

Toxic metal tolerance of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus nidulans* isolated from tailings

Tolerancia de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus nidulans* a metales tóxicos

Ana G. Villalba-Villalba*; Lerma H. Chan-Chan; Amir Maldonado-Arce

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

*Corresponding author: anagloria.villalba@unison.mx; tel.: +52 662 259 2108 ext. 2211.

Abstract

Introduction: Metals are found naturally in the environment, but their indiscriminate use has caused serious pollution problems.

Objective: Two species of *Aspergillus* were isolated and identified from tailings, then their tolerance index at different concentrations of several metals was evaluated.

Materials and methods: Fungi were isolated from tailings located in the Sonoran Desert. Fungal growth was evaluated in the presence of Cr⁶⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Ag⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ and Hg²⁺ metals using the tolerance index and minimum inhibitory concentration (MIC).

Results and discussion: *A. flavus* had very high tolerance indices to Cr⁶⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ at all concentrations evaluated (>20 mM); it also had a high tolerance index to the other metals at lower concentrations. The MIC for this fungus in the presence of Cd²⁺, Hg²⁺ and Ag⁺ was recorded between 5 and 10 mM. The growth of *A. nidulans* was not inhibited with 20 mM of Cr⁶⁺. The MIC of *A. nidulans* in presence of Hg²⁺, Ag⁺ and Cu²⁺ is in the range 1-5 mM; with Cd²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ it is in the range between 15 and 20 mM. The dose-response curves display a characteristic sigmoidal shape. With Ag⁺ and Cu²⁺ *A. flavus* displayed a hermetic behavior.

Conclusion: High metal tolerance of these fungi suggests their potential use in the removal of metals.

Keywords: Sonoran Desert; contamination of soil; metal toxicity; mining; filamentous fungi.

Resumen

Introducción: Los metales se encuentran en forma natural en el medio ambiente, pero el uso indiscriminado de estos ha causado problemas graves de contaminación.

Objetivo: Dos especies de *Aspergillus* se aislaron e identificaron a partir de jales mineros; posteriormente, el índice de tolerancia de los hongos se evaluó a concentraciones de varios metales.

Materiales y métodos: Los hongos se aislaron de jales mineros ubicados en el desierto de Sonora. El crecimiento fúngico se evaluó en presencia de los metales Cr⁶⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Ag⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ y Hg²⁺ mediante el índice de tolerancia y concentración mínima inhibitoria (CMI).

Resultados y discusión: *A. flavus* tuvo índices de tolerancia muy elevados a Cr⁶⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺ en todas las concentraciones evaluadas (>20 mM); también presentó un índice alto de tolerancia a los demás metales en concentraciones más bajas. La CMI para este hongo en presencia de Cd²⁺, Hg²⁺ y Ag⁺ se registró entre 5 y 10 mM. El crecimiento de *A. nidulans* no se inhibió con 20 mM de Cr⁶⁺. La CMI de *A. nidulans* en presencia de Hg²⁺, Ag⁺ y Cu²⁺ estuvo en el rango de 1 a 5 mM; con Cd²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺ se encontró entre 15 y 20 mM. Las curvas dosis-respuesta mostraron una forma sigmoidal característica. Con Ag⁺ y Cu²⁺, *A. flavus* tuvo un comportamiento de hormesis.

Conclusión: Debido a la alta tolerancia de *A. nidulans* y *A. flavus* se sugiere su uso potencial para la eliminación de metales.

Palabras clave: Desierto de Sonora; contaminación del suelo; toxicidad por metales; minería; hongos filamentosos.

Introduction

Metals are natural constituents of the environment. However, indiscriminate use in industrial activities has caused an alteration of their geochemical cycles and biochemical balance (Dixit et al., 2015). This is due to the excessive release of materials such as cadmium, lead, copper, chromium, zinc, arsenic, and mercury, among others. These metals cannot be broken down into non-toxic forms and they tend to accumulate in living organisms. Contamination of soil and water by these metals has become one of the main health problems in the world.

Some metals are toxic even at very low concentrations; some are carcinogenic and mutagenic (Nordberg, Fowler, & Nordberg, 2015). Within this group, arsenic, lead and cadmium are the most toxic substances for the environment and human health (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2019). Moreover, it has been found that soil contamination by metals is a serious problem for agriculture because it negatively affects the yield and quality of crops (Danesh, Tajbakhsh, Goltapeh, & Varma, 2013). The main sources of metals are anthropogenic activities, such as the manufacture of pesticides and batteries, tanning and mining. Mining is the activity which contributes more to soil and water contamination by toxic metals (Fan et al., 2008).

There are several physicochemical methodologies devised to remove metals from the environment. These include chemical precipitation, oxidation-reduction, ion exchange, reverse osmosis, membrane technology, evaporation, and electrochemical treatments. The main disadvantage of these methods is that they are very expensive and inefficient when metal concentrations are very low (for instance less than $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in water) (Ahluwalia & Goyal 2007). Therefore, it is crucial to search for less expensive strategies that help to reduce the presence of toxic metals in soils and water. In this sense, filamentous fungi have been considered for biotechnological processes that allow reducing the presence of these pollutants in the environment (Bennet, Wunch, & Faison, 2002). It has been seen that sites contaminated with toxic metals are usually a source of filamentous fungi tolerant to these substances. Toxic metal tolerance is considered as the ability of an organism to survive in the presence of toxic metals using a response mechanism (Oladipo, Awotoye, Olayinka, Bezuidenhout, & Maboeta, 2018).

Aspergillus and *Penicillium* species have been shown to be the most tolerant to toxic metals (Ezzouhri, Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009; Mohammadian, Ahari, Arzanlou, Oustan, & Khazaei, 2017; Oladipo et al., 2018). Also these are the species most common in

Introducción

Los metales son componentes naturales del medio ambiente; sin embargo, el uso indiscriminado de estos en actividades industriales ha provocado la alteración de los ciclos geoquímicos y del equilibrio bioquímico (Dixit et al., 2015). Esto se debe a la liberación excesiva de materiales como cadmio, plomo, cobre, cromo, zinc, arsénico y mercurio, entre otros. Estos metales no pueden ser degradados a formas no tóxicas y tienden a acumularse en los organismos vivos. La contaminación del suelo y agua por estos metales se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en el mundo.

Algunos metales son tóxicos, incluso en concentraciones muy bajas; varios son cancerígenos y mutagénicos (Nordberg, Fowler, & Nordberg, 2015). El arsénico, el plomo y el cadmio son las sustancias más tóxicas para el medio ambiente y la salud humana (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2019). Además, se ha comprobado que la contaminación del suelo por metales es un problema grave para la agricultura porque afecta negativamente el rendimiento y la calidad de las cosechas (Danesh, Tajbakhsh, Goltapeh, & Varma, 2013). Las fuentes principales de metales son las actividades antropogénicas como la fabricación de pesticidas y baterías, el curtido y la minería. Esta última es la actividad que más contribuye a la contaminación del suelo y agua por metales tóxicos (Fan et al., 2008).

Existen varias metodologías fisicoquímicas ideadas para la eliminación de los metales del medio ambiente. Entre ellas se encuentran la precipitación química, la oxidación-reducción, el intercambio de iones, la ósmosis inversa, la tecnología de membranas, la evaporación y los tratamientos electroquímicos. El principal inconveniente de estos métodos es que son muy caros e ineficaces cuando las concentraciones de metales son muy bajas (por ejemplo, menos de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en agua) (Ahluwalia & Goyal 2007). Por tanto, es fundamental buscar estrategias menos costosas que ayuden a la reducción de metales tóxicos en los suelos y el agua. En este sentido, los hongos filamentosos han sido considerados en los procesos biotecnológicos para reducir la presencia de contaminantes en el medio ambiente (Bennet, Wunch, & Faison, 2002). Se ha visto que los lugares contaminados con metales tóxicos suelen ser una fuente de hongos filamentosos tolerantes a estas sustancias. La tolerancia a los metales tóxicos se considera como la capacidad de un organismo para sobrevivir en presencia de estos, utilizando algún mecanismo de respuesta (Oladipo, Awotoye, Olayinka, Bezuidenhout, & Maboeta, 2018).

Las especies *Aspergillus* y *Penicillium* han demostrado ser las más tolerantes a los metales tóxicos (Ezzouhri,

arid or semiarid regions (Mouchacca, 2005; Oliveira, Cavalcanti, Fernandes, & Lima, 2013). Tolerance depends on factors such as the fungus species, metal and concentration of the contaminant, although environmental factors also influence it (Rose & Devi, 2018). In this work, two species of *Aspergillus* were isolated and identified from a mine soil located in a semiarid region, then their tolerance index to metals was evaluated.

Materials and methods

Samples and reagents

Tailings samples (15 cm depth) were collected from a gold mine located in Sonoran Desert, Mexico (110° 34' 32.84" W, 28° 48' 11.52" N) during the summer (June) of 2017. The climate is hot and dry, with temperatures often reaching 50 °C during the day, with a mean annual temperature of 24 °C and 450 mm of precipitation rates (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2020). This site has been identified as contaminated soil with toxic metals (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2017). Samples (100 g) were collected according to standard methods for contaminated soils (United States Environmental Protection Agency [USEPA], 1991) at five points within a surface area of 1 ha. The samples were deposited in sterile containers and transported to the laboratory for analysis. Metal salts (AgNO_3 , CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CuSO_4 , HgCl_2 , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) were used as source of toxic metals: Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} . Potato dextrose agar (PDA, Difco™) was used as culture medium.

