

## ***Aspergillus niger* Tiegh., isolated in Sonora, Mexico: metal tolerance evaluation**

## ***Aspergillus niger* Tiegh., aislado en Sonora, México: evaluación de tolerancia a metales**

Ana G. Villalba-Villalba<sup>1\*</sup>; Martín E. Cruz-Campas<sup>2</sup>; Grecia V. Azuara-Gómez<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Universidad Estatal de Sonora Ingeniería Ambiental. Ley Federal del Trabajo s/n, col. Apolo. C. P. 83100. Hermosillo, Sonora, México.

\*Corresponding author: villalba13@gmail.com, tel.: 662 259 2108, ext. 2211

### **Abstract**

**Introduction:** Metal contamination represents a significant risk to ecosystems; it is therefore necessary to reduce the bioavailability, mobility and toxicity of these elements.

**Objective:** To isolate a filamentous fungus with the ability to tolerate metals.

**Materials and methods:** The fungus was isolated from soil with mining activity. The tolerance index and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the fungus were determined at 1, 5, 10, 15 and 20 mM of the Cd, Hg, Pb, Ag, Cu, Zn and Cr metal salts.

**Results and discussion:** The isolated fungus was *Aspergillus niger*. It had average tolerance indices of 0.89, 1.03, 1.05, 0.94, 0.88, 0.87 and 1.27 at 1 mM of the Cd, Hg, Pb, Ag, Cu, Zn and Cr salts, respectively, after seven days of growth at 28 °C. The MIC of *A. niger* was found in a range of 5 to 10 mM of the Hg, Cu and Ag salts, and 15 to 20 mM of the Cd salt. The Pb, Zn and Cr salts did not inhibit the growth of the fungus with the highest concentration evaluated; that is, the MIC is greater than 20 mM.

**Conclusión:** *Aspergillus niger* has potential for the bioremediation of contaminants since it showed high tolerance to the metal salts.

**Keywords:** Filamentous fungus, lead, zinc, chromium, metal toxicity, mining activity.

### **Resumen**

**Introducción:** La contaminación por metales representa un riesgo significativo para los ecosistemas, por tanto, es necesario reducir la biodisponibilidad, movilidad y toxicidad de esos elementos.

**Objetivo:** Aislar un hongo filamentoso con capacidad para tolerar metales.

**Materiales y métodos:** El hongo se aisló a partir de suelo con actividad minera. El índice de tolerancia y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del hongo se determinaron a 1, 5, 10, 15 y 20 mM de sales metálicas de Cd, Hg, Pb, Ag, Cu, Zn y Cr.

**Resultados y discusión:** El hongo aislado fue *Aspergillus niger*. Este tuvo índices de tolerancia promedio de 0.89, 1.03, 1.05, 0.94, 0.88, 0.87 y 1.27 a 1 mM de las sales de Cd, Hg, Pb, Ag, Cu, Zn y Cr, respectivamente, después de siete días de crecimiento a 28 °C. La CMI de *A. niger* se encontró en un intervalo de 5 a 10 mM de las sales de Hg, Cu y Ag, y 15 a 20 mM de la sal de Cd. Las sales de Pb, Zn y Cr no inhibieron el crecimiento del hongo con la concentración más alta evaluada; es decir, la CMI es mayor de 20 mM.

**Conclusión:** *Aspergillus niger* tiene potencial para la biorremediación de contaminantes, ya que mostró alta tolerancia a las sales de los metales.

**Palabras clave:** Hongo filamentoso, plomo, zinc, cromo, toxicidad de metales, actividad minera.

## Introduction

Metal pollution in soils, sediments and natural water reservoirs is one of the biggest environmental problems worldwide (Srivastava & Thakur, 2006). Inorganic micropollutants are released by industries dedicated to electroplating, metal finishing, mining, tannery and battery manufacturing, among others (Ezzouhri, Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009). Many metals are cytotoxic, carcinogenic and mutagenic, even at very low concentrations, as in the case of arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, silver and zinc (Nordberg, Fowler, & Nordberg, 2015).

Metals are commonly removed by chemical precipitation, ion exchange, solvent extraction and oxide-reduction reactions; however, these methods are relatively expensive and inefficient, especially when the concentration of contaminants is in the range of 1 to 100 mg·L<sup>-1</sup> (Krauter, Martinelli, Williams, & Martins, 1996). An alternative to these conventional methods is bioremediation, which is based on the ability of certain living organisms, such as plants, bacteria and fungi, to grow in the presence of toxic compounds (Rhodes, 2014). In particular, filamentous fungi are a group of microorganisms which has received special attention for their high surface/volume ratio (Dixit et al., 2015) and their development capacity under extreme conditions of pH, temperature and nutrient availability, as well as high metal concentrations (Anand, Isar, Saran, & Saxena, 2006).

The introduction of metals into ecosystems induces morphological and physiological changes in microbial communities (Verma et al., 2001). This implies that the contaminated sites become a source of microorganisms that are tolerant or resistant to these micropollutants (Mohammadian, Babai, Arzanbu, Oustan, & Khazaei, 2017). The mechanisms used by filamentous fungi to tolerate or resist metals include biosorption, intracellular uptake and chemical transformation, but may vary depending on the species (Danesh, Tajbakhsh, Goltapeh, & Varma, 2013).

According to the Mexican Geological Survey (2017), Sonora is ranked first among Mexican states in mineral production; in 2016, the state contributed 33.3 % of the national total. In this sense, mining has been and is synonymous with growth and development for the state and the country; however, the intense mining activity has contaminated soils and waterbodies due to the release of metals. Hence there is a need to explore new strategies to eliminate or reduce the presence of such compounds in the environment. The objective of this work was to identify a species of fungus tolerant to metals and determine if it has potential for their bioremediation.

## Introducción

La contaminación con metales en suelos, sedimentos y reservorios naturales de agua es uno de los mayores problemas ambientales a nivel mundial (Srivastava & Thakur, 2006). Los microcontaminantes inorgánicos son liberados por industrias dedicadas a la galvanoplastia, carrocería, minería, curtido, manufactura de baterías, entre otras (Ezzouhri, Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009). Muchos de los metales son citotóxicos, carcinogénicos y mutagénicos, incluso en concentraciones muy bajas; por ejemplo, arsénico, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, níquel, selenio, plata y zinc (Nordberg, Fowler, & Nordberg, 2015).

La remoción de metales se hace comúnmente mediante precipitación química, intercambio iónico, extracción con solventes y reacciones de óxido-reducción; sin embargo, estos métodos son relativamente caros e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los contaminantes está en el rango de 1 a 100 mg·L<sup>-1</sup> (Krauter, Martinelli, Williams, & Martins, 1996). Una alternativa a estos métodos convencionales es la biorremediación, la cual se basa en la habilidad de ciertos organismos vivos, como las plantas, bacterias y hongos, para crecer en presencia de compuestos tóxicos (Rhodes, 2014). Particularmente, los hongos filamentosos son un grupo de microorganismos en los que se ha puesto atención especial por su alta relación superficie/volumen (Dixit et al., 2015) y su capacidad de desarrollo bajo condiciones extremas de pH, temperatura, nutrientes y concentración alta de metales (Anand, Isar, Saran, & Saxena, 2006).

La introducción de metales en los ecosistemas induce cambios morfológicos y fisiológicos en las comunidades microbianas (Verma et al., 2001). Lo anterior implica que los sitios contaminados se conviertan en una fuente de microorganismos tolerantes o resistentes a dichos microcontaminantes (Mohammadian, Babai, Arzanbu, Oustan, & Khazaei, 2017). Los mecanismos que los hongos filamentosos utilizan para tolerar o resistir metales incluyen biosorción, captación intracelular y transformación química, aunque pueden variar dependiendo de la especie (Danesh, Tajbakhsh, Goltapeh, & Varma, 2013).

Según el Servicio Geológico Mexicano (2017), Sonora es el estado de la república mexicana que ocupa el primer lugar en producción mineral; en 2016, la entidad aportó 33.3 % del total nacional. En este sentido, la minería ha sido y es sinónimo de crecimiento y desarrollo para el estado y el país; sin embargo, la intensa actividad minera ha provocado la contaminación de suelos y cuerpos de agua, debido a la liberación de metales. De ahí la necesidad de explorar nuevas estrategias para

## Materials and methods

### Fungus isolation and identification

Soil samples from an active mine located in the state of Sonora, Mexico, which were collected in sterilized containers, were analyzed. The samples (1 g) were deposited in 100 mL of sterilized distilled water; the mixture was stirred for 20 min at room temperature and serial dilutions were made ( $10^{-1}$  to  $10^{-4}$ ). Aliquots of 100  $\mu$ L of each dilution were then taken, placed in Petri dishes with PDA (potato dextrose agar) culture medium and incubated at 28 °C for five days. The developed colonies were selected and the sowing procedure was repeated in Petri dishes with PDA, until the isolation and purification of the fungal strain was achieved. This was identified based on the main morphological features of the colonies, considering macroscopic characteristics such as color, shape and type of colony, as well as the most important microscopic structures such as spores, conidial head and conidiophore.

### Spore suspension preparation

The isolated fungus was inoculated in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of PDA, and then incubated for seven days at 28 °C. Subsequently, 100 mL of distilled water at room temperature were added and carefully stirred for 5 min with a magnetic stirrer. The spore count was performed with a Neubauer chamber. The spore suspension was used in the inoculation of the culture medium supplemented with the salts of the toxic metals to be evaluated.

