



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación del efecto del pH en las interacciones inter- e intraespecíficas de micromicetes saprobios asociados a la rizósfera de gimnospermas en un jal minero de Taxco

Ciencias ambientales

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

Vianey López Pacheco

Directora de tesis:

Dra. Patricia Vélez Aguilar
Instituto de Biología, UNAM

Asesor interno:

Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro
FES-Zaragoza, UNAM



México, CDMX

Octubre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", los ha nombrado como Sinodales del Examen Profesional de la alumna:

LÓPEZ PACHECO VIANEY

Quien presenta como trabajo recepcional: **Evaluación del efecto del pH en las interacciones inter- e intraespecíficas de micromicetes saprobios asociados a la rizósfera de gimnospermas en un jal minero de Taxco.**

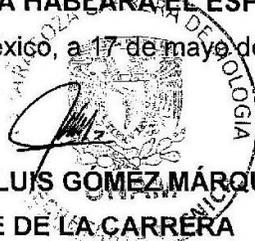
PRESIDENTE	M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL	
VOCAL	Dra. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR*	
SECRETARIO	Dr. JORGE ANTONIO VADIVIA ANISTRO	
SUPLENTE	Biól. MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ MUÑOZ	
SUPLENTE	Dra. CLAUDIA JANETTE DE LA ROSA MERA	

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarles.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad de México, a 17 de mayo de 2019



Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Escolar
c.c.p. Secretaría Técnica de la Carrera
c.c.p. Interesado

Esta investigación se realizó en el Laboratorio C-121 del Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, y fue financiado por los proyectos: “Patrones de diversidad de los hongos microscópicos que habitan en ecosistemas amenazados de México: bosques de niebla” Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT (Clave: IA201319) y “Fortalecimiento del proceso de enseñanza-aprendizaje de la Química en la Carrera de Biología” Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza, PAPIIME (Clave: PE204517). Además, esta tesis forma parte de los productos del proyecto de investigación: “Análisis de la diversidad microbiana asociada a la transformación química de compuestos sulfurados en un manantial hidrotermal y en un sitio de descarga de desechos mineros” (CAC-B/16/03-SO/5.1.1. y Clave de Registro Coordinación de la Investigación: FESZ-RP-16/111-63).

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la persona más aguerrida y admirable que he conocido. La cual ha sido un motor constante para perseguir mis objetivos y sueños. Mi hermano, Sergio Iván.

A mis padres

Francisca Pacheco Jiménez por tu apoyo incondicional, comprensión e infinito amor. Mujer admirable, tenaz y mi persona favorita en la vida.

Arnulfo Hernández por cuidar de nosotras, por esos momentos de risa y esa gran sabiduría y consejos que te hacen un increíble padre.

A mis hermanas

Emma Berenice por ser una gran amiga y cómplice en cada paso dado. Gracias por creer en mí y ser algo espléndido en mí día a día.

Jessica por esos momentos de alegría, esos chistes que a nadie más se le ocurren y por tu increíble personalidad, sin duda sobrenatural.

Araceli por tu apoyo y comprensión en los peores momentos, por las pláticas divertidas y tu gran humor.

Yadira por tus palabras de constatación estímulo y amor. Eres una extraordinaria mujer con gran fortaleza y totalmente admirable.

A mi pequeña y mejor secuaz, hermanita por elección, Xally Donaji; por apostar siempre por mí y amarme tanto.

Diana Patricia, por haberme permitido estar cerca de ti y regalarme momentos inolvidables llenos de mucha alegría y cariño. Cuan orgullosa estoy de ti.

Diego Alejandro por hacer de mi vida toda una aventura llena de locuras. Gracias por tu amor.

A mis amigos

Judith, Bryan, Andrea, Sofia, Sac-Nicté y Selene porque hicieron de mi trayectoria universitaria algo increíblemente divertido. Gracias por estar a mi lado, con sus palabras de aliento y su tan peculiar personalidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y ampliar mis horizontes.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por hacer de mí una bióloga capaz con otra perspectiva de la vida.

Al Instituto de Biología, UNAM, por acogerme y brindarme herramientas que me permitieron un mayor desarrollo académico.

Un reconocimiento personal e inmensa gratitud a la Dra. Patricia Vélez Aguilar por ser la mejor asesora que pude tener, por transmitirme su conocimiento e infinita pasión por la micología. Gracias, por impulsarme a ser una mejor estudiante y por sus palabras de aliento en el momento justo.

Al Dr. Jorge Antonio Valdivia por ayudarme a encontrar mi pasión. Por sus consejos y palabras que me hicieron creer aún más en mí.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa por su apoyo para la realización de este proyecto, por el tiempo y dedicación para enseñarme y propiciar en mí un mayor interés hacia la química.

A los miembros de mi jurado, M. en C. Armando Cervantes Sandoval, Dra. Patricia Vélez Aguilar, Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro, Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz y Dra. Claudia Janette de la Rosa Mera por su tiempo y comentarios para este proyecto.

Al M. en C. Armando Cervantes por sus asesorías en temas de estadística que fueron de gran ayuda a lo largo de la presente investigación.

Al Dr. Manuel Alejandro Aparicio Cuevas por ilustrarme en la parte química.

Al Dr. Jaime Gasca Pineda por su asesoría y enseñanza en la manipulación y manejo de datos mediante herramientas estadísticas y bioinformáticas.

A la Dras. Laura Márquez y Nelly López, LaNaBio por su apoyo técnico en la secuenciación de las muestras.

Al Dr. Pedro Mercado Ruaro del laboratorio de Morfo-Anatomía y Citogenética por su asistencia técnica durante la obtención de imágenes en el microscopio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio C-121 por sus aportaciones a este proyecto. Abril, Constanza, Nohely y Cinthya, gracias por compartir su conocimiento.

A mis compañeros y amigos Andrés Tonatiuh y Sac-Nicté por su ayuda y apoyo en el proceso experimental.

“Un hombre va al saber como a la guerra: bien despierto, con miedo, con respeto y con absoluta confianza. Ir en cualquier otra forma al saber o a la guerra es un error, y quien lo cometa vivirá para lamentar sus pasos (Carlos Castaneda, 2011)”.

“La actividad y el trabajo son consecuencia generalmente de la voluntad, y casi siempre el trabajo va acompañado del éxito. Trabajo, voluntad y éxito llenan la vida de un hombre. La voluntad abre las puertas del éxito con brillantez y felicidad; el trabajo hace pasar a través de estas puertas y al final del viaje el éxito corona los esfuerzos realizados (Paul de Kruif, 2015)”.

CONTENIDO

Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Reflexión	vi
Contenido	vii
Índice de figuras	x
Índice de tablas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	2
2.1 Minería y sus residuos tóxicos	2
2.2 La minería en México: Taxco	4
2.3 La rizósfera y los micromicetes saprobios	4
2.4 El pH como variable determinante en el reino Fungi	8
2.5 Interacciones inter e intra-específicas	11
2.6 Metabolitos secundarios fúngicos	15
3 ANTECEDENTES	17
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4.1 Problemática	20
4.2 Justificación	20
4.3 Importancia del estudio	21
5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
6 HIPÓTESIS	21
7 OBJETIVOS	22
7.1 General	22
7.2 Particulares	22
8 METODOLOGÍA	23
8.1 Área de estudio	23
8.2 Muestreo	24
8.3 Procesamiento <i>ex situ</i> de las muestras	26
8.3.1 Aislamiento de la diversidad de hongos saprobios	26
8.3.2 Agrupación de la diversidad fúngica por su morfología	26
8.3.3 Selección de morfotipos para los bioensayos	27
8.3.4 Identificación taxonómica y molecular de los morfotipos seleccionados	27

8.3.5	Bioensayos <i>in vitro</i> de interacción.....	31
8.3.6	Evaluación y fotodocumentación de las interacciones	32
8.3.7	Selección de las interacciones para el análisis metabolómico	33
8.3.8	Implementación de las fermentaciones.....	33
8.3.9	Extracción de compuestos orgánicos a pequeña escala.....	34
8.3.10	Técnicas de metabolómica para la exploración de las bases fisiológicas de las interacciones.....	35
8.3.11	Análisis de los perfiles metabolómicos.....	38
9	RESULTADOS	38
9.1	Diversidad de micromicetes saprobios cultivables	38
9.1.1	Aislamiento y agrupación de los morfotipos	38
9.1.2	Selección e identificación de los cinco micromicetes	39
9.2	Efecto del pH en interacciones	53
9.2.1	Medio Básico	54
9.2.1	Medio Ácido.....	65
9.3	Exploración de las bases fisiológicas de tres interacciones	67
9.3.1	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	70
9.3.2	UPLC-PDA-ESIMS: Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a los detectores de arreglo de fotodiodos y de espectrometría de masas por electrospray	74
9.3.3	UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS: Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a los detectores de arreglo de fotodiodos y de espectrometría de masas de alta resolución por electrospray y fragmentación masas-masas	82
10	DISCUSIÓN	90
10.1	Diversidad de micromicetes saprobios en el jal El Fraile.....	90
10.2	Efecto del pH sobre el crecimiento fúngico y sus interacciones	95
10.2.1	El pH sobre el crecimiento fúngico de los cultivos pareados.....	95
10.2.2	El pH en las interacciones fúngicas	100
10.3	Exploración de las bases fisiológicas de tres interacciones	103
11	CONCLUSIONES	104
12	PERSPECTIVAS	106
13	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
14	ANEXOS	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del área de estudio	25
Figura 2. Número de aislados en los diferentes medios de cultivo	39
Figura 3. Número de morfotipos aislados para cada medio de cultivo	39
Figura 4. Ilustración de la morfología de <i>Aspergillus</i> sp. 1	43
Figura 5. Ilustración de la morfología de <i>Aspergillus</i> sp. 2	46
Figura 6. Ilustración de la morfología de <i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	48
Figura 7. Ilustración de la morfología de <i>Fusarium solani</i>	50
Figura 8. Ilustración de la morfología de <i>Purpureocillium lilacinum</i>	52
Figura 9. Medias marginales de las áreas de crecimiento	54
Figuras 10. ANOVA multifactorial de dos vías	55
Figuras 11. Áreas de crecimiento de <i>Fusarium solani</i> en co-cultivo	59
Figuras 12. Áreas de crecimiento de <i>Aspergillus</i> sp. 1 en co-cultivo	60
Figuras 13. Áreas de crecimiento de <i>Aspergillus fumigatiaffinis</i> en co-cultivo	61
Figuras 14. Áreas de crecimiento de <i>Aspergillus</i> sp. 2 en co-cultivo	62
Figuras 15. Áreas de crecimiento de <i>Purpureocillium lilacinum</i> en co-cultivo	63
Figuras 16. Bioensayos de interacciones <i>in vitro</i>	64
Figuras 17. Porcentajes de inhibición (PI)	68
Figuras 18. Índice de antagonismo total en los diferentes medios de cultivo	69
Figura 19. Interacciones seleccionadas para metabolómica	70
Figura 20. Rendimiento de los extractos en medio sólido y líquido	70
Figura 21. Cromatogramas HPLC-UV, $\lambda = 254$ nm, <i>F. solani</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, V8	71
Figura 22. Cromatogramas HPLC-UV, $\lambda = 254$ nm, <i>Aspergillus</i> sp. 1/ <i>Aspergillus</i> sp. 2, V8	72
Figura 23. Cromatogramas HPLC- UV, $\lambda = 254$ nm, <i>A. fumigatiaffinis</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio V8	72
Figura 24. Cromatogramas HPLC-UV, $\lambda = 254$ nm, <i>F. solani</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio arroz	73

Figura 25. Cromatogramas HPLC-UV, $\lambda = 365$ nm, <i>Aspergillus</i> sp. 1/ <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio arroz	73
Figura 26. Cromatogramas HPLC-ELSD, <i>A. fumigatiaffinis</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio arroz	74
Figura 27. Cromatogramas UV (7-10 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>F. solani</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio V8	76
Figura 28. Cromatogramas UV (2-7 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>F. solani</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio V8	76
Figura 29. Cromatogramas UV (2-7 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>Aspergillus</i> sp. 1/ <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio V8	77
Figura 30. Cromatogramas UV (7-10 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>Aspergillus</i> sp. 1/ <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio V8	77
Figura 31. Cromatogramas UV (2-7 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>A. fumigatiaffinis</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio V8	78
Figura 32. Cromatogramas UV (7-10 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>A. fumigatiaffinis</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio V8	78
Figura 33. Cromatogramas UV (2-7 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>F. solani</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio arroz	79
Figura 34. Cromatogramas UV (7-10 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>F. solani</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio arroz	79
Figura 35. Cromatogramas UV (2-7 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>Aspergillus</i> sp. 1/ <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio arroz	80
Figura 36. Cromatogramas UV (7-10 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>Aspergillus</i> sp. 1/ <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio arroz	80
Figura 37. Cromatogramas UV (2-7 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>A. fumigatiaffinis</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, arroz	81
Figura 38. Cromatogramas UV (7-10 min) UPLC-PDA-ESIMS, <i>A. fumigatiaffinis</i> / <i>Aspergillus</i> sp. 2, medio arroz	81
Figura 39. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>F. solani</i> , medio arroz ESI (-)	84
Figura 40. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>F. solani</i> , medio arroz ESI (+)	84
Figura 41. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>Aspergillus</i> sp. 1, medio arroz ESI (-)	85

Figura 42. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>Aspergillus</i> sp. 1, medio arroz ESI (+)	85
Figura 43. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>A.</i> <i>fumigatiaffinis</i> , medio arroz ESI (-)	86
Figura 44. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>A.</i> <i>fumigatiaffinis</i> , medio arroz ESI (+)	86
Figura 45. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>F.</i> <i>solani</i> , medio V8 ESI (-)	87
Figura 46. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>F.</i> <i>solani</i> , medio V8 ESI (+)	87
Figura 47. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>Aspergillus</i> sp. 1, medio V8 ESI (-)	88
Figura 48. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>Aspergillus</i> sp. 1, medio V8 ESI (+)	88
Figura 49. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>A.</i> <i>fumigatiaffinis</i> , medio V8 ESI (-)	89
Figura 50. Cromatograma UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, <i>Aspergillus</i> sp. 2/ <i>A.</i> <i>fumigatiaffinis</i> , medio V8 ESI (-)	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del protocolo general de PCR	30
Tabla 2. Componentes del protocolo directo de PCR	31
Tabla 3. Identidad molecular de los micromicetes objeto del presente estudio	40

RESUMEN

Los jales mineros están formados por los residuos generados de la trituración y molienda de las rocas para la obtención de minerales. Estos desechos poseen características adversas para el establecimiento de comunidades bióticas, como valores extremos y contrastantes de pH (variando entre 2 y 9) y una escasa disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, pueden albergar una gran diversidad de microorganismos, entre los que destacan los hongos por su biomasa. Se sabe que el pH es una variable fundamental para la síntesis de metabolitos secundarios, por lo que, podría desempeñar un rol clave durante las interacciones inter- e intraespecíficas de la comunidad fúngica, regulando el flujo de nutrientes. Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos condiciones extremas y contrastantes de pH en las interacciones de cinco micromicetes saprobios aislados de jales mineros (*Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus fumigatiaffinis*, *Purpureocillium lilacinum* y *Fusarium solani*), mediante bioensayos *in vitro* y metabolómica. Los resultados de la presente investigación sugieren que hay una disminución en el crecimiento fúngico en respuesta a condiciones de pH ácido, en contraste con el pH alcalino. Por otro lado, los índices de interacción sugirieron que durante los primeros días, dominaron las interacciones de sinergia en ambos medios, las cuales prevalecieron por mayor tiempo en el medio con pH ácido. Cabe destacar, que al culminar las pruebas todas las interacciones fueron de antagonismo. Así mismo, con el análisis de metabolómica en las interacciones (*F. solani*/*Aspergillus* sp. 2; *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2; y *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2) se observó que el perfil cromatográfico de *Aspergillus* sp. 2 fue el dominante. Se identificaron metabolitos secundarios expresados *de novo* como resultado de las interacciones. En conclusión el pH es una variable que afecta el crecimiento de los micromicetes saprobios estudiados, y por lo tanto genera cambios en los tipos de interacción en la comunidad. Finalmente, *Aspergillus* sp. 2 al mostrar perfiles metabolómicos dominantes, podría poseer la capacidad de inhibir o biotransformar los metabolitos producidos por el organismo interactuante, por lo que resulta de interés por su posible potencial antifúngico.

ABSTRACT

Mining tailings are formed by wastes generated from the crushing and grinding of rocks during the extraction of minerals. These wastes provide with adverse characteristics for the establishment of biotic communities such as extreme and contrasting pH values (varying between 2 and 9). However, they shelter a unique diversity of fungi. The pH is a fundamental variable for the synthesis of secondary metabolites, especially during inter- and intraspecific interactions, regulating nutrients cycling. For this reason, the objective of the present study was to evaluate the effect of two extreme and contrasting pH conditions on the interactions of five saprobic microfungi (*Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus fumigatiaffinis*, *Purpureocillium lilacinum* y *Fusarium solani*) through *in vitro* bioassays and metabolomics. We observed that the fungal growth decreased in the medium with acid pH, in contrast to the basic medium. The interaction indexes suggested that during the first days, synergy interactions dominated in both media, which prevailed longer in the acid medium. It should be noted that at the end of the tests all interactions shifted to antagonism. On the other hand, in the interactions explored by metabolomics (*F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2; *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2; y *A. fumigatiaffinis*/ *Aspergillus* sp. 2) the chromatographic profile of *Aspergillus* sp. 2 expressed signals that were maintained in paired interactions in culture media. Moreover, we detected secondary metabolites produced *de novo* during interactions. We conclude that pH is a variable that affects the growth of saprobic microfungi, and therefore induces changes in the types of interaction. Finally, dominant metabolomic profiles in *Aspergillus* sp. 2 suggest its ability to inhibit or bio-transform the metabolites produced by the interacting organism, resulting of great interest for biocontrol.

1 INTRODUCCIÓN

En sitios cercanos a minas se encuentran áreas extensas de sedimento, conocidas como jales mineros. Estos desechos son el resultado de los procesos físicos y químicos para la extracción de minerales, los cuales, se caracterizan por la presencia de cobre (Cu), cadmio (Cd), arsénico (As) y plomo (Pb), elementos que, en altas concentraciones tienen efectos tóxicos (*Mendez-Ramírez & Armienta, 2012; Ruiz & Armienta, 2012*). Ejemplo de ello, son las anomalías biogeoquímicas que se propician con el aumento de la cantidad de microelementos en el suelo, afectando su calidad e inhibiendo la descomposición de la materia orgánica (*Puga et al., 2006*). Este proceso, evita que se establezca la comunidad vegetal debido a la carencia de nutrientes, agua, oxígeno y otros elementos necesarios para la subsistencia de la microbiota nativa que podría ayudar al establecimiento de organismos vegetales (*Huang et al., 2012*).

Con referencia a lo anterior, resulta increíble la posibilidad del establecimiento de plantas en un jal minero. No obstante, se ha reportado la presencia de gimnospermas en el jal “El Fraile” ubicado dentro del municipio de Taxco (*Gómez-Bernal et al., 2010*). Así pues, dicho suceso está directamente relacionado con las interacciones planta microorganismo. Siendo el mayor sitio de interacción, al menos en plantas terrestres, las raíces; zona mejor conocida como rizósfera. Esta zona es una fuente importante de compuestos orgánicos y exudados, altamente solubles que proporcionan una entrada continua de carbono (C) al suelo. Estos compuestos tienen una fuerte influencia en la actividad biológica y en la estructura de la comunidad fúngica. Dentro de la cual se encuentran los micromicetes saprobios, miembros comunes en la rizósfera (*Reinhold-Hurek et al., 2015*).

Los hongos microscópicos del suelo o micromicetes, son conocidos por tolerar y desintoxicar metales por varios mecanismos biológicos (*Sampedro et al., 2004*). Tienen un papel significativo en los procesos de mineralización de la materia orgánica, presente en el suelo, y tienen una gran participación en algunos ciclos biogeoquímicos esenciales para la vida como el ciclo del carbono (C), fósforo

(P) y recientemente se han relacionado con el ciclo del nitrógeno (N) (*Lenhart et al., 2012; Maeda et al., 2015*).

El papel de estos microorganismos es vital para el funcionamiento de los ecosistemas y esta mediado por sus interacciones inter- e intraespecíficas. Éstas, generalmente son señalizadas por la producción de metabolitos secundarios que responden a variables ambientales (pH, principalmente) y tienen una fuerte influencia en el desarrollo de las plantas (*Werner et al., 2014*). Ya que estas interacciones facilitan la movilización de nutrientes, la degradación de sustancias fitotóxicas, la producción sustancias que promueven o inhiben el crecimiento de otros microorganismos, y el suministro de grandes cantidades de biomasa microbiana al suelo, contribuyendo al uso óptimo de nutrientes por parte de la comunidad vegetal (*Sampedro et al., 2004*). Por lo que su estudio es de gran relevancia para comprender el funcionamiento de los ecosistemas y el flujo de sus nutrientes (*Chen et al., 2018*).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Minería y sus residuos tóxicos

Históricamente, la minería es un sector económico que ha contribuido de forma importante al desarrollo del país (*Gómez-Bernal et al., 2010*), por lo que es una de las actividades de mayor tradición en México. Actualmente comprende la explotación de metales preciosos, metales industriales, minerales metálicos y no metálicos, y metales obtenidos como subproductos (*Ruiz & Armienta, 2012*). Desafortunadamente, esta actividad que requiere de una gran demanda de agua y energía, es considerada como una de las principales causas de origen antropogénico que contribuyen a la degradación de los ecosistemas generando un impacto negativo en el ambiente (*Hatje et al., 2017*). Ejemplo de esto, son los “jales mineros”, los cuales están formados por residuos acumulados de los procesos de trituración y molienda de las rocas, durante la obtención de minerales mediante diferentes procesos físicos o químicos. Éstos pueden contener sulfuros, minerales de ganga (cuarzo, clorita, feldespato, principalmente.) y residuos de los

reactivos utilizados en los procesos de separación (*Mendez-Ramírez & Armienta, 2012*).

Los jales difieren de los suelos en su composición química, que es relativamente uniforme y, sobre todo, que carecen de materia orgánica y de elementos necesarios para la vida, debido a que al momento de la extracción se da un aumento de la cantidad de microelementos, alcanzando niveles de macroelementos, afectando la descomposición de la materia orgánica (*Puga et al., 2006*) y por tanto la disponibilidad de nutrientes. Algunas restricciones físicas y químicas típicas de los jales mineros son: una textura fina que por el tamaño de partícula provoca una estructura sólida compacta carente de espacios para aire y agua, limitando el contenido de humedad. Además, de que los desechos del jal pueden tener condiciones extremas de acidez y concentraciones elevadas de metales y metaloides (*Delfín-Alcalá & Durán-de-Bazúa, 2008; Huang et al., 2012*).

El pH es uno de los principales factores que afectan la dinámica de los minerales, porque regulan la solubilidad de metales, metaloides y otros iones en el agua intersticial, y que son tóxicos para el crecimiento de las plantas (*Huang et al., 2012*). Debido a las condiciones de acidez, falta de nutrientes, agua y aire, presentes en el sustrato de un jal es improbable que pueda desarrollarse una microbiota nativa (hongos, bacterias, protozoos, nematodos, microartrópodos, etc.) que contribuya al crecimiento y mantenimiento de especies vegetales (*Delfín-Alcalá & Durán-de-Bazúa, 2008*). Estos sedimentos son depositados cerca de las minas de extracción, a lo largo de varias hectáreas, dejando su superficie expuesta lo que posteriormente provoca una dispersión del material particulado (*Huang et al., 2012*). Cuando están expuestos a la intemperie, pueden llegar a oxidarse y propiciar la formación del drenaje ácido, el cual, se caracteriza por tener un alto contenido de metales (*Mendez-Ramírez & Armienta, 2012*). Lo que genera que los suelos de las zonas aledañas a los residuos mineros tengan un pH drásticamente ácido.

