



Evaluación del crecimiento de *trichoderma* spp en presencia de arsénico

Luis Felipe Juárez-Santillán^{1*}; Georgina Martínez-Reséndiz¹; Juan Pablo Reyes-Gómez¹, Fidel Alejandro Aguilar-Aguilar¹; Luis Carlos Sandoval-Herazo² y Juan José Balderas-Pérez¹

¹Univerisdad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, Área académica de Agrobiotecnología, Campus Gutiérrez Zamora. Carretera Gutiérrez Zamora, Boca de Lima Km 2.5, Gutiérrez Zamora 93556, Veracruz, México.

²Tecnológico Nacional de México, Campus Misantla, División de Investigación y Posgrado, km 1.8 Carretera a loma del cojolite, Misantla 93821, Veracruz, México.

*Autor de correspondencia: luis.santillan@utgz.edu.mx

Recibido 19 de mayo de 2020; aceptado 22 de junio de 2020

RESUMEN

Trichoderma spp., son especies de hongos poco estudiados en el área de biorremediación o biotransformación de contaminantes. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el crecimiento de *Trichoderma* spp. en presencia de As, con el fin de conocer el potencial de éste para poder ser empleado en procesos de biorremediación de suelos contaminados por metales tóxicos. Se desarrollaron cinéticas de crecimiento de *Trichoderma* spp. en As (0 ppm, 16.5 ppm, 33 ppm y 66 ppm). Los principales resultados indican que el hongo es tolerante a As, a pesar de que a 33 ppm de As el crecimiento del hongo se vio disminuido; es probable que el hongo esté biotransformando al As a especies menos tóxicas, lo cual favorece el desarrollo del mismo. Este estudio sugiere que *Trichoderma* spp. puede ser empleado en proceso de biorremediación o bitransformación de metales tóxicos.

PALABRAS CLAVE: *Trichoderma* spp., Arsénico, biorremediación.

ABSTRACT

Trichoderma spp. are fungi species not greatly studied in the area of bioremediation and biotransformation of contaminants. The main objective of this work was to evaluate the *Trichoderma* spp. growth in the presence of As, to know their potential for their implementation in the processes of bioremediation and biotransformation of contaminated soil with toxic metals. It was developed the *Trichoderma* spp. kinetics growth in As (0 ppm, 16.5 ppm, 33.0 ppm y 66.0 ppm). The main results show that the fungus is tolerant to As. However, it presented a decrease in growth in the case of As at 33.0 ppm. There is a probability that the fungus is bio-transforming As to less toxic species, which favors its development. The following study suggests the implementation of *Trichoderma* spp. in the bioremediation and biotransformation of toxic metals.

KEY WORDS: *Trichoderma* spp., Arsenic, bioremediation.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos resultan tener potencial para ser empleados en procesos de biorremediación, ya que varios estudios han demostrado que la biomasa de hongos, algas y bacterias tiene capacidad para adsorber metales tóxicos. Los hongos filamentosos presentan una alta capacidad para adaptarse a ambientes contaminados, la adaptación radica en la facilidad que tienen para tolerar y transformar los iones metálicos, así como la capacidad de precipitarlos vía intracelular y captarlos de forma activa (Martino et al., 2000; Rivas et al., 2004 y Basso et al., 2002). *Trichoderma* spp. frecuentemente puede ser aislado de suelo, madera, materia orgánica en descomposición y dentro de los tejidos de raíces de diversas plantas (Harman et al., 2006; Błaszczuk et al., 2011). Además, es un hongo colonizador ubicuo con capacidad de poder crecer en gran variedad de sustratos (Kubicek et al., 2003; Cázares-García et al., 2013).

Los hongos tienen una gran importancia en la biotecnología ambiental al presentar alta capacidad para acumular metales tóxicos, ya que pueden bioabsorberlos debido a la presencia de la melanina en su pared celular, la cual aparece en forma de depósitos

y gránulos densos que contienen péptidos, hidratos de carbono y ácidos grasos, los cuales permiten la adsorción (Yuan et al. 2012). Algunos procesos de quelación de metales ocurren en el citosol debido a la presencia de grupos funcionales como el glutatión y metalotioneínas; otra forma de tolerar contaminantes inorgánicos es por mecanismo de difusión y biotransformación a un estado de oxidación menos tóxico (Gadd 1993 y Shoaib et al., 2013).