### Tolerance index

The salts  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\times 3\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{ZnSO}_4\times 7\text{H}_2\text{O}$  were used as a source of the metals Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb and Zn, respectively. The effect of the metals on the growth of the fungus, also known as the tolerance or resistance index, was determined following the methodology described by Ezzouhri et al. (2009), under which the index is defined as the ratio of the extension radius of the colonies of the fungus treated with the metal to that of the colonies of the fungus without metal (control), that is to say:

Tolerance index =

$\frac{\text{Radius (cm) of the mycelium treated with metal}}{\text{Radius (cm) of the mycelium without metal}}$

Radius (cm) of the mycelium without metal

The isolated fungus was seeded in PDA supplemented with the metal salts, individually, at a concentration of 1 mM. Previously, a hole was made in the center of the PDA solidified in the Petri dishes in order to obtain circular-shaped colonies and thus enable measurements

eliminar o reducir la presencia de tales compuestos en el ambiente. El objetivo de este trabajo fue identificar una especie de hongo tolerante a los metales y determinar si presenta potencial para la biorremediación de estos.

## Materiales y métodos

### Aislamiento e identificación del hongo

Se analizaron muestras de suelo de una mina activa ubicada en el estado de Sonora, México, las cuales fueron recolectadas en recipientes esterilizados. Las muestras (1 g) se depositaron en 100 mL de agua destilada esterilizada; la mezcla se agitó durante 20 min a temperatura ambiente y se hicieron diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ). Después se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L de cada dilución, se colocaron en placas Petri con medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) y se incubaron a 28 °C por cinco días. Las colonias desarrolladas se seleccionaron y se repitió el procedimiento de siembra en placas Petri con PDA, hasta lograr el aislamiento y purificación de la cepa fúngica. Esta se identificó con base en los principales rasgos morfológicos de las colonias, considerando características macroscópicas tales como color, forma y tipo de colonia, además de las estructuras microscópicas más importantes como esporas, cabeza conidial y conidióforo.

### Preparación de la suspensión de esporas

El hongo aislado se inoculó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, que contenían 50 mL de PDA, y se incubaron durante siete días a 28 °C. Posteriormente se agregaron 100 mL de agua destilada a temperatura ambiente y se agitaron cuidadosamente durante 5 min con un agitador magnético. El conteo de esporas se realizó con una cámara Neubauer. La suspensión de esporas se utilizó en la inoculación del medio de cultivo suplementado con las sales de los metales tóxicos a evaluar.

### Índice de tolerancia

Las sales  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\times 3\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnSO}_4\times 7\text{H}_2\text{O}$  se utilizaron como fuente de los metales Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn, respectivamente. El efecto de los metales sobre el crecimiento del hongo, también conocido como índice de tolerancia o resistencia, se determinó siguiendo la metodología descrita por Ezzouhri et al. (2009). Dicho método considera que el índice de tolerancia es igual a la relación entre el radio de las colonias del hongo tratadas con el metal y el radio de las colonias del hongo sin metal (control), es decir:

Índice de tolerancia =

$\frac{\text{Radio (cm) del micelio tratado con metal}}{\text{Radio (cm) del micelio sin metal}}$

Radio (cm) del micelio sin metal

of the radius. A suspension of  $10^8$  spores·mL<sup>-1</sup> was deposited in said hole; the dishes were incubated at 28 °C. The growth of the fungus was determined seven days after the inoculation by measuring the radius of the colonies; all tests were performed in triplicate. The spores used were collected from a culture of the fungus with seven days of previous growth in PDA.

### Minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration of metal that inhibits the growth of a microorganism (Ezzouhri et al., 2009). In this study, to determine the MIC, the fungus was inoculated in the PDA culture medium containing, individually, the metal salts AgNO<sub>3</sub> (silver nitrate), CdCl<sub>2</sub> (cadmium chloride), K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (potassium dichromate), CuSO<sub>4</sub> (copper sulfate), HgCl<sub>2</sub> (mercury chloride), (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb×3H<sub>2</sub>O (lead acetate trihydrate), and ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O (zinc sulfate heptahydrate) as a source of the metals Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb and Zn, respectively, at concentrations of 5, 10, 15 and 20 mM. Inocula of  $10^8$  spores·mL<sup>-1</sup> with seven days of growth were used. The inoculated plates were incubated at 28 °C for seven days. The growth of the extension radius (cm) of the colonies was measured every 24 h, to determine the tolerance index at each concentration. All tests were performed in triplicate.

## Results and discussion

### Identification of the isolated fungus

According to the macroscopic characteristics, the colonies of the fungus in PDA, after seven days of growth, were white to yellowish (between the first 24 to 48 h of culture), turning black and granular, with yellow to green on the opposite side (Figure 1). Among the microscopic features, globose conidial heads of black to brown tone stand out, along with smooth, light brown conidiophores and conidia or globose

El hongo aislado se sembró en PDA suplementado con las sales metálicas, de manera individual, a una concentración de 1 mM. Previamente, se hizo un orificio en el centro del PDA solidificado en las placas Petri con el fin de obtener colonias de forma circular y, de este modo, hacer las mediciones del radio. En dicho orificio se depositó una suspensión de  $10^8$  esporas·mL<sup>-1</sup>; las cajas se incubaron a 28 °C. El crecimiento del hongo se determinó a los siete días después de la inoculación midiendo el radio de las colonias; todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las esporas utilizadas se colectaron de un cultivo del hongo con siete días de crecimiento previo en PDA.

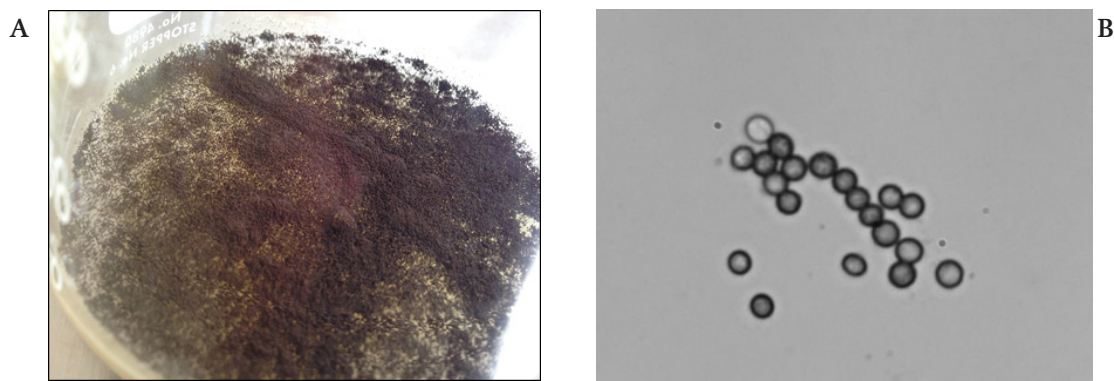
### Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como aquella concentración más baja de metal que inhibe el crecimiento de un microorganismo (Ezzouhri et al., 2009). En este estudio, para determinar la CMI, el hongo se inoculó en el medio de cultivo PDA que contenía, individualmente, las sales metálicas AgNO<sub>3</sub> (nitrato de plata), CdCl<sub>2</sub> (cloruro de cadmio), K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (dicromato de potasio), CuSO<sub>4</sub> (sulfato de cobre), HgCl<sub>2</sub> (cloruro de mercurio), (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb×3H<sub>2</sub>O (acetato de plomo trihidratado), y ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O (sulfato de zinc heptahidratado) como fuente de los metales Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn, respectivamente, en concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mM. Se utilizaron inóculos de  $10^8$  esporas·mL<sup>-1</sup> con siete días de crecimiento. Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C por siete días. El crecimiento del radio de extensión (cm) de las colonias se midió cada 24 h, para determinar el índice de tolerancia a cada concentración. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## Resultados y discusión

### Identificación del hongo aislado

De acuerdo con las características macroscópicas, las colonias del hongo en PDA, después de siete días de



**Figure 1.** A) *Aspergillus niger* in PDA medium after seven days of growth at 28 °C. B) Spores of *A. niger* observed in a 60x inverted optical microscope, after seven days of culture in PDA.

**Figura 1.** A) *Aspergillus niger* en medio PDA después de siete días de crecimiento a 28 °C. B) Esporas de *A. niger* observadas en un microscopio óptico invertido 60x, después de siete días de cultivo en PDA.

spores. The characteristics mentioned match those of the fungus *Aspergillus niger* Tiegh. 1867 (Abarca, 2000; Sáez, Flórez, & Cadavid, 2002).

### Tolerance index of the fungus

Prolonged exposure of soil fungi to metals can generate a physiological adaptation with important modifications that reduce the number of populations. The changes may be associated with the increase in biosorption, bioaccumulation and metal transformation capacity (Ashraf & Ali, 2007). Iram, Zaman, Iqbal, and Shabbir (2013) found that some fungi of the genus *Aspergillus* usually predominate in soil contaminated with metals. In this study, the tolerance index of *A. niger*, exposed to a 1 mM concentration of each metal salt, was greater than 0.80 after seven days of growth. Table 1 shows the tolerance index of the fungus to each of the evaluated salts. A filamentous fungus can be considered highly tolerant when exposed to a concentration of at least 1 mM of metal and the tolerance index is equal to or greater than 0.80 (Ezzouhri et al., 2009). Based on the above, the isolated filamentous fungus was highly tolerant to all metals evaluated.