2.2 La minería en México: Taxco

En México la producción minera está concentrada en trece estados, dentro de los cuales destaca el Estado de Guerrero. A lo largo del siglo XX, las minas de Taxco, Guerrero, fueron reconocidas por su producción de metales y con más de 450 años de actividad minera intensiva, se han suscitado descargas de grandes cantidades de desechos mineros en las áreas circundantes (*Talavera et al., 2006*). El distrito minero de Taxco fue uno de los grandes productores de oro y la plata durante la época colonial. En este distrito, se encuentra la Unidad Minera de Taxco (UMT), destacada por sus actividades de extracción de plata (*Gómez-Bernal et al., 2010*). La UMT alberga una gran cantidad de desechos mineros extraídos o enterrados durante el siglo XX y se pueden observar residuos reconocibles de los desechos generados durante los tiempos modernos (*Talavera et al., 2006*) como ocurre en el jal “El Fraile”.

El Fraile tiene un embalse con jales producidos entre 1940-1970, con dos acumulaciones a orillas de los efluentes adyacentes del arroyo Cacalotenango. Estas acumulaciones se encuentran directamente sobre areniscas calcáreas y pizarras de baja permeabilidad que facilitan el drenaje de los lixiviados. Se estima que están depositados alrededor de 5 millones de toneladas de relaves (*Talavera et al., 2006*). Sin embargo, a pesar de las condiciones adversas de “El Fraile”, se ha descrito la presencia de diversos organismos vegetales colonizándolo, destacando el género *Cupressus* (*Gómez-Bernal et al., 2010*). Suceso justificado por la capacidad de las plantas para desarrollar mecanismos de absorción, translocación y acumulación de algunos metales presentes en este tipo de sitios. Estos mecanismos son favorecidos, en gran parte, por las interacciones que ocurren en la rizósfera y que facilitan la asimilación de nutrientes por parte de las plantas (*Rugova et al., 2017*), actividad muchas veces realizada por la micobiota nativa.

2.3 La rizósfera y los micromicetes saprobios

La rizósfera, es un término acuñado por Lorenz Hiltner en 1904 (*Rugova et al., 2017*) y hace referencia al suelo adherido y afectado por las raíces (*Reinhold-*

Hurek et al., 2015). En este compartimento las plantas exudan compuestos orgánicos (productos químicos) que contribuyen al intercambio de gases, al agotamiento de nutrientes inorgánicos, y para comunicarse con organismos circundantes (*Badri et al., 2009; Reinhold-Hurek et al., 2015*). Los exudados de la raíz son compuestos orgánicos solubles que proporcionan una entrada semicontinua de carbono (C) lábil al suelo; en contraste con entradas transitorias de C recalcitrante proveniente de restos orgánicos como las raíces e hifas. En consecuencia, los exudados tienen una gran influencia en la actividad biológica del suelo y en su estructura (*Meier et al., 2012; Reinhold-Hurek et al., 2015*).

La rizósfera, es de suma importancia para la nutrición, la salud y la calidad de las plantas y favorece a la comunidad microbiana (*Meier et al., 2012*), ya que propicia el mejoramiento de la disponibilidad de nutrientes en la zona del suelo adyacente a las raíces y la movilización de nutrientes minerales poco solubles (mediante la liberación de agentes quelantes y alteraciones en el pH del medio). Por lo tanto, este compartimento establece y modela diversas relaciones tróficas y la proliferación considerablemente mejorada de algunas especies microbianas y de su biomasa (*Hinsinger et al., 2005; Rengel & Marschner, 2005*).

Es importante comprender los factores que influyen en la composición y funcionamiento de las comunidades microbianas (*Berg & Smalla, 2009*). Principalmente los hongos, por ser agentes de control biológico quienes presentan varias ventajas, en comparación con las bacterias, por su abundante biomasa y su eficiente propagación en el suelo y la rizósfera (*Morgan et al., 2005*). Incluso, una gran variedad de mecanismos realizados por los hongos en la rizósfera están involucrados en el control de fitopatógenos dentro de los que destacan: la competencia por los nutrientes, la producción de antibióticos y la resistencia inducida (*Morgan et al., 2005*).

El reino Fungi, incluye a los phyla *Chytridiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Mucoromycota*, *Zoopagomycota*, *Microsporidiomycota* y *Cryptomycota* (*Blackwell et al., 2006; Hibbett et al., 2007; Spatafora et al., 2016*). Este reino alberga, a organismos quimioheterótrofos y osmótrofos (*Herrera & Ulloa, 2004*) que están

constituidos por un talo unicelular o filamentosos (hifa; que puede ser septada o cenocítica) delimitado por una pared celular rígida (*Herrera & Ulloa, 2004; Fernández, 2014*). La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad que protege a las células de diferentes tipos de estrés ambiental, como los cambios osmóticos. Además, permite la interacción con el medio externo ya que algunas de sus proteínas son adhesinas o receptores. Siendo ésta, una estructura específica de la célula fúngica compuesta básicamente de polisacáridos (como la quitina, el glucano y el manano) (*Pontón, 2008*). Según el grupo, pueden presentarse otros polisacáridos en la pared. Los hongos son generalmente sésiles, aunque presentan flujo citoplasmático dentro del micelio; en algunos grupos se producen estructuras móviles (zoosporas). El núcleo es eucariótico. Los talos pueden ser uni- o multinucleados, con células homo- o heterocarióticas, haploides, dicarióticas, o diploides, las últimas generalmente de corta duración (*Herrera & Ulloa, 2004*).

Los hongos son un grupo diverso de organismos con una gran variedad de estrategias reproductivas. Si bien, algunas especies pueden reproducirse sexualmente, muchas se reproducen asexualmente la mayor parte del tiempo. Por lo que se pueden encontrar especies que van desde completamente asexuales a casi exclusivamente sexuales e incluyen aquellas que realizan ambas estrategias en diversos grados (*Nieuwenhuis & James, 2016*). La nutrición de los hongos puede lograrse por diferentes estilos de vida, parásita o simbiótica y saprobiótica (*Herrera & Ulloa, 2004; Fernández, 2014*). Además, son capaces de cambiar entre diferentes estilos de vida para adaptarse a los cambios ambientales. Su estrategia ecológica está conectada a su secretoma (el cual se define como la combinación de proteínas secretadas, así como la maquinaria celular involucrada en el proceso) puesto que los hongos obtienen nutrientes secretando enzimas a su entorno y adquiriendo las moléculas previamente digeridas (*Estrada-Luna et al., 2010; Muszewska et al., 2017*).

El reino de los hongos está constituido por organismos especializados en la descomposición de materia mediante la excreción de enzimas hidrolíticas y lignocelulíticas, responsables de la deconstrucción inicial de complejos

compuestos orgánicos (lignina y celulosa) (*Crowther et al., 2012; Jayasiri, 2015*). Un ejemplo canónico de una enzima hidrolítica fúngica es la serina proteasa (SP, enzima generalizada en los hongos), esencial para realizar gran variedad de funciones tales como: la maduración de proteínas, respuesta inmune, apoptosis, y el procesamiento del citocromo en las mitocondrias para la descomposición y adquisición de nutrientes (*Muszevska et al., 2017*). Además, los hongos son capaces de secretar cócteles de metabolitos secundarios, muchos de los cuales poseen actividades biológicas prominentes. Tal es el caso de la actividad antibiótica que inhibe la competencia de otros microorganismos. Resultando así en la hipótesis del metabolito ecológico, que postula a los metabolitos secundarios como moduladores de las interacciones entre sus productores y otros organismos. A tal punto de incluso inhibir la actividad o la síntesis de enzimas hidrolíticas y de otros metabolitos secundarios de alguno de los organismos en interacción (*Chatterjee et al., 2016*).

Los hongos saprobios, en especial los micromicetes (denominados así por su minúsculo tamaño) son componentes importantes de la rizósfera (*Sampedro et al., 2004*). Éstos, tienen la capacidad de traslocar C, N y P (*Crowther et al., 2012*), pese a que la cantidad total de P en el suelo está presente en formas no disponibles para las plantas y otros organismos (> 80 %), debido a la adsorción, precipitación o conversión de formas orgánicas (*Rengel & Marschner, 2005; Crowther et al., 2012*). Es aquí, donde las enzimas hidrolíticas producidas por los hongos saprobios resultan imprescindibles, ya que son las responsables de los pasos iniciales de la deconstrucción de las paredes celulares de las plantas y la mineralización de compuestos complejos en moléculas inorgánicas simples (azúcares, aminoácidos, NH_4^+ , PO_4^{3-} , H_2O y CO_2) que pueden ser asimiladas por las plantas y otros microorganismos (*Crowther et al., 2012*). La microbiota saprobia contribuye en la dinámica del P de los suelos, a través del recambio de los procesos microbianos de mineralización-inmovilización (*Rangel & Marschner, 2005*). Estos microorganismos pueden excretar ácidos orgánicos que incrementan la solubilidad del P, como enzimas con actividad fosfatasa que hidrolizan mono-, di- y tri-ésteres de fosfato. Algunos ejemplos de estos microorganismos son los

géneros *Aspergillus*, *Emmericella*, *Penicillium* y algunos hongos micorrízicos (Cerón & Aristizábal, 2012). Asimismo, se ha reconocido la contribución fúngica hasta en un 18% en procesos de desnitrificación en algunos sistemas terrestres (Maeda et al., 2015). De igual modo, Lenhart et al. (2012) dieron a conocer la formación de metano (utilizando metionina como precursor) en células fúngicas en condiciones aeróbicas, señalando a los hongos como otra fuente de metano en el medio ambiente.

Es evidente que los micromicetes saprobios son capaces de cambiar entre diferentes estilos de vida para adaptarse a los cambios ambientales (Muszewska et al., 2017). También son conocidos por tolerar y desintoxicar metales por varios mecanismos biológicos que incluyen precipitación extracelular e intracelular, quelación y cristalización, transformación de metales (transformación de valencia), biosorción a la pared celular y pigmentos, disminución del transporte e impermeabilidad, eflujo, compartimentación intracelular, secuestro y absorción activa (Zafar et al., 2007). Por lo que constituyen un componente dominante en el complejo microbiano de suelos altamente contaminados (Arredondo-Solórzano et al., 2016).

2.4 El pH como variable determinante en el reino Fungi

El pH es considerado como una de las propiedades químicas más importantes del suelo, debido al efecto significativo que ejerce sobre las características físicas, químicas y biológicas de éste (Pereira et al., 2007). Este parámetro es capaz de afectar la actividad de enzimas individuales, y a su vez determinar la supervivencia de las células que dependen de ellas para recolectar y asimilar nutrientes (Manteau et al., 2003). Esta variable induce muchas tensiones en las funciones celulares, incluida la alteración de la disponibilidad de micronutrientes, la función de las proteínas y el potencial de la membrana (Selving & Alspaugh, 2011). En consecuencia, regula el tipo de organismos que se desarrollan en el suelo (Pereira et al., 2007).

Los microorganismos son más susceptibles a los cambios de pH ambiental, porque sus células están en contacto directo con su entorno. No obstante, se sabe

que varios microorganismos tienen la capacidad de prevalecer en presencia de amplios rangos de pH (*Manteau et al., 2003*). Al respecto, en los hongos se ha reportado una menor correlación en su distribución con dicha variable, contrario a lo exhibido en las comunidades bacterianas del suelo (*Rousk et al., 2010*). Así mismo, se ha demostrado que el crecimiento fúngico es favorecido en pH ácido, mientras que el crecimiento bacteriano se ve beneficiado en pH básico (*Rousk et al., 2011*). Cabe mencionar, que la influencia del pH sobre la comunidad fúngica ha sido menos explorado en comparación con la comunidad bacteriana (*Rousk et al., 2010*), por lo que es necesario realizar más investigaciones en este campo.

Los hongos constituyen uno de los grandes grupos del suelo, que a menudo son capaces de sobrevivir en una amplia gama de condiciones ambientales, especialmente de pH (*Selving & Alspaugh, 2011*). Esta variable regula el ensamblaje de las comunidades de microorganismos que se desarrollan en el suelo (*Pereira et al., 2007*). Particularmente, las especies fúngicas se desarrollan en un pH óptimo de 5 a 9 sin mostrar inhibición significativa en su crecimiento, aunque algunos estudios han mostrado preferencia por ciertos valores de pH para diferentes taxones de hongos del suelo (*Rousk et al., 2010*). *Aspergillus nidulans*, por ejemplo, crece en un rango de pH que va de 2.5 a 9 (*Selving & Alspaugh, 2011*).

Así pues, las respuestas adaptativas inducidas por los cambios en el pH ambiental se han comenzado a estudiar con mayor interés en organismos modelo (*Vylkova, 2017*). Lo que ha dado pauta a la descripción de algunas vías de señalización reguladas de manera directa o indirecta por el pH. Siendo estas, componentes importantes de su maquinaria celular y de la capacidad de estos organismos para sobrevivir a un amplia diversidad de entornos (*Selving & Alspaugh, 2011*).

Hoy en día se sabe que organismos pertenecientes al Reino Fungi presentan vías de señalización, bioquímicas, únicas, inusuales y conservadas, sensibles al pH (*Keller et al., 2005; Rousk et al., 2010*). Y que éstas les proporcionan la cualidad de secretar ácidos o álcalis, según sean sus requerimientos. Hasta el momento se han reportado dos vías de señalización. La

primera como respuesta al estrés de un pH ácido en *Saccharomyces cerevisiae*, y la segunda en respuesta al pH básico, conocida como la vía de señalización alcalina Pal / Rim (Pal en hongos filamentosos y Rim en hongos similares a levaduras), una de las cascadas de señalización más especializadas y conservadas en hongos, descrita en *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *Yarrowia lipolytica* y varios hongos patógenos (Vylkova, 2017). Esta última, es un fenómeno que aún no se termina de comprender a pesar de ser la más estudiada y común (Selving & Alspaugh, 2011).

La alcalinización ambiental, se activa en respuesta a señales de pH alcalinas o neutras y ha sido estudiada en múltiples especies resultando de suma importancia en la patogénesis fúngica. Además, los componentes centrales de señalización se conservan entre distintas especies de hongos, tanto filamentosas como levaduriformes, pero con cierto grado de especificidad de señalización entre especies fúngicas (Selving & Alspaugh, 2011). La vía alcalina es un proceso generalmente mediado por el amoníaco, una molécula multifuncional con diversos papeles en eucariotas (e.g. *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* y *Debaryomyces hansenii*, y *Colletotrichum* sp.). El amoníaco se genera ya sea extracelularmente o dentro de la célula fúngica como un subproducto del catabolismo de proteínas y aminoácidos, nutrientes comunes en muchos nichos de hospederos. La acumulación de este compuesto altamente básico en el entorno inmediato aumenta el pH y su producción es regulada por señales ambientales (Vylkova, 2017).

Generalmente, los hongos alcalinizan o aumentan el pH ambiental a un ritmo constante pero lento. Sin embargo, *Candida albicans*, patógeno humano, es una clara excepción ya que es capaz de alcalinizar el pH ambiental de 4 a 7.5 con amoníaco en pocas horas. Opuesto a lo anterior, algunos hongos acidificantes secretan compuestos orgánicos a fin de disminuir el pH de su entorno, pero también pueden elevarlo según las necesidades de su entorno (Selving & Alspaugh, 2011; Vylkova, 2017). Cabe destacar, que en el proceso de adaptación a diferentes condiciones de pH pueden estar involucradas enzimas o conjunto de enzimas secretadas, permeasas y metabolitos exportados todos los cuales deben

funcionar a pH ambiental para que su pH óptimo coincida con el de su entorno (Peñalva & Arst, 2002; Manteau et al., 2003). La mayoría de las investigaciones sobre la capacidad de los hongos para modificar el pH ha sido ampliamente estudiada en hongos patógenos (e.g. *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. albicans*) (Selving & Alspaugh, 2011; Vylkova, 2017).

2.5 Interacciones inter e intra-específicas

Como se ha mencionado, los hongos saprobios son considerados los principales descomponedores primarios de compuestos recalcitrantes (e.g. lignina). Sin embargo, este proceso puede ser fuertemente afectado por las interacciones ecológicas que se establezcan entre especies (Chen et al., 2018). Desde el punto de vista funcional, una sola planta puede ser referida como un microcosmos, donde la estructura y las funciones están organizadas por una densa red de interacciones, entre la planta y sus co-habitantes y entre miembros de la comunidad microbiana que colonizan su rizósfera.

Los tipos de interacciones entre especies de hongos, así como las respuestas de especies fúngicas particulares a tales interacciones, dependen de la disponibilidad de nutrientes en el sustrato y de las condiciones ambientales. Por lo que la coexistencia de especies fúngicas en un sustrato implica que se ha alcanzado un equilibrio entre la supervivencia y la reproducción (HilleRisLambers et al., 2012; Morón-Ríos et al., 2017). Por consiguiente, la baja incidencia de una especie en una comunidad fúngica podría atribuirse a condiciones ambientales no ideales o a la competencia con otros hongos (Morón-Ríos et al., 2017). Las interacciones interespecíficas entre micelios de diferentes especies producen cambios principalmente en la morfología y fisiología del micelio en la zona de interacción (Šnajdr et al., 2011). Así mismo, pueden tener diversos efectos sobre los sustratos, permitiendo la degradación óptima de madera y rocas. Por lo que las interacciones con la comunidad microbiana probablemente contribuyan a la biomineralización y, por lo tanto, a la formación de suelo (Morón-Ríos et al., 2017).

En cuanto a las interacciones intraespecíficas, los estudios empíricos raramente consideran la variabilidad de las respuestas entre poblaciones de la

misma especie. Lo que supone que dentro de las especies la variación es insignificante. Sin embargo, la variación intraespecífica puede reducir los efectos generales de las alteraciones ambientales en la especie, amortiguando los impactos ambientales (McLean et al., 2018). Existen amplios estudios comparativos sobre la variación interespecífica, lo que podría indicar que hay pocas especies con suficiente información intraespecífica. Por ello, como lo menciona McLean et al. (2018) con el fin de evaluar los rasgos de genotipos locales, se necesitan análisis comparativos que incluyan relaciones tanto a nivel intra- como a nivel interespecífico.

Debido a que los diferentes grupos fúngicos, frecuentemente viven en entornos compartidos por otros grupos, la consideración de las interacciones intra- e interespecíficas es esencial para comprender su influencia en los procesos ecosistémicos (Fernández & Kennedy, 2016). Y para cumplir con dicho fin, se han estipulado algunas hipótesis enfocadas principalmente a interacciones bacterianas que pueden adaptarse a otros sistemas microbianos. Tal es el caso de La Teoría del Mercado Biológico, La Hipótesis de la Reina Roja (RQH), La Hipótesis de la Reina Negra (BQH) y Efecto Gadgil (esta última enfocada en hongos), las cuales se describen a continuación.

Desde los estudios realizados por Romell (1938) y Gadgil & Gadgil (1971, 1975) se le denominó “Efecto Gadgil” a patrones observados durante la descomposición de la hojarasca o de la materia orgánica del suelo realizada por hongos ectomicorrízicos (EM, solo un pequeño número de estos); debido a la competencia por los recursos limitados (Fernández & Kennedy, 2016); llevando a la inhibición directa y a la supresión de las tasas de descomposición por hongos saprobios a causa de las interacciones bióticas negativas con hongos EM y sus raíces hospedadoras asociadas (Bending, 2003). Los mecanismos responsables de tal efecto no se terminan de comprender (competencia por nitrógeno, inhibición química, micoparasitismo y alteración en la disponibilidad del agua) y algunos aún son desconocidos. Lo que certero es, que las comunidades de descomponedores fúngicos frecuentemente tienen relaciones negativas con respecto a la tasa de descomposición y diversidad, que se cree, es el resultado de que los

descomponedores son agresivamente antagónicos entre sí (*Fernández & Kennedy, 2016*). Por lo tanto, la magnitud del "Efecto Gadgil" dependerá de la disponibilidad de nutrientes presentes en el suelo particular que se estudia (*Bending, 2003*).

En 2014 Wernera et al., propusieron la teoría del Mercado Biológico que sostiene que los intercambios de recursos y servicios entre organismos pueden analizarse en términos mercantiles, con individuos que realizan inversiones comerciales estratégicas para maximizar sus ganancias. Esta teoría, es particularmente útil en el estudio de los mutualismos: interacciones cooperativas entre individuos de diferentes especies. El marco del Mercado Biológico es aplicable, de manera teórica, si se cumplen algunas condiciones tales como: los bienes o servicios deben intercambiarse entre individuos; deben existir al menos dos clases distintas de comerciantes; los organismos de al menos una clase deben poder elegir o cambiar de pareja; debe haber diferencias individuales en el costo energético de los productos básicos, de modo que se ejerza una competencia, y debe haber cierta variación temporal de la oferta y la demanda de los productos básicos, propiciando así fluctuaciones de costo. Aunado a ello, esta teoría propone las siguientes seis estrategias para optimizar el éxito en el mercado: a) evitar malos socios comerciales, esto va en función de los diversos socios y sus diferentes costos; b) construir lazos comerciales; la estructuración espacial de los socios puede limitar la propagación de socios menos beneficiosos y favorecer la evolución de los intercambios cooperativos, c) diversificarse; ofrecer múltiples bienes en lugar de uno lo que reduce la exposición a la volatilidad de los precios; o especializarse; pudiendo ofrecer un bien a un precio inferior aumentando sus posibilidades de superar a los competidores, d) ser indispensable; por ejemplo en una función vital como la reproducción se aumenta el valor en el mercado, e) "guardar para un día lluvioso"; ya que la gestión cuidadosa de los recursos es importante para el comercio futuro a un mejor precio, y finalmente, f) eliminar la competencia; si bien la eliminación directa de la competencia es una desviación de las suposiciones del mercado biológico; el antagonismo contra otros individuos ayuda a asegurar las condiciones comerciales

favorables para el individuo que los utiliza. Por lo que es probable que este tipo de estrategias antagónicas se vean favorecidas en lugar de superar a la competencia.

La RQH (por sus siglas en inglés, *Red Queen Hypothesis*), propuesta por Van Valen, sienta las bases para el estudio de interacciones antagónicas que pueden resultar en coevolución (*Mas et al., 2016*). Esta hipótesis sostiene que las especies deben evolucionar continuamente para sobrevivir frente a sus enemigos (*Brockhurst et al., 2014*), es decir, todas las especies experimentan un ambiente en constante cambio como consecuencia de la coevolución con otras especies (*Morris et al., 2012*). Por lo tanto, cada adaptación de una especie sucede en respuesta a las adaptaciones contrarias de la especie interactuante, de modo que se requiere un cambio evolutivo perpetuo para existir (*Brockhurst et al., 2014*). Un ejemplo claro, se observa entre algunos hospederos y sus parásitos, dado que los parásitos deben adaptarse para infectar a un genotipo específico (*Lively, 2010*) y esto requiere de cierta especificidad del parásito hacia el hospedero para una infección exitosa (*Gibson et al., 2015*).

La teoría alternativa de coevolución BQH (por sus siglas en inglés, *Black Queen Hypothesis*), propone que algunos organismos de vida libre pueden perder determinadas funciones como resultado del establecimiento de interacciones de cooperación muy estrechas. Esta pérdida de función es posible porque otros organismos en su entorno cercano proporcionan la función, ofreciendo un entorno estable. Este proceso evolutivo es de gran importancia en el contexto de interacciones duraderas, principalmente de cooperación, ya que influye en la evolución de la comunidad (*Mas et al., 2016*). La BQH, también puede visualizarse desde la perspectiva de un juego, en donde el objetivo de éste es tener el menor puntaje posible, por lo tanto se evita la carta con el mayor valor. En el contexto evolutivo, esta hipótesis deja claro que cualquier pérdida de un gen funcional tiene un costo potencial en la forma física, pero una función indispensable para el ecosistema (*Morris et al., 2012*).