En la Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora se identificó que *Trichoderma* spp. presenta resistencia ante As, es por ello que se desarrollaron cinéticas de crecimiento de este hongo en diferentes concentraciones de As, con la finalidad de ver la capacidad de tolerancia y su desarrollo, lo que permitirá proponer a *Trichoderma* spp. como una especie que pueda ser empleada en procesos de biorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras en la Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, éstas se obtuvieron de semillas de *Ricinus communis* las cuales fueron puestas en sustrato de agrolita y picgos (20:80); dicho sustrato fue tratado con fungicida. Después de cuatro días se observó la

germinación de semillas; pero varias ya estaban contaminadas por un hongo.

Para aislar el hongo se realizó lo siguiente:

- 1) Se tomaron muestras de semilla contaminada.
- 2) La inoculación del hongo se desarrolló en Agar papa dextrosa (PDA) (Atlas, 1993).

Identificación del hongo

Para la identificación, se dejó que el hongo creciera durante cuatro días en el medio de cultivo (PDA a pH de 5.8), después se hicieron preparaciones para ser observadas al microscopio; fueron empleadas claves dicotómicas para su identificación (Kubicek y Harman, 2002).

Cinética de crecimiento.

Se desarrollaron cinéticas de crecimiento del hongo para ver la resistencia que presenta al As. Se emplearon cuatro concentraciones: 0, 16.5, 33 y 66 ppm de As, empleando arsenito de sodio (As III, Sigma Aldrich) a pH 5.8; la concentración de 33 ppm se considera fitotóxica (Kabata-Pendias y Pendias, 1992). La cinética de crecimiento se observó durante cuatro días, midiendo el tamaño del halo del hongo para ir monitoreando el

desarrollo del mismo. La medición se realizó con un vernier digital (ultratech, modelo H-7352).

Desarrollo de modelo matemático de crecimiento

Se empleó el método de variables separables (modelo de Malthus) para resolver y encontrar la ecuación diferencial que modela el crecimiento del hongo. Se emplearon las siguientes condiciones (Zill, 2002):

$$\frac{dC}{dt} = KC$$

C = tamaño del halo del hongo en cm

t = tiempo en días

K = constante de proporcionalidad

Se necesitarán las condiciones iniciales de t y C , las cuales se obtuvieron del monitoreo que se hizo en las cinéticas de crecimiento.

RESULTADOS

Identificación del hongo

Para la identificación de *Trichoderma* spp., la literatura indica que presenta un crecimiento acelerado de micelio con la aparición de anillos concéntricos de coloración blanca, amarilla y verdosa; crece en formas de colonias blancas que simulan una película sobre el medio; genera

una gran cantidad de esporas (Guzmán, 1977 y Calva et al., 2018); la esporulación sobre la colonia da una apariencia verdosa (Guzmán, 1977); lo descrito se muestra en la imagen 1A.

A nivel microscópico está reportado que presenta conidióforos hialinos, altamente ramificados que usualmente emergen en ángulo de 90° respecto de la ramificación principal con estructura piramidal, fiálides ensanchadas de la parte central en forma de “botella” que pueden ser cilíndricas o subglobosas y se encuentran de forma simple o en grupos; hifas

vegetativas ramificadas, lisas, hialinas y septadas, lo cual se puede observar en las imágenes 1B-F. Las condiciones óptimas para su crecimiento en laboratorio son: temperatura, en un intervalo entre 25-35°C, siendo la óptima 25°C; humedad relativa, del 20 al 80%, con un óptimo de 70% y pH de 6 a 6.5 (Shukla et al., 2014).

En este sentido cabe destacar que el pH de trabajo fue de 5.8 y una temperatura de 26° C, si bien el pH se encuentra fuera del rango ideal para *Trichoderma* spp., éste pudo desarrollarse.