Tailings composition analysis

The composition of metals (elemental analysis) in tailings samples was determined by energy dispersive spectroscopy (EDS) through transmission electron microscopy (TEM). The samples were dried overnight at 60 °C and examined using a nickel rack (samples holder). Elemental analysis was performed using a Field Emission Electron Microscopy JEM-2010F.

Isolation of fungal strains from contaminated soil

Samples of 1 g of tailings were deposited in 100 mL of distilled sterilized water; the mixture was stirred for 20 min at 25 °C and serial dilutions were made (10^{-1} to 10^{-4}). After taking 100 μL aliquots of each dilution, they were placed in Petri dishes with PDA and incubated at 28 °C for seven days. The developed colonies were selected, and the sowing procedure was repeated in Petri dishes with PDA, until the isolation and purification of fungal strain was achieved.

Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009; Mohammadian, Ahari, Arzanlou, Oustan, & Khazaei, 2017; Oladipo et al., 2018). También son las especies más comunes en regiones áridas o semiáridas (Mouchacca, 2005; Oliveira, Cavalcanti, Fernandes, & Lima, 2013). La tolerancia depende de factores como la especie de hongo, el metal y la concentración del contaminante, aunque también influyen factores ambientales (Rose & Devi, 2018). En este trabajo se aislaron e identificaron dos especies de *Aspergillus* de un suelo minero ubicado en una región semiárida, luego se evaluó el índice de tolerancia a los metales.

Materiales y métodos

Muestras y reactivos

Las muestras de jales mineros (15 cm de profundidad) se recolectaron en una mina de oro situada en el desierto de Sonora, México (110° 34' 32.84" O, 28° 48' 11.52" N) durante el verano (junio) del 2017. El clima es cálido y seco con temperaturas que a menudo alcanzan 50 °C durante el día, temperatura media anual de 24 °C y 450 mm de tasas de precipitación (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2020). Este sitio se ha identificado como suelo contaminado con metales tóxicos (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2017). Las muestras (100 g) se colectaron de acuerdo con los métodos estándar para suelos contaminados (United States Environmental Protection Agency [USEPA], 1991) en cinco puntos dentro de una superficie de 1 ha. Las muestras se depositaron en contenedores estériles y se trasladaron al laboratorio para su análisis. Se utilizaron sales metálicas (AgNO_3 , CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CuSO_4 , 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 tóxicos Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} . El agar papa dextrosa (PDA, Difco™) se utilizó como medio de cultivo.

Composición de los jales mineros

La composición de los metales (análisis elemental) en las muestras de jales mineros se determinó mediante espectroscopia de dispersión de energía (EDS) a través de microscopía electrónica de transmisión (MET). Las muestras se secaron durante la noche a 60 °C y se examinaron utilizando una gradilla de níquel (soporte de muestras). El análisis elemental se realizó con un microscopio electrónico de emisión de campo JEM-2010F.

Aislamiento de cepas fúngicas de suelos contaminados

Muestras de 1 g de suelo de la mina (jales) se vertieron en 100 mL de agua destilada esterilizada; la mezcla se

Preparation of isolated spore suspension

Each isolated colony was inoculated separately in 250 mL Erlenmeyer flasks, which contained 50 mL of PDA, and were incubated for seven days at 28 °C. Subsequently, 100 mL of distilled water was added at room temperature and carefully stirred for 5 min with a magnetic stirrer. The spore count was performed with a Neubauer chamber. A suspension of approximately 10^8 conidia·mL⁻¹ were prepared to make inoculates in culture medium supplemented with the toxic metals to be evaluated.

Fungus inoculation

Each metal salt was prepared individually at a concentration of 1 mM. In the center of these Petri plates, containing solidified PDA, the spore suspension (10^8) was deposited in an orifice to obtain colonies of circular shape. Petri plates were incubated at 28 °C and at seven days after inoculation the radius of the colonies was measured; all tests were performed in triplicate.

Identification of isolated fungi

The strains of isolated fungi were identified based on main morphological characteristics 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 and conidiophore. In addition, the identification of the strains was complemented by 18S rRNA gene amplification according to the method described by White, Burns, Lee, and Taylor (1990). A partial sequence of the 18S rRNA gene was amplified using primers ITS1 and ITS4. The result of the 18S rRNA gene sequence was compared with those available in the GenBank public databases (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tolerance index

Fungal tolerance to the studied metals was evaluated by comparing the mycelium radii in culture medium with and without the respective metal (Valix, Tang, & Malik, 2001). The tolerance index is defined as mycelium radius with metal (cm)/mycelium radius without metal (cm).

Different metal salt concentrations were used (1, 5, 10, 15 and 20 mM) according to a multi-level categorical full factorial experimental design. The inocula of approximately 10^8 spores·mL⁻¹ were prepared in PDA culture medium. Inoculated plates were incubated at 28 °C for seven days. The tolerance index was determined on exponential phase of growth.

agitó durante 20 min a 25 °C y se hicieron diluciones en serie (10^{-1} a 10^{-4}). De cada dilución se tomaron alícuotas de 100 µL y se colocaron en placas de Petri con PDA e incubaron a 28 °C durante siete días. Las colonias desarrolladas se seleccionaron y se repitió el procedimiento de siembra en placas de Petri con PDA hasta lograr el aislamiento y la purificación de la cepa fúngica.

Preparación de la suspensión de esporas aisladas

Cada colonia aislada se inoculó por separado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de PDA y se incubaron durante siete días a 28 °C. Posteriormente, se añadieron 100 mL de agua destilada a temperatura ambiente y las esporas se removieron cuidadosamente durante 5 minutos con un agitador magnético. El recuento de esporas se realizó con una cámara Neubauer. Se preparó una suspensión de aproximadamente 10^8 conidios·mL⁻¹ para hacer inóculos en medio de cultivo suplementado con los metales tóxicos a evaluar.

Inoculación de hongos

Las sales metálicas se prepararon por separado a una concentración de 1 mM. En el centro de las placas de Petri con PDA solidificado se depositó la suspensión de esporas (10^8) en un orificio para obtener colonias de forma circular. Las placas de Petri se incubaron a 28 °C y a los siete días de la inoculación se midió el radio de las colonias; todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Identificación de los hongos aislados

Las cepas de los hongos aislados se identificaron con base en las principales características morfológicas de las colonias, considerando características macroscópicas como el color, forma y tipo de colonia, así como las estructuras microscópicas más importantes como las esporas y el conidióforo. Además, la identificación de las cepas se complementó con la amplificación del gen 18S rRNA según el método descrito por White, Burns, Lee, y Taylor (1990). Se amplificó una secuencia parcial del gen 18S rRNA utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4. El resultado de la secuencia del gen 18S rRNA se comparó con los disponibles en las bases de datos públicas del GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Índice de tolerancia

La tolerancia fúngica a los metales se evaluó comparando los radios del micelio en el medio de cultivo con y sin el metal respectivo (Valix, Tang, & Malik, 2001). El índice de tolerancia se define como el

Minimum inhibitory concentrations and dose-response behavior

The minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration at which a substance inhibits the growth of a microorganism (Rose & Devi, 2018). In this studio, the minimum inhibitory concentrations were obtained from the tolerance index experiments. Curves of dose (metal concentration)-response (tolerance index) behavior for each metal were obtained (Ezzouhri et al., 2009).

Statistical analysis

Data was analyzed by means of parametrical and non-parametrical methods of uni-variate statistical analysis. The normal distribution of data and homogeneity of variance were checked using the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. The influence of factors was evaluated by analysis of variance (One-way ANOVA) with *post hoc* Scheffé test. Significance was defined as $P < 0.01$. Results are presented as mean \pm the standard deviation from the mean ($n = 3$). Results were also analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA method. OriginLab software 8.0 (OriginLab Corporation, 2008) was used for statistical analysis.

Results

Elemental composition of tailings

The elemental composition obtained by TEM-EDS indicate the presence of 13 elements (O, Si, Al, Mg, S, Ca, Fe, K, Ni, Zn, Mn, Pb and As) in tailings sample. The presence of Pb, As and Mn stands out due to their potential toxicity to a great diversity of living organisms, from microorganisms to human. According to the TEM-EDS analysis, they are found in a proportion of 0.14, 0.11 and 0.10 %, respectively (Table 1).

Fungi isolation and identification of tolerant strains

Fungal strains tolerant to toxic metals (1 mM Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+}) were isolated from the mining tailing samples. The strains were identified morphologically (Figures 1 and 2) and genotypically.

Filamentous fungi were identified as *Aspergillus flavus* (Accession no. MN031598.1) and *Aspergillus nidulans* (Accession no. LM653124.1) based on molecular data according to the search in GenBank BLAST, with 96.74 % and 99.81 % similarity, respectively (BLAST, 2020). The length of the ITS4 sequence of the 18S RNA gene was 576 bp for *A. flavus* and 1 110 bp for *A. nidulans*.

The main macro and microscopic morphological characteristics of *A. flavus* are shown in Figure 1. The

radio del micelio con metal (cm)/radio del micelio sin metal (cm).

