branda E., Goretti, M., Turchetti B (2012) Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*; (82)(2): 217-21.

Buzzini P., Turk M., Perini L., Turchetti B., Gunde-Cimerman N (2017) Yeasts in Polar and Subpolar Habitats. In: Buzzini P., Lachance MA., Yurkov A. (eds) Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity. Springer, Cham.

Buzzini P., Branda E., Goretti M., Turchetti B (2012) Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: Diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. FEMS Microbiology Ecology; (82): 217-241.

Buzzini, P., Turchetti, B., Yurkov, A (2018) Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? Yeast. (35): 487–497.

Canganella F., Wiegel, J (2011) Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. Naturwissenschaften; (98)(4): 253-279.

Cárdenas J., Zárate M., Acosta I (2010) Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes ríos de la Huasteca Potosina. Laboratorio de Micología Experimental, CIEP. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luís Potosí. Tlatemoani: revista académica de investigación, ISSN-e N. (1):1989-9300.

Cavicchioli T., Charlton H., Ertan S., Mohd Omar K. S., Siddiqui T., Williams J (2011) Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. Microbial Biotechnology; (4): 449 - 460.

Calvillo-Medina R.P., Gunde-Cimerman N., Escudero-Leyva E. *et al.* (2020) Richness and metallo-tolerance of cultivable fungi recovered from three high altitude glaciers from Citlaltépetl and Iztaccíhuatl volcanoes (Mexico). Extremophiles; (24): 625–636.

Cavicchioli R., Siddiquia, A., Andrews, D., Sowers, K.R (2002) Low-temperature extremophiles and their applications. Current Opinion in Biotechnology; (13)(3): 253-261.

Clarke S.E., Stuart J., Sanders-Loehr J (1987) Induction of Siderophore Activity in *Anabaena* spp. and its Moderation of Copper Toxicity. Applied and Environmental Microbiology; (53)(5): 917-922.

Cicczazo S., Esposito A., Borruso L., Brusetti L (2016) Microbial communities and primary succession in high altitude mountain environments. Annals of Microbiology; (66):43–60.

De Garcia V; Giraudo M.R. (2014) Habitantes microscópicos de los glaciares; Universidad Nacional del Comahue; Desde la Patagonia Difundiendo Saberes; (11): 10-15.

Delgado-Granados H (2007) Climate Change Vs. Volcanic Activity: Forcing Mexican Glaciers to Extinguish and Related Hazards, Proceeding the First International Conference on the Impact of Climate Change on High- Mountain Systems, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, Bogotá, Colombia;153-168.

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

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

Deming JW (2002) Psychrophiles and polar regions. Current Opinion Microbiology; (5): 301–309.

De Souza M.J., Shanta Nair P. A., Bharathi L., Chandramohan D (2006) Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. Ecotoxicology; (15):379–384.

Díaz M.P. Moctezuma M.G., Acosta I (2002) Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros y su capacidad de remoción de metales pesados y Flúor en solución. FEMISCA; 473-474.

Espejo R., Romero P (1987) Growth of Thiobacillus ferrooxidans on elemental sulfur. Applied Environmental Microbiology; (53) (8):1907-1912.

Ezzouhri L., E. 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): 035-048.

Espinosa D., Luna I (2007) Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana, México, D. F; CONABIO-UNAM; 5.

Ferrer M., Golyshina O., Beloqui A., Golys-hin P. N (2007) Mining enzymes from extreme environments. Current Opinion in Microbiology; (10)(3): 207-214.

Ferrusquía-Villafranca I (2007) Ensayo sobre la caracterización y significación biológica. Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana; 7 - 24.

Fernández P. M., Martorell M. M., Blaser M. G., Ruberto L. A. M., de Figueroa L. I. C., Mac Cormack W. P (2017) Phenol degradation and heavy metal tolerance of Antarctic yeasts. Extremophiles; (21)(3), 445–457.

Galtier N, Gouy M., Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny: Bioinformatics;(12):543-548.

Galán H., Romero E., Antonio, B (2008) Contaminación de Suelos por Metales Pesados. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola. Facultad de Química. Apartado 553. Universidad de Sevilla., Sevilla; 41071.

Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J. C., Diderichsen, B., Plemenita, A (2003) Extremophilic fungi in arctic ice: A relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physical Chemical Earth*; (2):1273–1278.