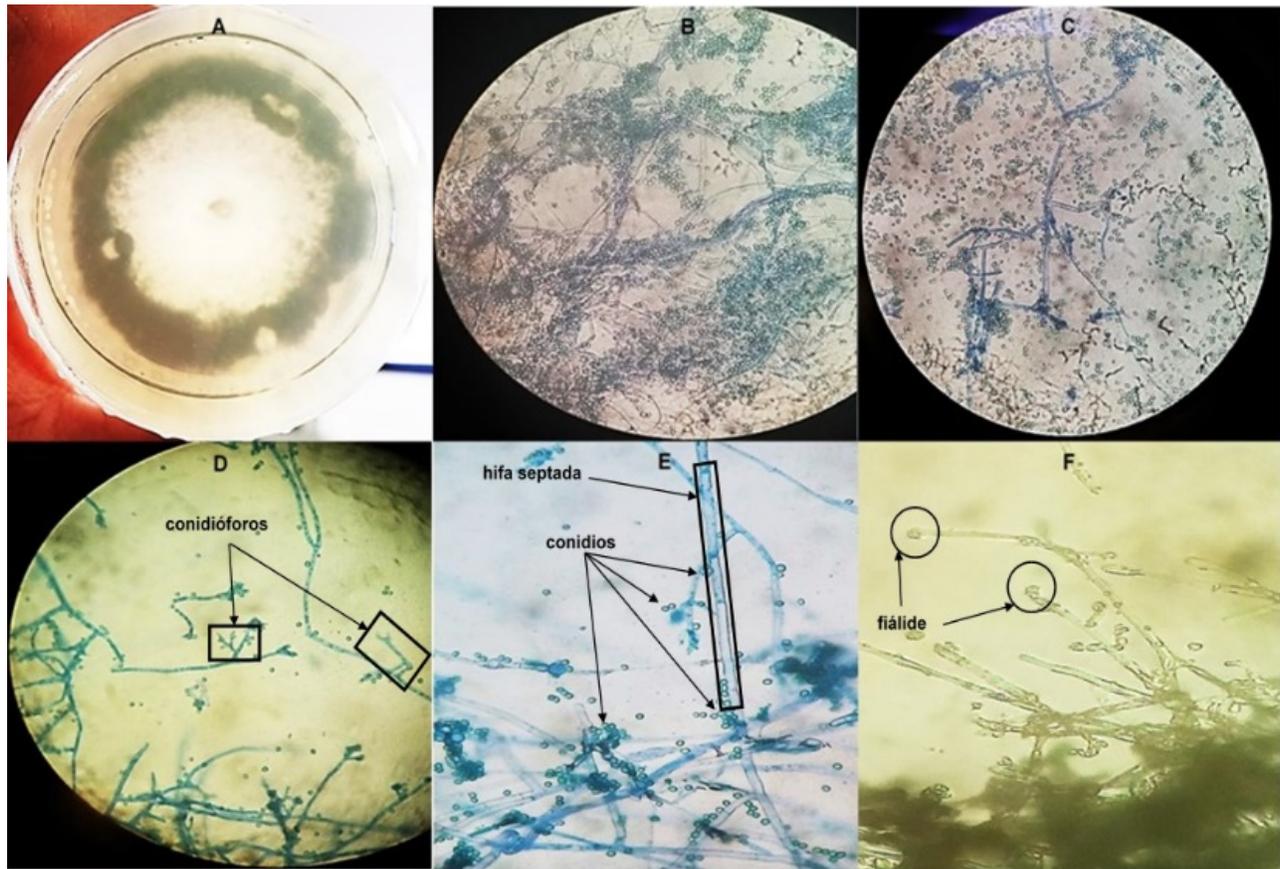


Imagen 1. Identificación del hongo

También se reporta que, el micelio está formado por hifas septadas. Se presentan conidióforos por segmentos cortos que se hallan a lado de la hifa, observándose en la imagen 1D, mostrando por su parte terminal pequeños conidios redondeados (Guzmán, 1977).