Varias concentraciones de sales metálicas (1, 5, 10, 15 y 20 mM) se utilizaron de acuerdo con el diseño experimental factorial completo categórico de varios niveles. Inóculos de aproximadamente 10^8 esporas·mL⁻¹ se prepararon en medio de cultivo PDA. Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C durante siete días. El índice de tolerancia se determinó en la fase exponencial de crecimiento.

Concentraciones mínimas inhibitorias y comportamiento dosis-respuesta

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja a la que una sustancia inhibe el crecimiento de un microorganismo (Rose & Devi, 2018). En este estudio, las concentraciones mínimas inhibitorias se obtuvieron a partir de los experimentos de índice de tolerancia. Las curvas de comportamiento dosis (concentración de metal)-respuesta (índice de tolerancia) se obtuvieron para cada metal (Ezzouhri et al., 2009).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante métodos paramétricos y no paramétricos del análisis univariado. La distribución normal de los datos y la homogeneidad de la varianza se comprobaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. La influencia de los factores se evaluó mediante el análisis de la varianza de una vía con la prueba *post hoc* de Scheffé. La significancia se definió como $P < 0.01$. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar ($n = 3$). Los resultados también se analizaron mediante el método ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. El *software* OriginLab 8.0 (OriginLab Corporation, 2008) se utilizó para el análisis estadístico.

Resultados

Composición elemental de los jales mineros

La composición elemental obtenida por MET-EDS indica la presencia de 13 elementos (O, Si, Al, Mg, S, Ca, Fe, K, Ni, Zn, Mn, Pb y As) en la muestra de jales mineros. La presencia de Pb, As y Mn destaca por su potencial toxicidad para una gran diversidad de organismos, desde microorganismos hasta el ser humano; según el análisis MET-EDS, se encuentran en una proporción de 0.14, 0.11 y 0.10 %, respectivamente (Cuadro 1).

Aislamiento fúngico e identificación de cepas tolerantes

Las cepas fúngicas tolerantes a los metales tóxicos (1 mM de Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+}) se

Table 1. Elemental composition of a mineral soil sample determined by transmission electron microscopy-energy dispersive spectroscopy (TEM-EDS).

Cuadro 1. Composición elemental de la muestra de suelo minero (jales), determinada por microscopía electrónica de transmisión-espectroscopía de dispersión de energía (MET-EDS).

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

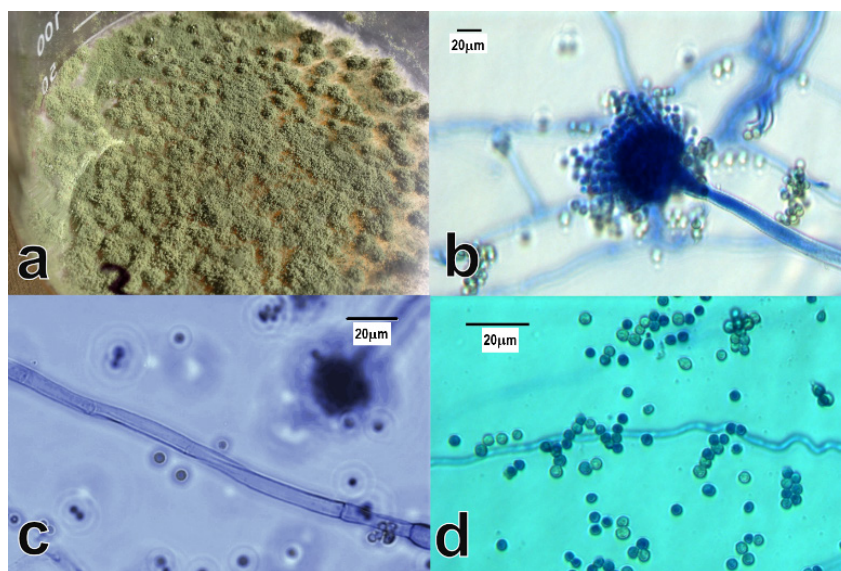


Figure 1. Macro and microscopic morphological characteristics of *Aspergillus flavus* isolated from mining soil. a) Mycelium, b) Conidiophore, c) Hypha, d) Conidia.

Figura 1. Características morfológicas macro y microscópicas de *Aspergillus flavus* aislado de suelo minero. a) Micelio, b) conidióforo, c) hifa y d) conidios.

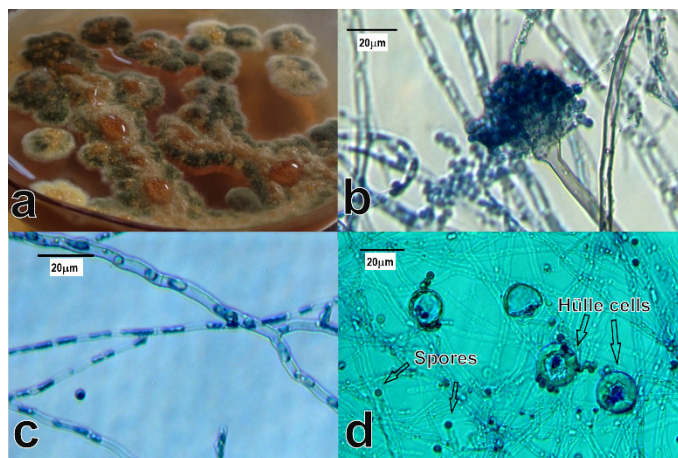


Figure 2. Macro and microscopic morphological characteristics of *Aspergillus nidulans* isolated from mining soil. a) Mycelium, b) Conidiophore, c) Hyphae, d) Conidia and Hülle cells.

Figura 2. Características morfológicas macro y microscópicas de *Aspergillus nidulans* aislado de suelos mineros. a) Micelio, b) conidióforo, c) hifas y d) conidios y células Hülle.

colonies grew rapidly at 28 °C, an initially white mycelium (first two days) turned green on the fifth day (Figure 1a). The conidiophores (Figure 1b) were 250 µm long; the spherical vesicles were completely covered by conidia and conidial biserial head. Additionally, branched mycelium with septate, hyaline hyphae (Figure 1c) with a diameter greater than 1 µm and abundant globose conidia with size of 2.5 to 3 µm (Figure 1d) were observed. These morphological characteristics are consistent with those previously reported for *A. flavus* (Iheanacho et al., 2014).

The macroscopic characteristic of the *A. nidulans* colonies were slightly different from those of *A. flavus* (Figure 2). During the first 48 h at 28 °C, the mycelium displayed a yellowish appearance; it turned dark green after five to seven days (Figure 2a). The conidiophores were 150 µm long, the spherical vesicles were partially covered (three quarters of their area) by the conidia (Figure 2b). On the other hand, the mycelium was branched with septate and hyaline hyphae (Figure 2c). The globose conidia were 2.5 to 3 µm in diameter. In addition, *A. nidulans* presented abundant Hülle cells which are a type of cells related to the formation of cleistothecia (closed spore-bearing structures), that produce certain species of *Aspergillus* (Figure 2d). The observed, morphological characteristics were consistent with those previously reported for *A. nidulans* (Chen et al., 2016; Larone, 2011).

Minimum inhibitory concentration of tolerant strains

MIC is defined as the lowest concentration of some substance (metals in this study) that inhibits the growth of a microorganism (Ezzouhri et al., 2009). MIC's for *A. flavus* and *A. nidulans* are summarized in

aislaron de las muestras de jales mineros. Las cepas se identificaron morfológicamente (Figuras 1 y 2) y genótipicamente.

Los hongos filamentosos se identificaron como *Aspergillus flavus* (núm. de registro MN031598.1) y *Aspergillus nidulans* (núm. de registro LM653124.1) con base en los datos moleculares, según la búsqueda en GenBank BLAST, con 96.74 % y 99.81 % de similitud, respectivamente (BLAST, 2020). La longitud de la secuencia ITS4 del gen ARN 18S fue de 576 pb para *A. flavus* y 1 110 pb para *A. nidulans*.

Las principales características morfológicas macro y microscópicas de *A. flavus* se muestran en la Figura 1. Las colonias crecieron rápidamente a 28 °C; el micelio inicialmente blanco (primeros dos días) se volvió verde al quinto día (Figura 1a). Los conidióforos (Figura 1b) tuvieron una longitud de 250 µm; las vesículas esféricas fueron completamente cubiertas por conidios y la cabeza biseriada de los conidios. Además, se observó un micelio ramificado con hifas hialinas y septadas (Figura 1c) con un diámetro superior a 1 µm y conidios globosos abundantes con un tamaño de 2.5 a 3 µm (Figura 1d). Estas características morfológicas son consistentes con las reportadas anteriormente para *A. flavus* (Iheanacho et al., 2014).

Las características macroscópicas de las colonias de *A. nidulans* fueron ligeramente diferentes de las de *A. flavus* (Figura 2). Durante las primeras 48 h, a 28 °C, el micelio mostró un aspecto amarillento que se volvió verde oscuro después de cinco a siete días (Figura 2a). Los conidióforos midieron 150 µm y las vesículas esféricas fueron parcialmente cubiertas (tres cuartas partes de la superficie) por conidios (Figura 2b). Por otro lado, el micelio fue ramificado con hifas hialinas y septadas

Table 2. The most toxic metals for *A. flavus* were Ag^+ , Cd^{2+} and Hg^{2+} ; in these cases, the MIC was between 5 and 10 mM. The MIC with Cu^{2+} was between 15 and 20 mM. Interestingly, the growth of *A. flavus* was not inhibited at the highest concentration (20 mM) of Pb^{2+} , Zn^{2+} and Cr^{6+} . On the other hand, the metals that most easily inhibited *A. nidulans* were Ag^+ , Cu^{2+} and Hg^{2+} ($1 < \text{MIC} < 5$), while the MIC for Cd^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} was between 15 and 20 mM and with Cr^{6+} fungus growth was not inhibited at the higher concentration tested (20 mM).