Hernández-García, M. A., Granados-Sánchez, D (2006) El Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl-Zoquiapan y El Impacto Ecológico-Social De Su Deterioro. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*; (12)(2): 101-109.

Ghasemi, E., Kaykhali, M (2017) Determination of Zinc, Copper, and Mercury in Water Samples by Using Novel Micro Cloud Point Extraction and UV-Vis Spectrophotometry. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*; (12)(4): 313-324.

Fernández-Lozano J, Carrasco-González R.M., de Pedraza-Gilsanz J., García-Talegón J (2017) Nuevas perspectivas para la identificación y el conocimiento de la morfología glaciaria de la Sierra del Teleno (León) y su transformación antrópica. *Sociedad Geológica de España, GEOGACETA*; (62).

Gilbert J.A. et al. (2005) A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium. *FEMS Microbiological Letter*; (245): 67–72.

Gadd G.M (2000) Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology*; (11): 271-279.

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

Gomes E. C. Q., Godinho V. M., Silva D. A. S., de Paula M. T. R., Vitoreli G. A., Zani C. L. *et al* (2018) Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*; (22): 381–393.

Gostinčar C., Grube, M., De Hoog, S., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N (2009) Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *FEMS Microbiology Ecology*; (71):2-11.

Hernández-García M. A., Granados-Sánchez D (2006) El Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl-Zoquiapan y El Impacto Ecológico-Social De Su Deterioro. *Revista Chapingo; Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, Universidad Autónoma Chapingo Chapingo, México. (2)(2): 101-109.*

Hodson A., Hood E. *et al* (2009) Glaciers as a source of ancient and labile organic matter to the marine environment. *Nature*: (462): 1044–1047.

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

Hood E. *et al.*, (2009) Glaciers as a source of ancient and labile organic matter to the marine environment. *Nature*; (462): 1044–1047.

Jia B., Cheong, G. W., Zhang S (2013) Multifunctional enzymes in archaea: promiscuity and moonlight. *Extremophiles*; (17)(2): 193-203.

Kratochvil D. and Volesky B (1998) Advances in the biosorption of Heavy metals. *TIBTECH*; (16): 291-300.

El-Khateeb MA, Arafa AM, El-dayem AMA, Wafra RA (2012) Effect of sewage water irrigation on macro nutrients, heavy metals and frequency percentage of fungi in soil cultivated with woody trees. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants*; (4):177–185.

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*; (23)(21): 2947–2948.

Lovley, D.R (2000) *Environmental Microbe-Metal Interactions*. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Margesin R., Feller G (2010) Biotechnological applications of psychrophiles; 835-844.

Pinzón M, Castro K, Rodríguez Sandoval A (2010) Producción de la casa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*; (7)(2).

Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*; 25(7):1253-1256.

Meier M.F (1973) Hydraulics and hydrology of glaciers, the role of snow and ice in hydrology. *IAHS Pub*; (107):353–369. 8

Metz J.G (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*; (293): 290–293.

Mendoza E., Sosa L., Gutiérrez F., Obregón A., Mendoza D., Lappe P., Ulloa M (1994) *Cryptococcus albidus* aislada de zonas mineras de Guanajuato como resistente a plata es capaz de acumular este metal. *Memorias del V Congreso Nacional de Micología*; 156.

Margesin R., Neuner G. and Storey K.B (2007) Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*; (94): 77–99.

Miranda-Tello E., Fardeau M. L., Thomas P., Ramirez F., Casalot L., Cayol J. L., Ollivier B (2004) *Petrotoga mexicana* sp. nov. a novel thermo-philic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; (54)(1): 169-174.

Miteva V (2007) Bacteria in snow and glacier ice. In: Margesin R, Schinner F, MJ C, Gerday C (eds) Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer, Berlin; 31–50.

Madigan M. T., Mairs B. L (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current opinion in microbiology*; (2)(3):265-269.

Moreno Ayala L.V (2017) Caracterización de cepas bacterianas de la laguna amarilla perteneciente al nevado El Altar en la provincia de Chimborazo. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; Riobamba.

Mohammadian E., Babai-Ahari A., Arzanlou M (2017) Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanzan Province. *Iran Chemosphere*; (185):290–296.