Cinética de crecimiento

En la tabla 1 se presentan las cinéticas de crecimiento de *Trichoderma* spp. a diferentes concentraciones de As, se inicia con la misma cantidad de inóculo; hasta el día dos se observa un crecimiento un tanto homogéneo. Para los días tres y cuatro en las concentraciones de 0.00, 16.50 y 66.00 ppm de As, se observó esporulación; mientras que a 33.00 ppm de As (Kabata-Pendias y Pendias, 1992), el crecimiento sigue pero más lento. La concentración fitotóxica de As es 33.00 ppm, por lo que estos resultados indican que *Trichoderma* spp. tolera concentraciones superiores a esta, dato importante para poder ser considerando como un hongo que pueda ser empleado en biorremediación del metaloide.

Se observó que *Trichoderma* spp. esporula a los tres días en concentraciones de 0, 16.5 y 66 ppm de As; esto indica que el As está propiciado una aceleración en el crecimiento del hongo.

Tabla 1. Cinética de crecimiento de *Trichoderma* spp. a diferentes concentraciones de As

ppm de As	TH (Día 0)	TH (Día 1)	TH (Día 2)	TH (Día 3)	TH (Día 4)
	cm				
0.00	0.10 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.60 ± 0.01	E	E
16.50	0.10 ± 0.00	0.33 ± 0.05	0.55 ± 0.00	E	E
33.00	0.10 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.40 ± 0.01	0.50 ± 0.01	1.00 ± 0.01
66.00	0.10 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.40 ± 0.01	E	E

TH: tamaño de halo, E: esporulación

En la figura 2 se observan las imágenes de crecimiento de *Trichoderma* spp. en las diferentes concentraciones de As. En las concentraciones de 0, 16.5 y 66 ppm de As, el hongo esporula a los tres días de iniciada la cinética, datos importantes para confirmar la resistencia de este organismo al metaloide. A concentración de 33 ppm de As, el hongo presenta una cierta inhibición. Si bien a concentraciones de 66 ppm de As el tamaño de halo del hongo no es igual en comparación con 0 ppm, si se observó esporulación importante.