When *A. niger* was exposed to a 1 mM concentration of cadmium chloride, a tolerance index of  $0.89 \pm 0.12$  was obtained. This result is slightly higher than that described by Ezzouhri et al. (2009) for *Penicillium* sp.

**Table 1. Tolerance index of *Aspergillus niger* exposed to 1 mM of  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  as a source of the metals Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb and Zn, respectively, after seven days of incubation at 28 °C.**

**Cuadro 1. Índice de tolerancia de *Aspergillus niger* expuesto a 1 mM de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  como fuente de los metales Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn, respectivamente, después de siete días de incubación a 28 °C.**

Metal	Tolerance index of the fungus / Índice de tolerancia del hongo
Cd	$0.89 \pm 0.12$
Hg	$1.03 \pm 0.14$
Pb	$1.05 \pm 0.18$
Ag	$0.94 \pm 0.11$
Cu	$0.88 \pm 0.04$
Zn	$0.87 \pm 0.07$
Cr	$1.27 \pm 0.07$

± Standard deviation of the mean

± Desviación estándar de la media

crecimiento, fueron blancas a amarillentas (entre las primeras 24 a 48 h de cultivo), volviéndose negras y granuladas, con reverso amarillo a verde (Figura 1). Entre las características microscópicas destacan cabezas conidiales globosas de tono negro a café; conidióforos lisos de color café claro y conidios o esporas globosas. Las características mencionadas coinciden para el hongo *Aspergillus niger* Tiegh. 1867 (Abarca, 2000; Sáez, Flórez, & Cadavid, 2002).

### Índice de tolerancia del hongo

La exposición prolongada de los hongos del suelo a metales puede generar una adaptación fisiológica con modificaciones importantes reduciendo el número de poblaciones. Los cambios pueden estar asociados al incremento en la capacidad de biosorción, bioacumulación y transformación de metales (Ashraf & Ali, 2007). Iram, Zaman, Iqbal, y Shabbir (2013) encontraron que algunos hongos del género *Aspergillus* suelen predominar en suelo contaminado con metales. En este estudio, el índice de tolerancia de *A. niger*, expuesto a una concentración 1 mM de cada sal metálica fue mayor de 0.80, después de siete días de crecimiento. El Cuadro 1 muestra el índice de tolerancia del hongo a cada una de las sales evaluadas. Un hongo filamentoso puede considerarse altamente tolerante cuando se expone a una concentración de al menos 1 mM de metal y el índice de tolerancia es igual o mayor

(S4S) and *Penicillium* sp. (S5S) with indices of 0.55 and 0.62, respectively, using cadmium sulfate as the source of said element. These authors also determined that the index of *Alternaria alternata* (Fr) Keissl. 1992 is only 0.13 and that several species of *Fusarium* sp. did not grow in the presence of 1 mM of cadmium. Roane and Pepper (2000) mention that tolerance levels among fungal species may be different due to the variation in resistance mechanisms.

In the case of mercury (1 mM of mercury chloride), *A. niger* had a tolerance index of  $1.03 \pm 0.14$ , so it was highly tolerant to metal. Kurniati, Arfarita, and Imai (2014) reported that *Aspergillus flavus* Link 1809 had a tolerance index of 0.80 with 25 ppm of mercury chloride.

Lead is the metal that is found mostly as a contaminant in soil, water and air and is also highly toxic to plants, humans, animals and microorganisms (Low, Lee, & Liew, 2000), hence the importance of the search for alternatives to treat sites contaminated with this metal. In this sense, it was found that *A. niger* is highly tolerant to 1 mM of lead acetate, since its index was  $1.05 \pm 0.18$ .

In this work, it was observed that *A. niger* was highly tolerant to silver, since the index was  $0.94 \pm 0.11$  (using silver nitrate as the source of the element). At present there are not many studies that demonstrate the tolerance or resistance of filamentous fungi to this metal; however, Singh (2006) found that *Fusarium oxysporum* Link 1809 reduces silver ions in solution, resulting in a stable suspension.

With respect to copper (1 mM of copper sulphate), *A. niger* showed tolerance rates of  $0.88 \pm 0.04$ ; that is, the fungus is highly tolerant. Ezzouhri et al. (2009) indicated similar values of tolerance to 1 mM of copper: 0.79, 0.98, 0.91 and 1.0 for the fungi *Penicillium* sp. (S2W), *Penicillium* sp. (S2S), *Fusarium* sp. (S1S) and *Aspergillus niger* (S5W), respectively.

The tolerance index of *A. niger* to 1 mM of zinc sulfate was  $0.81 \pm 0.07$ ; therefore, the fungus was highly tolerant. Sintuprapa, Thiravetyan, and Tanticharoen (2000) suggested that certain species of filamentous fungi tolerate zinc thanks to the mechanism of uptake through intra- and extracellular exchange in the form of polyphosphate precipitation.

Finally, in the case of chromium (1 mM of potassium dichromate), *A. niger* had a high tolerance index of  $1.27 \pm 0.06$ . Ezzouhri et al. (2009) reported similar indices in other fungi; these authors found that *A. alternata* and *Penicillium* sp. were highly tolerant to chromium (potassium dichromate as a source) with indices of 1.02 and 1.23, respectively. They also indicated that *Geotrichum candidum* Link 1809 is not very tolerant to metal, since they determined an index of 0.19.

que 0.80 (Ezzouhri et al., 2009). Con base en lo anterior, el hongo filamentoso aislado fue altamente tolerante a todos los metales evaluados.

Cuando *A. niger* se expuso a una concentración 1 mM de cloruro de cadmio se obtuvo un índice de tolerancia de  $0.89 \pm 0.12$ . Este resultado es ligeramente superior al descrito por Ezzouhri et al. (2009) para *Penicillium* sp. (S4S) y *Penicillium* sp. (S5S) con índices de 0.55 y 0.62, respectivamente, usando sulfato de cadmio como fuente de dicho elemento. Estos autores también determinaron que el índice de *Alternaria alternata* (Fr) Keissl. 1992 es solo de 0.13 y que varias especies de *Fusarium* sp. no crecieron en presencia de 1 mM de cadmio. Roane y Pepper (2000) mencionan que los niveles de tolerancia entre especies de hongos pueden ser diferentes, debido a la variación de los mecanismos de resistencia.

En el caso del mercurio (1 mM de cloruro de mercurio), *A. niger* tuvo un índice de tolerancia de  $1.03 \pm 0.14$  por lo que resultó altamente tolerante al metal. Kurniati, Arfarita, e Imai (2014) reportaron que *Aspergillus flavus* Link 1809 tuvo un índice de tolerancia de 0.80 con 25 ppm de cloruro de mercurio.

El plomo es el metal que se encuentra mayormente como contaminante en suelo, agua y aire y es también altamente tóxico para las plantas, humanos, animales y microorganismos (Low, Lee, & Liew, 2000). De ahí la importancia de la búsqueda de alternativas para tratar sitios contaminados con este metal. En este sentido, se encontró que *A. niger* es altamente tolerante a 1 mM de acetato de plomo, ya que su índice fue  $1.05 \pm 0.18$ .

En este trabajo se observó que *A. niger* fue altamente tolerante a la plata, ya que el índice fue  $0.94 \pm 0.11$  (usando nitrato de plata como fuente del elemento). En la actualidad no existen muchos estudios que demuestren la tolerancia o resistencia de los hongos filamentosos a dicho metal; sin embargo, Singh (2006) encontró que *Fusarium oxysporum* Link 1809 reduce iones de plata en solución, dando lugar a una suspensión estable.

Con respecto al cobre (1 mM de sulfato de cobre), *A. niger* mostró índices de tolerancia de  $0.88 \pm 0.04$ ; es decir, el hongo es altamente tolerante. Ezzouhri et al. (2009) indicaron valores similares de tolerancia a 1 mM de cobre: 0.79, 0.98, 0.91 y 1.0 para los hongos *Penicillium* sp. (S2W), *Penicillium* sp. (S2S), *Fusarium* sp. (S1S) y *Aspergillus niger* (S5W), respectivamente.

El índice de tolerancia de *A. niger* a 1 mM de sulfato de zinc fue  $0.81 \pm 0.07$ , por lo tanto, el hongo fue altamente tolerante. Sintuprapa, Thiravetyan, y Tanticharoen (2000) sugirieron que ciertas especies de hongos filamentosos toleran al zinc gracias al mecanismo de

### Minimum inhibitory concentration

Table 2 indicates the minimum concentration of metals (in the form of a metal salt) that inhibited the growth of *A. niger*. Mercury, copper and silver were the most toxic for *A. niger*, since the MIC was found between 5 and 10 mM of each metal salt, while, for cadmium chloride, the MIC was between 15 and 20 mM. In the presence of lead, zinc and chromium salts, the fungus grew even with the highest concentration of these metals; therefore, the MIC was greater than 20 mM. In this sense, other studies with higher concentrations of lead, zinc and chromium are necessary to find those that inhibit the growth of *A. niger*.