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

Margesin R, Miteva V (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Microbiological Research*; (162): 346–361

Möller E.M., Bahnweg G, Sandermann H., Geiger H (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., Kochkina G., Ivanushkina N (2010) Fungi in permafrost. In: Margesin R (ed.). *Permafrost Soils*; (16): 85–96.

Nixon GT. (1989) La geología del volcán Iztaccíhuatl y las áreas adyacentes de Sierra Nevada y Valle de México. Sociedad de Geología de América, Universidad de la Columbia Británica, Vancouver Canada; (6): 219:58.

Oliart-Ros R.M., Manresa-Presas Á., Sánchez-Otero M.G (2016) Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *Ciencia UAT*; (11): 79-90.

Orrantía E., Arévalo S., Pereyra B. (1995) Aislamiento de cepas de *Tiobacillus ferrooxidans* resistentes a altas concentraciones de arsénico. *Memorias del XXVI Congreso Nacional de Microbiología*; M-68.

Perini L, Gostinčar G, Williamson A., et al (2019) Darkening of the Greenland ice sheet: fungal abundance and diversity are associated with algal bloom. *Frontiers in Microbiology*; (10):1–14.

Podgorskii V.S., Kasatkina T.P., Lozovaia O.G (2004) Yeasts biosorbents of heavy metals. *Mikrobiol. Z;*(1): 91-103.

Paraszkievicz K, Frycie A, Słaba M, Długoński J (2007) Enhancement of emulsifier production by *Curvularia lunata* in cadmium, zinc and lead presence. *Biometals;* (20):797–805.

Ramírez D.N , Serrano J.A., Sandoval H (2006) Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal;* (37):3.

Reed C. J., Lewis H., Trejo E., Winston V., Evilia C. (2013) Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea;* 1-14.

Rehman A., Sohail Anjum M (2010) Cadmium Uptake by Yeast, *Candida tropicalis*, Isolated from Industrial Effluents and Its Potential Use in Wastewater Clean-Up Operations. *Water Air Soil Pollution;* (205): 149.

Rothschild L. J., Mancinelli R. L (2001) Life in extreme environments. *Nature;* (409)(6823): 1092-1101.

Robles G. A (1996) Aislamiento de hongos contaminantes en ausencia y presencia de plomo a partir de aguas y lodos del Tanque Tenorio. Tesis Licenciatura. Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas; UASLP.

Rambaut A (2006–2014) FigTree Tree Figure Drawing Tool, Version 1.4.2.

Roling J.A., Bain L.J., Gardea-Torresdey J., Bader J., Baldwin W.S (2006) Hexavalent chromium reduces larvae growth and alters gene expression in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry;* (25): 2725-2733.

Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M, Raimondi S, Ponzoni C, Pagnoni UM, Matteuzzi D (2009) Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiological Ecology;* (69):363–372.

Santiago I., Maria T., Alves D.A., Rabello A (2014) Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles;* (16):95–103.

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

Shazia I., Iftikhar A., Barira S.Y., Kulsoon A., Munawar R., Bdar-Uz Z (2009) Fungal tolerance to heavy metals. *Pak. J. Bot;* (41)(5): 2583-2594.

Congeevarama S., Dhanarania S., Parkb J., Dexilina M., Thamaraiselvia K (2007) Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials*; (146):270-277.

Shao Z, Sun F (2007) Intracellular sequestration of manganese and phosphorus in a metal-resistant fungus *Cladosporium cladosporioides* from deep-sea sediment. *Extremophiles*; (11):435–443.

Sannino C., Tasselli G., Filippucci S., Turchetti B., Buzzini P (2017) Yeasts in nonpolar cold habitats in *Yeasts in natural ecosystems: Diversity* (eds); Buzzini P., Lachance M.A., Yurkov A., Berlin.

Valls M., de Lorenzo (2002) Exploiting the genetic and the biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*; (26):327-338.

Volesky B, Holand Z. R (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*; (11): 235-250.

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

Zajc J., Zalar P., Gunde-Cimerman N (2017) Yeasts in hypersaline habitats in *Yeasts in natural ecosystems: Diversity* (eds); Buzzini P, Lachance M. A., Yurkov A; Berlin.