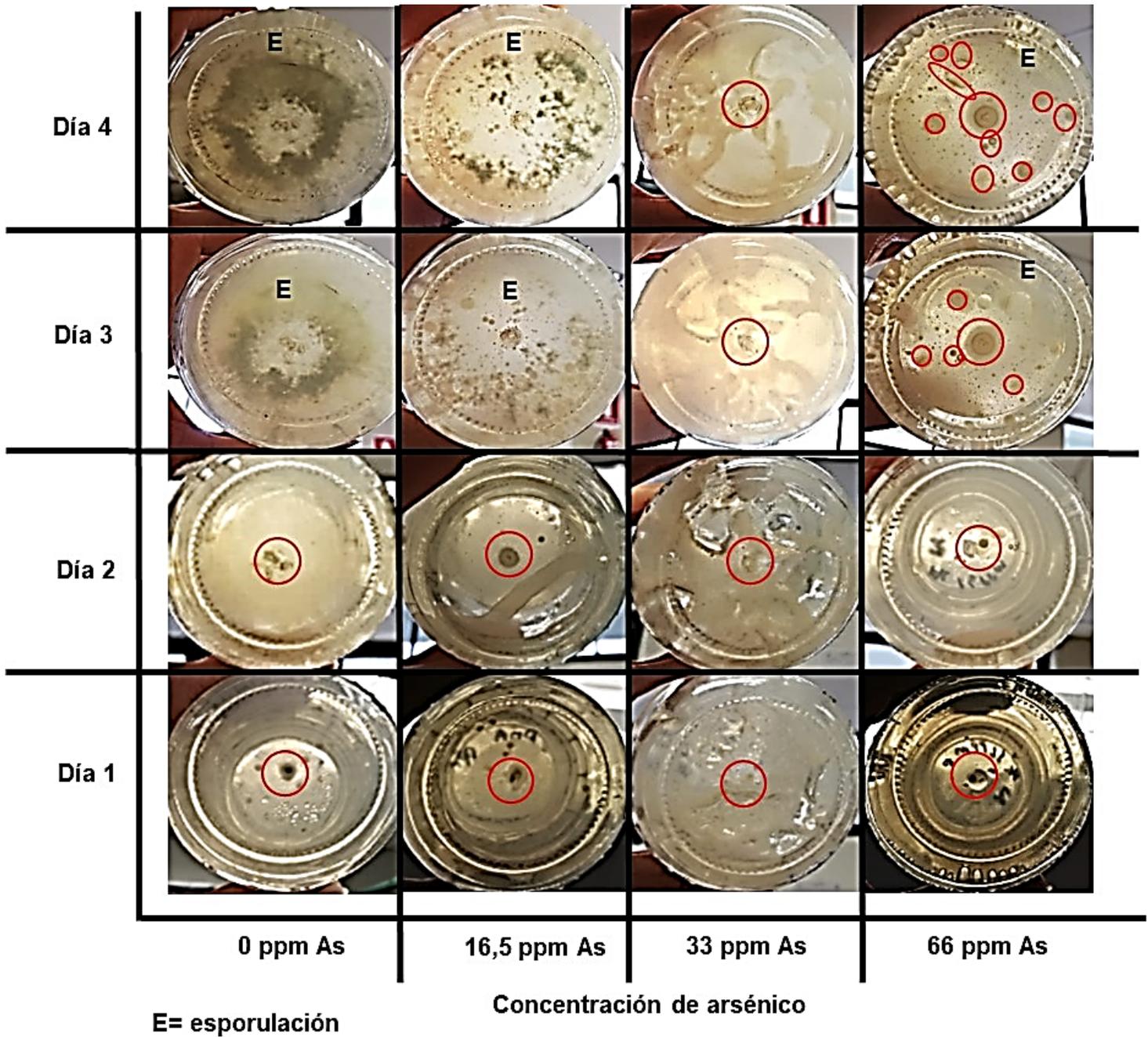


Imagen 2. Cinéticas de crecimiento de *Trichoderma* spp. a diferentes concentraciones de arsénico.

Considerando que la concentración fitotóxica de As en plantas está en un rango de 15-50 ppm con un promedio de 33 ppm (Kabata-Pendias y Pendias, 1992) y

partiendo que las plantas son organismos superiores a los hongos, se destaca más la resistencia de *Trichoderma* spp. al As, reforzando la teoría que puede ser empleado en

proceso de biorremediación.

La resistencia de *Trichoderma* spp. a As se puede explicar debido a que, bajo condiciones aerobias, el As y P son estables en formas de oxianiones de As (V) y ortofosfatos (P (V)); en suelo, el As existe predominantemente en formas inorgánica (arsenato, As (V) y arsenito, As (III) en menor concentración ácido dimetilarsénico y ácido monometilarsénico). As y P presenta propiedades fisicoquímicas similares (Lambkin y Alloway, 2003; Quaghebeur y Rengel, 2005; Zhao et al., 2009). También podría ser explicada debido a los mecanismos de metilación que presentan hongos, bacterias y levaduras, el producto final que es el trimetilarsénico (TMA), especie volátil, lo cual permite la detoxificación en algunos organismos (Bentley y Chasteen, 2002). El mecanismo de transporte de fosfatos es el que podría estar permitiendo la entrada de As, al confundirlo con los iones esenciales de este nutriente (Dhankhar y Hooda, 2011).

Los hongos presentan una composición química, la cual les permite adsorber, absorber o biotransformar metales tóxicos. Cuentan con una pared celular compuesta por grupos funcionales como fosfato, carboxil, amino y especies de diéster, lo que les permite tener

interacciones inorgánicas físicas y químicas de adsorción (Gadd, 1993). Los mecanismos de transporte de metales tóxicos son poco conocidos, los transportadores habituales se asocian a proteínas y sistemas de canalización, también, se conoce la fijación mediante gránulos de polifosfatos (Turana et al., 1996) o la captación por metalotioneínas y polipéptidos ricos en azufre, así como otras proteínas y macromoléculas que no presentan grupo tiol (Morselt et al., 1986).