Dose-response behavior

In ecotoxicological studies, dose-response relationships are fundamental for the understanding of the capacity of organisms to tolerate toxic exposures to chemical, biological, and physical agents (Agathokleous & Calabrese, 2019). In this study, the tolerance index (response) was used for assessing the behavior of the studied fungi at different doses of toxic metals. Results of statistical analysis can be observed in the dose-response graphs for each metal in Figures 3 to 5.

According to Oladipo et al. (2018), metal tolerance index for fungi can be classified as follows: ≥ 1 very high metal tolerance, 0.8-0.99 high metal tolerance, 0.6-0.79 moderate metal tolerance, 0.4-0.59 low metal tolerance and 0.0-0.39 very low metal tolerance. Based on this, *A. flavus* showed very high tolerance to the metals Cr^{6+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} at all the concentrations evaluated, since all tolerance index values were greater than 1 (Figure 3). In addition, significant differences were observed between the control and different concentrations of metals. At 1, 5, 10 and 15 mM of Cu^{2+} , the tolerance index of *A. flavus* was very high (Figure 4). The values

(Figura 2c). Los conidios globosos midieron entre 2.5 y 3 μm de diámetro. Además, *A. nidulans* presentó abundantes células Hülle, células relacionadas con la formación de cleistotecios (estructuras cerradas portadoras de esporas) producidas por ciertas especies de *Aspergillus* (Figura 2d). Las características morfológicas fueron consistentes con las reportadas previamente para *A. nidulans* (Chen et al., 2016; Larone, 2011).

Concentración mínima inhibitoria de cepas tolerantes

La CMI se define como la menor concentración de alguna sustancia (metales en este caso) que inhibe el crecimiento de un microorganismo (Ezzouhri et al., 2009). Las CMI para *A. flavus* y *A. nidulans* se resumen en el Cuadro 2. Los metales más tóxicos para *A. flavus* fueron Ag^+ , Cd^{2+} and Hg^{2+} ; en estos casos, la CMI fue entre 5 y 10 mM. La CMI con Cu^{2+} se registró entre 15 y 20 mM. Curiosamente, el crecimiento de *A. flavus* no se inhibió con la concentración más alta (20 mM) de Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cr^{6+} . Por otro lado, los metales que inhibieron más fácilmente a *A. nidulans* fueron Ag^+ , Cu^{2+} y Hg^{2+} ($1 < \text{CMI} < 5$), mientras que la CMI para Cd^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} se situó entre 15 y 20 mM y con Cr^{6+} el crecimiento del hongo no se inhibió con la concentración más alta evaluada (20 mM).

Comportamiento dosis-respuesta

En estudios ecotoxicológicos, las relaciones dosis-respuesta son fundamentales para entender la capacidad de los organismos con tolerancia a exposiciones tóxicas frente a agentes químicos, biológicos y físicos (Agathokleous & Calabrese, 2019). En este estudio se utilizó el índice de tolerancia (respuesta) para evaluar el

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of *Aspergillus flavus* and *A. nidulans* at concentrations 1, 5, 10, 15 and 20 mM of AgNO_3 , CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CuSO_4 , 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.

Cuadro 2. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de *Aspergillus flavus* y *A. nidulans* a concentraciones 1, 5, 10, 15 y 20 mM de AgNO_3 , CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CuSO_4 , 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 metales.

Metal	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
Ag^+	5 < MIC < 10	1 < MIC < 5
Cd^{2+}	5 < MIC < 10	15 < MIC < 20
Cr^{6+}	MIC > 20	MIC > 20
Cu^{2+}	10 < MIC < 15	1 < MIC < 5
Hg^{2+}	5 < MIC < 10	1 < MIC < 5
Pb^{2+}	MIC > 20	15 < MIC < 20
Zn^{2+}	MIC > 20	15 < MIC < 20

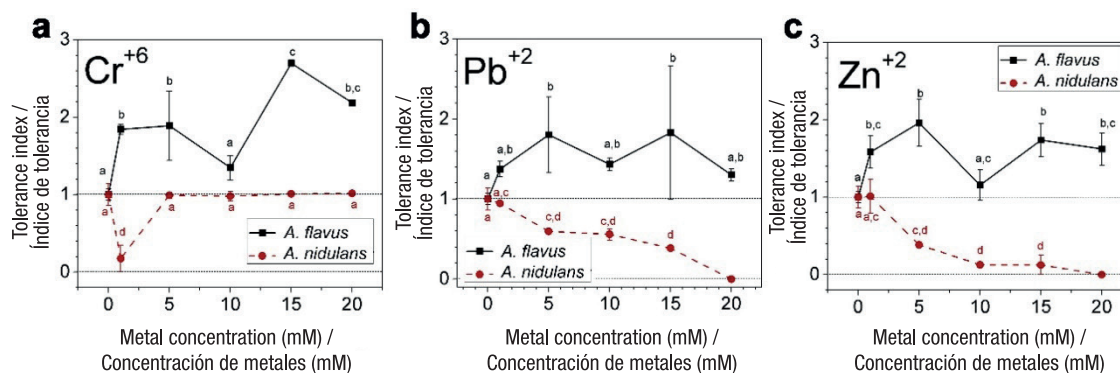


Figure 3. Dose-response behavior of *Aspergillus flavus* and *A. nidulans*. Tolerance indices with different letters denote significant differences ($P < 0.01$) between metal concentrations (One-way ANOVA with Scheffé *post hoc* testing and non-parametrical Kruskal-Wallis testing).

Figura 3. Comportamiento dosis-respuesta de *Aspergillus flavus* y *A. nidulans*. Índices de tolerancia con letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.01$) entre concentraciones de metal (ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Scheffé y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis).

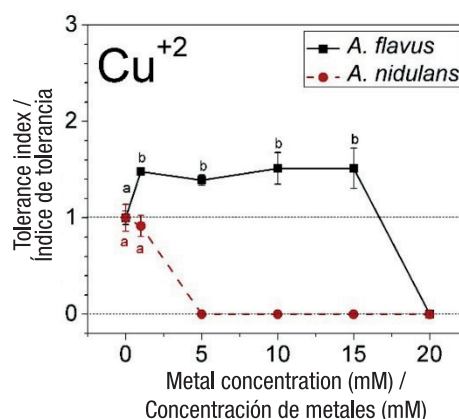


Figure 4. Dose-response behavior of *Aspergillus flavus* and *A. nidulans*. Tolerance indices with different letters denote significant differences ($P < 0.01$) between metal concentrations (One-way ANOVA with Scheffé *post hoc* testing and non-parametrical Kruskal-Wallis testing).

Figura 4. Comportamiento dosis-respuesta de *Aspergillus flavus* y *A. nidulans*. Índices de tolerancia con letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.01$) entre concentraciones de metal (ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Scheffé y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis).

are statistically equal, although there are significant differences to the control sample. Only the highest concentration of copper (20 mM) inhibited the growth of *A. flavus*.

The tolerance index with Ag^+ , Cd^{2+} and Hg^{2+} was very high only at 1 and 5 mM (Figure 5). The fungus no longer grew at higher concentrations of these metals. The statistical analysis showed significant differences between the tolerance index of *A. flavus* at 1 and 5 mM of Ag^+ respect to control (Figure 5a).

On the other hand, *A. nidulans* displayed a different behavior, with very high or high tolerance index to Cu^{2+} , Ag^+ and Hg^{2+} at 1 mM (Figure 5). At higher

comportamiento de los hongos estudiados ante varias dosis de metales tóxicos. Los resultados del análisis estadístico se pueden observar en los gráficos dosis-respuesta para cada metal en las Figuras 3 a 5.

De acuerdo con Oladipo et al. (2018), el índice de tolerancia a los metales para los hongos se puede clasificar de la siguiente manera: ≥ 1 tolerancia muy alta, 0.8-0.99 tolerancia alta, 0.6-0.79 tolerancia moderada, 0.4-0.59 tolerancia baja y 0.0-0.39 tolerancia muy baja. Con base en esto, *A. flavus* mostró tolerancia muy alta a los metales Cr^{6+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} en las concentraciones evaluadas, ya que todos los valores del índice de tolerancia fueron superiores a 1 (Figura 3); además, se observaron diferencias significativas entre el control

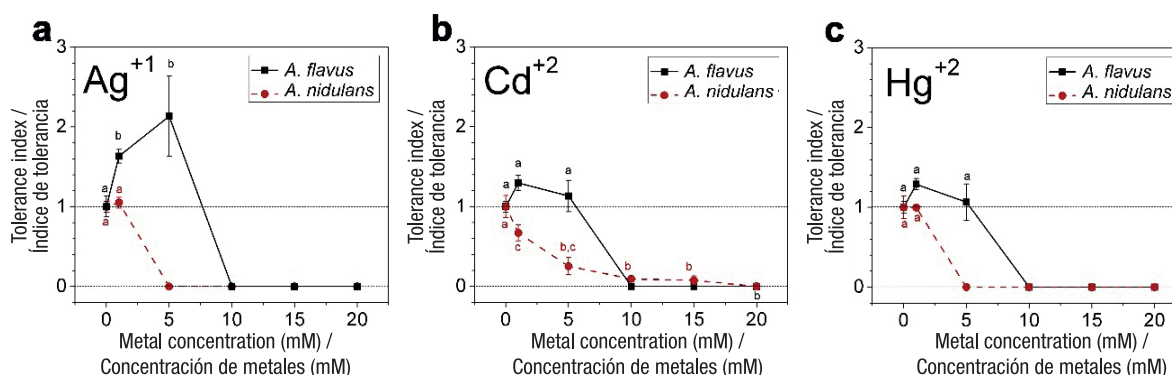


Figure 5. Dose-response behavior of *Aspergillus flavus* and *A. nidulans*. Tolerance indices with different letters denote significant differences ($P < 0.01$) between metal concentrations (One-way ANOVA with Scheffé *post hoc* testing and non-parametrical Kruskal-Wallis testing).