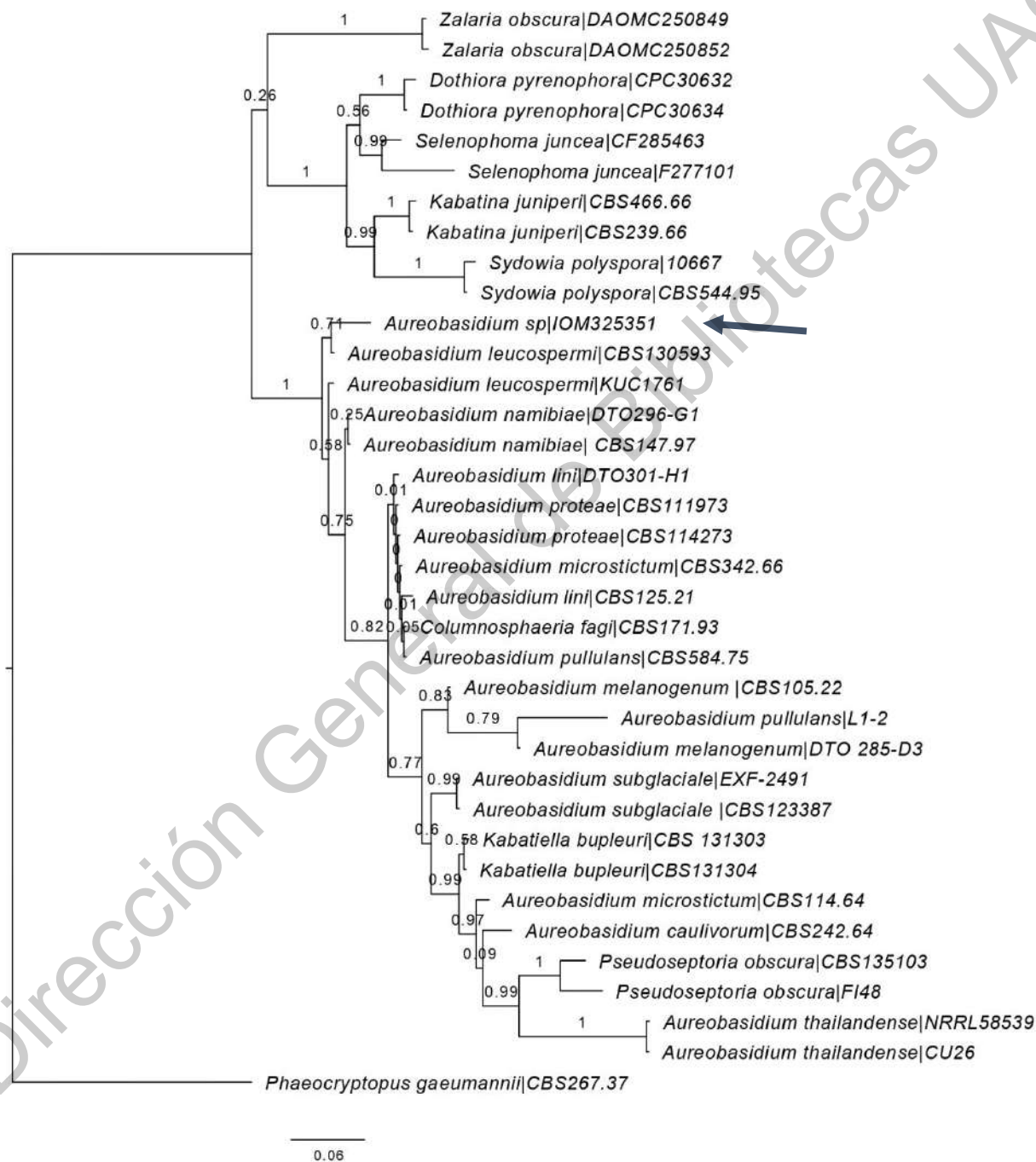
Zajc J., Gostinčar C., Černoša A., Gunde-Cimerman N (2019) Stress-tolerant yeasts: Opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. *Genes (Basel)*; (10):1.

Orberá R. T (2004) Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés botecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*; (21):15-19.