2.6 Metabolitos secundarios fúngicos

Muchos microorganismos pueden producir una amplia gama de metabolitos secundarios, especialmente bacterias y hongos que habitan en el suelo, debido a la complejidad de los ecosistemas y sus interacciones (Brakhage, 2013). El estudio sistemático del metabolismo secundario fúngico comenzó en 1922 bajo el liderazgo de Harold Raistrick, quien caracterizó más de 200 metabolitos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento y desarrollo de la penicilina que la atención general se centró en los metabolitos fúngicos (Keller et al., 2005).

Los hongos son organismos notables que producen una gran variedad de productos naturales a menudo llamados metabolitos secundarios (Calvo et al., 2002). Moléculas de baja peso molecular estructuralmente heterogéneas que, a diferencia de los metabolitos primarios, no son requeridos directamente para asegurar el crecimiento de los organismos que los producen y con frecuencia tienen potentes actividades fisiológicas (Keller et al., 2005; Brakhage, 2013). Son químicamente diversos, y producidos por algunas vías biosintéticas comunes, a lo largo del desarrollo morfológico (Keller et al., 2005; Jančić et al., 2016). La producción secundaria de estos compuestos es controlada por factores de transcripción globales, codificados por genes no vinculados a los grupos de genes biosintéticos. Dichos genes regulan múltiples procesos fisiológicos y generalmente responden a señales ambientales como el pH (Fox & Howlett, 2008).

Comúnmente, el metabolismo secundario se asocia con procesos de esporulación en microorganismos, incluidos los hongos. Su producción generalmente comienza tarde en el crecimiento del microbio, a menudo al ingresar a la fase estacionaria o de reposo, a medida que el micelio envejece. Algunos de estos compuestos orgánicos tienen efectos fácilmente observables en la diferenciación morfológica de los hongos. Varios estudios muestran que los compuestos excretados por el micelio pueden inducir la esporulación sexual y asexual en otros hongos; este fenómeno sucede a nivel de géneros y especies (Calvo et al., 2002). Además, los metabolitos secundarios desempeñan funciones en una gran variedad de procesos celulares como la transcripción, el desarrollo y

la comunicación intercelular (Calvo et al., 2002; Brakhage, 2013). Por tanto, pueden jugar un papel crucial en la nutrición, los procesos de esporulación, las interacciones con otros organismos y la tolerancia al estrés (Jančić et al., 2016). Cabe mencionar que, en la mayoría de los casos estos compuestos no se han identificado y se desconoce el beneficio que le confiere al organismo (Calvo et al., 2002; Brakhage, 2013).

En interacciones, los micelios pueden producir compuestos orgánicos, volátiles o difusibles (COV y DOC), así como policétidos, péptidos no ribosómicos, terpenos, indolterpenos, entre otros (Fox & Howlett, 2008; Hiscox et al., 2018) a fin de alterar el pH del territorio que habitan, lo que inhibe el crecimiento de la competencia y actúa como mecanismo defensivo y de ataque. Muchos hongos producen mono y sesquiterpenos, y compuestos aromáticos, algunos de los cuales poseen actividad antifúngica. Las funciones de los COV y los DOC varían según la combinación de las especies involucradas, e incluyen la germinación de las esporas alteradas y los cambios en la morfología micelial y la actividad enzimática. En algunos casos puede ocurrir una inhibición mutua de ambos competidores, pero en otros puede estimularse el crecimiento micelial. Las defensas incluyen barreras físicas, por ejemplo, placas pseudosclerotiales, que comprenden bandas estrechas de tejido melanizado que rodean el territorio ocupado por el hongo (Hiscox et al., 2018).

Por otra parte, debido a que algunos de los metabolitos secundarios producidos por el organismos llegan a ser perjudiciales no solo para otros microorganismos sino para el organismo que los produce, los hongos los secuestran en vacuolas y vesículas para protegerse de la auto-toxicidad (Chanda et al., 2009). La regulación del metabolismo secundario en hongos es compleja, involucra múltiples proteínas y complejos que responden a diversos estímulos ambientales siendo la ventaja más probable para un organismo productor permitir que sobreviva en su nicho ecológico. Principalmente en el caso de organismos saprobios del suelo, que están expuestos a un ambiente hostil con una gran variedad de organismos en competencia (Fox & Howlett, 2008).

3 ANTECEDENTES

Son pocas investigaciones se han realizado en jales mineros con relación a la diversidad de hongos. Destacan los trabajos realizados en Yunnan, China (*Li et al., 2012*), el Estado de México (*Delfín-Alcalá & Durán-de-Bazúa, 2008*), y en sitios con altas concentraciones de metales pesados en México (característica de los jales mineros) (*Zafar et al., 2007*). Además, el número de taxones reportados varía considerablemente en todos los trabajos, siendo el jal minero de China (*Li et al., 2012*) el que destaca por su alta riqueza (20 taxones), mientras que en la mayoría de las investigaciones se han encontrado apenas algunos géneros (*Zafar et al., 2007; Delfín-Alcalá & Durán-de-Bazúa, 2008*). Lo interesante de estos trabajos es que coinciden en la presencia de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, lo que sugiere que éstos podrían ser un componente frecuente de las comunidades fúngicas en jales mineros.

Referente al pH y su repercusión en la fisiología del Reino Fungi, se ha demostrado que modula la producción de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) en *Aspergillus parasiticus* (*Buchanan & Ayres, 1975*). Mientras que en las especies *A. nidulans* y *A. parasiticus* se observó que provoca una disminución en la síntesis de micotoxinas (aflatoxina y esterigmatocistina) a medida que aumenta el pH del entorno (*Cotty, 1998*) pero, en *Penicillium ochrochloron* el aumento en dicha variable promueve una mayor excreción de metabolitos (*Vralb et al., 2012*). También, es considerado promotor de factores de patogenicidad en la especie *Botrytis cinerea* (a pH 3.1 y 6 produce metabolitos involucrados en la patogénesis) (*Manteau et al., 2003*), y controla la acumulación de carbohidratos (glucógeno y la trehalosa) de reserva en *Neurospora crassa* (*Virgilio et al., 2017*). Estos trabajos son evidencia clara de la importancia que tiene el pH sobre la producción de metabolitos fúngicos y por ende en su fisiología.

El antagonismo puede ser definido como la competencia por el sustrato y/o el espacio, particularmente cuando éstos están limitados (*Chen et al., 2018*). Este proceso depende de la producción de antibióticos (metabolitos secundarios) y enzimas hidrolíticas asociadas a la competencia por recursos (*Contreras-Cornejo*

et al., 2016) con el fin de eliminar a la competencia de manera directa ayudando a asegurar las condiciones favorables para el individuo que lo emplea (*Werner et al., 2014*). Por su parte la competencia hace referencia a los efectos negativos que un organismo tiene sobre otro al consumir o controlar el acceso a un recurso de disponibilidad limitada (*Shearer, 1995*). Y a su vez este proceso es modulado por las necesidades metabólicas de cada individuo. Un ejemplo claro de este tipo de interacción lo podemos visualizar en una placa de agar ya que se observan, en algunos fenotipos, defectos visibles en el desarrollo, la inhibición del crecimiento, lisis, motilidad y producción de pigmento (*Stubbendieck et al., 2016*).

Por otra parte la sinergia se define como la acción de dos o más causas cuyo efecto es superior a la suma de los efectos individuales. En este tipo de interacción, se pueden liberar metabolitos que son empleados por ambos interactuantes con un mismo fin (*Chen et al., 2018*). Por otro lado, la cooperación se ha conceptualizado en dos sentidos: 1) donación gratuita en una interacción por pares entre un donante y un receptor y 2) como un bien público, un recurso costoso producido por el cooperador y disponible gratuitamente para otros. Para los microbios, típicamente la última conceptualización se ha considerado más apropiada (*Tarnita, 2017*). Los comportamientos cooperativos son difíciles de interpretar porque aunque el costo puede ser muy obvio, los beneficios a menudo carecen de evidencias (*West et al., 2007*). Partiendo de las definiciones anteriores y considerando que muchas interacciones ya sean de antagonismo o sinergia, dependen de la competencia o la cooperación (respectivamente) para lograr la adquisición de nutrientes (*Deveau et al., 2018*), a lo largo de esta investigación emplearemos como sinónimos antagonismo y competencia, así como cooperación y sinergia.

La mayoría de los estudios sobre interacciones se llevan a cabo a nivel interespecífico y entre hongos con estilos de vida diferentes. Además, hasta donde sabemos no hay trabajos que evalúen las interacciones entre organismos aislados de jales mineros. Sin embargo, hay grandes aportaciones en el tema de interacciones hongo-hongo. Diversos grupos de investigación (*De Jaeger et al., 2010; Torres et al., 2017*) han encontrado evidencias sobre la capacidad

antagónica de hongos saprobios (*Trichoderma*, *Cladosporium cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*), para acceder a recursos mediante la inhibición o el micoparasitismo de algunas micorrizas (*Glomus* sp.) o patógenos fúngicos (*Puccinia horiana*, causante de la roya blanca del crisantemo). También se han reportado interacciones de cooperación entre hongos endófitos (e.g. *Pyrenophora leucospermi*, *Cadophora* sp., y *Phoma exigua*) y micorrizas arbusculares (*Rhizopagus irregularis*), así como entre saprobios fúngicos (*Phanerochaete velutina* y *Hypholoma fasciculare*), que mejoran la calidad del hospedero (*Verbascum lychnitis*) o el establecimiento de otras comunidades fúngicas o microbianas (Šnajdr et al., 2011; Wężowicz et al., 2017). Pocos trabajos incluyen experimentos a nivel intraespecífico como el realizado por Morón-Ríos et al. (2017). En el cual se reportaron interacciones de competencia relacionadas con procesos de biomineralización del suelo. Estas aportaciones no muestran patrones claros en el tipo de interacción, no obstante en la mayoría de ellos, los hongos saprobios respondieron de manera competitiva u antagónica.

Actualmente es sabido que el co-cultivo puede activar respuestas fisiológicas diferentes a aquellas que se observan cuando los microorganismos se encuentran en mono-cultivo. Esto, se refleja en la producción de metabolitos secundarios (cuya producción pueden ser *de novo*) (Brakhage, 2013; Jančič et al., 2016). Partiendo de lo anterior, se ha estudiado la actividad antifúngica de hongos saprobios (*Trichoderma*) mediada por sus metabolitos secundarios (azafilona T22, antraquinonas y T39 butenolide) sobre algunos hongos patógenos (*Leptosphaeria maculans*, *Phytophthora cinnamomi* y *B. cinerea*) (Vinale et al., 2009). De igual modo, se ha demostrado que los metabolitos secundarios producidos por *Stachybotrys elegans* (tricotecenos) se elevan durante el micoparasitismo de *Rhizoctonia solani* (Chamoun et al. 2015). Algo similar a los resultados de Chatterjee et al. (2016) quienes informaron que los metabolitos producidos por *A. niger* (saprobio) inhiben o biotransforman los metabolitos de *Fusarium verticillioides*, patógeno y *Clonostachys rosea*, micoparásito durante sus interacciones duales. Estos hallazgos resaltan la importancia de las interacciones

y de los organismos involucrados en ellas, sobre el aumento o disminución de sus metabolitos o la producción de nuevos.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1 Problemática

Los jales están constituidos por residuos de los procesos de extracción de minerales. Sus sedimentos presentan condiciones adversas para la vida (e.g. valores de pH extremos y contrastantes), que alteran la dinámica de las comunidades microbianas *sensu stricto*. Esta alteración potencialmente podría repercutir sobre la cubierta vegetal debido a la disminución en la disponibilidad de algunos nutrientes, siendo sistemas complejos para la biorremediación. A pesar de ello, en El Fraile [Gómez-Bernal et al. \(2010\)](#) han reportado la presencia de una cubierta vegetal destacable, representada por Gimnospermas siendo un sistema interesante para realizar estudios prospectivos sobre las capacidades ecológicas de micromicetes saprobios asociados a la rizósfera de estas plantas.

4.2 Justificación

Los micromicetes saprobios son una parte central del complejo microbiano, particularmente en sitios altamente contaminados. Son capaces de facilitar la sucesión ecológica, el establecimiento de la comunidad vegetal e influir en la dinámica de los ecosistemas, debido a sus interacciones ecológicas. Estas interacciones son moduladas por metabolitos secundarios que responden a diversos factores abióticos, tales como el pH. Se sabe, que los hongos pueden generar respuestas fisiológicas diversas según sea el pH de su entorno, para evitar efectos adversos en su desarrollo, reproducción y producción de metabolitos, etc. Sin embargo, el papel de los micromicetes saprobios en las interacciones ecológicas entre miembros de la comunidad fúngica aún se desconoce. Considerando que las variaciones extremas en el pH son una variable propia de los jales, conocer y caracterizar a nivel inter- e intraespecífico dichas interacciones bajo condiciones extremas y contrastantes de pH resulta sustancial para el desarrollo de estrategias de biorremediación. Por lo que, la implementación

integrativa de diversas herramientas, tales como experimentos *in vitro* y metabolómica permitirán obtener información sobre cómo el pH regula las interacciones y la producción diferencial de metabolitos secundarios durante éstas. Lo cual permitirá comprender el ensamblaje y prevalencia de las comunidades fúngicas en relaves mineros.

4.3 Importancia del estudio

A pesar de su importancia, los micromicetes saprobios, son un grupo poco estudiado en términos de su ecología y plasticidad funcional en respuesta a condiciones ambientales adversas. Particularmente, no existe información referente a el efecto que condiciones extremas de pH tienen en su desarrollo e interacciones en sitios impactados por la minería. Considerando lo anterior, la presente investigación es una contribución al conocimiento de las capacidades ecológicas fúngicas bajo condiciones contrastantes de pH (ácido y básico) y de su efecto en las interacciones a nivel inter- e intraespecífico. Además, la incorporación del análisis de metabolómica, permitirá una mayor comprensión en las respuestas fisiológica de los organismos interactuantes.

5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las interacciones que se establecen entre micromicetes saprobios aislados de la rizósfera de Gimnospermas en el jal “El Fraile” y cómo éstas varían bajo condiciones extremas y contrastantes de pH?

6 HIPÓTESIS

El pH influirá de manera significativa en las interacciones establecidas entre los micromicetes saprobios analizados; ya que esta variable tiene el potencial de afectar su fisiología y por tanto la coexistencia entre especies. Asimismo, se observarán interacciones de antagonismo durante los primeros días debido a la posible competencia por el espacio y los recursos, que serán más evidentes en el medio de cultivo básico ya que éste representa un elemento favorable para el

desarrollo fúngico. Posteriormente, habrá una disminución en la fuerza de las interacciones concluyendo los experimentos con interacciones de sinergia (cooperación).

7 OBJETIVOS

7.1 General

Evaluar el efecto de condiciones extremas y contrastantes pH sobre las interacciones inter- e intraespecíficas de cinco especies de micromicetes saprobios aislados del jal minero “El Fraile” en Taxco, Guerrero, y explorar las bases fisiológicas de las interacciones más destacadas en términos de producción de metabolitos secundarios.

7.2 Particulares

- a) Aislar la diversidad de hongos saprobios cultivables asociados a la rizósfera de gimnospermas en el jal “El Fraile”, Taxco, utilizando tres medios de cultivo.
- b) Agrupar la diversidad fúngica obtenida en morfotipos, evaluando caracteres macroscópicos tales como: tipo de crecimiento, color, forma y textura de los aislados.
- c) Seleccionar cinco morfotipos utilizando como criterio características ecológicas: crecimiento, exudados, producción de pigmentos, etc.
- d) Identificar a los micromicetes, seleccionados, con base a su morfología y al análisis de dos regiones genéticas ITS1-5.8-ITS2 del ADNr y β -tubulina.
- e) Implementar bioensayos de interacción *in vitro* utilizando cinco especies seleccionadas, en dos condiciones de pH contrastantes (3 y 8).
- f) Evaluar y fotodocumentar los bioensayos de interacción durante 14 días para determinar con índices de especializados el tipo de interacción.
- g) Seleccionar las interacciones con presencia de especies bioactivas durante los bioensayos, para un análisis de metabolómica.

- h) Realizar fermentaciones a pequeña escala (de cultivos axénicos y co-cultivos) de las interacciones elegidas, en medio líquido (pH 8) y medio sólido.
- i) Extraer los metabolitos secundarios producidos durante la fermentación de los organismos involucrados por medio de maceración y reparto.
- j) Explorar las bases fisiológicas de algunas interacciones utilizando técnicas de metabolómica (HPLC, UPLC-PDA-ESIMS y UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS).
- k) Comparar los perfiles metabolómicos individuales y en interacción, para identificar las señales químicas características de dichas interacciones.

8 METODOLOGÍA

8.1 Área de estudio

Taxco de Alarcón está situado al norte de la capital del estado de Guerrero a 1,752 msnm. Se localiza en la Provincia de la Sierra Madre del Sur, subprovincia 67 en la Depresión del Balsas, con un sistema de topofomas de sierras con cañadas (*Mendez-Ramires & Armienta, 2012*). Debido a la fisiografía del municipio, se presenta una variedad de climas que van desde cálido hasta templado subhúmedo con lluvias en verano (Acw_0) según la clasificación climática de Köppen (*Gómez-Bernal et al., 2010; Mendez-Ramires & Armienta, 2012*). La época de lluvias abarca los meses de junio a octubre, con una precipitación máxima en septiembre de 275 mm, mientras que en la época de secas la precipitación promedio es de 21.2 mm en el mes de febrero (*Gómez-Bernal et al., 2010; Mendez-Ramires & Armienta, 2012*).

La zona de estudio “El Fraile” está ubicado en Taxco, Guerrero, al sur de México (**Fig. 1**). Es un embalse de relaves ubicado a 12 Km al SO de la Ciudad de Taxco, aproximadamente, y contiene relaves producidos entre 1940-1970 (*Talavera et al., 2006*). La vegetación que prevalece es el bosque tropical caducifolio, y se ha determinado la presencia de ciertas plantas de asociaciones vegetales secundarias (e.g. *Bouteloua repens*, *Gomphena decumbens*) y también especies del bosque primario, como por ejemplo *Cupressus lindleyi*, especie

pionera ([Gómez-Bernal et al., 2010](#)). En mayo del 2018 se realizó la caracterización de la rizósfera del grupo de gimnospermas; *Cupressus*; consideradas para este trabajo. Con los datos obtenidos de esta caracterización se determinó que el pH de la rizósfera es alcalino (6.6-8) y que presenta un C% y de MO% (materia orgánica) muy bajos, mientras que el P% y el NT% (nitrógeno total) se determinaron de medios a pobres ([M. Patiño, comunicación personal, junio de 2019](#)).

8.2 Muestreo

Se colectaron muestras de sustrato asociado a tres individuos de *Cupressus lindleyi* presentes en el jal “El Fraile” durante dos muestreos realizados en los meses de octubre del 2017 y enero del 2018. Para la colecta de sustrato, se realizó un perfil con una profundidad de 0-45 cm. Posteriormente, con tubos Falcón de 50 mL esterilizados y etiquetados (número de muestra, sitios de colecta, coordenadas geográficas, nombre del colector y profundidad) se colectaron las muestras de sustrato a diferente profundidad. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se conservaron a una temperatura de 4.0 °C para su traslado a laboratorio con el fin de evitar el efecto de factores ambientales como la humedad, O₂ (oxígeno), CO₂ (dióxido de carbono), luz, calor y otros materiales pudieran alterar la naturaleza de la muestra hasta su procesamiento ([NOM-021-SEMARNAT-2000](#)).

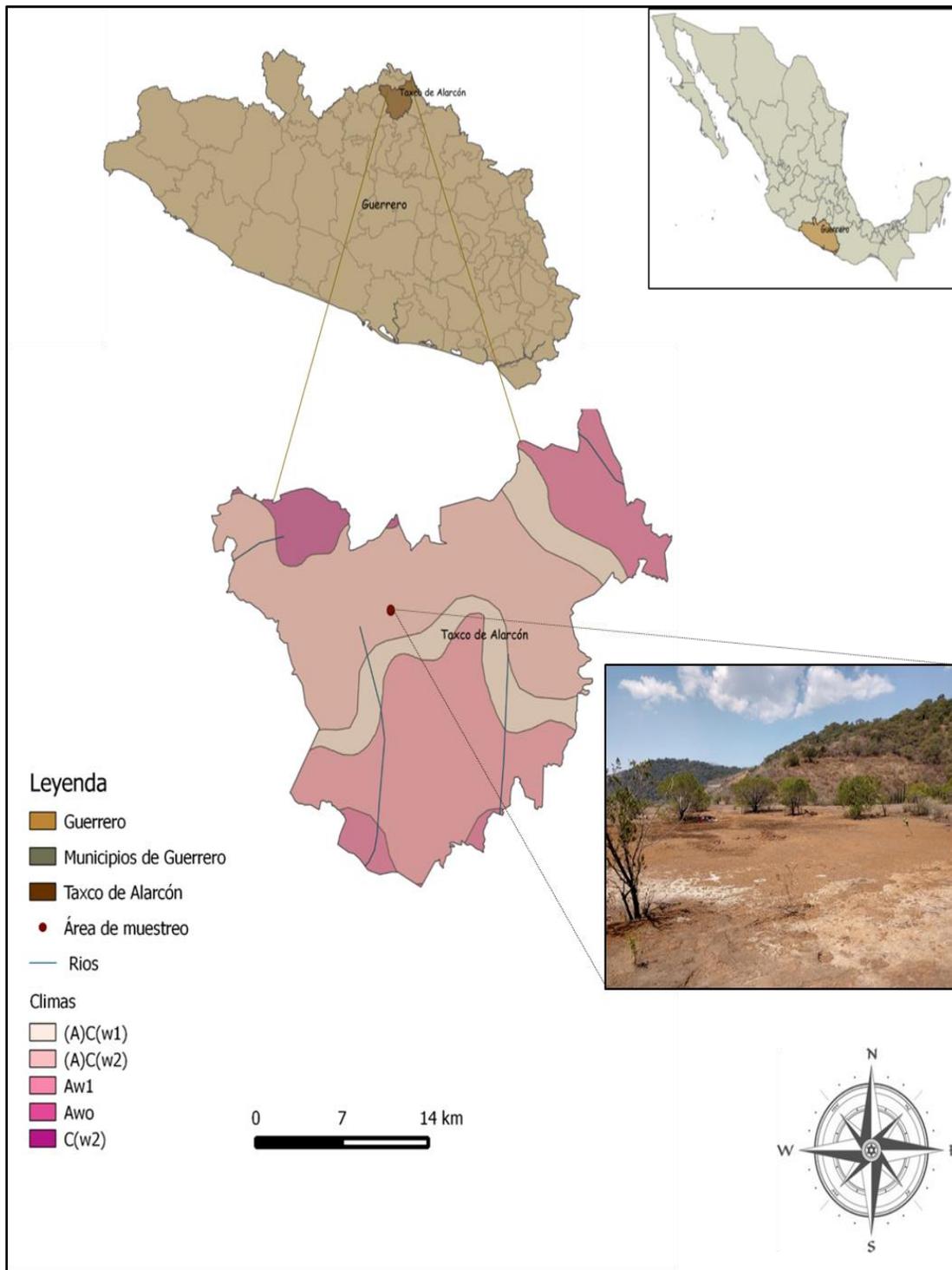


Figura 1. Localización del área de estudio. Los climas (A)C(w1), (A)C(w2), Aw1, Awo y C(w2) hacen referencia a la clasificación de Köeppen: semicálido subhúmedo, lluvias de verano con índice P/T entre 43.2 y 55; semicálido subhúmedo con lluvias de verano con índice P/T mayor a 55; cálido subhúmedo con una precipitación del mes más seco menor de 60 mm; cálido subhúmedo con precipitación del mes más seco entre 0-60 mm y templado, subhúmedo con una precipitación en el mes más seco menor de 40 mm, de manera correspondiente. Mapa elaborado en QGIS (v 2.01-Deufour), capas descargadas de CONABIO (<http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>) con escala 1:250000.