Figura 5. Comportamiento dosis-respuesta de *Aspergillus flavus* y *A. nidulans*. Índices de tolerancia con letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.01$) entre concentraciones de metal (ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Scheffé y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis).

concentrations, the tolerance index decreased abruptly. In presence of Pb^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} the tolerance at 1 mM was very high to moderate, decreasing gradually until the complete inhibition of growth at 20 mM (Figure 3).

Discussion

Tolerant fungus species

Our research shows that the two fungal strains, isolated from the same contaminated source, developed different levels of resistance to toxic metals. The high and moderate tolerance of the strains to the metals evaluated is relevant, since lead, mercury, cadmium, and chromium have been classified as priority substances due to their toxic characteristics (ATSDR, 2019).

Soil contains microbial communities of great diversity, particularly fungi found mainly in the upper 10 cm. According to reports of fungi isolated from soil, species of genera *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Geotrichum* predominate. They have a cosmopolite distribution (Ezzouhri et al., 2009; Jiang, Wang, Xue, Cao, & Zhang, 2016; Mohammadian et al., 2017; Oladipo et al., 2018). However, the mycological diversity in environments with presence of toxic substances is usually poor than in healthy environments. In the present work only the *Aspergillus* genus was found.

The presence and success of an organism in an ecosystem depend both on its nutritional needs and on its environmental tolerance. The limits of tolerance to specific stressors are those that largely determine the inhabitants in extreme environments, including those contaminated with toxic substances. Some

y las concentraciones de metales. A 1, 5, 10 y 15 mM de Cu^{2+} , el índice de tolerancia de *A. flavus* fue muy alto (Figura 4). Los valores fueron estadísticamente iguales, aunque existen diferencias significativas con la muestra control. Solo la mayor concentración de cobre (20 mM) inhibió el crecimiento de *A. flavus*.

El índice de tolerancia al Ag^+ , Cd^{2+} y Hg^{2+} fue muy alto solo con 1 y 5 mM (Figura 5). *Aspergillus flavus* y *A. nidulans* dejaron de crecer con concentraciones más altas de estos metales. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el índice de tolerancia de *A. flavus* a 1 y 5 mM de Ag^+ en comparación con el control (Figura 5a).

Por otro lado, *A. nidulans* mostró un comportamiento diferente con un índice de tolerancia muy alto a 1 mM de Cu^{2+} , Ag^+ y Hg^{2+} (Figura 5), el cual disminuyó bruscamente hasta la inhibición con el resto de las concentraciones. En presencia de Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} , la tolerancia con 1 mM fue de muy alta a moderada, disminuyendo gradualmente hasta la inhibición completa del crecimiento a 20 mM (Figura 3).

Discusión

Especies de hongos tolerantes

La investigación muestra que *A. flavus* y *A. nidulans*, aislados de la misma fuente contaminada, desarrollaron niveles diferentes de resistencia a los metales tóxicos. La tolerancia alta y moderada de las cepas a los metales es relevante, ya que el Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} han sido clasificados como sustancias prioritarias por sus características tóxicas (ATSDR, 2019).

microorganisms are specially adapted to extreme habitats, where other microorganisms cannot survive (Dixit et al., 2015).

Studies on filamentous fungi in the soil of the Sonoran desert are few, one such study is that of Ranzoni (1968), who reported several species of anamorphic fungi, among them several of the genus *Penicillium* and *Aspergillus*, including *A. flavus* and *A. nidulans*. These results are similar those reported for other regions of semi-arid soils. Oliveira et al. (2013) found that the most abundant genera in a semi-arid region of Brazil are *Aspergillus* and *Penicillium*. Abdullah and Al-Bader (1990) reported a predominance of *Aspergillus* species on thermophilic and thermotolerant fungi in Iraq. The study of Mouchacca (2005) shows the fungi found in arid regions in the Middle East between 1940 and 2000 and noted the prevalence of anamorphic fungi (seven species of the genus *Aspergillus*).

In other countries, the presence of filamentous fungi has been confirmed in mines contaminated with metals: Nigeria (Oladipo et al., 2018), Iran (Mohammadian et al., 2017), China (Jiang et al., 2016) and Korea (Babu, Shim, Bang, Shea, & Oh, 2014). The species of indigenous filamentous fungi isolated from contaminated sites have in common a high to moderate tolerance index to different toxic metals. This extraordinary characteristic can be explained by the different strategies developed by these microorganisms to tolerate toxic metals and avoid cell damage (Gadd, 1993). Among such strategies one can list chelation and cell wall binding (extracellular sequestration) and intracellular physical sequestration of metal by binding to proteins and other ligands.

On the other hand, it has been reported that toxic metal stress may also be reduced by melanin synthesis. In a general sense, melanin refers to dark pigments synthesized by organisms of all biological kingdoms, including fungi (Nosanchuk & Casadevall, 2003). In this regard, filamentous fungi with dark-colored mycelium (black, brown or deep green) have been predominantly found in the Sonoran desert (Ranzoni, 1968). Melanins have been suggested to play many roles in fungal biology (Cordero & Casadevall, 2017). Given their many unique properties, it seems likely that melanins help fungi survive a range of biotic and abiotic stresses. The latter include high UV radiation, reactive oxygen species and toxic metals. Melanins are polymerized from phenolic and/or indolic compounds. The result is negatively charged, hydrophobic pigments of high molecular weight (White, 1958). Melanins form granules that may accumulate at the cell surface or be released into the extracellular space (Malofe, Solhaug, Minibayera, & Beckett, 2019). In the Sonora Desert filamentous fungi with dark-colored mycelium (intense green, brown, or black) have been predominantly found (Ranzoni,

El suelo contiene comunidades microbianas de gran diversidad, en especial hongos que se encuentran principalmente en los 10 cm superiores. De acuerdo con los reportes de hongos aislados del suelo, las especies predominantes son de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Geotrichum*. Estos tienen una distribución cosmopolita (Ezzouhri et al., 2009; Jiang, Wang, Xue, Cao, & Zhang, 2016; Mohammadian et al., 2017; Oladipo et al., 2018); sin embargo, la diversidad micológica en ambientes con presencia de sustancias tóxicas suele ser pobre en comparación con ambientes sanos. En el presente trabajo solo se encontró el género *Aspergillus*.

La presencia y el éxito de un organismo en un ecosistema dependen tanto de sus necesidades nutricionales como de su tolerancia ambiental. Los límites de tolerancia a factores de estrés específicos son los que determinan, en gran medida, los habitantes en ambientes extremos incluidos los contaminados con sustancias tóxicas. Algunos microorganismos están especialmente adaptados a hábitats extremos, donde otros microorganismos no pueden sobrevivir (Dixit et al., 2015).

Los estudios acerca de los hongos filamentosos en el suelo del desierto de Sonora son pocos, uno de esos estudios es el de Ranzoni (1968), quien reportó varias especies de hongos anamórficos, entre ellos varios del género *Penicillium* y *Aspergillus*, incluyendo *A. flavus* y *A. nidulans*. Estos resultados son similares a los reportados para otras regiones de suelos semiáridos. Oliveira et al. (2013) encontraron que los géneros más abundantes en una región semiárida de Brasil son *Aspergillus* y *Penicillium*. Abdullah y Al-Bader (1990) informaron del predominio de especies de *Aspergillus* en hongos termófilos y termotolerantes en suelos de Irak. El estudio de Mouchacca (2005) muestra los hongos encontrados en las regiones áridas de Medio Oriente entre 1940 y 2000 y señala la prevalencia de hongos anamórficos (siete especies del género *Aspergillus*).

En otros países se ha confirmado la presencia de hongos filamentosos en minas contaminadas con metales: Nigeria (Oladipo et al., 2018), Irán (Mohammadian et al., 2017), China (Jiang et al., 2016) y Corea (Babu, Shim, Bang, Shea, & Oh, 2014). Los hongos filamentosos autóctonos, aislados de lugares contaminados, tienen en común un índice de tolerancia alto a moderado frente a varios metales tóxicos. Esta característica extraordinaria puede explicarse por estrategias desarrolladas por los microorganismos para tolerar los metales tóxicos y evitar el daño celular (Gadd, 1993). Entre estas se puede enumerar la quelación, la unión a la pared celular (secuestro extracelular) y el secuestro físico intracelular del metal mediante la unión a proteínas y otros ligandos.