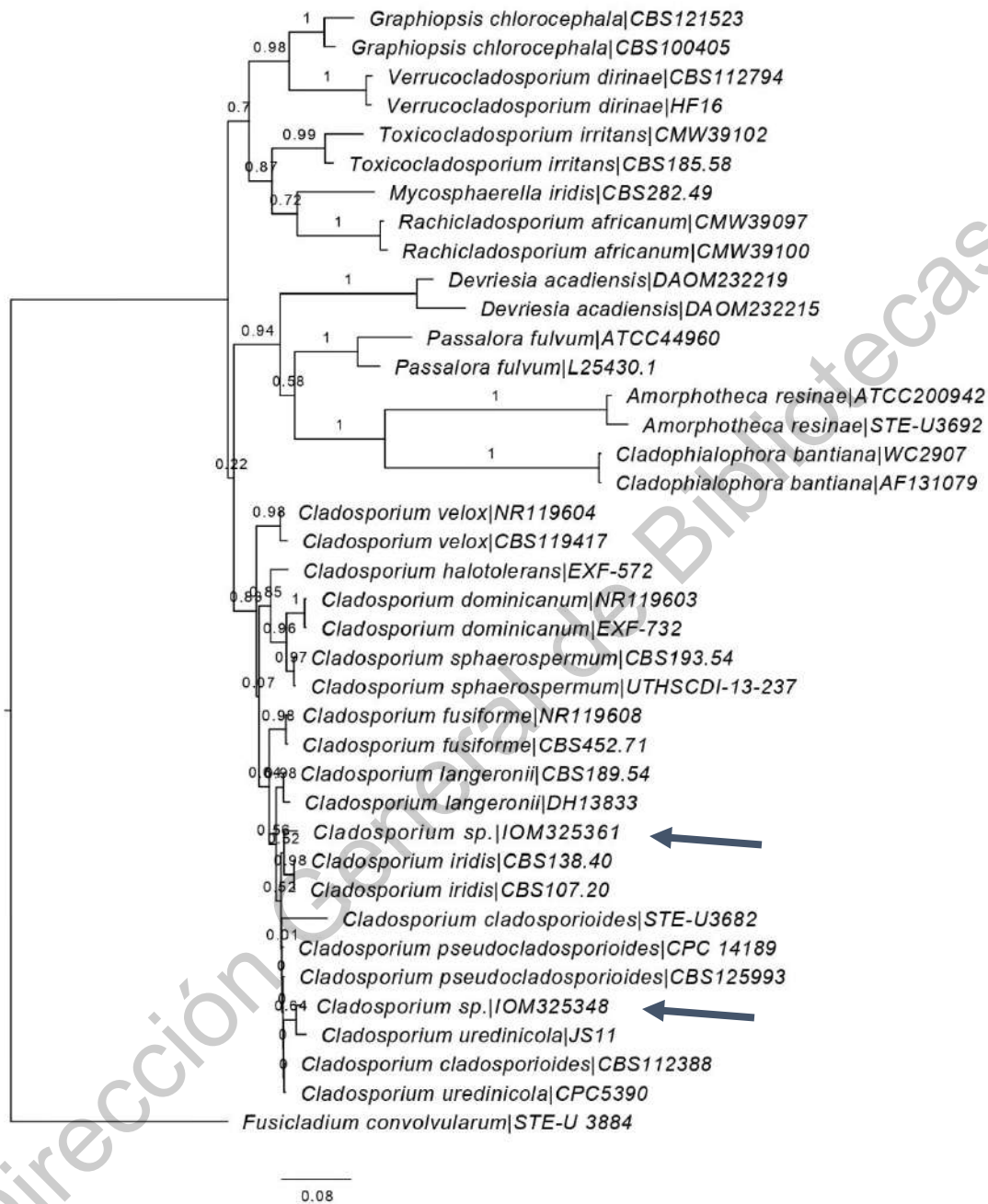
Zafar S., Aquil F., Ahmad I (2007) Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technologies*; (98): 2557-2561.