De forma general los hongos pueden tolerar metales tóxicos debido al mecanismo que incluye: 1) los sistemas de transporte e incorporación (bioacumulación); 2) la interacción y unión con componentes de la superficie celular (biosorción); y 3) la transformación química (reducción) (Cervantes et al., 2006).

Modelo matemático

El modelo matemático realizado indica que, al momento de resolver la ecuación diferencial por el método de variables separables, se obtiene la siguiente ecuación para las cuatro cinéticas.

$$C = C_i e^{kt}$$

Donde:

C: Tamaño del halo calculado (cm)

C_i: Tamaño de halo inicial (cm)

K: Constante

t: tiempo (días)

El parámetro importante a resaltar es *K*, el cual indica la resistencia al elemento químico, afinidad al medio de cultivo y la velocidad con la cual se estaría propagando el organismo.

En la tabla 2 se pueden observar los valores de *K* y *R* para cada una de las diferentes concentraciones. Para *K* se puede decir que a 0 y 16.5 ppm de As, *Trichoderma* spp. presentan un comportamiento similar en cuanto a crecimiento y por lo tanto no se muestra inhibición en el mismo. Para 33 y 66 ppm de As, el valor de *K* disminuye, mostrando una mayor inhibición de crecimiento, a pesar de esto, el hongo logra desarrollarse.

Es importante saber que el resultado del coeficiente de determinación (*R*) oscila entre 0 y 1. Cuanto más cerca de 1 se sitúe su valor, mayor será el ajuste del modelo a la variable que estamos intentando explicar. De forma inversa, cuanto más cerca de cero, menos ajustado estará el modelo. Por lo tanto, con base en el valor de *R* (superior a 0.9) se puede decir que el crecimiento de *Trichoderma* spp. se ajusta al modelo matemáticos

planteado.

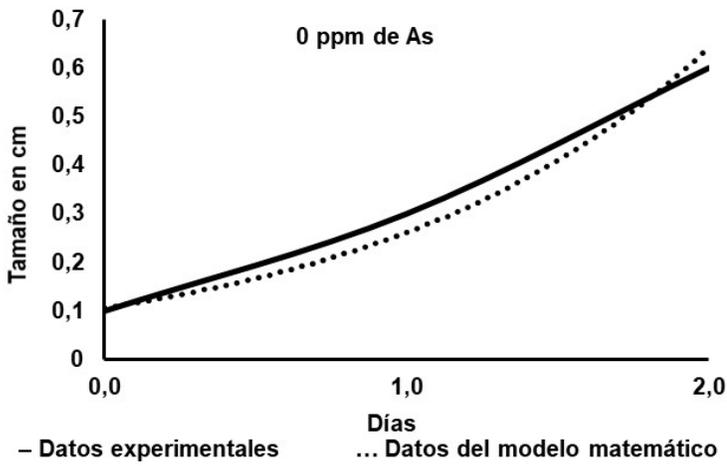
Tabla 2. Valores de *K* y *R*

Concentración	<i>K</i>	<i>R</i>
0	0.8959	0.9832
16.5	0.8524	0.9492
33	0.5521	0.9787
66	0.6931	1

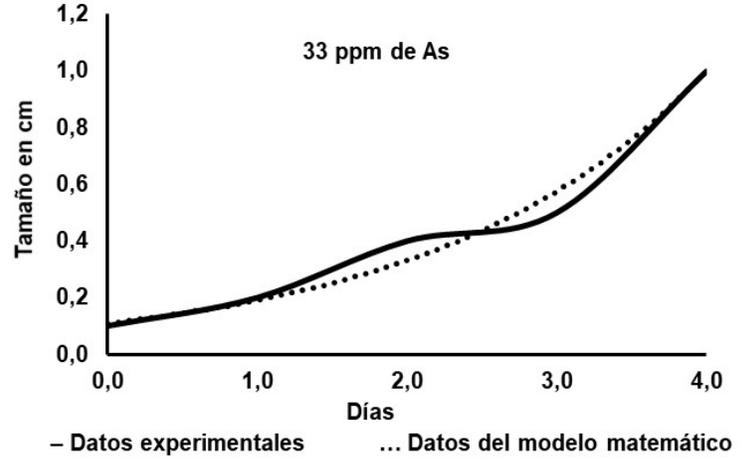
R = Coeficiente de determinación, *K* = constante