1968). Melanins exhibit high binding affinity for many different metal ions (Cordero & Casadevall, 2017). Carboxyl, amine, and hydroxyl functional groups of the pigment can potentially bind metals. Therefore, the importance of melanins in metal tolerance is a topic of interest for future research.

Each species can use several strategies. In addition, its large surface/volume ratio and its intense metabolic activity filamentous fungi are very efficient vectors to accumulate metals (Dixit et al., 2015).

Dose-response behavior

A remarkable high tolerance to toxic metals by *Aspergillus* species has been reported (Thippeswamy, Shivakumar, & Krishnappa, 2014). In this research Cu^{2+} was very toxic to *A. nidulans*, it only grew at a concentration of 1 mM. However, other studies have shown that some fungal species are resilient to this metal (Oladipo et al., 2018). It has been shown that the tolerance to copper is due to an active process that involves the synthesis of a metallothionein (Kermasha, Pellerin, Rovel, Goetghebeur, & Metche, 1993). The metallothionein is a low molecular weight protein rich in cysteine that allows the union of copper, cadmium, and zinc; once bound these metals become innocuous.

Hg^{2+} is toxic, but *A. nidulans* and *A. flavus* are still able to grow at 5 and 1 mM, respectively. It has been reported that other fungal species are capable to tolerate and accumulate this metal (Dhawale, Lane, & Dhawale, 1996; Kurniati, Arfarita, & Imai, 2014). Regarding Cd^{2+} , it is one of the most toxic metals for the *A. flavus* isolated in this research. This result agrees with other experiments that have reported a strong inhibition of fungi exposed to minimal concentrations of cadmium salts (Joo & Hussein, 2012; Oladipo et al., 2018). In contrast, *A. nidulans* had resisted higher concentrations of this metal as reported in other works; for instance, Massaccesi, Romero, Cazau, and Bucszinsky (2002) showed that several species of filamentous fungi, isolated from sediments contaminated by industrial activities, removed up to 70 % of Cd^{2+} in 13 days. These results demonstrate the adaptability of fungal microorganisms, as well as their potential for use in bioremediation.

Pb^{2+} , Cr^{6+} and Zn^{2+} exerted a different effect on the growth of *A. flavus*; the highest concentration of these metals evaluated in this work was not enough to inhibit the growth of the microorganism. The same behavior has been observed in yeasts isolated from coal mines (Castro-Silva et al., 2003). Despite this, it has also been observed that Zn^{2+} can have toxic effects in certain species of fungi such as *Penicillium atramentosum* 25SL, which decreased its growth when exposed to 40 mM solutions (Levinskaite, 2001). It

Por otra parte, se ha informado que el estrés por metales tóxicos también puede reducirse mediante la síntesis de melanina. En sentido general, la melanina se refiere a los pigmentos oscuros sintetizados por organismos de todos los reinos biológicos, incluidos los hongos (Nosanchuk & Casadevall, 2003). Al respecto, en el desierto de Sonora se han encontrado predominantemente hongos filamentosos con micelio de color oscuro (negro, marrón o verde intenso) (Ranzoni, 1968). Se ha sugerido que las melaninas desempeñan muchas funciones en la biología de los hongos (Cordero & Casadevall, 2017). Dadas sus numerosas propiedades singulares, parece probable que las melaninas ayuden a los hongos a sobrevivir a una serie de estreses bióticos y abióticos. Estos últimos incluyen la alta radiación UV, las especies reactivas de oxígeno y los metales tóxicos. Las melaninas se polimerizan a partir de compuestos fenólicos e indólicos. El resultado son pigmentos hidrofóbicos con carga negativa y alto peso molecular (White, 1958). Las melaninas forman gránulos que pueden acumularse en la superficie celular o liberarse al espacio extracelular (Malofe, Solhaug, Minibayera, & Beckett, 2019). Las melaninas presentan alta afinidad de unión a diferentes iones metálicos (Cordero & Casadevall, 2017). Los grupos funcionales de carboxilo, amina e hidroxilo del pigmento pueden potencialmente unir metales. Por lo tanto, la importancia de las melaninas en la tolerancia a los metales es un tema de interés para investigaciones futuras.

Cada especie puede utilizar varias estrategias. Además, debido a su gran relación superficie/volumen y a su intensa actividad metabólica, los hongos filamentosos son vectores muy eficientes para acumular metales (Dixit et al., 2015).

Comportamiento dosis-respuesta

Se ha reportado una notable tolerancia a los metales tóxicos por parte de las especies de *Aspergillus* (Thippeswamy, Shivakumar, & Krishnappa, 2014). En esta investigación, Cu^{2+} fue muy tóxico para *A. nidulans*, ya que solo creció a una concentración de 1 mM; sin embargo, otros estudios han demostrado que algunas especies de hongos son resistentes a este metal (Oladipo et al., 2018). Se ha demostrado que la tolerancia al Cu^{2+} se debe a un proceso activo que implica la síntesis de una metalotioneína (Kermasha, Pellerin, Rovel, Goetghebeur, & Metche, 1993). Esta es una proteína de bajo peso molecular rica en cisteína que permite la unión del cobre, el cadmio y el zinc; una vez unidos, estos metales se vuelven inocuos.

Hg^{2+} es tóxico, pero *A. nidulans* y *A. flavus* siguen siendo capaces de crecer a 5 y 1 mM, respectivamente. Se ha reportado que otras especies de hongos son capaces de tolerar y acumular este metal (Dhawale, Lane, &

has been suggested that the mechanism by which some fungal species immobilize or capture Zn^{2+} is the intracellular and extracellular exchange in the form of polyphosphate precipitation. Although Zn^{2+} is essential for all organisms, at very high concentrations it can have a toxic effect (Balsalobre et al., 2003). For certain species of fungi, exposure to toxic substances in their habitat can induce adaptive changes that allow them to remain viable under these stressful conditions (Valix et al., 2001). It is known that the species *Aspergillus* spp. has developed an enzymatic mechanism to detoxify Cr^{6+} ; this mechanism is mediated by an antioxidant enzyme system involving peroxidases, catalases and peroxide ascorbate (Chakraborty, Mukherjee, & Das, 2012; Srivastava & Thakur, 2006).

Life on Earth has existed since its beginning in extreme environments, where cells have been exposed to free radicals and various toxic substances (Calabrese et al., 2007). Interestingly, were observed that the tolerance behavior of *A. flavus* when exposed to toxic metals was stimulated (values above the control). Particularly the fungus showed stimulation at low doses of Cu^{2+} and Ag^+ (Figures 4 and 5a). According to Calabrese and Blain (2009), this behavior corresponds to hormesis, a characteristic phenomenon that in toxicology describes biphasic dose response processes where cells or organisms (animals, fungi or plants) benefit from exposition to low doses of toxic or harmful environmental factors. This process is followed by inhibition and toxic effects at higher doses, as observed in Figures 4 and 5. Life on earth has existed since its inception in extreme environments, in which cells have been exposed to free radicals and various toxic substances. For this reason, organisms have developed complex mechanisms to deal with environmental hazards (Calabrese et al., 2007). The mechanism that explains hormesis (conditioning, adaptive response, and self-protection) establishes that at low levels of stress, metabolic pathways that already exist at the molecular and cellular level are autoregulated. In the case of fungi, the mechanisms that help them to resist the presence of toxic metals are hormetic routes that involve proteins and binding peptides, such as phytochelatin and metallothioneins (Sácký et al., 2014), which allow them to incorporate toxic metals into their cells. On the other hand, there are proteins with enzyme functions, for example, those of the cytochrome P450 superfamily and laccase mainly (Sharma, Dangi, & Shukla, 2018), used by fungi to biotransform metals to less toxic chemical forms. For *A. nidulans* it was not observed hormesis with the metals at the different concentrations.

Statistical analysis

The data obtained from the complete factorial experimental design were analyzed by different

Dhawale, 1996; Kurniati, Arfarita, & Imai, 2014). Por otra parte, el Cd^{2+} fue uno de los metales más tóxicos para *A. flavus*. Este resultado coincide con otros experimentos que han reportado una fuerte inhibición de los hongos expuestos a concentraciones mínimas de sales de cadmio (Joo & Hussein, 2012; Oladipo et al., 2018). Por el contrario, *A. nidulans* resistió concentraciones más altas de este metal, como se informó en otros trabajos; por ejemplo, Massaccesi, Romero, Cazau, y Bucsinzky (2002) demostraron que varias especies de hongos filamentosos, aislados de sedimentos contaminados por actividades industriales, eliminaron hasta 70 % del Cd^{2+} en 13 días. Estos resultados demuestran la adaptabilidad de los microorganismos fúngicos, así como su potencial de uso en la biorremediación.