At the lowest concentrations of the metal salts (1 and 5 mM), the fungus was very tolerant and showed strong growth, exceeding the control (without metal) in the case of lead, zinc and chromium. The growth pattern suggests the development of tolerance or the adaptation of the fungi to the presence of metals.

Figure 2 shows the tolerance indices of *A. niger* exposed to 5 mM of each metal salt. From said concentration, the lag phase was prolonged in comparison with the control, especially with Cd, Hg, Cu and Ag; the growth of the fungus could be observed and measured up to three days after the inoculation.

captación a través del intercambio intra y extracelular en forma de precipitación de polifosfatos.

Finalmente, en el caso del cromo (1 mM de dicromato de potasio), *A. niger* tuvo un índice alto de tolerancia de  $1.27 \pm 0.06$ . Ezzouhri et al. (2009) reportaron índices similares en otros hongos; estos autores encontraron que *A. alternata* y *Penicillium* sp. fueron altamente tolerantes al cromo (dicromato de potasio como fuente) con índices de 1.02, y 1.23, respectivamente. También indicaron que *Geotrichum candidum* Link 1809 es poco tolerante al metal, ya que determinaron un índice de 0.19.

### Concentración mínima inhibitoria

El Cuadro 2 indica la concentración mínima de los metales (en forma de sal metálica) que inhibieron el crecimiento de *A. niger*. El mercurio, el cobre y la plata fueron los *más tóxicos para A. niger*, ya que la CMI se encontró entre 5 y 10 mM de cada sal metálica, mientras que, para cloruro de cadmio, la CMI fue entre 15 y 20 mM. En presencia de las sales de plomo, zinc y cromo, el hongo creció incluso con la concentración más elevada de dichos metales; por lo tanto, la CMI fue mayor de 20 mM. En este sentido, otros estudios con concentraciones más altas de plomo, zinc y cromo son necesarios para encontrar aquellas que inhiban el crecimiento de *A. niger*.

**Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Aspergillus niger* exposed to  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  as a source of the metals Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb and Zn, respectively.**

**Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Aspergillus niger* expuesto a  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  como fuente de los metales Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn, respectivamente.**

Metal	MIC (mM)/CMI (mM)
Cd	15 < MIC < 20 / 15 < CMI < 20
Hg	5 < MIC < 10 / 5 < CMI < 10
Pb	MIC > 20 / CMI > 20
Ag	5 < MIC < 10 / 5 < CMI < 10
Cu	5 < MIC < 10 / 5 < CMI < 10
Zn	MIC > 20 / CMI > 20
Cr	MIC > 20 / v

It was observed that *A. niger* was tolerant up to 5 mM of silver nitrate, since the fungus had no growth capacity at 10 mM. Silver is a metal widely used in the photographic, electrical, electronic and chemical industries; the soluble form, as in other heavy metals, is very dangerous because it is easily transported and becomes available for plants and animals. For humans, poisoning with this type of metal can cause severe dysfunction of the kidneys, reproductive system, liver, brain and central nervous system (Dixit et al., 2015), hence the importance of finding possible strategies to treat sites contaminated with the metal.

In the presence of copper (copper sulfate), the MIC of *A. niger* was between 5 and 10 mM. The fungus had growth capacity up to 5 mM with a tolerance index of  $1.18 \pm 0.38$ , after seven days of incubation (Figure 2). Ezzouhri et al. (2009) found similar MIC values for *Penicillium* sp. (S4W) and *Penicillium* sp. (S5S), being  $7.5 \text{ mM} < \text{MIC} < 10 \text{ mM}$  for both fungi, also using copper sulfate as the metal source. According to Kermasha, Pellerin, Rovel, Goetghebeur, and Metche (1993), the tolerance or resistance of fungi to copper, such as *A. niger*, is due to an active process that involves the synthesis of a metallothionein (a copper-dependent protein).

En las concentraciones más bajas de las sales metálicas (1 y 5 mM), el hongo fue muy tolerante y mostró un fuerte crecimiento, excediendo el control (sin metal) en el caso del plomo, zinc y cromo. El patrón de crecimiento sugiere el desarrollo de tolerancia o la adaptación de los hongos a la presencia de metales.

La Figura 2 muestra los índices de tolerancia de *A. niger* expuesto a 5 mM de cada sal metálica. A partir de dicha concentración, la fase de latencia se prolongó en comparación con el control, especialmente con Cd, Hg, Cu y Ag; el crecimiento del hongo se pudo observar y medir hasta los tres días después de la inoculación.

Se observó que *A. niger* fue tolerante hasta 5 mM de nitrato de plata, ya que el hongo no tuvo capacidad de crecimiento a 10 mM. La plata es un metal usado ampliamente en las industrias fotográfica, eléctrica, electrónica y química; la forma soluble, al igual que en otros metales pesados, resulta muy peligrosa porque es transportada fácilmente quedando disponible para plantas y animales. Para los humanos, el envenenamiento con este tipo de metales puede provocar disfunción severa de los riñones, sistema reproductivo, hígado, cerebro y sistema nervioso

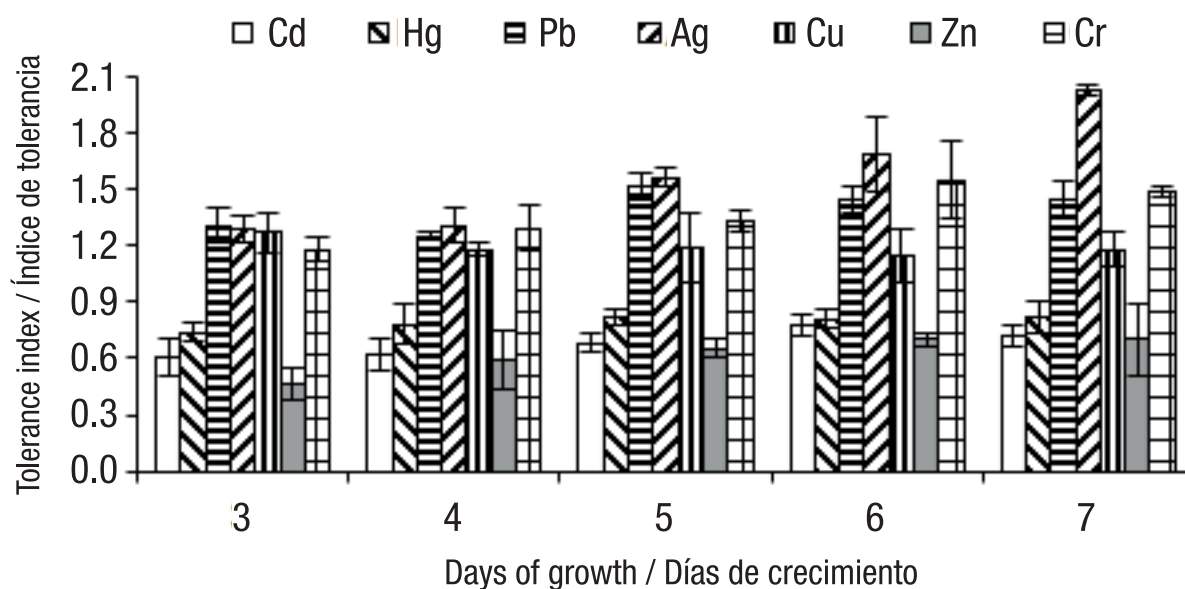


Figure 2. Tolerance index of *Aspergillus niger* in the presence of 5 mM of  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , as a source of the metals Ag, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn and Cr, respectively. The standard deviation of the mean is shown on the bars.

Figura 2. Índice de tolerancia de *Aspergillus niger* en presencia de 5 mM de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , como fuente de los metales Ag, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn y Cr, respectivamente. Sobre las barras se representa la desviación estándar de la media.



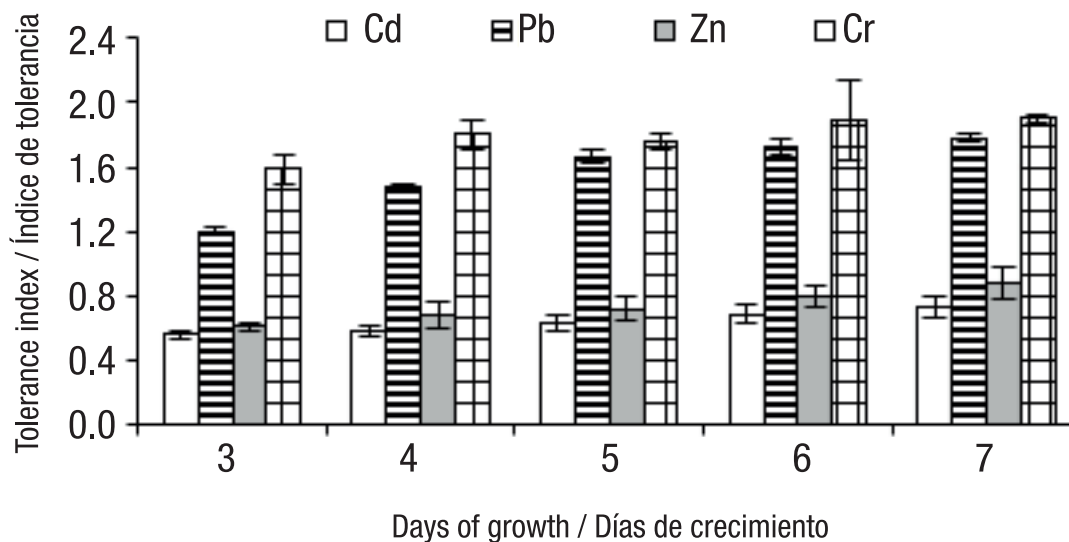
Mercury appears to be toxic to *Aspergillus*; despite this, certain species are still able to grow at certain concentrations of the metal. In this work, *A. niger* was highly tolerant to mercury (tolerance index of  $1.03 \pm 0.14$  at 1 mM of mercury chloride). When increasing the concentration of the mercurial salt to 5 mM, the tolerance index decreased to  $0.82 \pm 0.03$ . The fungus showed significant growth capacity in the presence of up to 5 mM of mercury chloride, but the inhibition was complete at 10 mM. Another study found that *A. flavus* tolerates up to 100 ppm of mercury (Kurniati et al., 2014). It has also been indicated that *Phanerochaete chrysosporium* Burds 1974 is tolerant and has the ability to accumulate this metal (Dhawale, Lane, & Dhawale, 1996).