8.3 Procesamiento *ex situ* de las muestras

8.3.1 Aislamiento de la diversidad de hongos saprobios

Para el aislamiento de los micromicetos se hicieron dos pruebas, la primera se realizó con diluciones decimales seriadas, de 1×10^{-1} a 1×10^{-5} en agua destilada estéril (Warcup, 1950). La segunda, una modificación de la técnica de inoculación directa creada por Waksman en 1916 (Chesters & Thorton, 1956), la cual consistió; en tomar 0.5 g de sedimento el cual fue diluido en 1 mL de agua estéril. Seguido de ello se colocaron 0.2 mL de dilución en cajas de Petri y se agregó medio de cultivo.

Una vez estandarizado el protocolo se procesaron todas las muestras implementando cinco replicas. Se utilizaron tres diferentes medios, Agar Papa Dextrosa (PDA; 200g de papa, 20g de dextrosa, 15 g de agar y 1L de agua destilada), V8 Agar (V8; 160 ml de V8 jugo de verduras Campbells®, 15 g de agar y 1L de agua destilada) y Agar Harina de Maíz (CMA; 40 g de harina de maíz, 15 g de agar y 1L de agua destilada) adicionados con ampicilina (2.5 ml) para inhibir el crecimiento bacteriano. Cabe mencionar, que el pH de los medios fue de 6.5, 5.5 y 7.5; de forma respectiva; por otra parte se implementaron controles negativos, a fin de comprobar esterilidad durante el proceso. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 7 días, y se revisaron periódicamente para detectar oportunamente el desarrollo fúngico. Las colonias que se desarrollaron en los medios se aislaron en cajas de Petri con PDA realizando un raspado a la superficie del crecimiento con una aguja bajo condiciones de esterilidad. Los aislados se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso posterior.

8.3.2 Agrupación de la diversidad fúngica por su morfología

Se evaluó la morfología de caracteres macroscópicos en todos los aislados obtenidos para realizar un agrupamiento preliminar de la diversidad mediante la macromorfología de las colonias, dentro de las cuales consideramos el color de la colonia: anverso y reverso; aspecto de la superficie: algodonoso, aterciopelado, brillante, butiracio (apariencia y consistencia de mantequilla), cerebriforme, flocoso (aglomerados en copos), lanoso, liso, mucilaginoso, plegado, pulverulento, rugoso, veloso, zonado (bandas o zonas de apariencia distinta); consistencia: blanda,

dura, elástica, mucoide: superficie: convexa, elevada, plana, umbonada (con prominencia central en forma de cono); producción de exudado y de pigmento; tamaño de la colonia dado en el diámetro en mm y velocidad de crecimiento calculada mediante el registro del diámetro de la colonia a diferentes tiempos (Mier *et al.*, 2013). Dicha caracterización se realizó a los 21 días de crecimiento, cuando el organismo se encontraba en una etapa de madurez y esporulación en medio de cultivo PDA. Todos los ejemplares se foto-documentaron. Para su resguardo genético, un representante de cada morfotipo se transfirió a tubos de cultivo para su preservación *ex situ* en la colección del laboratorio C-121 Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, y así asegurar su uso *a posteriori*.

8.3.3 Selección de morfotipos para los bioensayos

Para la selección de organismos fúngicos que se utilizarían en los bioensayos de interacción, se analizaron características con potencial en la producción de metabolitos secundarios durante el proceso de maduración. Esto con base a la producción de pigmentos, exudados y el tamaño de la colonia características ya antes observadas en la sección de agrupación de los morfotipos.

8.3.4 Identificación taxonómica y molecular de los morfotipos seleccionados

8.3.4.1 Morfología

Para la determinación taxonómica se analizó la morfología de estructuras microscópicas (principalmente estructuras reproductivas e hifas) por medio de la preparación de laminillas semipermanentes y microcultivos. Para las laminillas se depositó una gotita de agua, glicerina o lactofenol en el centro de un portaobjetos, después se tomó un fragmento pequeño del micelio aéreo de la colonia con un asa estéril y se colocó dentro de la gota. Enseguida, se colocó un cubreobjetos presionando ligeramente. En el caso de las preparaciones con lactofenol, se fijó el contorno del cubreobjetos con barniz transparente para su preservación. En algunos casos, fue necesario realizar impresiones de la superficie de la colonia con ayuda de cinta adhesiva transparente de aproximadamente 5 cm, la cual se tomó por los extremos y se dobló hasta darle forma de “U” luego se colocó de

manera suave sobre la el micelio aéreo. Posteriormente, éste se montó sobre la gota de agua, colocada con antelación en el portaobjetos (Mier et al., 2013).

Por su parte, se elaboraron microcultivos en medio PDA. Para ello, se cortaron tres bloques de agar de aproximadamente 1 cm² con una aguja de disección estéril. Luego, se inoculó una fracción activa del hongo en cada bloque y se cubrieron con un cubreobjetos, dejándolos a temperatura ambiente de 3-5 días, tiempo en el que el organismo comienza la esporulación. Pasado este lapso, tomamos y colocamos el cubreobjetos sobre un portaobjetos con un poco de agua destilada (Mier et al., 2013). Para concluir, hicimos observaciones al microscopio (Zeiss modelo Axioskop con una cámara Axiocam ERc5s) empleando microscopia de campo claro y contraste de fases, con aumentos de 5X, 10X, 20X y 40X. La determinación taxonómica fue respaldada con el uso de literatura especializada *ad hoc* por ejemplo, Domsch et al. (1993), Herrera & Ulloa (2004), Ulloa & Halin (2006), Mirhedi et al. (2016) y Frisvad et al. (2019).

8.3.4.2 Identificación molecular

Debido a la complejidad para realizar determinaciones taxonómicas del Reino Fungi, en algunos casos la implementación de técnicas modernas de clasificación como lo es la secuenciación de ADN combinada con la taxonomía tradicional brinda un enfoque más integral (Jayasiri, 2015) y revolucionario útil en la ecología microbiana (De Filippis et al., 2017). En particular, la secuenciación de amplicones de genes taxonómicamente relevantes, tal es el caso de las regiones ITS y β -tubulina. Los cuales han sido propuestas como una herramienta primaria para la identificación de los hongos, siendo ampliamente utilizadas (Einax & Voigt, 2003; De Filippis et al., 2017).

Es de destacar que el gen 5. 8S esta integrado por repeticiones en *tanden* y se ubica entre los dos espaciadores internos transcritos, ITS-1 e ITS-2. Por lo que este gen presenta regiones altamente conservadas dentro de una especie, pero con suficiente variabilidad entre los diferentes tipos de hongos; lo que lo convierte en un marcador viable para la determinación hasta nivel especie (Villavicencio, 2013). Como resultado, la región ITS se ha designado recientemente como el código de barras oficial para el grupo de los hongos

(Köljalg *et al.*, 2013). Además, cuenta con una base de datos curada y rica en contraste con otros genes (De Filippis *et al.*, 2017). Por su parte, los genes que codifican para tubulinas, especialmente para β -tubulina, cada vez reciben más interés en estudios de grupos de especies debido a su abundancia en las células eucariotas, ya que sus heterodímeros son los constituyentes principales de los microtúbulos, por tanto su implementación, en las determinaciones moleculares no es de extrañarse (Einax & Voigt, 2003).

8.3.4.2.1 Extracción de ADN

Cada uno de los morfotipos objeto de estudio fue colocado en tubos Falcon con 25 mL de medio líquido PDA (Agar Papa Dextrosa) y sometido a las condiciones descritas con anterioridad (sección 8.3.1) de 15-20 días. El micelio obtenido, fue empleado para las extracciones de ADN utilizando CTAB de acuerdo al protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987). La integridad del ADN fue corroborada con electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % (p/v) teñidos con GelRed®, utilizando TAE 1X (85 V durante 30 min).

8.3.4.2.2 PCR y secuenciación de regiones de interés

Para la amplificación de las regiones de interés se utilizaron los siguientes oligonucleótidos específicos: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (White *et al.*, 1990); y Bt2a (TTCCCCGCTCCACTTCTTCATG) y Bt2b (GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC) (Glass & Donaldson, 1995). Para las reacciones de PCR, utilizamos dos protocolos que se describen a continuación:

En el primero, empleamos ADN genómico como templado, y las condiciones de reacción explicadas en la **Tabla 1**. El programa de amplificación consistió de una desnaturalización inicial de 95°C por 5m, 95°C por 25s, 55°C por 25s y una extensión final de 72°C por 25s, 72°C 5m, esto durante 35 ciclos y para concluir 4°C hasta el momento de retirar las muestras del termociclador.

Para el segundo protocolo, se utilizó como material/templado tejido fúngico/diluciones (1:100) de ADN genómico. Las concentraciones y el volumen de cada uno de los componente se describe en la **Tabla 2**, utilizamos el kit de PCR

Thermo Scientific Phire Animal Tissue Direct PCR Kit, para un volumen de 20 µL/ 50 µL. El programa de amplificación fue de 35 ciclos con las siguientes condiciones: 98°C por 5min, 98°C por 5s, 55°C por 5s, 72°C por 20s, 72°C por 1 min y 4 °C, temperatura que se mantuvo hasta ser retiradas las muestras. Los amplicones obtenidos por ambos protocolos fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % (p/v) y los productos se enviaron a secuenciar comercialmente.

Las secuencias se ensamblaron y su calidad fue evaluada usando Consed (v 29.0). Los alineamientos se realizaron con el programa Unipro UGENE (v 1.32.0), y mediante el algoritmo de Blast se compararon con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para la asignación taxonómica, utilizamos los parámetros reportados por [Millberg et al. \(2015\)](#), que proponen una homología de 98-100% para nivel especie, 94-97% para género, y 80-93% para orden.

Tabla 1. Componentes del protocolo general de PCR.

Componentes	Volumen de reacción 50 (µL)	Concentración final
H2O	37.3	-
Buffer	5	1X
MgCl2	2.5	25 mM
dNTPs	1	10 mM
Primer (forward)	1	10 mM
Primer (reverse)	1	10 mM
Polimerasa	0.2	1U
ADN	1	-

Tabla 2. Componentes del protocolo de PCR directo.

Componentes	20 (µL)	50 (µL)	Concentración final
H ₂ O	6.6	16.5	-
Buffer	10	25	1X
Primer (forward)	1	2.5	0.5 mM
Primer (reverse)	1	2.5	0.5 mM
Polimerasa	0.4	1	1U
Muestra de tejido/ ADN	1	2.5/0.5*	-

8.3.5 Bioensayos *in vitro* de interacción

Los experimentos se realizaron en medio de cultivo V8 Agar bajo las siguientes condiciones de pH: 1) pH básico (8), y 2) pH ácido (3). La formulación de los medios de cultivo fue la siguiente: 160 ml de jugo V8, agar 1.5% para el medio básico y agar 3% para el medio ácido. El pH se ajustó en cada caso con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl). Es de destacar, que la preparación del medio ácido se realizó en dos fases, es decir, por una parte se esterilizó el agar con un poco de agua, y por otra parte se esterilizó el jugo V8 con el resto del volumen requerido de agua con el pH ajustado a 3. Después de haber sido esterilizados en autoclave, el contenido de cada uno de los matraces se mezcló bajo condiciones de esterilidad. Seguido de ello, los medios fueron servidos en cajas de Petri etiquetadas con su respectiva clave, para determinar el tipo de medio en cada caso y la especie fúngica a inocular.

Para los bioensayos, se inoculó una porción del organismo con crecimiento activo (*Morón-Ríos et al., 2017*); con 3mm de distancia entre ellos para el caso de los co-cultivos. Además, se implementaron monocultivos (controles), en los cuales los microorganismos fueron inoculados de manera individual. El experimento se mantuvo a temperatura ambiente, para observar el desarrollo fúngico a lo largo de 14 días, tiempo en el que el área de crecimiento no logró alcanzar los bordes de la caja Petri (*Morón-Ríos et al., 2017*).

8.3.6 Evaluación y fotodocumentación de las interacciones

Se realizó un registro fotográfico en los días 3, 5, 7, 12 y 14 utilizando una cámara digital Nikon D90 y condiciones idénticas durante cada sesión. Posteriormente, cada imagen fue examinada y procesada con el programa ImageJ (v1.52a.) con el fin de medir el área de crecimiento; y los datos se exploraron de manera preliminar mediante graficas de caja y bigote para evaluar la varianza y la dispersión de los datos con el programa R (v. 3.6.0) de cada uno de los organismos en interacción y controles en los diferentes medios (con pH ácido y pH básico). Con los datos obtenidos se generó una matriz, la cual se exploró con un Análisis de varianza (ANOVA) multifactorial empleando el programa Statgraphics Centurium XVI (v 16.1.11), con el fin de evaluar diferencias significativas en el crecimiento de los organismos entre los diferentes tratamientos.

Se evaluaron dos índices de interacción descritos en la literatura: Porcentaje de Inhibición (PI) y el porcentaje de antagonismo total (*Overall Antagonisms Index*, OAI por sus siglas en inglés). El PI es una medida cualitativa definida como la capacidad de una especie para dominar y competir con otras especies ([Morón-Ríos et al., 2017](#)). La interpretación del PI nos dice que cuando hay valores cercanos a cero hablamos de neutralismos, valores negativos (-) se atribuyen a posibles sinergias y positivos (+) tratan de antagonismos ([Chen et al., 2018](#)). Para su cálculo, se empleó la siguiente formula:

$$PI = (1 - Gi - li/Gc - Ic) * 100$$

Donde G_i , es el crecimiento total de una especie dada en interacción; l_i , es el inóculo en la interacción; G_c , crecimiento total del control e I_c , inóculo del control ([Mishra, 2010](#)). Corregido por el tamaño del inóculo.

Por otro lado, el OAI hace referencia a la suma de los porcentajes de inhibición y nos indica de manera global qué tan antagónico es un organismo con relación a cada uno de sus competidores. La fórmula se representa de la siguiente manera:

$$OAI = \Sigma PI$$

8.3.7 Selección de las interacciones para el análisis metabólico

Una vez concluidos los bioensayos *in vitro*, seleccionamos tres de las interacciones en donde se detectó que ambos competidores crecían de manera similar (crecimiento en área). También se evaluó su capacidad para delimitar el espacio ocupado por el competidor sin necesidad de estar totalmente en contacto (halos de inhibición) así como la producción de algún metabolito, ya sean pigmentos o exudados, en la zona de contacto o por parte de alguno de los competidores al estar en co-cultivo.

8.3.8 Implementación de las fermentaciones

Se realizaron fermentaciones a pequeña escala en medio sólido y líquido en co-cultivo (interacción) y axénicas (controles). Las fermentaciones en medio líquido fueron ejecutadas en medio V8 (líquido) con un pH de 8 (160 mL de jugo V8/1L de agua). Mientras que la fermentaciones en medio sólido se realizaron utilizando un sustrato sólido, de arroz (10g/20ml de agua). Por un lado se sabe que la fermentación líquida permite un mayor control de los parámetros, como el pH, caso de nuestros bioensayos (*Robinson et al. 2001*). Sin embargo, ésta también presenta desventajas como deficiencias en la transferencia de oxígeno. Caso contrario, en los sustratos sólidos de fermentación (SSF) que permite una mejor circulación de oxígeno y brindan el soporte micelial que está asociada con la producción de metabolitos secundarios en grandes cantidades (*Robinson et al., 2001*). Por tanto, la implementación de este medio es favorable para una determinación más completa y exitosa de metabolitos secundarios fúngicos.

Para el caso del medio sólido, cada organismo se cultivó inicialmente en 15 mL de medio líquido (V8) con las condiciones de pH ya mencionadas, a 100rpm durante 5 días, para favorecer el aumento de biomasa. En seguida fueron vertidos sobre el sustrato sólido (20 g de arroz/ 20 mL de agua), en matraces Erlenmeyer de 125 mL. En caso del medio líquido la inoculación se realizó directamente en los matraces Erlenmeyer. En ambos casos, se realizó un duplicado tanto de controles como de interacciones y un blanco para cada uno de los medios. Los cultivos se

incubaron a temperatura ambiente durante 21 días con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 h y 100 rpm (en el caso de los cultivos en medio líquido).

8.3.9 Extracción de compuestos orgánicos a pequeña escala

Se llevó a cabo la obtención de extractos orgánicos adicionando 100 ml de una mezcla cloroformo: metanol 9: 1 (CHCl_3 : MeOH) a cada cultivo del medio V8, entre tanto para los medios sólidos primero se añadieron 10 ml de MeOH, pasados 30 mn se agregó 100ml de una mezcla CHCl_3 : MeOH (1:1) y estos se fragmentaron manualmente con ayuda de una espátula para asegurar una mezcla adecuada y con ello una mejor extracción. Cada uno, con su respectiva mezcla fue agitado a 100rpm a temperatura ambiente y durante 2h y de 8 a 10 h, de manera correspondiente. Expirado el tiempo se filtraron de inmediato a vacío para eliminar la biomasa fúngica. Para el medio sólido se realizó un lavado a la biomasa con una mezcla CHCl_3 : MeOH (1:2) para después aforar a 200ml con agua (H_2O) y llevar de nuevo a agitación durante 2 h.

Cada una de las mezclas; de los dos medios; se transfirió a un embudo de separación y la fase orgánica, de interés, se resguardó en un matraz Erlenmeyer. En seguida, se agregaron 100 ml más de la mezcla CHCl_3 : MeOH (9:1) para el medio líquido, mientras que para el sólido 100ml de CHCl_3 fueron agregados, a la fase inorgánica con lo que se recuperó más volumen de la fase orgánica de interés. Las fases orgánicas de cada ensayo se reunieron y se llevaron a sequedad al vacío (*VanderMolen et al., 2013*).

La fracción orgánica fue resuspendida con 60 ml de CH_3CN (acetonitrilo): MeOH 1:1 y 60 ml de hexano (C_6H_{14}). Esta solución bifásica se agitó y se transfirió a un embudo de separación, el extracto orgánico desgrasado del fondo se evaporó a sequedad al vacío. El desgrasado fue un paso muy importante en el proceso de extracción dado que el lavado con hexano elimina algunos metabolitos comunes pero no deseados, como los ácidos grasos, que no son de interés para la mayoría de los programas de detección de productos naturales. También, limpia el extracto de los componentes muy polares que son perjudiciales para las columnas de fase inversa (columna empleada en cromatografía líquida de alta resolución, (HPLC) (*VanderMolen et al., 2013*).

8.3.10 Técnicas de metabolómica para la exploración de las bases fisiológicas de las interacciones

8.3.10.1 Cromatografía

8.3.10.1.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés high-performance liquid chromatography)

La técnica de HPLC, se basa en una muestra líquida o sólida disuelta en un disolvente adecuado que se transporta a través de una columna cromatográfica mediante una fase móvil líquida. La separación está determinada por las interacciones soluto / fase estacionaria, incluida la adsorción líquido-sólido, la partición líquido-líquido, el intercambio iónico y la exclusión de tamaño, y por las interacciones soluto / fase móvil. Una HPLC generalmente incluye dos columnas: una columna analítica responsable de la separación y una columna de protección, que se coloca antes de la columna analítica, protegiéndola de la contaminación. La cromatografía más común de HPLC es la de fase inversa, donde la fase estacionaria no es polar y la fase móvil es polar. El orden de elución de los solutos se rige por la polaridad por lo que los tiempos de retención se controlan según sea la selección de la fase móvil (*Harvey, 2000; Skoog et al., 2008; Baidoo, 2019*).

En una separación de fase inversa, el soluto más polar es el primero en eluir. El aumento de la polaridad de la fase móvil conduce a tiempos de retención más largos, mientras que los tiempos de retención más cortos requieren una fase móvil de menor polaridad (*Harvey, 2000; Skoog et al., 2008; Baidoo, 2019*). Nuestros análisis por cromatografía líquida de alta resolución a nivel analítico se realizaron en un equipo marca Waters equipado con los detectores PDA y ELSD, una bomba de gradiente cuaternaria y un inyector automático. Los análisis se realizaron en una columna tipo C₁₈ con un tamaño de partícula de 5 µm con un diámetro interno de 4.6 mm y una longitud de 250 mm. El control del equipo, la adquisición, procesamiento y manipulación de los datos fueron realizados a través del software Empower 2.0 (*Camiña, 2018*) Para las lecturas, cada extracto crudo se transfirió en un vial pesado con antelación, mediante 3 lavados de CHCl₃ y MeOH y se dejaron secar en una línea de aire. Una vez secos, se disolvieron en una mezcla de MeOH: dioxano 1:1 a una concentración de 3mg/ml. Se inyectaron 120 µL y se analizaron mediante HPLC; método basado en una elución en

gradiente con agua y acetonitrilo que contiene 0.005% de ácido trifluoroacético en una columna de fase inversa (*Frisvad et al., 1989*).

La elución se realizó en un sistema de gradiente lineal constituida por la mezcla binaria de ácido fórmico acuoso (0.1%; A) y MeCN (B) como se indica a continuación: 15% B (0-5 min); 100% B (5-20 min); 100% B (20-25 min); y finalmente 15% B (25-32 min) La velocidad de flujo fue de 1 ml/mn, y las longitudes de onda utilizadas para la detección de compuestos estuvieron comprendidas en un intervalo de detección entre 200 a 400 nm (*Camióna, 2018*).

8.3.10.2 Espectrometría de masas (SM, por sus siglas en ingles)

8.3.10.2.1 UPLC-PDA-ESIMS: Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a los detectores de arreglo de fotodiodos y de espectrometría de masas por electrospray

Se realizaron lecturas de espectrometría de masas (mediante la técnica: UPLC-PDA-ESIMS) de cada uno de los extractos a una concentración de 0.3mg / ml (MeOH: dioxano 1:1) y se inyectaron 50 µL. Con lo anterior se obtuvieron tres tipos de cromatogramas: UV, ESI- (modo de ionización negativa) y ESI+ (modo de ionización positiva). Estos contenían el peso molecular estimado de cada uno de los compuestos orgánicos presentes en cada extracto.

8.3.10.3 UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS: Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a los detectores de arreglo de fotodiodos y de espectrometría de masas de alta resolución por electrospray y fragmentación masas-masas

Con el fin de alcanzar una resolución más alta implementamos espectrometría de masas exactas. Por el método UPLC-PDA-HRMS-MS / MS (Cromatografía líquida de rendimiento óptimo, matriz de fotodiodos, espectrometría de masas en tándem de alta resolución) a concentraciones de 0.3 mg/ 130 µL para el medio V8 y de 0.3 mg/150 µL para el medio sólido. De ambos medios se inyectaron 150 µL de cada uno de los extractos siguiendo el protocolo descrito por *El-Elimat et al. (2013)*. Así, se consiguieron tres tipos de cromatogramas: UV, ESI- y ESI+.

UPLC-PDA-HRMS-MS / MS es una técnica que utiliza la alta resolución y el corto tiempo de análisis que ofrece la cromatografía líquida de rendimiento óptimo (UPLC) junto con la precisión de la masa obtenida por un espectrómetro de masas

para desarrollar un método rápido y eficaz para duplicar los extractos fúngicos biológicamente activos. Además, los espectros MS / MS y UV (matriz de fotodiodos) fungen como parte integral de la estrategia, para diferenciar los compuestos isobáricos que a menudo se encuentran en extractos de productos naturales. Esta metodología fue desarrollada para la implementación de la desreplicación de metabolitos secundarios en extractos crudos de cultivos de hongos. Y cuenta con varias ventajas como una base de datos, que incluye espectros de masas de alta resolución de barrido completo y espectros MS / MS de los modos de ionización positiva y negativa junto con los máximos de absorción UV y los tiempos de retención. Además es la primera en construirse con base a metabolitos secundarios de hongos citotóxicos y la que permite un método cromatográfico rápido (10 min) (*El-Elimat et al., 2013*).

8.3.10.4 Condiciones de las técnicas espectrométricas

Los análisis para ambas técnicas espectrométricas en UPLC se realizaron en un cromatografo marca Wasters (Wasters Corp., MA. EEUU para la técnica UPLC-PDA-ESIMS y Acquity para UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA para UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS) y un detector de masas de cuadrupolo simple con fuente de ionización por electrospray (SQD, marca Wasters para UPLC-PDA-ESIMS) empleado en una columna Acquity BEH C₁₈ (Wasters Corp., MA EEUU; 1.7 MIROMETROS, 2.1x 10mm) y una mezcla de elución binaria constituida CH₃CN (A)-ácido fórmico 0.1 % (B) en un gradiente de elución lineal con una composición inicial del 15 % A hasta 100% A en 8 mn manteniendo la condición socrática por 1.5 mn y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min. La detección en ultravioleta se realizó mediante un barrido desde 200 hasta 400 nm con una resolución de 4 nm. El control del equipo la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información fueron realizados utilizando el programa Empower 2.0 (*Fajardo, 2018; Yeverino, 2019*).