11. Apéndices

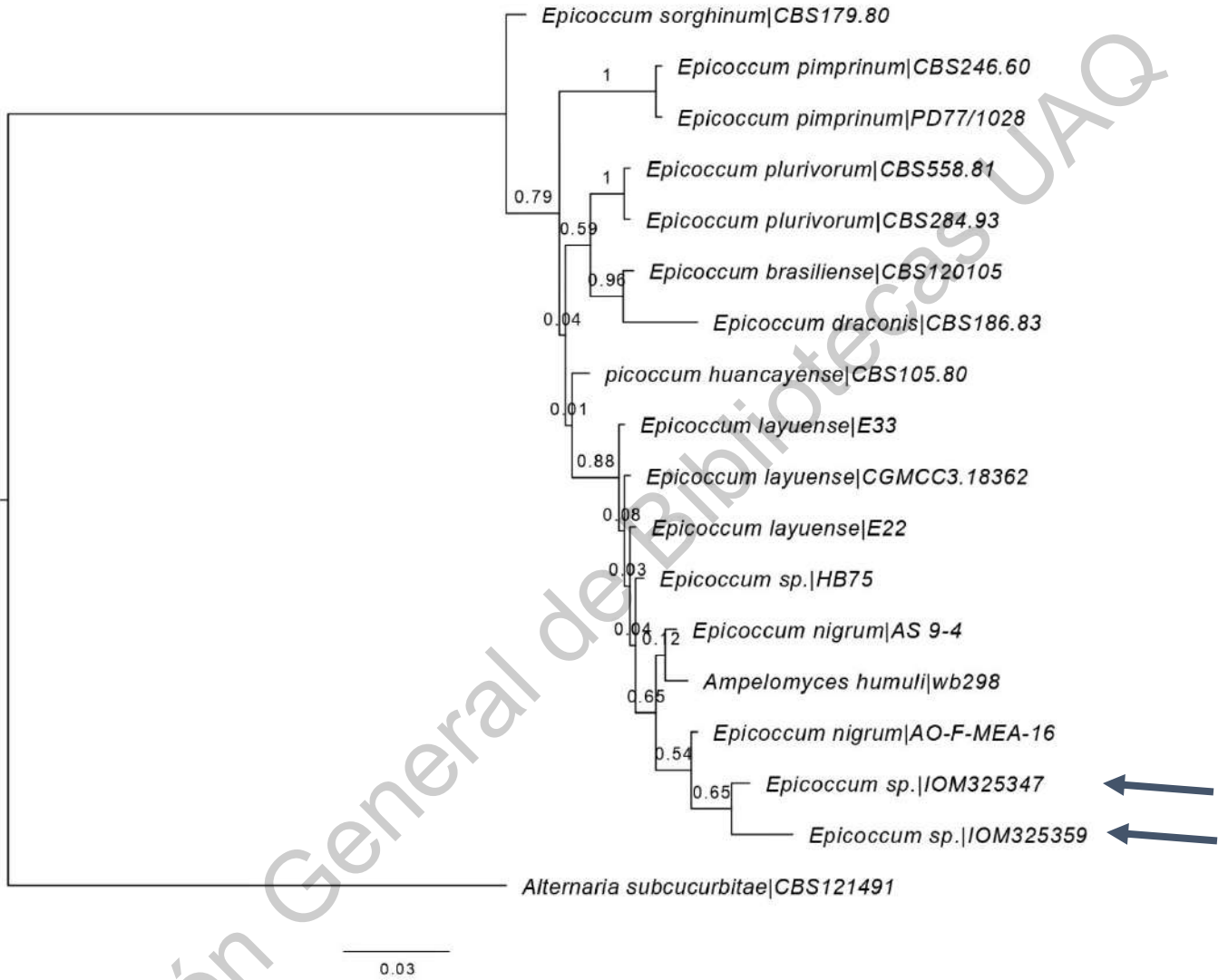
Apéndice 1. Árbol filogenético del género *Aureobasidium*. Se observa la relación filogenética entre especies de hongos psicrófilos del género *Aureobasidium* mediante el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS).