Figure 3 shows the tolerance index of *A. niger* at 10 mM of cadmium, lead, zinc and chromium salts. This concentration reduced growth and increased the lag phase compared to the control (without metal). However, in some cases, the fungus grew relatively quickly, even after a long lag phase, for example with lead and chromium salts at 15 and 20 mM. The reduced growth rate is a typical response of fungi in the presence of toxins (Gadd, 1993), while the lengthening of the lag phase is not always present (Ezzouhri et al., 2009).

central (Dixit et al., 2015). De ahí, la importancia de la búsqueda de posibles estrategias para tratar sitios contaminados con el metal.

En presencia de cobre (sulfato de cobre), la CMI de *A. niger* fue entre 5 y 10 mM. El hongo tuvo capacidad de crecimiento hasta 5 mM con un índice de tolerancia de  $1.18 \pm 0.38$ , después de siete días de incubación (Figura 2). Ezzouhri et al. (2009) encontraron valores similares de CMI para *Penicillium* sp. (S4W), *Penicillium* sp. (S5S), siendo  $7.5 \text{ mM} < \text{CMI} < 10 \text{ mM}$  para ambos hongos, usando también sulfato de cobre como fuente del metal. Según Kermasha, Pellerin, Rovel, Goetghebeur, y Metche (1993), la tolerancia o resistencia de hongos al cobre, como *A. niger*, se debe a un proceso activo que involucra la síntesis de una metalotioneína (proteína dependiente del cobre).

El mercurio parece ser tóxico para *Aspergillus*; a pesar de ello, ciertas especies todavía son capaces de crecer a ciertas concentraciones del metal. En este trabajo, *A. niger* resultó altamente tolerante al mercurio (índice de tolerancia de  $1.03 \pm 0.14$  a 1 mM de cloruro de mercurio). Al aumentar la concentración de la sal mercurial a 5 mM, el índice de tolerancia disminuyó a



**Figure 3.** Tolerance index of *Aspergillus niger* in the presence of 10 mM of  $\text{CdCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  as a source of the metals Cd, Pb, Zn and Cr, respectively. The standard deviation of the mean is shown on the bars.

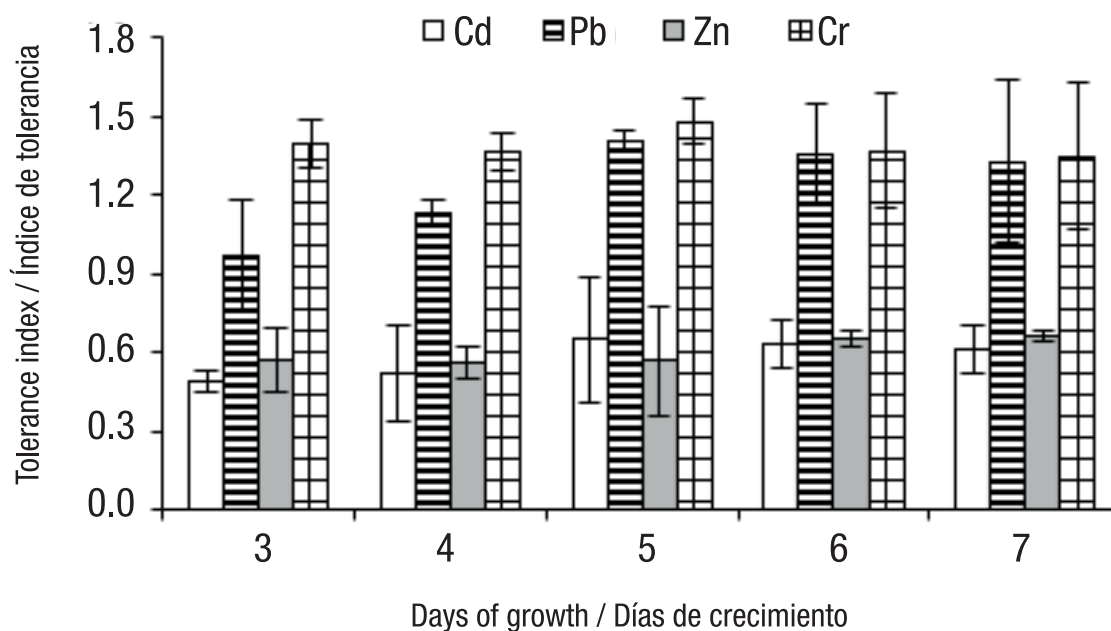
**Figura 3.** Índice de tolerancia de *Aspergillus niger* en presencia de 10 mM de  $\text{CdCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , como fuente de los metales Cd, Pb, Zn y Cr, respectivamente. Sobre las barras se representa la desviación estándar de la media.

Figure 4 shows that *A. niger* had growth capacity up to 15 mM of cadmium chloride with a tolerance index of  $0.61 \pm 0.09$ , after seven days of incubation at 28 °C; however, at 20 mM there was no growth. This could be due to an inhibition effect resulting from the poisoning of the fungus, since cadmium is considered one of the most dangerous metals due to its high stability and toxicity. Joo and Hussein (2012) observed a strong inhibition of the growth of *A. niger* exposed to 1 mM of cadmium. Jabbari, Faezi, Khosravan, Farahmad, and Shakibaie (2010) observed that cadmium exerts severe inhibitory effects on the physiological processes of organisms, in some cases, even at concentrations less than 2 ppm. By contrast, Massaccesi, Romero, Cazau, and Bucszinsky (2002) indicated that several species of filamentous fungi, isolated from contaminated industrial sediments, were able to remove 63 to 70 % of the cadmium during 13 days of growth. In addition, Mohammadian et al. (2015) indicated that *Aspergillus versicolor* Vuillemin 1903 and *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1863 have MIC of 2 000 mg·L<sup>-1</sup> and 1 000 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. This shows the adaptability of microorganisms, as well as their potential for use in bioremediation.

$0.82 \pm 0.03$ . El hongo mostró capacidad de crecimiento significativo en presencia de hasta 5 mM de cloruro de mercurio, pero la inhibición fue completa a 10 mM. En otro estudio se encontró que *A. flavus* tolera hasta 100 ppm de mercurio (Kurniati et al., 2014). También se ha indicado que *Phanerochaete chrysosporium* Burds 1974 es tolerante y tiene la capacidad de acumular dicho metal (Dhawale, Lane, & Dhawale, 1996).

La Figura 3 muestra el índice de tolerancia de *A. niger* a 10 mM de sales de cadmio, plomo, zinc y cromo. Dicha concentración redujo el crecimiento y aumentó la fase de latencia en comparación con el control (sin metal). No obstante, en algunos casos, el hongo creció relativamente rápido, incluso después de una larga fase de latencia; por ejemplo, con sales de plomo y cromo a 15 y 20 mM. La reducción de la tasa de crecimiento es una respuesta típica de los hongos en presencia de tóxicos (Gadd, 1993), mientras que el alargamiento de la fase de latencia no siempre está presente (Ezzouhri et al., 2009).

La Figura 4 muestra que *A. niger* tuvo capacidad de crecimiento hasta 15 mM de cloruro de cadmio con



**Figure 4. Tolerance index of *Aspergillus niger* in the presence of 15 mM of CdCl<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb×3H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O and K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, as a source of the metals Cd, Pb, Zn and Cr, respectively. The standard deviation of the mean is shown on the bars.**

**Figura 4. Índice de tolerancia de *Aspergillus niger* en presencia de 15 mM de CdCl<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb×3H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, como fuente de los metales Cd, Pb, Zn y Cr, respectivamente. Sobre las barras se representa la desviación estándar de la media.**

Figure 5 shows that *A. niger* had greater resistance to lead, zinc and chromium, since it tolerated a concentration of 20 mM of the salts used as a source of these metals. In the case of lead, the fungus had a tolerance index of  $0.71 \pm 0.12$  after seven days. An increase in the growth of the fungus was observed at all evaluated concentrations; Ezzouhri et al. (2009) observed similar behavior in *A. alternata*, which increased its growth by 4 % in the presence of 1 mM of lead carbonate. These authors also found that the MIC (mM) of lead for *Penicillium* sp. (S3S) *Penicillium* sp. (S4W), *Penicillium* sp. (S5S), *Fusarium* sp. (S5S), *A. niger* (S5W) and *A. niger* (S5S) was  $12.5 < \text{MIC} < 15$ ,  $20 < \text{MIC} < 25$ ,  $7.5 < \text{MIC} < 10$ ,  $12.5 < \text{MIC} < 15$ ,  $20 < \text{MIC} < 25$  and  $25 < \text{MIC} < 30$ , respectively; all strains were isolated from soil with mining activity. On the other hand, Sanyal, Rautaray, Bansal, Ahmad, and Sastry (2005) reported that lead is not toxic to the fungus *F. oxysporum*, which grows easily after exposure to this metal.