Los análisis de espectrometría de masas de alta resolución se realizaron por la técnica de ionización mediante electrospray (HRESIMS) en el modo positivo y negativo (ESI+ y ESI-) en un espectrómetro de masas Thermo Q-Exactiva

(ThermoFisher Inc., MA, EEUU). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: ESI positivo: Temperatura del capilar y voltaje para la fuente; 20 v para el voltaje de capilar y 95v para la lente del tubo; y en ESI negativo: temperatura del capilar y voltaje para la fuente, 275 c y 3.5 kv, respectivamente; 42 v para el voltaje de capilar y 110 v para la lente del tubo (*Fajardo, 2018; Yeverino, 2019*).

Como fuente de gas acarreador se empleó nitrógeno, el cual se fijó entre 20 y 25 unidades arbitrarias para el modo positivo y negativo. El control del instrumento y el análisis de los datos se realizaron utilizando el programa Xcalibur 2.1 (Thermo). Para cada análisis se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 ml de una mezcla de dioxano-MeOH (1:1) para obtener una concentración final de 2mg/ml (*Fajardo, 2018; Yeverino, 2019*).

8.3.11 Análisis de los perfiles metabolómicos

Los cromatogramas obtenidos por HPLC, UPLC-PDA-ESIMS y UPLC-PDA-HRMS-MS / MS se compararon entre sí para detectar cambios en la producción de metabolitos específicos en interacción con relación a los controles, así como la prevalencia de patrones específicos.

9 RESULTADOS

9.1 Diversidad de micromicetes saprobios cultivables

9.1.1 Aislamiento y agrupación de los morfotipos

La modificación a la técnica directa (*Chesters & Thorton, 1956*) permitió la obtención de 511 aislados, agrupados en 77 morfotipos. El mayor número de aislados se obtuvo en el medio V8 (211), seguido de PDA (177) y CMA (123), **Fig. 2**. Asimismo, el mayor número de morfotipos se registró en el medio V8 (50), PDA (39) y en menor cantidad para CMA (19), **Fig. 3**.

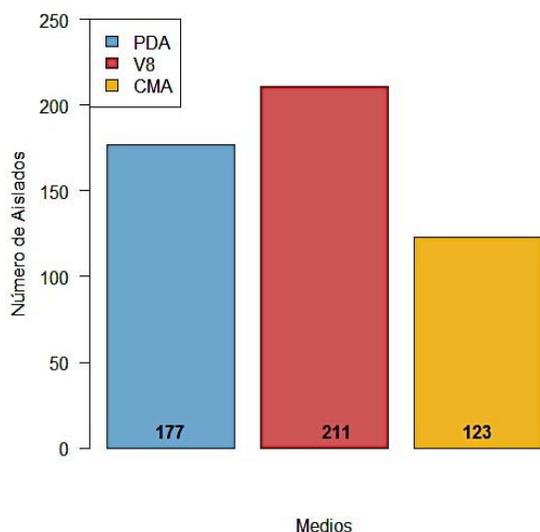


Figura 2. Número de aislados en los diferentes medios de cultivo.

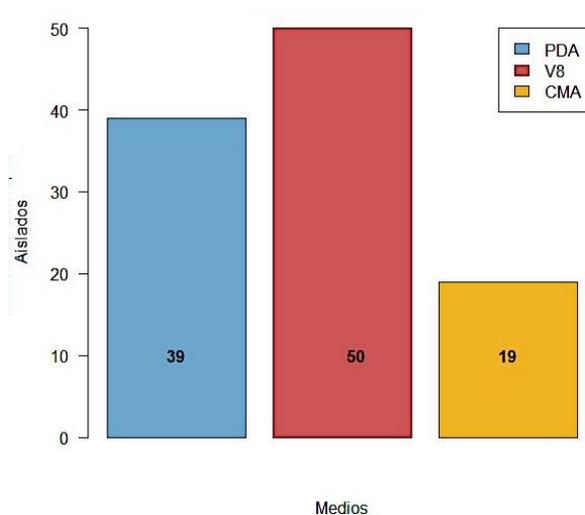


Figura 3. Número de morfotipos aislados en cada medio de cultivo.

9.1.2 Selección e identificación de los cinco micromicetes

Con base a las características descritas a continuación los aislados A, B, C, D y E fueron seleccionados para los experimentos de interacciones *in vitro*. Los aislados A, B y D presentaron un rápido crecimiento acompañado por la producción de exudados. En el caso de A distinguimos la secreción de exudados incoloros, verdes y melón (estos dos con una consistencia viscosa), B por su parte produjo un pigmento amarillo que tiñó todo el medio de cultivo. Por otro lado, C y E a pesar de mostrar un crecimiento menor, produjeron una gran cantidad de conidios acompañados, para el caso de E, de exudados hialinos en cantidades destacadas.

Basado en sus caracteres morfológicos y moleculares, los aislados A, B, C, D y E se identificaron como: *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2, *A. fumigati*affinis, *Fusarium solani* y *Purpureocillium lilacinum* (Tabla 3). A continuación se presentan la taxonomía (Figs. 4-8) y descripción de los caracteres morfológicos evaluados para los cinco taxa.

Tabla 3. Asignación taxonómica y comparación con secuencias de referencia del material analizado en el presente estudio.

CLAVE	BTL				ITS				IDENTIDAD
	% Cobertura	% Id.	Número de acceso NCBI	OTU	% Cobertura	% Id.	Número de acceso NCBI	OTU	
B	99	99.7	MG517785.1	<i>Aspergillus vandermerwei</i>	-	-	-	-	<i>Aspergillus</i> sp. 1
	99	99.7	MG517784.1		-	-	-	-	
	99	99.7	MG517780.1		-	-	-	-	
	98	99.1	MG517789.1		-	-	-	-	
	98	99.1	MG517788.1		-	-	-	-	
	99	98.4	MG517661.1		-	-	-	-	
	99	98.4	MG517675.1		-	-	-	-	
	99	98.2	MG517783.1		-	-	-	-	
	99	98.2	EF661467.1	<i>Aspergillus alliaceus</i>	-	-	-	-	
	99	98.4	EF661468.1	<i>Aspergillus lanosus</i>	-	-	-	-	
C	100	99.5	KJ175524.1	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	-	-	-	-	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>
	100	99.5	GQ376143.1		-	-	-	-	
	96	99.7	KF021550.1		-	-	-	-	
	94	99.7	HE578083.1		-	-	-	-	
	95	99.5	DQ094885.1		-	-	-	-	
	100	96.8	DQ094886.1		-	-	-	-	
	90	99.7	HF933348.1	<i>Neosartorya spinosa</i>	-	-	-	-	
	100	96.6	AY870765.1		-	-	-	-	
	100	96.6	AY870760.1		-	-	-	-	
D	100	98.9	MH614559.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	100	MF848976.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Aspergillus</i> sp. 2
	100	99.1	MH204808.1		100	100	MK761048.1		
	100	98.9	FJ828908.1		100	100	MK761039.1		
	100	98.9	MH781304.1		100	100	MK761035.1		
	100	98.9	MK636652.1		100	100	MK737577.1	<i>Aspergillus niger</i>	
	100	98.9	MH494180.1		100	100	MK598817.1		
	100	98.9	MG991406.1		100	100	MK204311.1		

	100	98.9	MH204838.1		100	100	MK397041.1		
	100	98.9	MH614560.1		100	100	MH613160.1		
	100	99.3	MH614551.1	<i>Aspergillus piperis</i>	100	100	MK841478.1		
A	100	100	KJ125994.1	<i>Fusarium solani</i>	100	100	MH191237.1	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>
	100	99.5	KX240355.1		100	100	MK817050.1		
	100	99.1	KM232059.1		100	100	KU712219.1		
	100	99.1	JX241678.1		100	100	KP992939.1		
	100	99.1	DQ220247.1		100	100	KF939490.1		
	100	99.5	KU720781.1	<i>Fusarium sp.</i>	99	100	MK367751.1	<i>Nectria haematococca</i>	
	100	98.6	MH327790.1		100	100	MH855496.1		
	100	100	JQ265763.1	<i>Nectria haematococca</i>	100	100	FJ903374.1	<i>Fusarium sp.</i>	
	100	99.5	JQ265764.1		99	100	KT225531.1		
	100	99.5	HM054108.1		100	100	KP091293.1		
E	100	99.1	MH613756.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100	100.	MH059649.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
	100	99.1	KY488511.1		100	100	MK729128.1		
	100	99.1	KT427383.1		100	100.	MK715152.1		
	100	99.1	KT427382.1		100	100	MK715142.1		
	100	99.1	KM268894.1		100	100	MK367755.1		
	100	99.1	AY624228.1		100	100	MK332498.1		
	100	98.7	MH193387.1		100	100	MK304340.1		
	100	98.7	LC278945.1		100	100	MH512954.1		
	100	98.7	LC278944.1		100	100	MF996819.1		
	100	98.7	JQ965112.1		100	100	MF996818.1		

Dominio: Eukariota

Reino: Fungi Bartling (1830)

Fillum: Ascomycota Caval.-Sm. (1998)

Subfillum: Pezizomycotina O.E. Erikss. & Winka (1997)

Clase: Eurotiomycetes O.E. Erikss. & Winka (1997)

Sub-clase: Eurotiomycetidae Geiser & Lutzoni (2007)

Orden: Eurotiales G.W. Martin ex Benny & Kimbr. (1980)

Familia: *Aspergillaceae* Link, Abh. dt. Akad. Wiss. Berlin: 165 (1826)

Género: *Aspergillus* P. Micheli ex Haller (1768)

Aspergillus sp. 1 sección Flavi

Descripción (Fig. 4):

Macromorfología: El área de la colonia en medio V8 básico (pH: 8): día 3 es de 2-3 cm², día 5 de 7-8 cm², día 7 14-16 cm², día 12 de 27-31 cm² y día 14 de 30-32 cm². El área de la colonia en medio V8 ácido (pH: 3, cm²): día 3 de 1-1.2, día 5 2-3, día 7 5-6, día 12 de 19-21y día 14 de 19-22. Colonias con micelio blanco; textura flocosa; esporulación densa; presentan exudados incoloros y al reverso de la colonia de un color pálido lúteo.

Micromorfología: Conidióforos con estípites lisos, hialinos, 2000–3000 × 9.5–15.5 µm. Cabezas conidiales pálidas a amarillo intenso cuando son jóvenes, cambiando a canela (pienso que es marrón) en etapa madura; radiada y biseriada. Vesículas globosas a subglobosas, de 35–57 µm de ancho, fértiles en toda la superficie; métulas hialinas 7–8.5 × 3–4.5 µm; fiálides hialinos, en forma de matraz, 7.5–10 × 2–3.5 µm. Conidios lisos, subglobosos a elipsoidales, 3–4 × 2.5–3.5 µm.

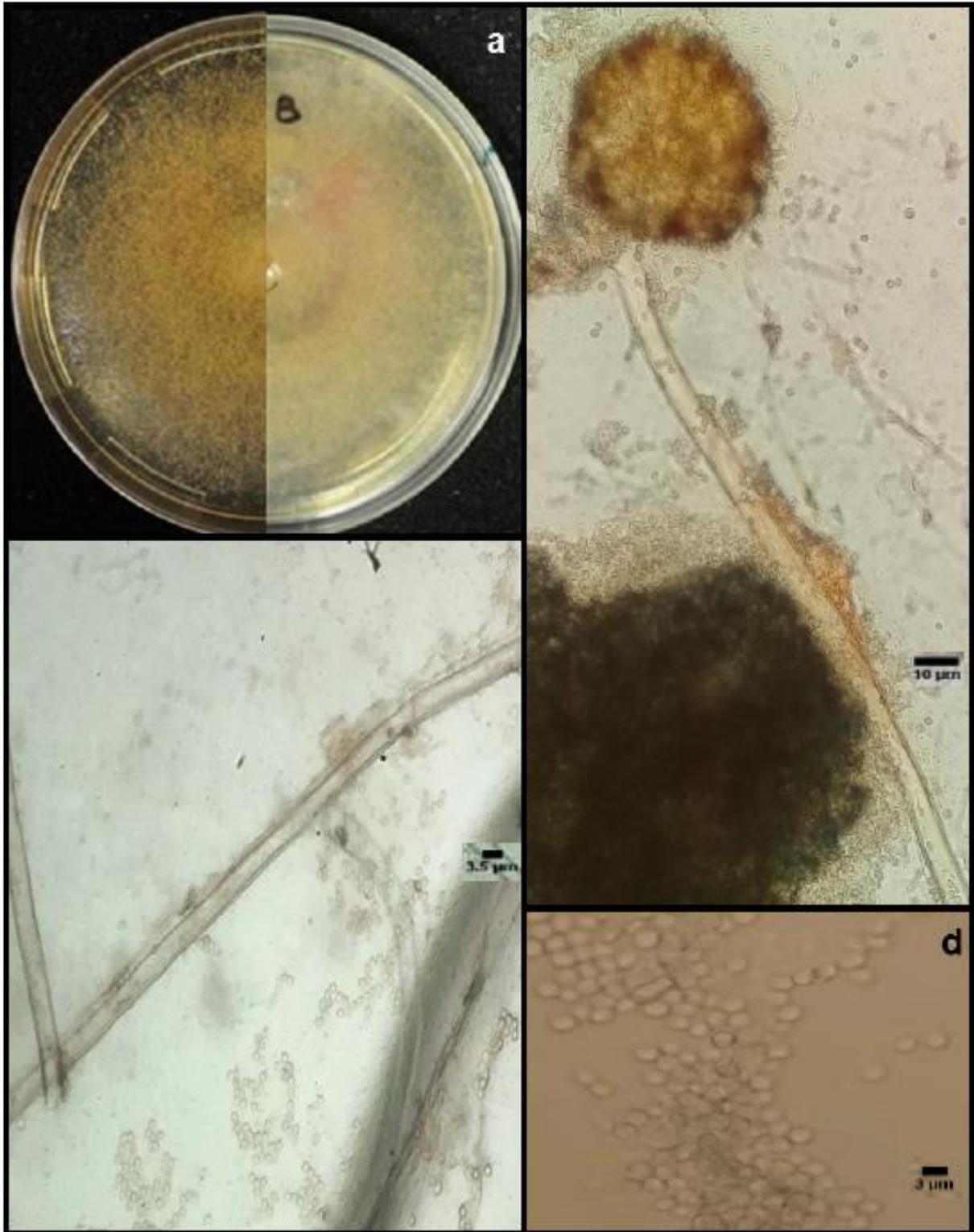


Figura 4. Descripción morfológica de *Aspergillus* sp. 1. (a) Cultivo axénico in vitro en V8, anverso y reverso. (b) Conidióforo; (c) Hifas septadas y (d) Conidios. Microscopía de campo claro y contraste de fases.

Dominio: Eukariota

Reino: Fungi Bartling (1830)

Phylum: Ascomycota Caval.-Sm. (1998)

Subphylum: Pezizomycotina O.E. Erikss. & Winka (1997)

Clase: Eurotiomycetes O.E. Erikss. & Winka (1997)

Sub-clase: Eurotiomycetidae Geiser & Lutzoni, (2007)

Orden: Eurotiales G.W. Martin ex Benny & Kimbr (1980)

Familia: *Aspergillaceae* Link, Abh. dt. Akad. Wiss. Berlin: 165 (1826)

Género: *Aspergillus* P. Micheli ex Haller (1768)

Aspergillus sp. 2, sección niger

Descripción (Fig. 5):

Macromorfología: Las colonias en agar solución de Czapek crecen lento a temperatura ambiente (24-26 °C), alcanzando un diámetro de 4 a 5 cm en 10 días, profundamente aterciopelado, plano o casi, algo zonado, que consiste en un micelio basal blanco bastante compacto que puede extenderse 2 o 3 mm. El área central es de abundante esporulación, los márgenes contiguos de la colonia permanecen blancos incluso en etapa de madurez. Al reverso es de color blanco con falta de exudado y de olor.

Las colonias en agar de extracto de malta a temperatura ambiente crecen rápidamente, alcanzando los 6 cm de diámetro en 10 días, pero sin mostrar mayor aumento en la edad, delgada, plana, aterciopelada, indistintamente zonada, fuertemente esporulada en tonos marrones muy oscuros pero a menudo mostrando un desarrollo superficial delgado de micelio blanco que luego se vuelve más visible; al reverso es incoloro. Es posible la presencia de esclerocios en algunas cepas, que llegan a dominar ocasionalmente el aspecto de la colonia, de globosa a subglobosa, de color crema al principio y luego de color rosado y a veces oscureciéndose a casi negro, generalmente de 500 a 800 µm de diámetro.

Micromorfología: Los conidióforos son lisos, largos y gruesos, comúnmente de 2 a 3 mm, pero hasta 5 a 6 mm de alto con diámetros que alcanzan los 30 µm, pero más comúnmente son de 15 a 20 µm, generalmente de color claro en tonos

marrones, paredes comparativamente delgadas con grosor de pared más comúnmente de 1 μm y rara vez alcanzan 2 μm . Las cabezas conidiales son globosas y llegan a medir de 200 a 300 μm de diámetro, pero con un rango de hasta 500 μm , son de tono marrón a ligeramente grisáceos, y las cabezas conidiales globosa pueden mostrar una variación de colores a bajos aumentos de gris claro a marrón. Las cabezas conidiales a menudo se hallan expuestas en conidióforos largos que comúnmente tienen un brillo metálico a bajos aumentos y pueden llegar a mostrar esporas de color terminal más claro en las cadenas. Las vesículas son globosas, de tamaño bastante variable, más comúnmente de 40 a 60 μm de diámetro pero que varían desde aprox. 20 μm hasta 80 μm , fértiles en toda su superficie; esterigmas en dos series, primarias en su mayoría de 15 a 30 μm de largo pero que varían hasta 50 μm , secundarias numerosas, de 7.5 a 10.0 μm por 2.8 a 3.3 μm . Conidios globosos, equinulados, y hialinos cuando se forman por primera vez, volviéndose progresivamente más oscuros y ásperos y finalmente apareciendo estriados longitudinalmente a partir de barras conspicuas de material colorante, que al ser maduros son algo aplanados horizontalmente y miden de 3.0 a 3.5 μm de diámetro.

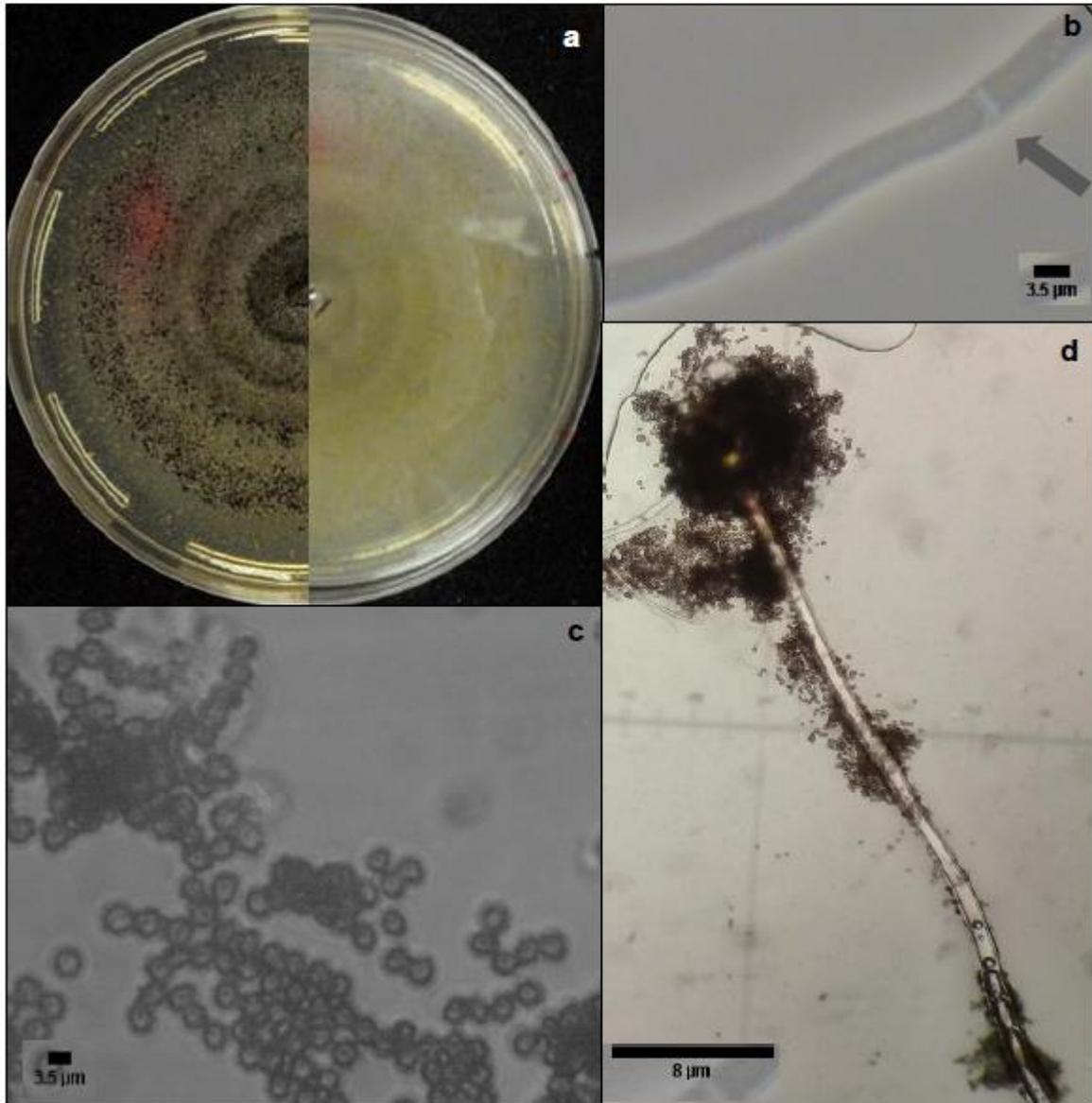


Figura 5. Características morfológicas de *Aspergillus* sp. 2. (a) Crecimiento de colonia en medio V8, anverso y reverso. (b) Hifas septadas. (c) Conidióforo. (d) Conidios equinulados. Microscopia de campo claro y contraste de fases.

Dominio: Eukariota

Reino: Fungi Bartling (1830)

Phylum: Ascomycota Caval.-Sm. (1998)

Subphylum: Pezizomycotina O.E. Erikss. & Winka (1997)

Clase: Eurotiomycetes O.E. Erikss. & Winka (1997)

Sub-clase: Eurotiomycetidae Geiser & Lutzoni, (2007)

Orden: Eurotiales G.W. Martin ex Benny & Kimbr (1980)

Familia: *Aspergillaceae* Link, Abh. dt. Akad. Wiss. Berlin: 165 (1826)

Género: *Aspergillus* P. Micheli ex Haller (1768)

Aspergillus fumigatiifinis S.B. Hong, Frisvad & Samson, 97 (6): 1326 (2006)

Descripción (Fig. 6):

Macromorfología: Colonias en Czapek-Levadura (CYA) que crecen ampliamente, 48-65 mm de diámetro en 7 días a 25 °C o más de 70 mm en 7 días a 37 °C. Las colonias en extracto de malta agar (MEA) crecen rápidamente, 55-65 mm en 7 días a 25°C. La textura de la colonia es flocosa y generalmente blanca con escasa esporulación, pero en el centro, de color verde opaco y con conidios abundantes. Al inverso en MEA es de color naranja amarillento a naranja grisáceo. El aspecto de la colonia en CYA es similar al MEA, pero el inverso es de color blanco amarillento a amarillo pálido.