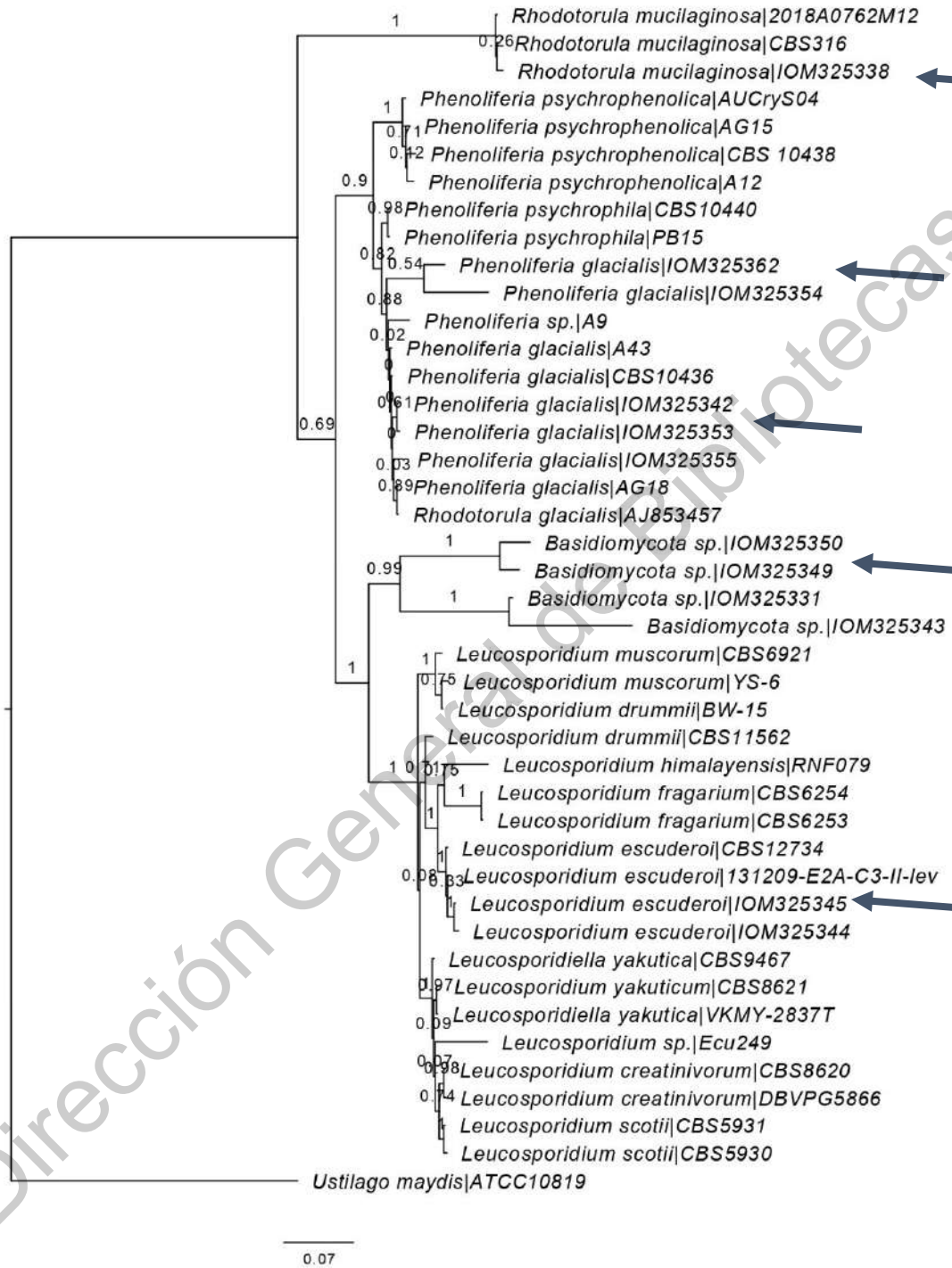
Apéndice 2. Árbol filogenético del género *Cladosporium*. Se observa la relación filogenética entre especies de hongos psicrófilos del género *Cladosporium* mediante el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS).