Pb^{2+} , Cr^{6+} y Zn^{2+} ejercieron efecto diferente sobre el crecimiento de *A. flavus*; la mayor concentración evaluada en este trabajo no fue suficiente para inhibir el crecimiento del microorganismo. El mismo comportamiento se ha observado en levaduras aisladas de minas de carbón (Castro-Silva et al., 2003). A pesar de ello, también se ha observado que el Zn^{2+} puede tener efectos tóxicos en ciertas especies de hongos como *Penicillium atramentosum* 25SL, que disminuyó su crecimiento cuando fue expuesto a soluciones de 40 mM (Levinskaite, 2001). Se ha sugerido que el mecanismo por el que algunas especies de hongos inmovilizan o capturan Zn^{2+} es el intercambio intracelular y extracelular en forma de precipitación de polifosfatos. Aunque el Zn^{2+} es esencial para todos los organismos, en concentraciones muy elevadas puede tener un efecto tóxico (Balsalobre et al., 2003). Para ciertas especies de hongos, la exposición a sustancias tóxicas en su hábitat puede inducir cambios adaptativos que les permitan seguir siendo viables en esas condiciones de estrés (Valix et al., 2001). Se sabe que la especie *Aspergillus* spp. ha desarrollado un mecanismo enzimático para desintoxicar el Cr^{6+} ; este mecanismo está mediado por un sistema enzimático antioxidante en el que participan peroxidases, catalasas y peróxido de ascorbato (Chakraborty, Mukherjee, & Das, 2012; Srivastava & Thakur, 2006).

La vida en la Tierra ha existido desde sus inicios en entornos extremos, en los que las células han estado expuestas a los radicales libres y a diversas sustancias tóxicas (Calabrese et al., 2007). Resulta interesante observar que el comportamiento de tolerancia de *A. flavus* cuando se expone a metales tóxicos fue estimulado (valores por encima del control); particularmente, el hongo mostró estimulación con dosis bajas de Cu^{2+} y Ag^+ (Figuras 4 y 5a). Según Calabrese y Blain (2009), este comportamiento corresponde a la hormesis, un fenómeno característico que en toxicología describe procesos bifásicos de respuesta a la dosis en los que las células u organismos (animales, hongos o plantas) se benefician de la exposición a dosis bajas de factores

statistical methods used in toxicology research. The analysis of such methods helps us to choose the adequate statistical test to avoid inflating the type I error, when the null hypothesis is true, and it is rejected (null hypothesis: means are equal) in our interpretation of the results. Multi-way ANOVA, multivariate linear regression analysis and log normal regression analysis were not appropriate, high quantity of zeros when the doses of the metal were inhibitory and for the high variability when the growth of the fungus was stimulated above the control. Therefore, statistical analysis of one factor at the time was performed for determining the significance and the effect of concentration for the *A. flavus* and *A. nidulans* at specific metal.

Then, the Kolmogorov-Smirnov test performed. This revealed that the data were normally distributed, except for zero tolerance index, however, the Levene test revealed that some data were heteroscedastic. It is interesting that, for one-way ANOVA, homoscedasticity or normality assumptions are rarely tested in studies of toxicology (Na, Yang, Bae, & Lim, 2014).

In this case, one-way ANOVA was complemented with the Scheffé test, which is a more conservative *post hoc* test, and were used a conservative level of significance ($P < 0.01$) the most appropriate response to a significant ANOVA (Oliveira et al., 2014). The Scheffé procedure is the only multiple comparison procedure that is entirely coherent with ANOVA results. That is, with the Scheffé procedure, one is guarantee that if the ANOVA suggested a difference between groups (groups in this study: different concentrations of metals for each fungus) then at least one of the Scheffé comparisons will be significant at the same level (Ruxton & Beauchamp, 2008).

In addition, non-parametrical Kruskal-Wallis testing was performed for corroborate significant differences at each metal concentration. However, Kruskal-Wallis is based on differences of medians and ranges. Both, parametrical and non-parametrical test had the same results. The behavior of the two fungal species is statistically different, and it also depends on the metal and the concentration.

Conclusions

Aspergillus flavus and *A. nidulans* fungi are present in tailings in the semiarid region of the Sonoran Desert. The isolated filamentous fungi display different levels of tolerance to toxic metals (Ag^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+}) which depend on the species, the type of metal and concentration. *Aspergillus flavus* is the fungus with the highest tolerance to all metals, with growth observed even at concentrations of 20 mM of Cr^{6+} , Pb^{2+}

ambientales tóxicos o nocivos. A este proceso le sigue la inhibición y los efectos tóxicos a dosis más altas, como se observa en las Figuras 4 y 5. El mecanismo que explica la hormesis (condicionamiento, respuesta adaptativa y autoprotección) establece que a niveles de estrés bajos se autorregulan vías metabólicas ya existentes a nivel molecular y celular. En el caso de los hongos, los mecanismos que les ayudan a resistir la presencia de metales tóxicos son rutas horméticas que involucran proteínas y péptidos de unión, como las fitoquelatinas y las metalotioneínas (Sácký et al., 2014), que les permiten incorporar metales tóxicos a sus células. Por otro lado, existen proteínas con funciones enzimáticas; por ejemplo, las de la superfamilia del citocromo P450 y la lacasa principalmente (Sharma, Dangi, & Shukla, 2018), utilizadas por los hongos para biotransformar los metales a formas químicas menos tóxicas. Para *A. nidulans* no se observó hormesis con las concentraciones de los metales.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos del diseño experimental factorial completo se analizaron mediante varios métodos estadísticos, utilizados habitualmente en la investigación toxicológica. El análisis de dichos métodos nos ayuda a elegir la prueba estadística adecuada para evitar inflar el error tipo I cuando la hipótesis nula es verdadera y se rechaza (hipótesis nula: las medias son iguales) en nuestra interpretación de los resultados. El análisis multivariante de la varianza, el análisis de regresión lineal multivariante y el análisis de regresión logarítmica normal no fueron apropiados, debido a la cantidad elevada de ceros cuando las dosis del metal resultaron inhibitorias y por la variabilidad elevada cuando el crecimiento del hongo fue estimulado por encima del control. Por tanto, se realizó un análisis estadístico de un factor a la vez para determinar la significancia y el efecto de concentración para *A. flavus* y *A. nidulans* con un metal específico.

Posteriormente, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, la cual reveló que los datos se distribuían normalmente, excepto el índice de tolerancia cero; sin embargo, la prueba de Levene indicó que algunos datos fueron heteroscedásticos. Es interesante que, para el análisis de varianza de una vía, los supuestos de homocedasticidad o normalidad rara vez se ponen a prueba en estudios de toxicología (Na, Yang, Bae, & Lim, 2014).

En este caso, el análisis de varianza de una vía se complementó con la prueba de Scheffé que es una prueba *post hoc* más conservadora se utilizó un nivel de significancia conservador ($P < 0.01$) la respuesta más adecuada a un análisis de varianza significativo (Oliveira et al., 2014). El procedimiento Scheffé es el

and Zn²⁺. In future research, it will be interesting to search for the mechanisms that allow *A. flavus* its high level of tolerance to toxic metals. On the other hand, *A. nidulans* proved to be highly tolerant to Cr⁶⁺ up to a concentration of 20 mM, and to Ag⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ and Cu²⁺ up to 1 mM. The tolerance level observed by these fungi, especially to Cr⁶⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺, suggests their potential use to remove these metals.

Acknowledgments

The authors thank the Transmission Electron Microscopy Laboratory of the Universidad de Sonora for the facilities provided for energy dispersive spectroscopy (EDS) analyses.

End of English version

References / Referencias

- Abdullah, S. K., & Al-Bader, S. M. (1990). On the thermophilic and thermotolerant mycoflora of Iraqi soils. *Sydowia*, 42, 1–7. Retrieved from https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_42_0001-0007.pdf
- Agathokleous, E., & Calabrese, E. (2019). Hormesis: The dose response for the 21st century: The future has arrived. *Toxicology*, 425, 152249. doi: 10.1016/j.tox.2019.152249
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2019). Priority list of hazardous substances. Retrieved March 17, 2020, from <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html/>
- Ahluwalia, S. S., & Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98(12), 2243–2257. doi: 10.12691/env-2-3-1
- Babu, A. G., Shim, J., Bang, K. S., Shea, P. J., & Oh, B. T. (2014). *Trichoderma virens* PDR-28: a heavy metal-tolerant and plant growth-promoting fungus for remediation and bioenergy crop production on mine tailing soil. *Journal of Environmental Management*, 132, 129–134. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.10.009
- Balsobre, L., De Silóniz, M. I., Valderrama, M. J., Benito, T., Larrea, M. T., & Peinado, J. M. (2003). Occurrence of yeasts in municipal wastes and their behaviour in presence of cadmium, copper and zinc. *Journal of Basic Microbiology*, 43(3), 185–193. doi: 10.1002/jobm.200390021
- Bennet, J. W., Wunch, K. G., Faison, B. D. (2002). Use of fungi biodegradation. In J. Hurst (Ed.), *Manual of environmental microbiology* (pp. 960–971). Washington: ASM.
- BLAST. (2020). Basic Local Alignment Search Tool. Retrieved August 28, 2020, from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>
- Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., ...Clarkson, T. W. (2007). Biological

único de comparación múltiple totalmente coherente con los resultados del análisis de varianza. En otras palabras, con el procedimiento Scheffé se garantiza que si el análisis de varianza sugiere una diferencia entre grupos (grupos en este estudio: concentraciones de metales para cada hongo) entonces al menos una de las comparaciones Scheffé será significativa al mismo nivel (Ruxton & Beauchamp, 2008).