En las gráficas 1 a 4 se observan las cinéticas de crecimiento, éstas siguen un comportamiento similar al obtenido experimentalmente, si bien en las gráficas 1, 2 y 4 pareciera un crecimiento lineal, es importante recordar que en el día tres se presentó esporulación, por esa razón se justifica su crecimiento exponencial.

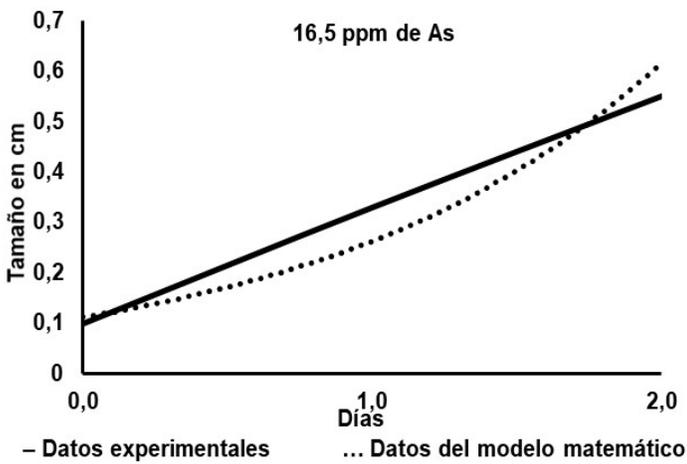
En las gráficas 1, 2, 3 y 4 se presentan los datos teóricos y experimentales. Por los datos teóricos obtenidos de la ecuación obtenida del modelo matemático de Malthus se puede decir que este se ajusta al crecimiento de *Trichoderma* spp. en las diferentes concentraciones planteadas en el experimento de As.



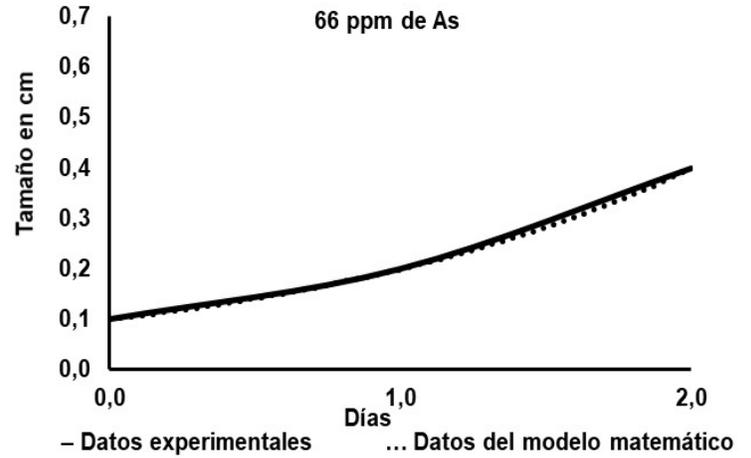
Grafica 1. Modelo matemático y datos experimentales a 0 ppm de As.



Grafica 3. Modelo matemático y datos experimentales a 33 ppm de As.



Grafica 2. Modelo matemático y datos experimentales a 16.5 ppm de As.



Grafica 4. Modelo matemático y datos experimentales a 66 ppm de As.

El modelo matemático obtenido permitirá que en estudios posteriores se puedan desarrollar experimentos más controlados y poder predecir la resistencia de *Trichoderma* spp. a diferentes concentraciones de As; de igual forma permite ver en que concentración este organismo puede presentar inhibición.

CONCLUSIONES

Trichoderma spp., es un organismo que presentó resistencia a As en concentraciones consideradas fitotóxicas para plantas, lo cual lo hace un candidato adecuado para procesos de biorremediación.