Micromorfología: Las estructuras de los conidióforos y los conidios se asemejan a *A. fumigatus*, pero con poca esporulación. En este caso los conidióforos surgen de hifas aéreas, 6-8 µm de ancho en el centro. Vesículas de la cabezuela conidial generalmente son globosas y miden de 18-24 µm de diámetro, cortas y columnares. Fiálides de 6-8 µm, que cubren la mitad superior de la vesícula. Tiene cadenas conidiales uniseriadas, con menos de 10 secuencias y los conidios son globosos a subglobosos, lisos que miden de 2-3 µm.

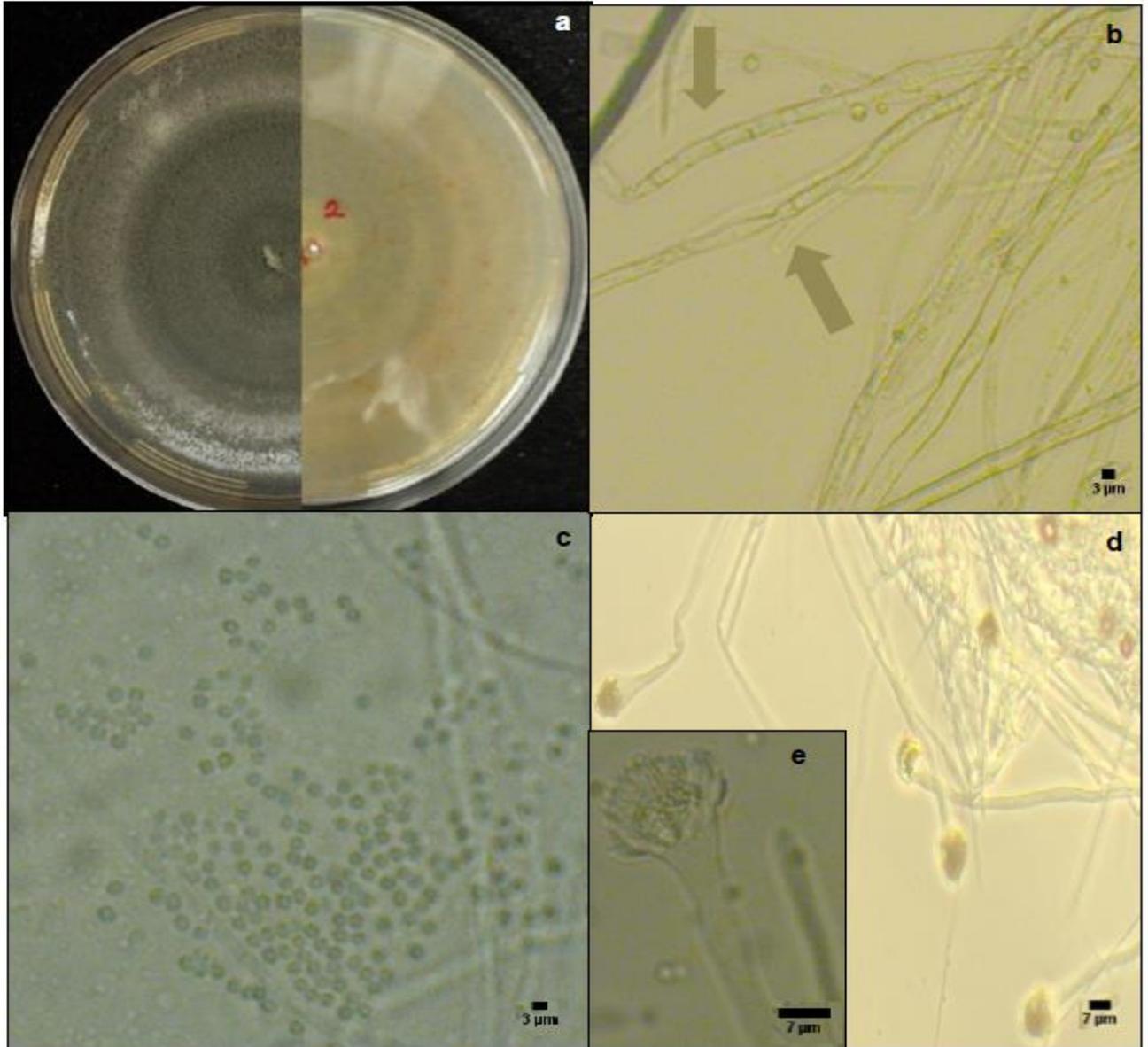


Figura 6. Descripción morfológica de *Aspergillus fumigati* affinis. (a) Crecimiento de colonia en V8, anverso y reverso. (b) Hifas septadas; (c) Conidios; (d) Conidióforos y (e) Conidióforo con fiálides y vesículas. Fotos en microscopía de campo claro y contraste de fases.

Dominio: Eukariota

Reino: Fungi Bartling (1830)

Fillum: Ascomycota Caval.-Sm. (1998)

Subfillum: Pezizomycotina O.E. Erikss. & Winka (1997)

Clase: Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka (1997)

Sub-clase: Hypocreomycetidae O.E. Erikss. & Winka (1997)

Orden: Hypocreales Lindau, Natürl. (1897)

Familia: *Nectriaceae* Tul. & C. Tul. (1865)

Género: *Fusarium* Link (1809)

Fusarium solani (Mart.) Sacc., *Michelia* 2(7): 296 (1881)

Sinonimia:

Fusisporium solani Mart (1842), *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenw.(1910), *Neocosmospora solani* (Mart.) L. Lombard & Crous (2015), *Fusarium martii* Appel & Wollenw (1910), *Nectria cancri* Rutgers (1913), *Fusarium striatum* Sherb.(1915), *Fusarium solani* var. minus Wollenw. (1916), *Fusarium solani* f. 2 W.C. Snyder (1934) y *Cylindrocarpon vaginae* C. Booth, Y.M. Clayton & Usherw. (1985).

Descripción (Fig. 7):

Macromorfología: Las colonias crecen moderadamente rápido, cubriendo la pendiente del agar en 4-6 días con un micelio blanco escamoso, flocoso, algo escaso; típicamente una decoloración azulada a marrón azulada que se desarrolla en el agar.

Micromorfología: Microconidios que se forman abundantemente en el micelio aéreo a partir de fiálides laterales, son alargados, hialinos, cilíndricos, en forma de cuña o alantoides, 9-16 x 2-4 µm que a veces se convierten en un septo. Macroconidios que se desarrollan en 4-7 días a partir de conidióforos ramificados y bien desarrollados, cilíndricos a falcados, a menudo ligeramente más anchos hacia el ápice. Clamidosporas de globosas a ovals, de paredes lisas a rugosas, de 10-11 x 8-9 µm, que se desarrollan intercalares o terminales. La formación de

clamidosporas es más frecuente en la oscuridad que en la luz y es estimulada por la presencia de bacterias del suelo en el cultivo.

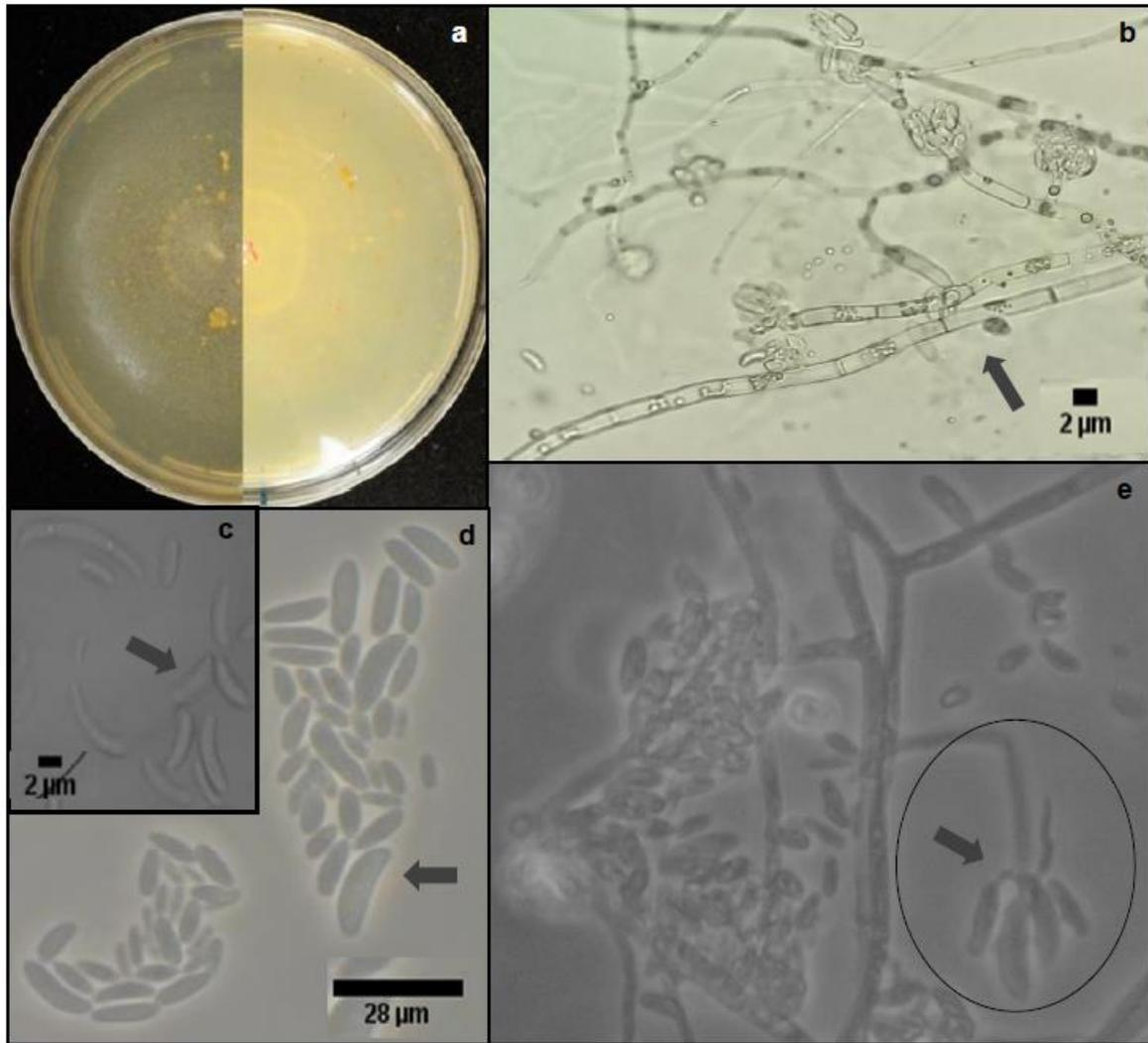


Figura 7. Descripción morfológica de *Fusarium solani*. (a) Crecimiento de monocultivo en V8, anverso y reverso. (b) Hifas septadas; (c, d) Macroconidios y microconidios y (e) Conidióforo y monofialides con macro y microconidios. Microscopia de campo claro.

Dominio: Eukariota

Reino: Fungi Bartling (1830)

Fillum: *Ascomycota Caval.-Sm. (1998)*

Subfillum: Pezizomycotina O.E. Erikss. & Winka (1997)

Clase: Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka (1997)

Sub-clase: Hypocreomycetidae O.E. Erikss. & Winka (1997)

Orden: Hypocreales Lindau, Natürl. Pflanzenfam (1897)

Familia: *Ophiocordycipitaceae* G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (2007)

Género: *Purpureocillium* Luangsa-ard, Hywel-Jones, Houbraken & Samson (2011)

Purpureocillium lilacinum (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson, 321: 144 (2011)

Sinonimia:

Penicillium lilacinum Thom (1910), *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (1974), *Paecilomyces nostocoides* M.T. Dunn (1983) y *Spicaria rubidopurpurea* Aoki (1941).

Descripción (Fig. 8):

Macromorfología: Las colonias en MEA presentan un crecimiento rápido alcanzan un diámetro de 25-35 mm después de 7 días a 25 ° C; Crecimiento nulo o restringido a 37 ° C, 0-10 (-20) mm. Las colonias en agar de zanahoria papa (PCA) simulan un fieltro basal de numerosos conidióforos con un crecimiento excesivo de micelio flocoso aéreo, al principio presenta una tonalidad blanca que después cambia de color a tonos de púrpura debido a la esporulación. El reverso es púrpura o, a veces, sin color.

Micromorfología: Conidióforos que surgen a partir de hifas sumergidas de 4 a 6 µm de longitud, formando ocasionalmente en sinemas sueltos de hasta 2 mm de altura; Tallos con paredes gruesas y rugosas de 3-4 µm de ancho que consisten en ramas verticiladas, con verticilos de 2 - 4. Fiálides 6 - 9 x 2,5 - 3 µm, que consiste en una porción basal hinchada que se estrecha en un cuello corto y

definido de aproximadamente 1 μm de ancho. Conidios en cadenas divergentes, elipsoidales a fusiformes, de paredes lisas a ligeramente rugosas, hialinos, púrpura en masa 2-3 x 2-4 μm . Clamidosporas ausentes.

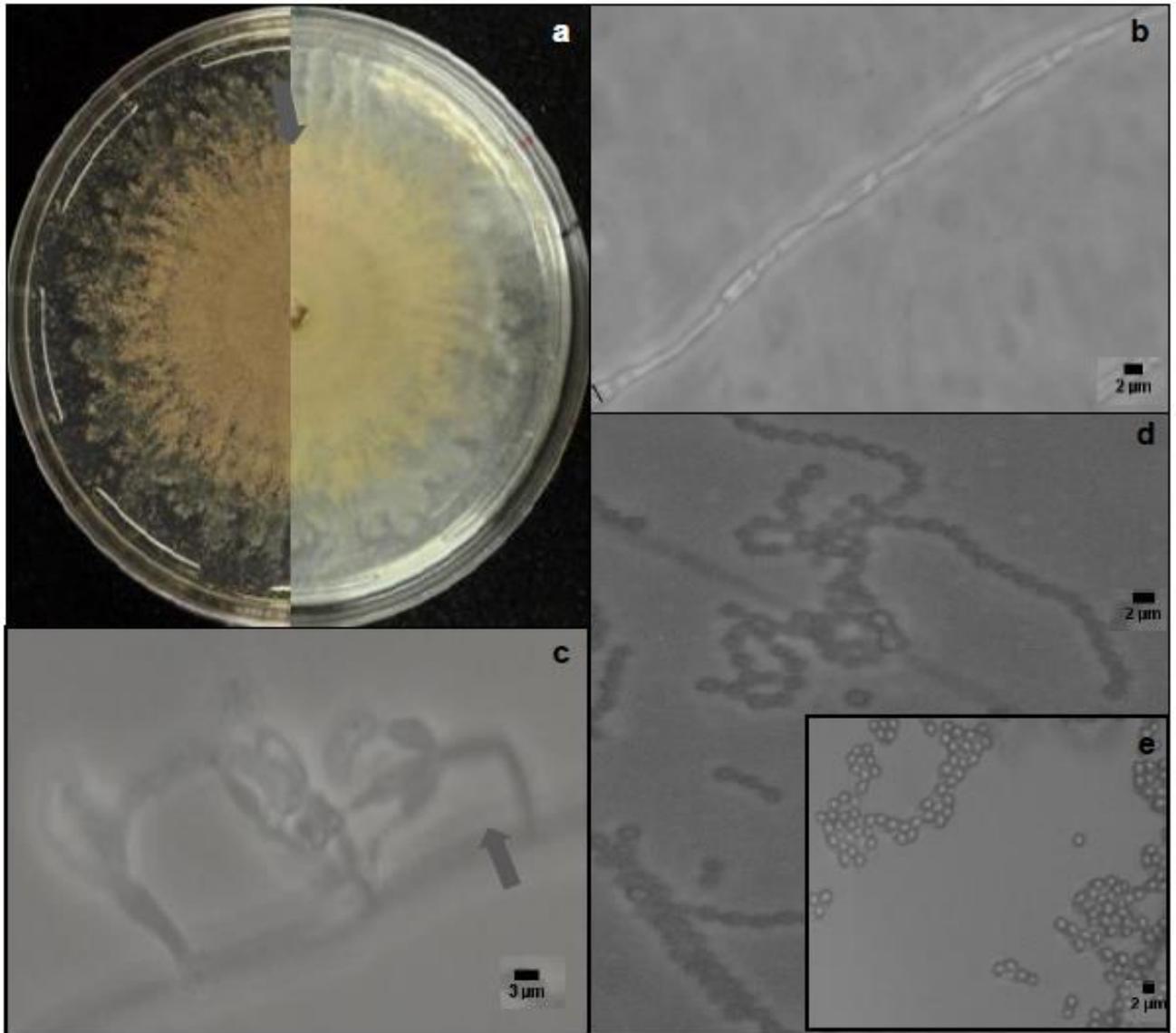


Figura 8. Morfología de *Purpureocillium lilacinum*. (a) Crecimiento colonial en monocultivo, anverso y reverso. (b) Hifa septada. (c) Conidióforos con metúla y fiálides. (d) Conidios. (e) Conidios a 40X. Microscopia de campo claro y contraste de fases.

9.2 Efecto del pH en interacciones

Mediante la exploración de la matriz de datos se obtuvo un gráfico (**Fig. 9**) con las medias marginales donde se pudo percibir que el medio con pH básico permitió crecimientos más óptimos en comparación con el medio ácido. En conjunto se realizó un análisis multifactorial ANOVA para cada uno de los días y para cada uno de los bioensayos analizados (**Fig. 10**). Proceso que evidenció que en el día 3 los crecimientos fueron similares (**Fig. 10 a**), a excepción del crecimiento de *Aspergillus* sp. 2 que se vio afectado al estar con *F. solani* bajo tratamiento con pH ácido. A partir del día 5 es que se percibieron marcadas diferencias entre tratamientos (pH 3 y 8) (**Fig. 10 b**), sin incluir los crecimientos de *Aspergillus* sp. 2; al estar con dos de sus competidores (*F. solani* y *P. lilacinum*); y *P. lilacinum* (con crecimiento similar con todos los organismos interactuantes, en ambas pruebas). Para el día 7 el único cambio registrado fue que el desarrollo fúngico de *Aspergillus* sp. 2 al coexistir con *P. lilacinum* difirió en crecimiento dado que este fue mayor en condiciones de pH 8 (**Fig. 10 c**). En el día 12 reportamos un aumento en la similitud de los crecimientos (**Fig. 10 d**, 14 áreas con crecimiento similar y 11 diferentes) en las dos condiciones de pH. Terminando el día 14, con 19 crecimientos similares y 6 crecimientos diferentes, es decir una mayor similitud entre crecimientos en ambas condiciones de pH, un patrón algo similar a lo ya reportado para el día 3 (**Fig. 10 e**). Hay que agregar que el crecimiento de *P. lilacinum* no fue alterado en vista de que en ambos tratamientos se encontró un área de crecimiento similar al coexistir con todos sus competidores. Y que *Aspergillus* sp. 2, en condiciones de pH 3.0 (al estar en co-cultivo con *F. solani*) exhibió una mayor área en el primer día evaluado, pero a partir del día 5 y hasta el día 14 el crecimiento de este organismo en pH básico fue idéntico al registrado en el tratamiento con pH ácido.

Así mismo, el crecimiento de los hongos evaluados, en experimento y control, a lo largo de los 14 días se muestra en las **Figs. 11-15** que concentran las áreas de crecimiento de los días 3, 5, 7, 12 y 14 por triplicado y para cada experimento; medio ácido y medio básico; de cada uno de los organismos y en co-cultivo. Adicionalmente, se muestra la fotodocumentación de los días 5, 7, 12 y 14

de las interacciones (**Fig. 16**), evidencias que respaldan de manera más ilustrativa la respuesta de cada organismo según el tipo de interacción y el pH del medio.

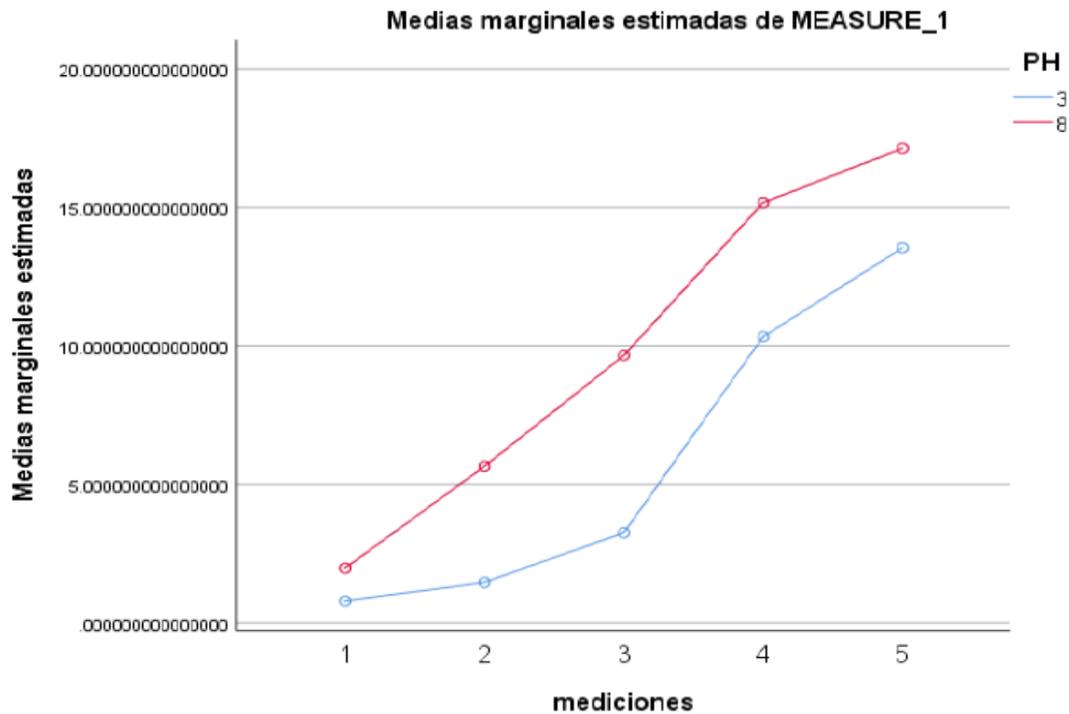


Figura 9. Medias marginales de las áreas de crecimiento a lo largo de los 5 días evaluados, para medio ácido (azul) y medio básico (rojo). El 1= día 3, 2= día 5, 3= día 7, 4= día 12 y 5= día 14.

9.2.1 Medio Básico

Con base a los resultados, **Figs. 11-15** y **Fig. 16**, los controles de cada organismo mostraron áreas de crecimiento considerables en comparación a las cuantificadas en interacciones. Aún cuando en el día 3 se identificó que *Aspergillus* sp. 1 y *P. lilacinum* aumentaron su crecimiento en interacción intraespecífica, y este último además con todos sus competidores, a nivel interespecífico (*Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2, *A. fumigati* y *F. solani*). En los días siguientes hubo un aumento en el crecimiento de todos los cultivos axénicos. Y aunque el control de *P. lilacinum* creció más que en los cultivos pareados, este presentó un menor crecimiento (con un área final de entre 7-8 cm², aproximadamente) al ser comparado con los demás controles.