Asimismo, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para corroborar las diferencias significativas en cada concentración de metal; sin embargo, Kruskal-Wallis se basa en diferencias de medianas y rangos. Tanto la prueba paramétrica como la no paramétrica tuvieron los mismos resultados; el comportamiento de las dos especies de hongos es estadísticamente diferente y también depende del metal y la concentración

Conclusiones

A. flavus y *A. nidulans* están presentes en los jales mineros de la región semiárida del desierto de Sonora. Los hongos filamentosos aislados muestran diferentes niveles de tolerancia a los metales tóxicos (Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺), dependiendo de la especie, el metal y la concentración. *A. flavus* es el hongo con mayor tolerancia a todos los metales, con crecimiento incluso a concentraciones de 20 mM de Cr⁶⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺. En investigaciones futuras será interesante la búsqueda de los mecanismos que permiten a *A. flavus* un nivel alto de tolerancia a los metales tóxicos. Por otro lado, *A. nidulans* demostró tener tolerancia alta a Cr⁶⁺ hasta una concentración de 20 mM, y a Ag⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ y Cu²⁺ hasta 1 mM. El nivel de tolerancia de estos hongos, especialmente frente a Cr⁶⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺, sugiere su uso potencial para eliminar dichos metales.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad de Sonora por las facilidades otorgadas para la realización de los análisis de espectroscopía de dispersión de energía (EDS).

Fin de la versión en español

- stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(1), 122–128. doi: 10.1016/j.taap.2007.02.015
- Calabrese, E. J., & Blain, R. B. (2009). Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*, 157(1), 42–48. doi: 10.1016/j.envpol.2008.07.028
- Castro-Silva, M. A., Lima, A. O. S., Gerchenski, A. V., Jaques, D. B., Rodrigues, A. L., Souza, P. L., & Rörig, L. R. (2003). Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(1), 45–47. doi: 10.1590/S1517-83822003000500015
- Chakraborty, S., Mukherjee, A., & Das, T. K. (2013). Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: An implication of bioremediation of lead from liquid media. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 134–142. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.05.031
- Chen, A. J., Frisrad, J. C., Sun, B. D., Vargas, J., Kocsubé, S., Dijksterhuis, J., ... Samson, R. A. (2016). *Aspergillus* section Nidulantes (formerly *Emericella*): polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Studies in Mycology*, 84, 1–118. doi: 10.1016/j.simyco.2016.10.001
- Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*, 31(2), 99–112. doi: 10.1016/j.fbr.2016.12.003
- 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* (pp. 245–267). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Dhawale, S. S., Lane, A. C., & Dhawale, W. (1996). Effects of mercury on the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bulletin of Environmental Contamination of Toxicology*, 56(5), 825. doi: 10.1007/s001289900120
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., Shukla, R., ... Lade, H. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189–2212. doi: 10.3390/su7022189
- Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F., & Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 3(2), 35–48. Retrieved from https://academicjournals.org/article/article1380177143_Ezzouhri%20et%20al.pdf
- Fan, T., Liu, Y., Feng, B., Zeng, G., Yang, C., Zhou, M., ... Wang, X. (2008). Biosorption of cadmium (II), zinc (II) and lead (II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 160(2-3), 655–661. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.03.038
- Gadd, G. M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytology*, 124(1), 25–60. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03796.x
- Iheanacho, H. E., Njobeh, P. B., Dutton, F. M., Steenkamp, P. A., Steenkamp, L., Mthombeni, J. Q., ... Makun, A. H. (2014). Morphological and molecular identification of filamentous *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* isolated from compound feeds in South Africa. *Food Microbiology*, 44, 180–184. doi: 10.1016/j.fm.2014.05.019
- Jiang, S., Wang, W., Xue, X., Cao, C., & Zhang, Y. (2016). Fungal diversity in major oil-shale mines in China. *Journal of Environmental Science*, 41, 81–89. doi: 10.1016/j.jes.2015.04.032
- Joo, J. H., & Hussein, K. A. (2012). Heavy metal tolerance of fungi isolated from contaminated soil. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 45(4), 565–571. doi: 10.7745/KJSSF.2012.45.4.565
- 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
- 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
- Larone, D. (2011). *Medically important fungi: A guide to identification*. Washington, USA: ASM Press.
- Levinskaite, L. (2001). Effect of heavy metals on the individual development of two fungi from the genus *Penicillium*. *Biologija*, 1, 25–30. Retrieved from <http://www.elibrary.lt/resursai/LMA/Biologija/BIO-25.pdf>
- Malofe, T. C., Solhaug, K. A., Minibayera, F. V., & Beckett, R. P. (2019). Occurrence and possible roles of melanic pigments in lichenized ascomycetes. *Fungal Biology Reviews*, 33(3-4), 159–165. doi: 10.1016/j.fbr.2018.10.002
- Massaccesi, G., Romero, M. C., Cazau, M. C. & Bucsinzky, 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, 817–820. doi: 10.1023/A:1021282718440
- Mohammadian, E., Ahari, A. B., Arzanlou, M., Oustan, S., & Khzaei, 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
- Mouchacca, J. (2005). Mycobiota of the arid Middle East: check-list of novel fungal taxa introduced from 1940 to 2000 and major recent biodiversity titles. *Journal of Arid Environmental*, 60(3), 359–387. doi: 10.1016/j.jaridenv.2004.06.007
- Na, J., Yang, H., Bae, S., & Lim, K. M. (2014). Analysis of statistical methods currently used in toxicology journals. *Toxicological Research*, 30(3), 185. doi: 10.5487/TR.2014.30.3.185
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., & Nordberg, M. (2015). Toxicology of metals: overview, definitions, concepts, and trends. In G. F. Nordberg, B. A. Fowler, & M. Nordberg (Eds.), *Handbook on the toxicology of metals* (pp. 1–12). USA: Academic Press-Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-444-59453-2.00001-9
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular*

- Microbiology*, 5(4), 203–223. doi: 10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x
- Oladipo, O. G., Awotoye, O. O., Olayinka, A., Bezuidenhout, C. C., & Maboeta, M. S. (2018). Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 29–37. doi: 10.1016/j.bjm.2017.06.003
- Oliveira, L. G., Cavalcanti, M. A. Q., Fernandes, M. J. S., & Lima, D. M. (2013). Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, 95, 49–54. doi: 10.1016/j.jaridenv.2013.03.007
- Oliveira, T. A., Koakoski, G., da Motta, A. C., Piato, A. L., Barreto, R. E., Volpato, G. L., & Barcellos, L. J. G. (2014). Death-associated odors induce stress in zebrafish. *Hormones and Behavior*, 65(4), 340–344. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.02.009
- OriginLab Corporation (2008). OriginLab software 8.0. Scientific data analysis and graphing software. Northampton, Massachusetts, USA: Author. Retrieved from www.originlab.com
- 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
- Ranzoni, F. V. (1968). Fungi isolated in culture from soils of the Sonoran desert. *Mycologia*, 60(2), 356–371. doi: 10.2307/3757166
- Rose, P. K., & Devi, R. (2018). Heavy metal tolerance and adaptability assessment of indigenous filamentous fungi isolated from industrial wastewater and sludge samples. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4), 688–694. doi: 10.1016/j.bjbas.2018.08.001
- Ruxton, G. D., & Beauchamp, G. (2008). Time for some a priori thinking about post hoc testing. *Behavioral Ecology*, 19(3), 690–693. doi: 10.1093/beheco/arn020
- Sácký, J., Leonhardt, T., Borovička, J., Gryndler, M., Briksí, A., & Kotrba, P. (2014). Intracellular sequestration of zinc, cadmium and silver in *Hebeloma mesophaeum* and characterization of its metallothionein genes. *Fungal Genetics and Biology*, 67, 3–14. doi: 10.1016/j.fgb.2014.03.003
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2017). Sitios potencialmente contaminados y sitios contaminados registrados en el SISCO como pasivos ambientales. Retrieved February 12, 2020, from [http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_SITIOS03_01&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce&NOMBREENTIDAD=*](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_SITIOS03_01&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce&NOMBREENTIDAD=)
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). (2020). Reporte del clima en México. Retrieved from <https://smn.conagua.gob.mx/tools/DATA/Climatolog%C3%ADa/Diagn%C3%B3stico%20Atmosf%C3%A9rico/Reporte%20del%20Clima%20en%20M%C3%A9xico/Anual2020.pdf>
- Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *Journal of Environmental Management*, 210, 10–22. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.12.075
- Srivastava, S., & Thakur, I. S. (2006). Biosorption potency of *Aspergillus niger* for removal of chromium (VI). *Current Microbiology*, 53(3), 232–237. doi: 10.1007/s00284-006-0103-9
- Thippeswamy, B., Shivakumar, C., & Krishnappa, M. (2014). Studies on heavy metals detoxification biomarkers in fungal consortia. *Caribbean Journal of Science and Technology*, 2, 496–502.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1991). Soil screening guidance: User's guide. Retrieved from https://rais.ornl.gov/documents/SSG_nonrad_user.pdf
- Valix, M., Tang, J. Y., & Malik, R. (2001). Heavy metal tolerance of fungi. *Minerals Engineering*, 14(5), 499–505. doi: 10.1016/S0892-6875(01)00037-1
- White, T. J., Burns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Snisky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego, USA: Academic Press. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
- White, L. P. (1958). Melanina naturally occurring cation exchange material. *Nature*, 182, 1427–1428. doi: 10.1038/1821427a0