El modelo matemático obtenido, permitirá relacionar dos variables o más, por lo que puede ser utilizado para entender el comportamiento de *Trichoderma* spp. y permite predecir posibles resultados.

En estudio posteriores se tendrán que realizar especiaciones de As para determinar si *Trichoderma* spp. lo biotransforma, lo adsorbe o absorbe.

BIBLIOGRAFÍA

Atlas, R.M. (1993). Handbook of microbiological media. Potato Dextrose Agar. CRC Press. Boca Ratón. Florida. Pág. 722.

Basso, M., Cerrella, E. y Cukierman, A. (2002). Empleo de algas marinas para la biosorción de metales pesados de agua contaminada. Avance en Energías Renovables y Medio Ambiente, Argentina, 69-74.

Bentley, R. and Chasteen, T.G. (2002). Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 250-271.

Błaszczuk, L., Popiel, D., Chelkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G.J, Sobieralski, K. and Siwulski, M. (2011). Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of Applied Genetics* 52, 233-243.

Cázares-García, S.V., Vázquez-Garcidueñas, M.S. and Vázquez-Marrufo, G. (2013). Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: A bioinformatic approach. *Plos One* 8, 55295.

Cervantes, C.J., Campos-García, S., Devars, F., Gutiérrez-Corona, H., Loza-Tavera, J.C., Torres-Guzmán and Moreno-Sánchez, R. (2006). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 335-347.

Dhankhar, R. and Hooda, A. (2011). Fungal biosorption

- an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>
- Gadd, G.M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124, 25-60.
- Guzmán, M. (1977). *Micología médica*. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia, 386 pág.
- Harman, G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96, 190-194.
- Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (1992). *Trace elements in soils and plants*. Florida: CRC Press, Inc.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I, Kullnig-Gradinger, C. and Szakács, G. (2003). The genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study in Southeast Asia isolated. *Fungal Genetics and Biology* 38, 310-319.
- Kubicek, P.C. and Harman, E.G., 2002. *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics*. Volume 1. Ed. Taylor & Francis, USA. 3-8.
- Lambkin, D.C. and Alloway, B.J. (2003). As(V) - induced phosphate release from soils and its effect on plant phosphorus. *Water, Air, Soil Pollution* 144, 41-56.
- Martino, E., Turnau, K., Girlanda, M., Bonfate, P. and Perroto, S. (2000). Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metals polluted soils; their identification and growth in the presence of zinc ions. *Mycology Research* 84, 338-344.
- Morselt, A.F.W., Smits, W.T.M. and Limonard, T. (1986). Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 96, 417-420.
- Quaghebeur, M. and Rengel, Z. (2005). Arsenic speciation governs arsenic uptake and transport in terrestrial plants. *Microchimica Acta* 151, 141-152.
- Rivas, B., Gutiérrez, S. y Merino, F. (2004). Biorremoción de metales pesados en solución por *Pseudomonas fluorescens* M1A-4s aisladas de ambientes mineros. En S. S. Tecnología, Asociación Chotona de Ciencia, Perú.
- Shoaib, A., Aslam, N. and Aslam, N. (2013). *Trichoderma harzianum*: Adsorption, desorption, isotherm and FTIR studies. *Journal of Animal and Plant Sciences* 23(5), 1460-1465.

- Shukla, D.I., Gupta, V., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R., Druzhinina, I. and Tuohy, M. (2014). Role of *Trichoderma* species in bioremediation process: biosorption studies on hexavalent chromium. *Health and Environmental Research* 30, 405-412.
- Turanau, K., Kottke, I. and Dexheimer, J. (1996). Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus*/*Pinus sylvestris* mycorrhizas collected from calamine dumps. *Mycology Research* 100(1), 16-22.
- Zhao, F.J., Ma, J.F., Meharg, A.A. and McGrath, S.P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytology* 181, 777-794.
- Zill, D.G. (2002). Ecuaciones diferenciales con aplicaciones de modelado. México: International Thomson Editores.