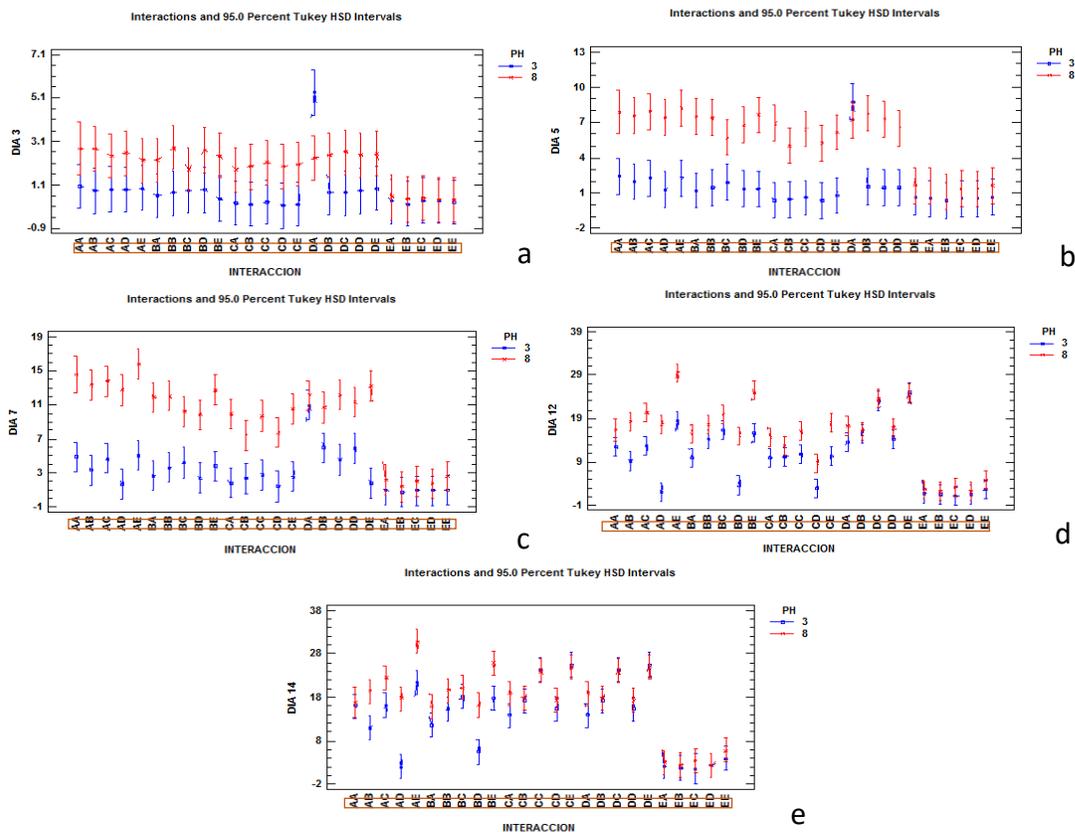


Figura 10. ANOVA multifactorial de dos vías con intervalos de confianza de Tukey de los días: 3 (a), 5 (b), 7 (c), 12 (d) y 14 (e). Color rojo medio básico, azul medio ácido. A= *F. solani*, B= *Aspergillus* sp. 1, C= *A. fumigatiaffinis*, D= *Aspergillus* sp. 2 y E= *P. lilacinum*. Letras con recuadro son los organismos de quienes se registro el área y letras sin recuadro organismos competidores durante bioensayos pareados.

A nivel intraespecífico, los datos y la fotodocumentación de las pruebas pareadas; *F. solani*/ *F. solani*; *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 1; *A. fumigatiaffinis*/ *A. fumigatiaffinis*; *Aspergillus* sp. 2/ *Aspergillus* sp. 2 y *P. lilacinum*/ *P. lilacinum*; exhibieron un crecimiento similar para ambos organismos con algunos cm^2 de diferencia, pero no hubo cambios abruptos. Y la interacción *P. lilacinum*/*P. lilacinum*, a diferencia de los otros ensayos, concentró la menor área de crecimiento durante toda la fase experimental, mismo patrón que el visto en los controles.

Las interacciones interespecíficas, al considerar los promedios, mostraron que en el caso de los ensayos: *F. solani*/ *P. lilacinum*, *Aspergillus* sp. 1/ *P. lilacinum* y *A. fumigatiaffinis*/ *P. lilacinum*, *P. lilacinum* fue el micromicete que mostró menor área, pero a pesar de ser superado en crecimiento este no dejó de

crecer a lo largo de los días documentados. Algo similar ubicamos en los co-cultivos *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2 y *Aspergillus* sp. 2/*P. lilacinum*, en estos caso (igual que en los anteriores hubo un organismo con mayor crecimiento) el organismo más destacado fue *Aspergillus* sp. 2. Igualmente, se encontraron algunas interacciones (*Aspergillus* sp. 1/ *A. fumigatiaffinis*, *F. solani*/ *Aspergillus* sp.1 y *F. solani*/ *A. fumigatiaffinis*) que durante los días 3 y 5 no arrojaron diferencias notables entre áreas, pero llegado el día 7 y hasta el día 14 se presentaron variaciones un tanto notorias que oscilaron entre 5 a 7 unidades y fue, en este caso, *Aspergillus* sp.1 y *F. solani* en el orden correspondiente (en las interacciones *F. solani*/ *Aspergillus* sp.1 y *F. solani*/ *A. fumigatiaffinis*) quienes sobresalieron en cuanto a crecimiento. Paralelamente, en las interacciones: *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2 y *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2, ambos competidores crecieron con áreas idénticas, es destacable decir que en este último co-cultivo *F. solani* produjo un pigmento de color rojo que se hizo más intenso en la zona de contacto con el competidor *Aspergillus* sp. 2.

En cuanto a los PI (porcentaje de inhibición, **Fig. 17**), mostraron que el tipo de interacción cambia a lo largo del tiempo. Por ejemplo, los PI relacionados con *F. solani* en interacciones intraespecífica e interespecífica (con *Aspergillus* sp. 1) indicaron respuestas de posible sinergia en el primer día (**Fig. 17 a**), pero con el paso del tiempo ésta cambio a una relación de antagonismo que se mantuvo hasta el final del experimento (**Fig. 17 c, e, g, i**). Otro valor bastante peculiar fue el que se interpretó en el día 12 para *F. solani* al interactuar con *P. lilacinum* con un valor cercano a 0, que se acuñó a una interacción neutral (**Fig. 17 g**), relación que en los primeros días era de antagonismo. Los valores en todas las interacciones relacionadas con *F. solani* mostraron algunos cambios, aumentos o disminuciones, pero al culminar los bioensayos todas las respuestas fueron de antagonismo.

Por otro lado, las respuestas de *Aspergillus* sp. 1 en todos los bioensayos pareados en interacción interespecífica fueron de antagonismo con algunas variaciones, que no propiciaron cambios en el tipo de interacción (**Fig. 17 a, c, e, g, i**). Algo similar, se dio en interacciones intraespecíficas de *Aspergillus* sp. 1

(Fig. 17 c, e, g, i), ya que en el día 3 la respuesta de la interacción *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 1 fue una posible sinergia (Fig. 17 a) que culminó en antagonismo, identificado a partir del día 5. Paralelamente, los PI de los micromicetes *A. fumigatiaffinis* y *Aspergillus* sp. 2 fueron de antagonismo, esto se determinó desde el inicio y esta respuesta se mantuvo durante el lapso estipulado para el proyecto, claro que con algunas variaciones tal como se observa en la Fig. 17 (a, c, e, g, i). Para culminar, *P. lilacinum* mostró valores de posible sinergia en el día 3 (Fig. 17 a) con todos los competidores, a excepción de la interacción intraespecífica en donde se mantuvo hasta el día 5 (Fig. 17 a, c). En adelante todos los porcentajes fueron de antagonismo con algunas discrepancias.

Partiendo de la sumatoria de los PI se obtuvo el OAI, por sus siglas en inglés (Overall antagonisms index), para cada organismo en los 5 días documentados (Fig. 18). Con lo que obtuvimos información sobre cual de nuestros organismos fue el más antagónico a lo largo de la fase experimental. Para el día 3 obtuvimos el siguiente orden (Fig. 18 a): *A. fumigatiaffinis* > *F. solani* > *Aspergillus* sp. 2 > *Aspergillus* sp. 1 > *P. lilacinum*, para el día 5 se dio un cambio en el índice (Fig. 18 b), lo que produjo el siguiente acomodo: *A. fumigatiaffinis* > *F. solani* > *Aspergillus* sp. 2 > *P. lilacinum* > *Aspergillus* sp. 1. Este tipo de cambios se dio en los días restantes, tal que en el día 7 el acomodo fue el siguiente (Fig. 18 c): *A. fumigatiaffinis* > *Aspergillus* sp. 2 > *F. solani* > *P. lilacinum* > *Aspergillus* sp. 1. Para el día 12 fue (Fig. 18 d): *A. fumigatiaffinis* > *P. lilacinum* > *Aspergillus* sp. 2 > *Aspergillus* sp. 1 > *F. solani* y culminamos el día 14 con el mayor OAI (Fig. 18 e) asignado a *P. lilacinum* > *A. fumigatiaffinis* > *F. solani* > *Aspergillus* sp. 2 > *Aspergillus* sp. 1. Estos cambios abruptos fueron de esperarse dados los porcentajes de inhibición en donde se hallaron algunas posibles sinergias y neutralismos lo que repercutió en el OAI ya que este es la sumatoria del PI para cada día.

De manera general los organismos *F. solani*, *Aspergillus* sp. 1 y *Aspergillus* sp. 2 fueron los organismos con mayor crecimiento, hecho que se hizo; aún más; evidente en sus controles con áreas cuantificadas según sus promedios en: 40.5, 32.5 y 37.5, de modo correspondiente. Aunque en interacción las áreas de estos

tres micromicetes se vieron disminuidas mantuvieron un crecimiento alto al estar en competencia con los otros organismos (*A. fumigatiaffinis* y *P. lilacinum*) y entre ellos con diferencias que oscilan entre 1 y 2 unidades al finalizar el experimento. En contraste, *A. fumigatiaffinis* y *P. lilacinum* mostraron menores áreas de crecimiento, tanto en interacción como en control. El caso de *A. fumigatiaffinis* fue llamativo, porque en interacción su crecimiento fue reducido (a excepción de su interacción con *P. lilacinum* donde este logro sobresalir), entre tanto su control arrojó un área de 30-30.5 cm². Por su parte, *P. lilacinum* fue otro caso particular dado que su crecimiento (hasta el día 14) fue de un máximo de 7-7.8 cm², crecimiento lento y constante que fue manifestado en cultivos axénicos, y experimentos. Por su parte los PI de *F. solani*, *Aspergillus* sp. 1, *A. fumigatiaffinis* y *Aspergillus* sp. 2 sugirieron valores de antagonismo durante los 5 días registrados, solo *P. lilacinum* presentó casos de posible sinergia que pasaron a un posterior antagonismo. En consecuencia los OAI sufrieron cambios drásticos, aumentos y disminuciones, a lo largo del tiempo y por ende cambios en la posición del organismo con el índice de antagonismo más alto.

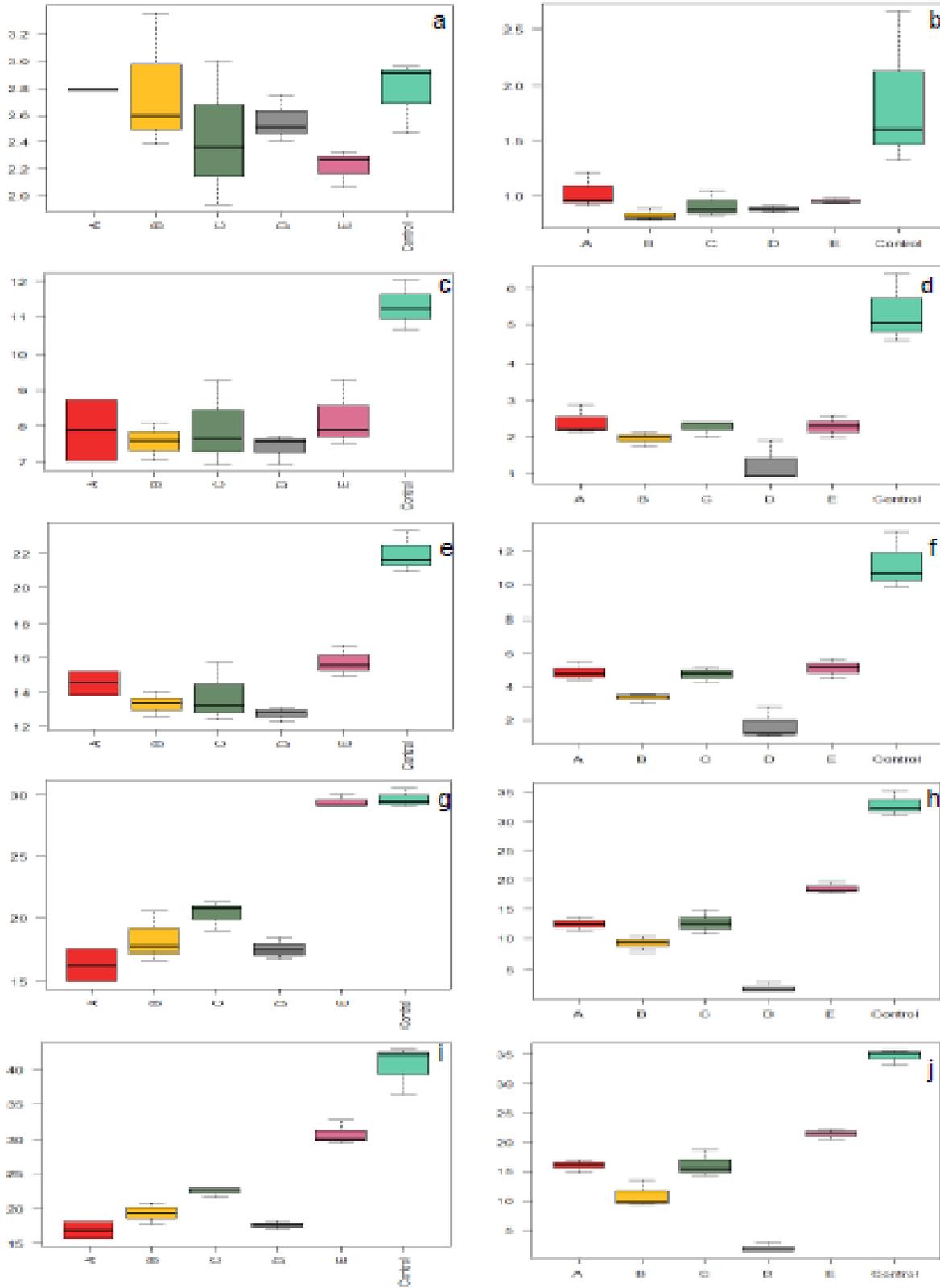


Figura 11. Áreas de crecimiento (cm²) del organismo *Fusarium solani* con cada uno de los competidores durante los días: 3 (a, b), 5 (c, d), 7 (d, e), 12 (e, f) y 14 (g, h) en ambos medios. Columna derecha= medio ácido y columna izquierda= medio básico, A: *F. solani*; B: *Aspergillus* sp. 1; C: *A. fumigatiformis*; D: *Aspergillus* sp. 2; E: *P. lilacinum*; Control: *Fusarium solani* en cultivo axénico.

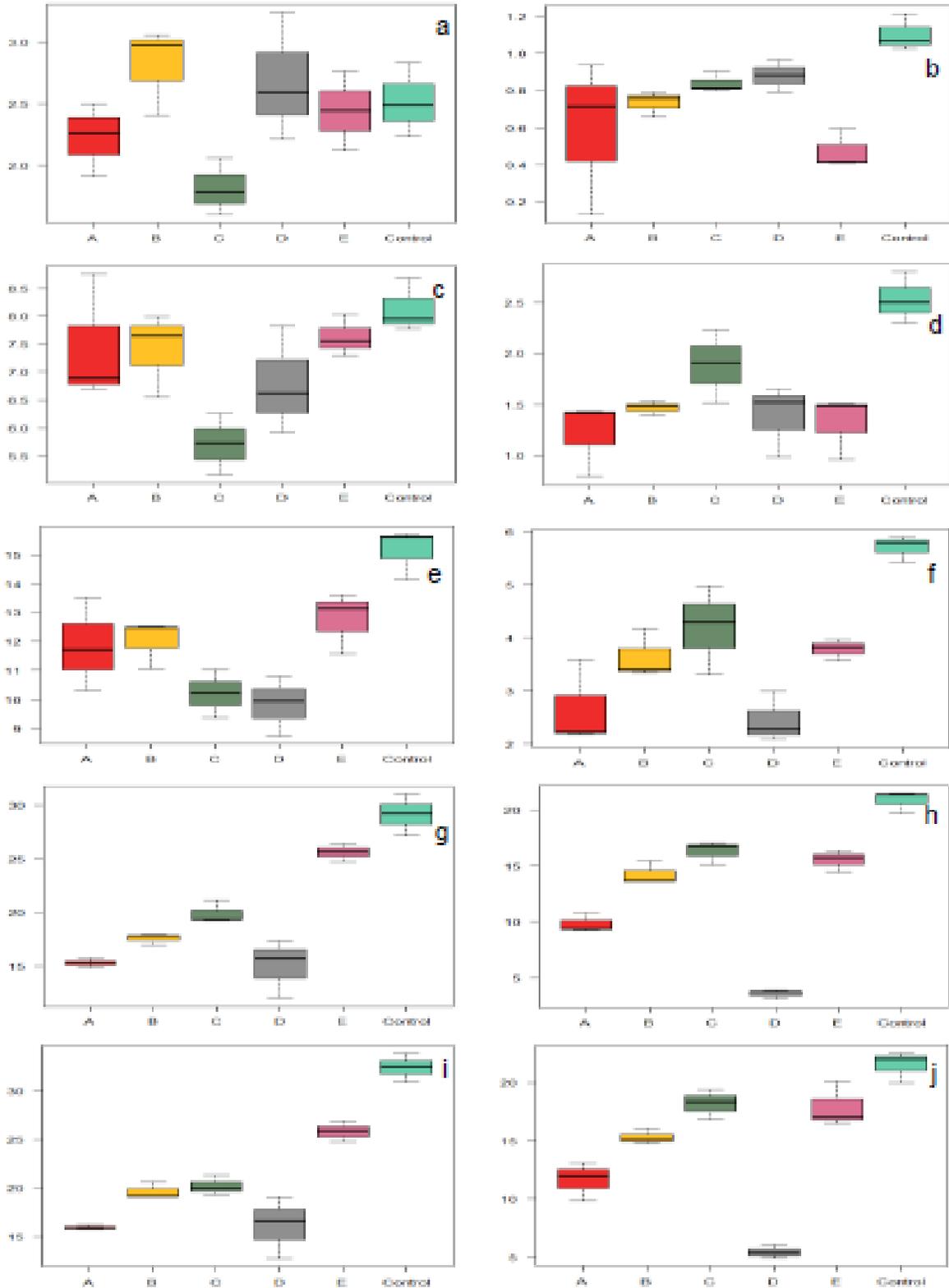


Figura 12. Áreas de crecimiento (cm^2) del organismo *Aspergillus* sp. 1 con cada uno de los competidores durante los días: 3 (a, b), 5 (c, d), 7 (d, e), 12 (e, f) y 14 (g, h) en ambos medios. Columna derecha= medio ácido y columna izquierda= medio básico, A: *F. solani*; B: *Aspergillus* sp. 1; C: *A. fumigatiformis*; D: *Aspergillus* sp. 2; E: *P. lilacinum*; Control: *Aspergillus* sp. 1 en cultivo axénico.

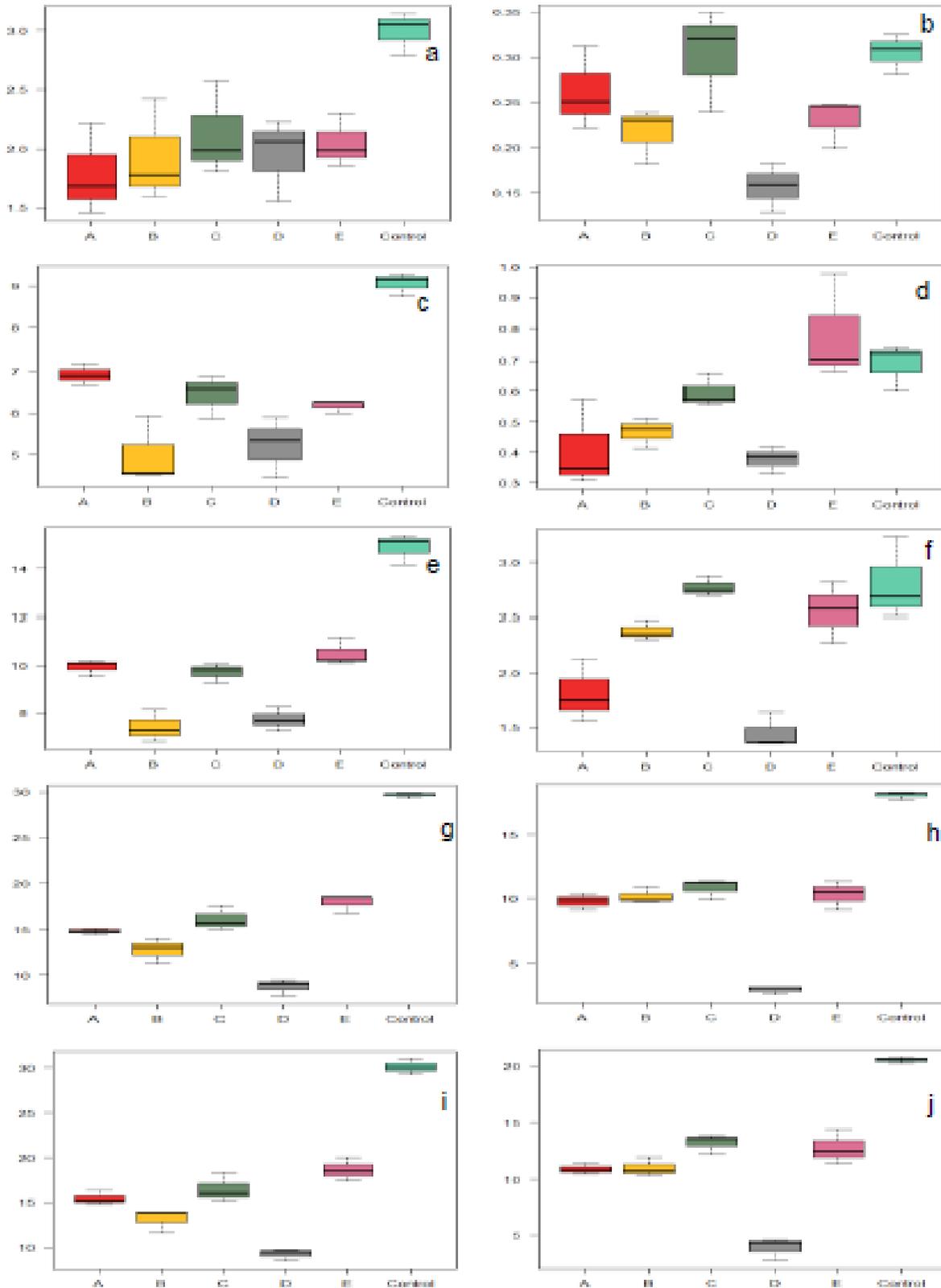


Figura 13. Áreas de crecimiento del organismo *Aspergillus fumigatiaffinis* con cada uno de los competidores durante los días: 3 (a, b), 5 (c, d), 7 (d, e), 12 (e, f) y 14 (g, h) en ambos medios. Columna derecha= medio ácido y columna izquierda= medio básico, A: *F. solani*; B: *Aspergillus* sp. 1; C: *A. fumigatiaffinis*; D: *Aspergillus* sp. 2; E: *P. lilacinum*; Control: *Aspergillus* sp. 1 en cultivo axénico.