The fungus *A. niger* was moderately tolerant to zinc, since indices of  $0.87 \pm 0.07$ ,  $0.55 \pm 0.01$ ,  $0.88 \pm 0.10$ ,  $0.66 \pm 0.02$  and  $0.55 \pm 0.01$  were obtained at 1, 5, 10, 15 and 20 mM of zinc sulfate, respectively, after seven days of growth. Given that even at 20 mM significant growth of the fungus mycelium was observed, the MIC is greater than this concentration. Vadkertiova and

un índice de tolerancia de  $0.61 \pm 0.09$ , después de siete días de incubación a 28 °C; sin embargo, a 20 mM ya no hubo crecimiento. Esto pudo deberse a un efecto de inhibición producto de la intoxicación del hongo, ya que el cadmio es considerado uno los metales más peligrosos por su alta estabilidad y toxicidad. Joo y Hussein (2012) observaron una fuerte inhibición del crecimiento de *A. niger* expuesto a 1 mM de cadmio. Jabbari, Faezi, Khosravan, Farahmad, y Shakibaie (2010) observaron que el cadmio ejerce efectos severos de inhibición en los procesos fisiológicos de los organismos, en algunos casos, incluso a concentraciones menores de 2 ppm. En contraste, Massaccesi, Romero, Cazau, y Bucszinsky (2002) indicaron que varias especies de hongos filamentosos, aislados de sedimentos industriales contaminados, pudieron remover de 63 a 70 % del cadmio durante 13 días de crecimiento. Además, Mohammadian et al. (2015) indicaron que *Aspergillus versicolor* Vuillemin 1903 y *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1863 presentan CMI de  $2\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Lo anterior demuestra la capacidad de adaptación de los microorganismos, así como su potencial de uso en biorremediación.

La Figura 5 muestra que *A. niger* presentó mayor resistencia al plomo, zinc y cromo, ya que toleró una

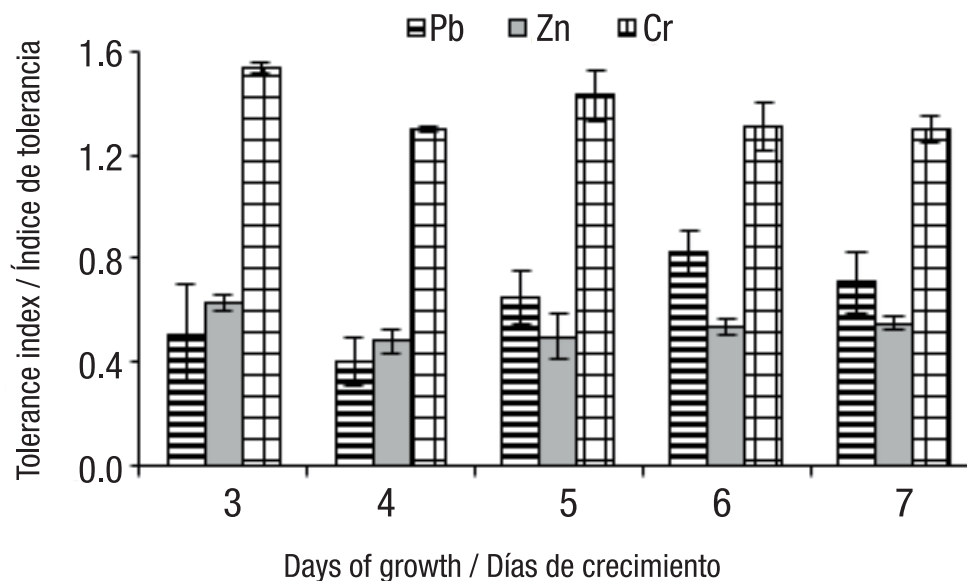


Figure 5. Tolerance index of *Aspergillus niger* in the presence of 20 mM of  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , as a source of Pb, Zn and Cr, respectively. The standard deviation of the mean is shown on the bars.

Figura 5. Índice de tolerancia de *Aspergillus niger* en presencia de 20 mM de  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , como fuente de Pb, Zn y Cr, respectivamente. Sobre las barras se representa la desviación estándar de la media.

Slavikova (2006) found that *Pichia anomala* Hansen 1904, *Candida krusei* Berkhot 1923 and *Cryptococcus laurentii* (Kuff.) C. E. Skinner 1950 tolerate zinc at concentrations higher than 20 mM, a result similar to that found in this work with *A. niger*. Castro-Silva et al. (2003) also observed such similarity in yeast strains isolated from coal mines. On the other hand, Levinskaite (2002) showed that the growth rate of *Penicillium atramentosum* Pitt 1980 25SL slowly decreased from 40 mM of zinc, using zinc sulfate as the metal source. Moreover, Sintuprapa et al. (2000) suggested that the mechanism of zinc uptake, of certain species of filamentous fungi, is intra- and extracellular exchange in the form of polyphosphate precipitation. Zinc is essential for all organisms, although at high concentrations it can become toxic (Balsalobre et al., 2003).

The chromium source promoted the growth of the fungus at all concentrations evaluated. Tolerance indices of  $1.27 \pm 0.06$ ,  $1.49 \pm 0.06$ ,  $1.90 \pm 0.03$ ,  $1.35 \pm 0.01$  and  $1.30 \pm 0.05$  were found for 1, 5, 10, 15 and 20 mM of potassium dichromate, respectively; that is, *A. niger* is highly resistant and the MIC is greater than 20 mM. In this sense more studies are required to find the chromium concentration that inhibits the growth of *A. niger*. In this regard, Ezzouhri et al. (2009) used potassium dichromate, as a source of chromium, and observed similar MIC values ( $20 \text{ mM} < \text{MIC} < 25 \text{ mM}$ ) for fungal species such as *Penicillium* sp. (S3S) and *Fusarium* sp. (S5S), while for *Penicillium* sp. (S4W), *Penicillium* sp. (S5S), *A. niger* (S5W) and *A. niger* (S5S) the MIC were lower:  $12.5 < \text{MIC} < 15$ ,  $15 < \text{MIC} < 20$ ,  $12.5 < \text{MIC} < 15$  and  $10 < \text{MIC} < 12.5$ , respectively. The detoxification of chromium by *A. niger* can be mediated by an antioxidant enzyme system such as peroxidase, catalase and ascorbate peroxide (Srivastava & Thakur, 2006).

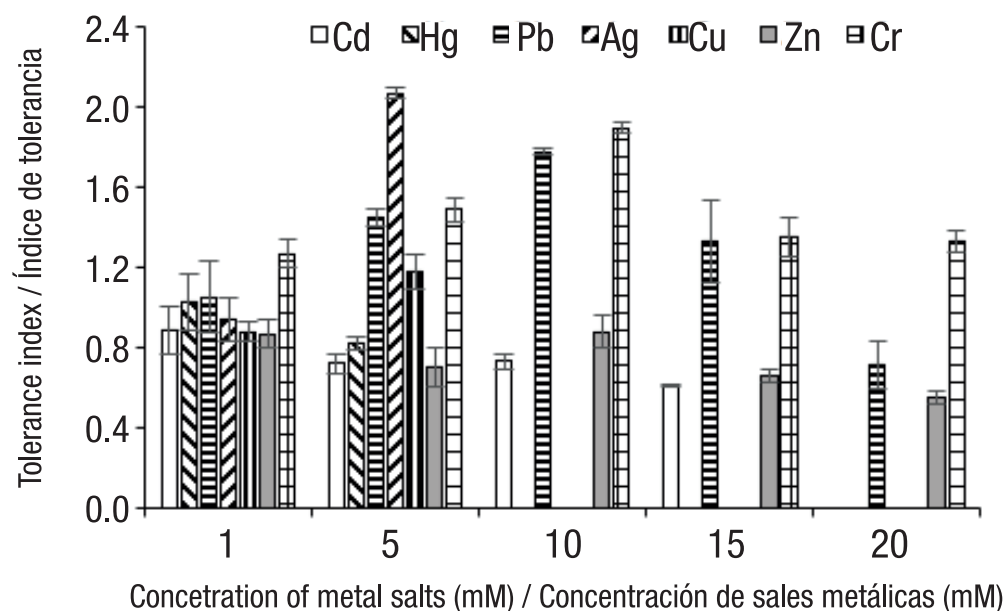
In general, the growth pattern of the fungus suggests the development of tolerance and adaptation to the presence of the metals evaluated. With 1 mM of each metal salt, the growth of the fungus began 24 h after incubation, while, starting at 5 mM, the growth of the fungus began at 72 h, which implies an extension of the lag phase. Figure 6 illustrates the tolerance indices of *A. niger* at the different concentrations evaluated for each metal, during seven days of culture. The most toxic metals for the fungus were silver, mercury and copper, since from 10 mM of the metal salts there was no growth, followed by Cd (15 mM). At 20 mM, the growth of the fungus was only observed with the lead, zinc and chromium salts.