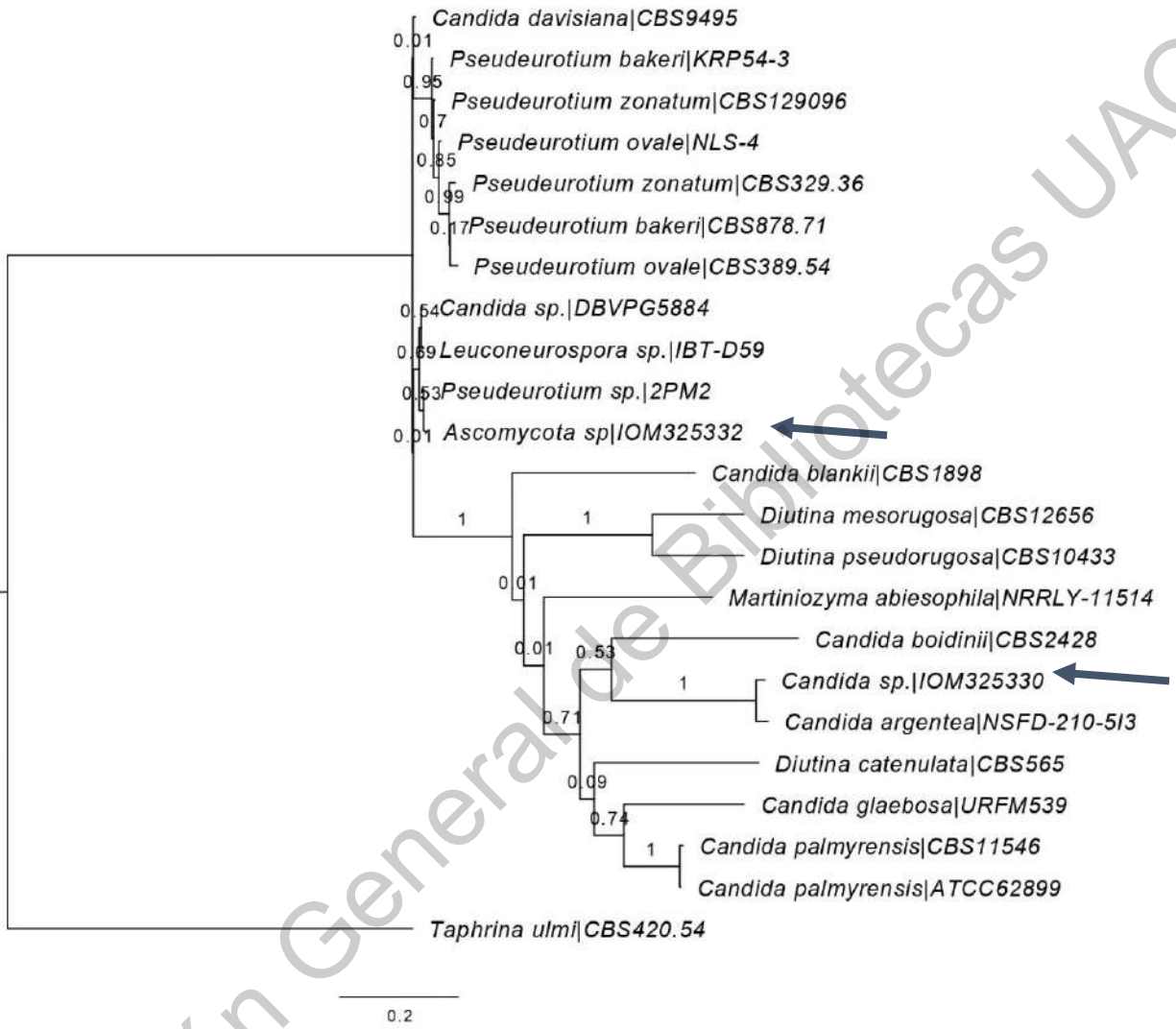
Apéndice 3. Árbol filogenético de la familia *Didymellaceae*. Se observa la relación filogenética entre especies de hongos psicrófilos de la familia *Didymellaceae* mediante el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS).



Apéndice 4. Árbol filogenético de la clase *Microbotryomycetes*. Se observa la relación filogenética entre especies de hongos psicrófilos de la clase *Microbotryomycetes* mediante el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS).



Apéndice 5. Árbol filogenético de la clase *Saccharomycetes*. Se observa la relación filogenética entre especies de hongos psicrófilos de la clase *Saccharomycetes* mediante el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS).



Apéndice 6. Árbol filogenético del orden *Taphirales*. Se observa la relación filogenética entre especies de hongos psicrófilos del orden *Taphirales* mediante el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS).



Apéndice 7. Árbol filogenético de la clase *Tremellomycetes*. Se observa la relación filogenética entre especies de hongos psicrófilos de la clase *Tremellomycetes* mediante el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS).