This and other studies have found that filamentous fungi tolerate the presence of toxic metals. Therefore, these microorganisms are considered excellent candidates to accumulate metals in their mycelia and spores and even to reduce toxicity (Bennet,

concentración de 20 mM de las sales utilizadas como fuente de estos metales. En el caso del plomo, el hongo tuvo un índice de tolerancia de  $0.71 \pm 0.12$  después de siete días. Se observó un incremento en el crecimiento del hongo en todas las concentraciones evaluadas; Ezzouhri et al. (2009) observaron un comportamiento similar en *A. alternata* al incrementar 4% su crecimiento en presencia de 1 mM de carbonato de plomo. Dichos autores también encontraron que la CMI (mM) de plomo para *Penicillium* sp. (S3S) *Penicillium* sp. (S4W), *Penicillium* sp. (S5S), *Fusarium* sp. (S5S), *A. niger* (S5W) y *A. niger* (S5S) fue de  $12.5 < \text{CMI} < 15$ ,  $20 < \text{CMI} < 25$ ,  $7.5 < \text{CMI} < 10$ ,  $12.5 < \text{CMI} < 15$ ,  $20 < \text{CMI} < 25$  y  $25 < \text{CMI} < 30$ , respectivamente; todas las cepas fueron aisladas de suelo con actividad minera. Por otra parte, Sanyal, Rautaray, Bansal, Ahmad, y Sastry (2005) reportaron que el plomo no es tóxico para el hongo *F. oxysporum*, el cual crece fácilmente después de la exposición a este metal.

El hongo *A. niger* resultó moderadamente tolerante al zinc, ya que se obtuvieron índices de  $0.87 \pm 0.07$ ,  $0.55 \pm 0.01$ ,  $0.88 \pm 0.10$ ,  $0.66 \pm 0.02$  y  $0.55 \pm 0.01$  a 1, 5, 10, 15 y 20 mM de sulfato de zinc, respectivamente, después de siete días de crecimiento. Dado que aún a 20 mM se observó crecimiento importante del micelio del hongo, la CMI es mayor que dicha concentración. Vadkertiova y Slavikova (2006) encontraron que *Pichia anomala* Hansen 1904, *Candida krusei* Berkhot 1923 y *Cryptococcus laurentii* (Kuff.) C. E. Skinner 1950 toleran el zinc a concentraciones superiores de 20 mM, resultado similar al de este trabajo con *A. niger*. Castro-Silva et al. (2003) también observaron tal similitud en cepas de levaduras aisladas de minas de carbón. Por otro lado, Levinskaite (2002) demostró que el índice de crecimiento de *Penicillium atramentosum* Pitt 1980 25SL disminuyó lentamente a partir de 40 mM de zinc, usando sulfato de zinc como fuente del metal. Por su parte, Sintuprapa et al. (2000) sugirieron que el mecanismo de captación de zinc, de ciertas especies de hongos filamentosos, es el intercambio intra y extracelular en forma de precipitación de polifosfatos. El zinc es esencial para todos los organismos, aunque a altas concentraciones puede volverse tóxico (Balsalobre et al., 2003).

La fuente de cromo promovió el crecimiento del hongo en todas las concentraciones evaluadas. Se encontraron índices de tolerancia de  $1.27 \pm 0.06$ ,  $1.49 \pm 0.06$ ,  $1.90 \pm 0.03$ ,  $1.35 \pm 0.01$  y  $1.30 \pm 0.05$  para 1, 5, 10, 15 y 20 mM de dicromato de potasio, respectivamente; es decir, *A. niger* es altamente resistente y la CMI es mayor de 20 mM. En este sentido se requieren más estudios para encontrar la concentración de cromo que inhibe el crecimiento de *A. niger*. Al respecto, Ezzouhri et al. (2009) utilizaron dicromato de potasio, como fuente de cromo, y observaron valores similares de CMI ( $20 \text{ mM} < \text{CMI} < 25 \text{ mM}$ ) para especies de hongos como *Penicillium* sp. (S3S) y *Fusarium* sp. (S5S); mientras que



**Figure 6.** Tolerance index of *Aspergillus niger* at 1, 5, 10, 15 and 20 mM of  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , as a source of the metals Ag, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn and Cr, respectively, after seven days of culture at 28 °C. The standard deviation of the mean is shown on the bars.

**Figura 6.** Índice de tolerancia de *Aspergillus niger* a 1, 5, 10, 15 y 20 mM de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , como fuente de los metales Ag, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn y Cr, respectivamente, después de siete días de cultivo a 28 °C. Sobre las barras se representa la desviación estándar de la media.

Wunch, & Faison, 2002). Biosorption, intracellular uptake and chemical transfer are some of the mechanisms that fungi use to tolerate, accumulate and transform toxic metals, although they can vary depending on the species (Chatterjee, Mukherjee, Sarkar, & Roy, 2012; Dixit et al., 2015). Biosorption is based on the interactions between metals and living or non-living cells (biomass) of microorganisms (Izkandar, Zainudin, & Tan, 2011) and includes ion exchange, chelation, adsorption, crystallization, and precipitation, followed by diffusion through the cell wall (Danesh et al., 2013). In filamentous fungi, the wall is formed by chitin, chitosan, glucans, proteins, lipids and other polysaccharides. This composition confers on the cell wall a large number and variety of functional groups or sites, such as an ion exchange resin. On the other hand, the mechanisms of transfer or chemical transformation are reduction, methylation and dealkylation (Danesh et al., 2013; Gadd, 1993). With this last type of mechanism, it is important to consider the possibility that the product resulting from the transformation, by the action of the microorganisms, is more toxic than the initial form of the metal; this can happen with lead or mercury. This research did not review the production of methylated lead and mercury compounds, but it has been considered to do so in subsequent studies.

para *Penicillium* sp. (S4W), *Penicillium* sp. (S5S), *A. niger* (S5W) y *A. niger* (S5S), los CMI fueron menores:  $12.5 < \text{CMI} < 15$ ,  $15 < \text{CMI} < 20$ ,  $12.5 < \text{CMI} < 15$  y  $10 < \text{CMI} < 12.5$ , respectivamente. La detoxificación del cromo por *A. niger* puede ser mediada por un sistema enzimático antioxidante como peroxidasa, catalasa y peróxido ascorbato (Srivastava & Thakur, 2006).

En general, el patrón de crecimiento del hongo sugiere el desarrollo de tolerancia y adaptación a la presencia de los metales evaluados. Con 1 mM de cada sal metálica, el crecimiento del hongo inició a las 24 h posteriores a la incubación, mientras que, a partir de 5 mM, el crecimiento del hongo inició a las 72 h, lo que implica un alargamiento de la fase de latencia. La Figura 6 ilustra los índices de tolerancia de *A. niger* a las distintas concentraciones evaluadas para cada metal, durante siete días de cultivo. Los metales más tóxicos para el hongo fueron plata, mercurio y cobre, ya que a partir de 10 mM de las sales metálicas no hubo crecimiento, seguidos por el Cd (15 mM). A 20 mM, el crecimiento del hongo solo se observó con las sales de plomo, zinc y cromo.

En este y otros estudios se ha observado que los hongos filamentosos toleran la presencia de metales tóxicos. Por ello, estos microorganismos se consideran

## Conclusions

The results of this research indicate that the filamentous fungus *A. niger*, isolated from a site with industrial activity such as mining, has the capacity to tolerate high metal concentrations. The tolerance level depended on the metal, with cadmium, mercury, silver and copper being the most toxic, while lead, zinc and chromium did not affect the growth of the fungus at the highest evaluated metal salt concentration (20 mM). Therefore, it is suggested that *A. niger* is a promising candidate for the removal of metals in contaminated environments. It is recommended to determine the amount of metals that this fungus can bioaccumulate and transform, as well as to evaluate different culture conditions (temperatures, pH, contact times and metal mix).

## Acknowledgements

The authors thank Sonora State University for the funding granted for carrying out this research through the internal project UES-PII-14-UAH-IAI-04 (2014-2015 period), as well as Denisse Palma, Karen Vargas, Martín Quintero, Melissa Domínguez and Roxana Adriano, scientific summer students of the “2015 Dolphin Program,” for the isolation of the fungus strain, and Eber Addi Quintana Obregón for the technical advice at the beginning of the study.

*End of English version*

## References / Referencias

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S79–S84. Retrieved from <http://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi33.pdf>
- Anand, P., Isar, J., Saran, S., & Saxena, R. K. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97, 1018–1025. doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.046
- Ashraf, R., & Ali, T. A. (2007). Effect of heavy metals on soil microbial community and Mung beans seed germination. *Pakistan Journal of Botany*, 39(2), 629–636. Retrieved from [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39\(2\)/PJB39\(2\)629.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39(2)/PJB39(2)629.pdf)
- Balsalobre, L., De Siloniz, M. I., Valderrama, M. J., Benito, T., Larrea, M. T., & Peinado, J. M. (2003). Occurrence of yeasts in municipal wastes and their behavior in presence of cadmium copper and zinc. *Journal of Basic Microbiology*, 43, 185–193. doi: 10.1002/jobm.200390021
- Bennet, J. W., Wunch, K. G., & Faison, B. D. (2002). *Manual of environmental microbiology: Use of fungi biodegradation*. Washington D.C., USA: ASM Press.

excelentes candidatos para acumular metales en sus micelios y esporas e incluso reducir la toxicidad (Bennet, Wunch, & Faison, 2002). La biosorción, captación intracelular y transferencia química son algunos de los mecanismos que los hongos utilizan para tolerar, acumular y transformar los metales tóxicos, aunque pueden variar según la especie (Chatterjee, Mukherjee, Sarkar, & Roy, 2012; Dixit et al., 2015). La biosorción se basa en las interacciones entre los metales y las células (biomasa) vivas o no vivas de los microorganismos (Izkandar, Zainudin, & Tan, 2011) e incluye intercambio iónico, quelación, adsorción, cristalización y precipitación, seguido por la difusión a través de la pared celular (Danesh et al., 2013). En los hongos filamentosos, la pared está formada por quitina, quitosano, glucanos, proteínas, lípidos y otros polisacáridos. Esta composición le confiere a la pared celular un gran número y variedad de grupos funcionales o sitios, como una resina de intercambio iónico. Por otro lado, los mecanismos de transferencia o transformación química son reducción, metilación y dealquilación (Danesh et al., 2013; Gadd, 1993). Con este último tipo de mecanismos, es importante considerar la posibilidad de que el producto resultante de la transformación, por acción de los microorganismos, resulte más tóxico que la forma inicial del metal; esto puede ocurrir con el plomo o el mercurio. En esta investigación no se revisó la producción de compuestos metilados de plomo y mercurio, pero se ha considerado hacerlo en estudios posteriores.

## Conclusiones

Los resultados de esta investigación indican que el hongo filamentoso *A. niger*, aislado de un sitio con actividad industrial como la minería, tiene la capacidad de tolerar concentraciones altas de metales. El nivel de tolerancia dependió del metal, siendo el cadmio, mercurio, plata y cobre los más tóxicos, mientras que el plomo, zinc y cromo no afectaron el crecimiento del hongo a la concentración de sal metálica más alta evaluada (20 mM). Por lo anterior se sugiere que *A. niger* es un candidato prometedor para la eliminación de metales en ambientes contaminados. Se recomienda determinar la cantidad de metales que este hongo puede bioacumular y transformar, así como evaluar diferentes condiciones de cultivo (temperaturas, pH, tiempos de contacto y mezcla de metales).

## Agradecimientos

A la Universidad Estatal de Sonora por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación a través del proyecto interno con clave UES-PII-14-UAH-IAI-04 (periodo 2014-2015). A Denisse Palma, Karen Vargas, Martín Quintero, Melissa Domínguez y Roxana Adriano, estudiantes del verano científico

- Castro-Silva, M. A., De Souza, L. A. O., Gerchenski, A. V., Jaques, D. B., Rodrigues, A. L., De Souza, P. L., & Rorig, L. R. (2003). Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 45–47. doi: 10.1590/S1517-83822003000500015
- Chatterjee, S., Mukherjee, A., Sarkar, A., & Roy, P. (2012). Biorremediation of lead by lead-resistant microorganisms, isolated from industrial sample. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(3), 290–295. doi: 10.4236/abb.2012.33041
- Danesh, Y. R., Tajbakhsh, M., Goltapeh, E. M., & Varma, A. (2013). Mycoremediation of heavy metals. In E. M. Goltapeh, Y. R. Danesh, & A. Varma (Eds.), *Fungi as bioremediators. Soil Biology* (vol. 32, pp. 245–267). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-33811-3\_11
- Dhawale, S. S., Lane, A. C., & Dhawale, W. (1996). Effects of mercury on the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(5), 825. doi: 10.1007/s001289900120
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., ...Paul D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7, 2189. doi: 10.3390/su7022189
- Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F., & Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 3(2), 035–048. Retrieved from [http://www.academicjournals.org/article/article1380177143\\_Ezzouhri%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380177143_Ezzouhri%20et%20al.pdf)
- Gadd, G. M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124(1), 25–60. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03796.x
- Iram, S., Zaman, A., Iqbal, Z., & Shabbir R. (2013). Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. *Polis Journal of Environmental Studies*, 22(3), 691–697. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/8e80/0b9756b6b298a05c31668bfd2b820361b0b3.pdf>
- Izkandar, N. L., Zainudin, N. A., & Tan, S. G. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 824–830. doi: 10.1016/S1001-0742(10)60475-5
- Jabbari, N. K. A., Faezi, G. M., Khosravan, A., Farahmad, A., & Shakibaie, M. R. (2010). Cadmium bioremediation by metal resistant mutated bacteria isolated from active sludge of industrial effluent. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 7(4), 279–286. Retrieved from <http://www.bioline.org.br/pdf?se10032>
- Joo, J. H., & Hussein, K. A. (2012). Heavy metal tolerance of fungi isolated from contaminated soil. *Korean Journal of Soil Science Fertilized*, 45(4), 565–571. doi: 10.7745/KJSSF.2012.45.4.565
- del “Programa Delfín 2015”, por el aislamiento de la cepa del hongo, y a Eber Addi Quintana Obregón por la asesoría técnica al inicio del estudio.

*Fin de la versión en español*

- Kermasha, S., Pellerin, F., Rovel, B., Goetghebeur, M., & Metche, M. (1993). Purification and characterization of copper metallothioneins from *Aspergillus niger*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(9), 1420–1423. doi: 10.1271/bbb.57.1420
- Krauter, R., Martinelli, K., Williams, S., & Martins, S. (1996). Removal of Cr (VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodegradation*, 7(4), 277–286. doi: 10.1007/BF00115741
- Kurniati, E., Arfarita, N., & Imai, T. (2014). Potential use of *Aspergillus flavus* strain KRP1 in utilization of mercury contaminant. *Procedia Environmental Science*, 20, 254–260. doi: 10.1016/j.proenv.2014.03.032
- Levinskaite, L. (2002). Response of soil fungi to chromium (VI). *Ekologija*, 1, 10–13. Retrieved from <http://elibrary.lt/resursai/LMA/Ekologija/E-10.pdf>
- Low, K. S., Lee, C. K., & Liew, S. C. (2000). Sorption of cadmium and lead from aqueous solution by spent grain. *Process Biochemistry*, 36, 59–64. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00177-1
- Massaccesi, G., Romero, M. C., Cazau, M. C., & Bucszinsky, A. M. (2002). Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(9), 817–820. doi: 10.1023/A:1021282718440
- Mohammadian, E., Babai, A. A., Arzanbu, M., Oustan, S., & Khazaei, S. H. (2017). Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. *Chemosphere*, 185, 290–296. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.022
- Mohammadian, F. M., Soleimani N., Mehrasbi M., Darabian A., Mohammadi, J., & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 13(19), 1-9. doi: 10.1186/s40201-015-0176-0
- Nordberg, G., Fowler, B., & Nordberg, M. (2015). Toxicology of metals: overview, definitions, concepts and trends. In G. Nordberg, B. Fowler, & M. Nordberg (Eds.), *Handbook on the toxicology of metals* (vol. 1, pp. 1–12). San Diego, USA: Elsevier.
- Roane, T. M., & Pepper, L. L. (2000). Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microbial Ecology*, 38, 358–364. doi: 10.1007/s002489901001
- Rhodes, Ch. (2014). Mycoremediation (bioremediation with fungi) – growing mushrooms to clean the earth. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 26(3), 196–198. doi: 10.3184/095422914X14047407349335

- Sáez, V. A., Flórez, V. L., & Cadavid, R. A. (2002). Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad EAFIT*, 128, 33–41. Retrieved from <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/845/753>
- Sanyal, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A., & Sastry, M. (2005). Heavy metal remediation by a fungus as a mean of lead and cadmium carbonate crystals. *Langmuir*, 21, 7220–7224. doi: 10.1021/la047132g
- Servicio Geológico Mexicano (SGM). (2017). Anuario estadístico de la minería mexicana 2016. Retrieved from [http://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/Anuario\\_2015\\_Edicion\\_2016.pdf](http://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/Anuario_2015_Edicion_2016.pdf)
- Singh, H. (2006). *Mycoremediation*. New York, USA: Ed. Wiley-Interscience.
- Sintuprapa, W., Thiravetyan, P., & Tanticharoen, M. (2000). A possible mechanism of Zn<sup>2+</sup> uptake by living cells of *Penicillium* sp. *Biotechnology Letters*, 22, 1709–1712. doi: 10.1023/A:1005688132205
- Srivastava, S., & Thakur, I. S. (2006). Biosorption potency of *Aspergillus niger* for removal of chromium (VI). *Current Microbiology*, 53, 232–237. doi: 10.1007/s00284-006-0103-9
- Vadkertiova, R., & Slavikova, E. (2006). Metal tolerance of yeasts isolated from water. *Journal Basic of Microbiology*, 46(2), 145–152. doi: 10.1002/jobm.200510609
- Verma, T., Srinath, T., Gadpayle, R. U., Ramteke, P. W., Hans, R. K., & Garg, S. K. (2001). Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. *Bioresource Technology*, 78, 31–35. doi: 10.1016/S0960-8524(00)00168-1