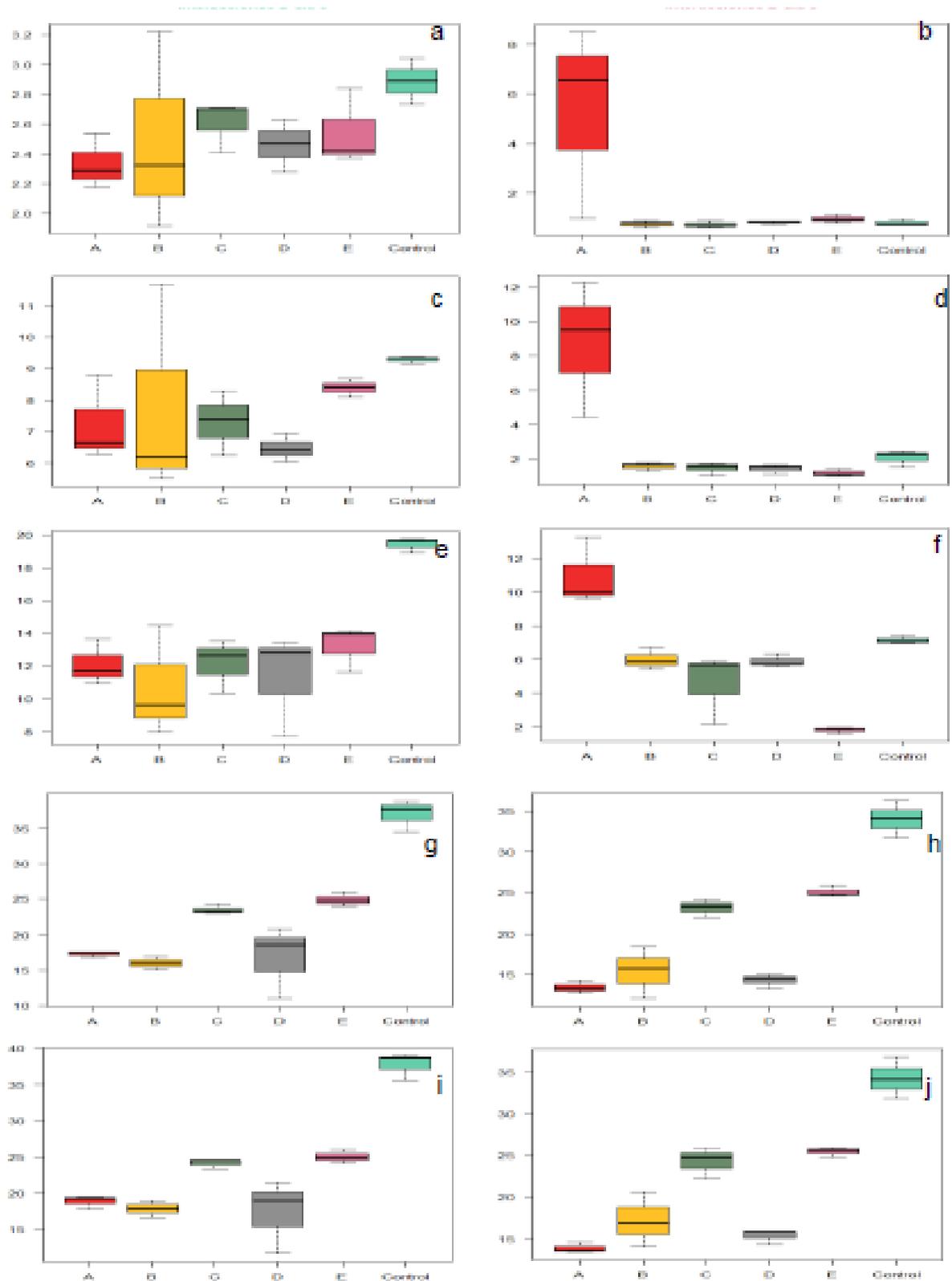


Figura 14. Áreas de crecimiento del organismo de *Aspergillus* sp. 2 con cada uno de los competidores durante los días: 3 (a, b), 5 (c, d), 7 (d, e), 12 (e, f) y 14 (g, h) en ambos medios. Columna derecha= medio ácido y columna izquierda= medio básico, A: *F. solani*; B: *Aspergillus* sp. 1; C: *A. fumigatiaffinis*; D: *Aspergillus* sp. 2; E: *P. lilacinum*; Control: *Aspergillus* sp. 2 en cultivo axénico.

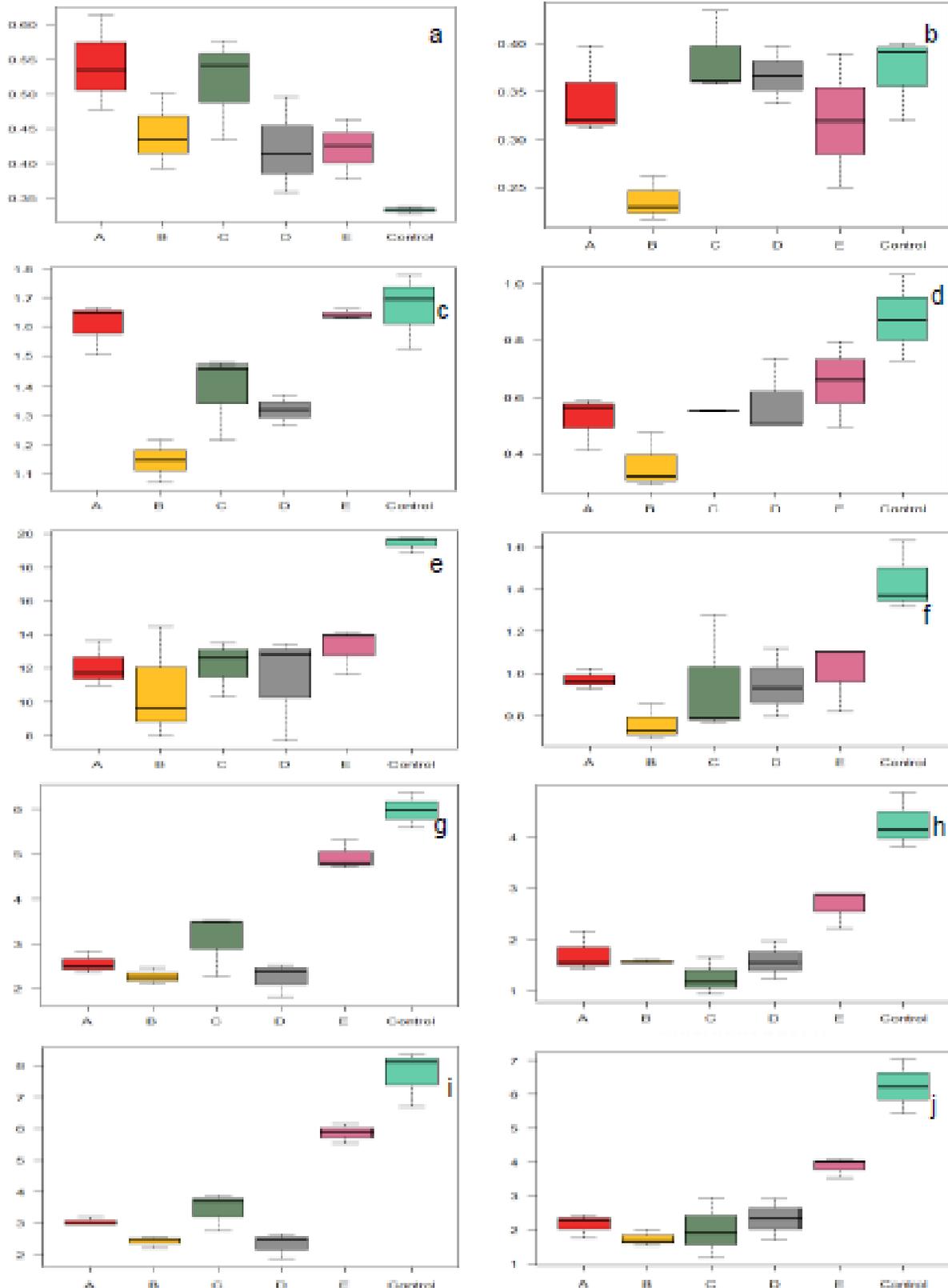


Figura 15. Áreas de crecimiento del organismo *Penicillium lilacinum* con cada uno de los competidores durante los días: 3 (a, b), 5 (c, d), 7 (d, e), 12 (e, f) y 14 (g, h) en ambos medios. Columna derecha= medio ácido y columna izquierda= medio básico, A: *F. solani*; B: *Aspergillus* sp. 1; C: *A. fumigatiaffinis*; D: *Aspergillus* sp. 2; E: *P. lilacinum*; Control: *Penicillium lilacinum* en cultivo axénico.

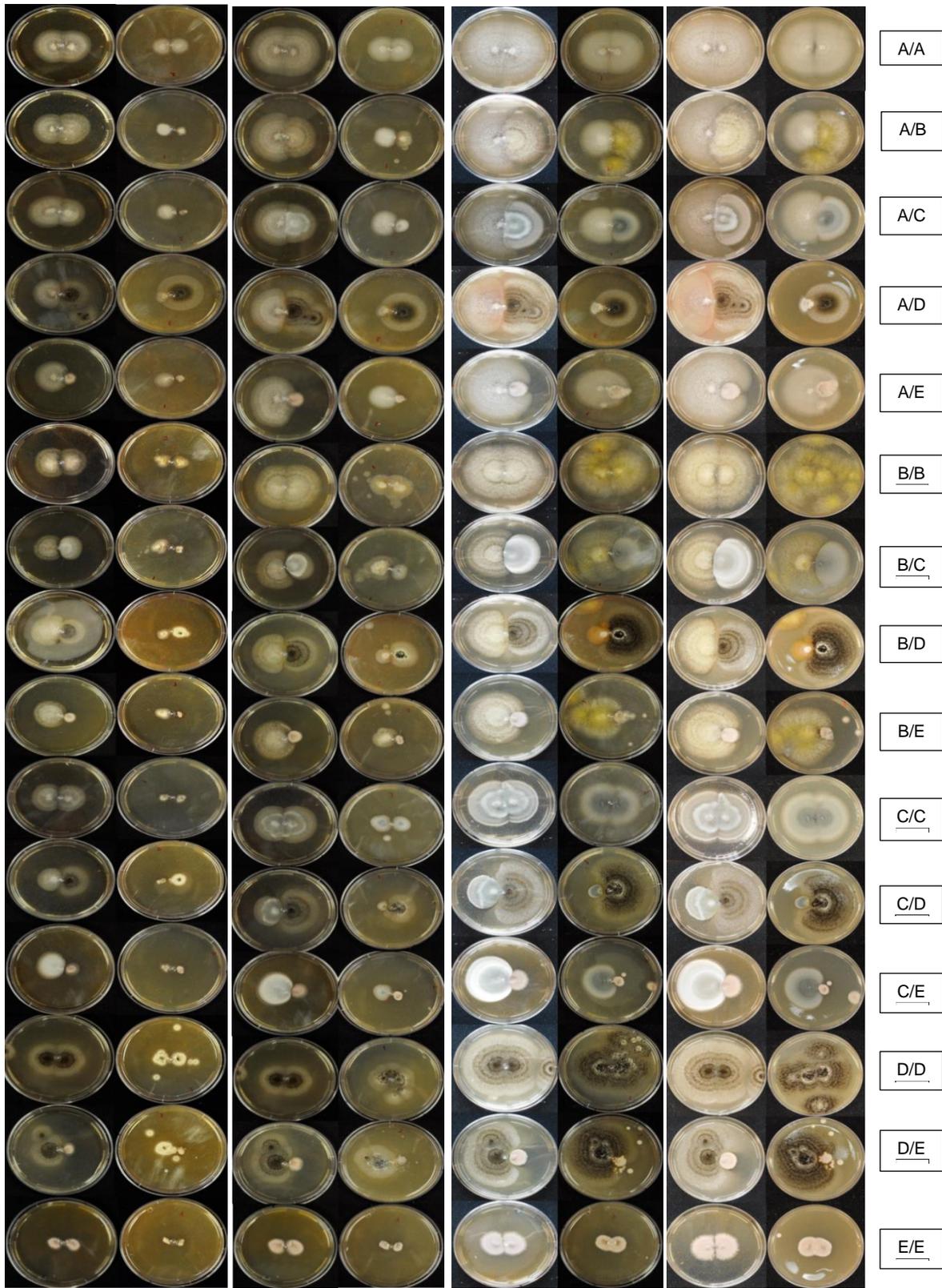


Figura 16. Bioensayos de interacciones *in vitro* de los días 5 (a), 7 (b), 12 (c) y 14 (d), las etiquetas del lado derecho hacen referencia a los organismos en co-cultivo (en el mismo orden de aparición). A: *F. solani*, B: *Aspergillus* sp. 1, C: *A. fumigatiaffinis*, D: *Aspergillus* sp. 2 y E: *P. lilacinum*. Medio básico a la izquierda de cada imagen (a, b, c y d) y ácido a la derecha.

9.2.1 Medio Ácido

Bajo condiciones de pH 3 los controles, en su mayoría, presentaron un mejor crecimiento (**Figs. 11-15**) a diferencia de los hallados en las interacciones. Sólo hubo dos casos en donde el organismo en cuestión creció de manera más significativa en bioensayos, estos fueron: *A. fumigatiaffinis* (al coexistir con *P. lilacinum* y *A. fumigatiaffinis*, durante los días 3-5) y *Aspergillus* sp. 2 (en co-cultivos con *F. solani*, durante los día 3-7). Sin embargo, pasados los primeros días, el crecimiento de los cultivos axénicos fue mayor que el crecimiento en interacción.

En todas las interacciones intraespecíficas (*F. solani*/ *F. solani*; *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 1; *A. fumigatiaffinis*/ *A. fumigatiaffinis*; *Aspergillus* sp. 2/ *Aspergillus* sp. 2 y *P. lilacinum*/ *P. lilacinum*) el crecimiento fue similar durante todo el proceso experimental. Es de resaltar que, a diferencia de los demás organismo, *P. lilacinum* tanto en co-cultivo (*P. lilacinum*/ *P. lilacinum*) como en cultivo axénico, expresó un crecimiento lento y menor, pero no hubo interferencias en su crecimiento.

Las interacciones interespecíficas revelaron, que en su mayoría, las áreas de crecimientos fueron notablemente diferentes; desde el inicio de las pruebas; entre los competidores. Claras evidencias fueron notables en los siguientes cultivos pareados (**Fig. 16**): *F. solani*/ *A. fumigatiaffinis* (donde *F. solani* destacó), *Aspergillus* sp. 1/ *A. fumigatiaffinis* (*Aspergillus* sp. 1 con crecimiento predominante), *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2 (*Aspergillus* sp. 2 con un área mayor), *F. solani*/ *P. lilacinum* (*F. solani* creció notoriamente), *Aspergillus* sp. 1/ *P. lilacinum* (*Aspergillus* sp. 1 con crecimiento sobresaliente), *A. fumigatiaffinis*/ *Aspergillus* sp. 2 (*Aspergillus* sp. 2 con crecimiento destacado desde principios de las pruebas), *A. fumigatiaffinis*/ *P. lilacinum* (*A. fumigatiaffinis* destacó con un crecimiento por mas de 10 veces en tamaño) y *Aspergillus* sp. 2/ *P. lilacinum* (*Aspergillus* sp. 2 con mayor crecimiento). No obstante, en el experimento de *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2, ambos micromicetes durante los días 3 y 5 mostraron un crecimiento similar, pero fue a partir del día 7 que *Aspergillus* sp. 2 creció destacablemente. Aunado a ello, solo detectamos que en la interacción de *F. solani* / *Aspergillus* sp. 1 ambos organismos presentaron diferencias mínimas.

Los porcentajes de inhibición (PI, **Fig. 17**), sugirieron algunas interacciones de posibles sinergia durante los primeros días, tal fue el caso de: *A. fumigatiaffinis* en interacción con *Aspergillus* sp. 1 (d 3), *P. lilacinum* (d 3- 5) y mientras coexistió con su misma especie (*A. fumigatiaffinis*, d 3); (**Fig. 17 b**), *Aspergillus* sp. 2, por su parte, al estar con su misma especie, con *P. lilacinum* y con *F. solani* en el día 3 (**Fig. 17 b, d**). Aunque con *F. solani* este tipo de interacción se extendió hasta el día 7 (**Fig. 17 b, d**) y *P. lilacinum* expuso esta misma respuesta (sinergia), en interacción con *A. fumigatiaffinis*, únicamente durante el día 3.

Con relación a neutralismos, se halló uno, que correspondió a *A. fumigatiaffinis* en interacción intraespecífica. Hay que recalcar que los días siguientes, a partir del día 12, todas las interacciones fueron de antagonismo y que los organismos *F. solani* y *Aspergillus* sp. 1, fueron los únicos que presentaron este tipo de interacción (antagonismo) desde los primeros días y en cualquier tipo de interacción, incluso con su misma especie (**Fig. 17 b, d, f, h, j**). Consecuentemente, el hecho de haber encontrado valores negativos (relacionados con posibles sinergias) tuvo repercusiones en el índice de antagonismo total u OAI.

Por lo dicho anteriormente los OAI (**Fig. 18**), para este medio, colocaron en el día 3 al organismos *F. solani* con el mayor porcentaje de antagonismo, seguido de *Aspergillus* sp. 1 > *P. lilacinum* > *A. fumigatiaffinis* > *Aspergillus* sp. 2, (**Fig. 18 a**). En el día 5 el orden fue el siguiente (**Fig. 18 b**): *F. solani* > *P. lilacinum* > *Aspergillus* sp. 1 > *A. fumigatiaffinis* > *Aspergillus* sp. 2. Del mismo modo, se detectaron cambios en los días restantes: día 7 (**Fig. 18 c**) con un valor más alto por parte de *F. solani* después *Aspergillus* sp. 1 > *P. lilacinum* > *A. fumigatiaffinis* > *Aspergillus* sp. 2, día 12 (**Fig. 18 d**) primero *F. solani* > *P. lilacinum* > *A. fumigatiaffinis* > *Aspergillus* sp. 2 > *Aspergillus* sp. 1. Culminando el día 14 con el siguiente acomodo (**Fig. 18 e**): *P. lilacinum* > *F. solani* > *A. fumigatiaffinis* > *Aspergillus* sp. 2 > *Aspergillus* sp. 1, dichos resultados indicaron que la respuesta de los organismos cambiaron a lo largo del tiempo.

Como observaciones finales en este medio *F. solani* y *Aspergillus* sp. 1 tuvieron un crecimiento sobresaliente al interactuar con *A. fumigatiaffinis* y *P. lilacinum*, pero un desarrollo similar al estar justos de manera *in vitro*. En cuanto a *Aspergillus* sp. 2, del mismo modo que en el medio básico mostró un mayor crecimiento al estar con *A. fumigatiaffinis* y *P. lilacinum*, pero lo interesante es que al interactuar con *F. solani* y *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2 prosperó notoriamente, cosa que en el medio básico no sucedió. Por su parte, *A. fumigatiaffinis* al estar en interacción con cualquiera de los antes mencionados disminuyó su área de crecimiento pero al estar con *P. lilacinum* logró sobresalir, lo que dejó a *P. lilacinum* como el organismo con el crecimiento más lento ya que con cualquier competidor creció poco en área y esto se vio reflejado en los controles. Por tanto, los PI mostraron variaciones notorias en el tipo de interacción que si bien se presentaron posibles sinergias y/o neutralismos todos los bioensayos culminaron con porcentajes de antagonismo. Además, este hecho se reflejó en los OAI de cada uno de los micromicetes generando cambios en la posición del organismo con el mayor índice de antagonismo total a lo largo de los días documentados.

9.3 Exploración de las bases fisiológicas de tres interacciones

Las interacciones seleccionadas para su exploración por técnicas metabolómicas fueron tres relacionadas con *Aspergillus* sp. 2. En los cultivos pareados de: *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2 y *A. fumigatiaffinis*/ *Aspergillus* sp. 2; en medio básico dado que bajo esta condición de pH se encontró la síntesis de pigmentos por uno de los competidores o en la zona de contacto de la interacción (**Fig. 19**). En los cultivos duales de *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2 y *A. fumigatiaffinis*/ *Aspergillus* sp. 2 se produjo un pigmento en las zonas de contacto de los individuos y para el caso del co-cultivo *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2 se detectó la producción de un pigmento de color rojo por parte del organismo *F. solani*, hecho que en el medio ácido no se visualizó en ninguno de los casos.

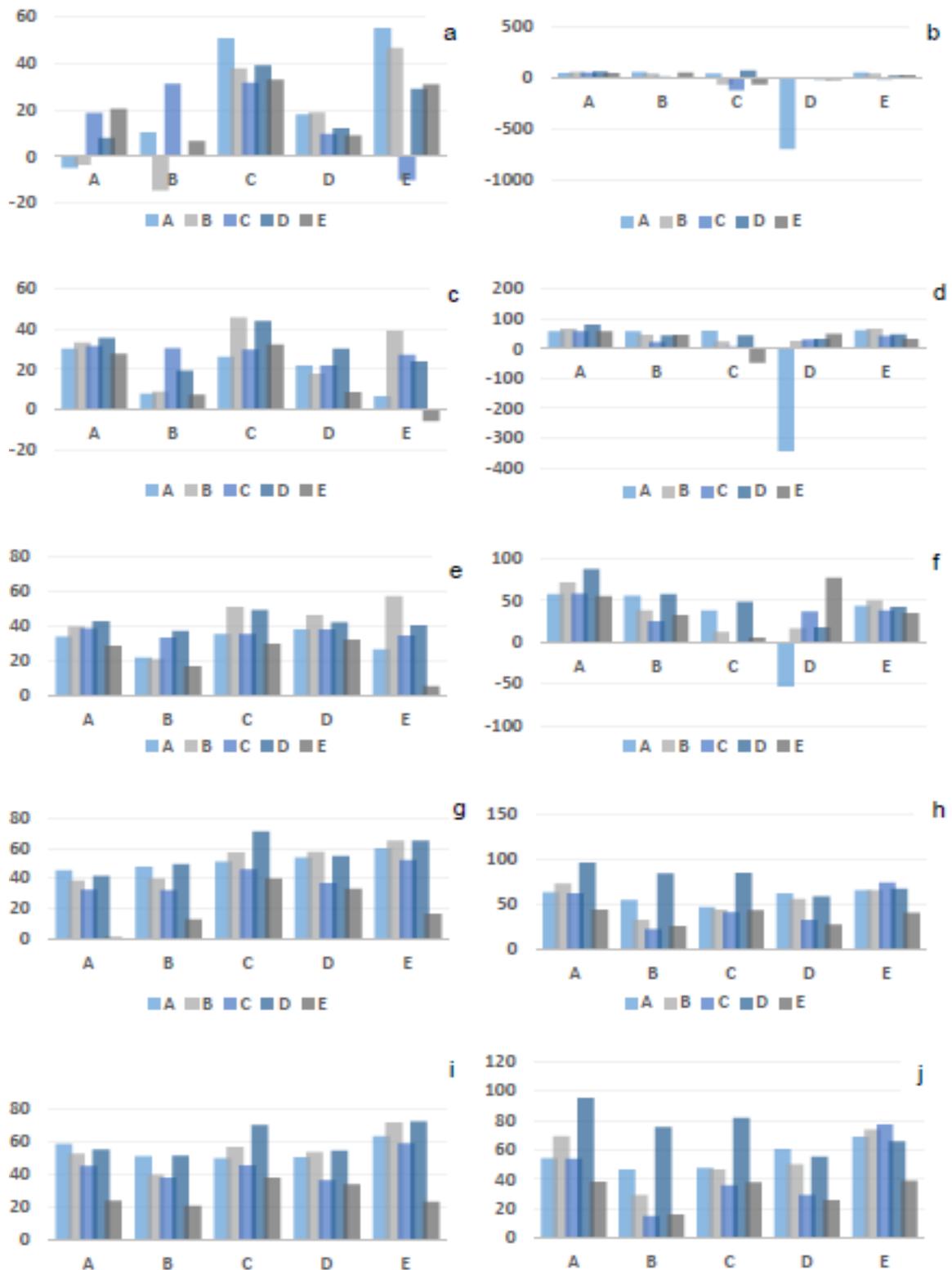


Figura 17. Porcentajes de inhibición (PI) de cada uno de los organismos al estar en interacción en los días 3 (a, b), 5 (c, d), 7 (e, f), 12 (g, h) y 14 (i, j). Columna derecha medio ácido, columna izquierda medio básico. A: *F. solani*, B: *Aspergillus* sp. 1, C: *A. fumigati*affinis, D: *Aspergillus* sp. 2 y E: *P. lilacinum*.

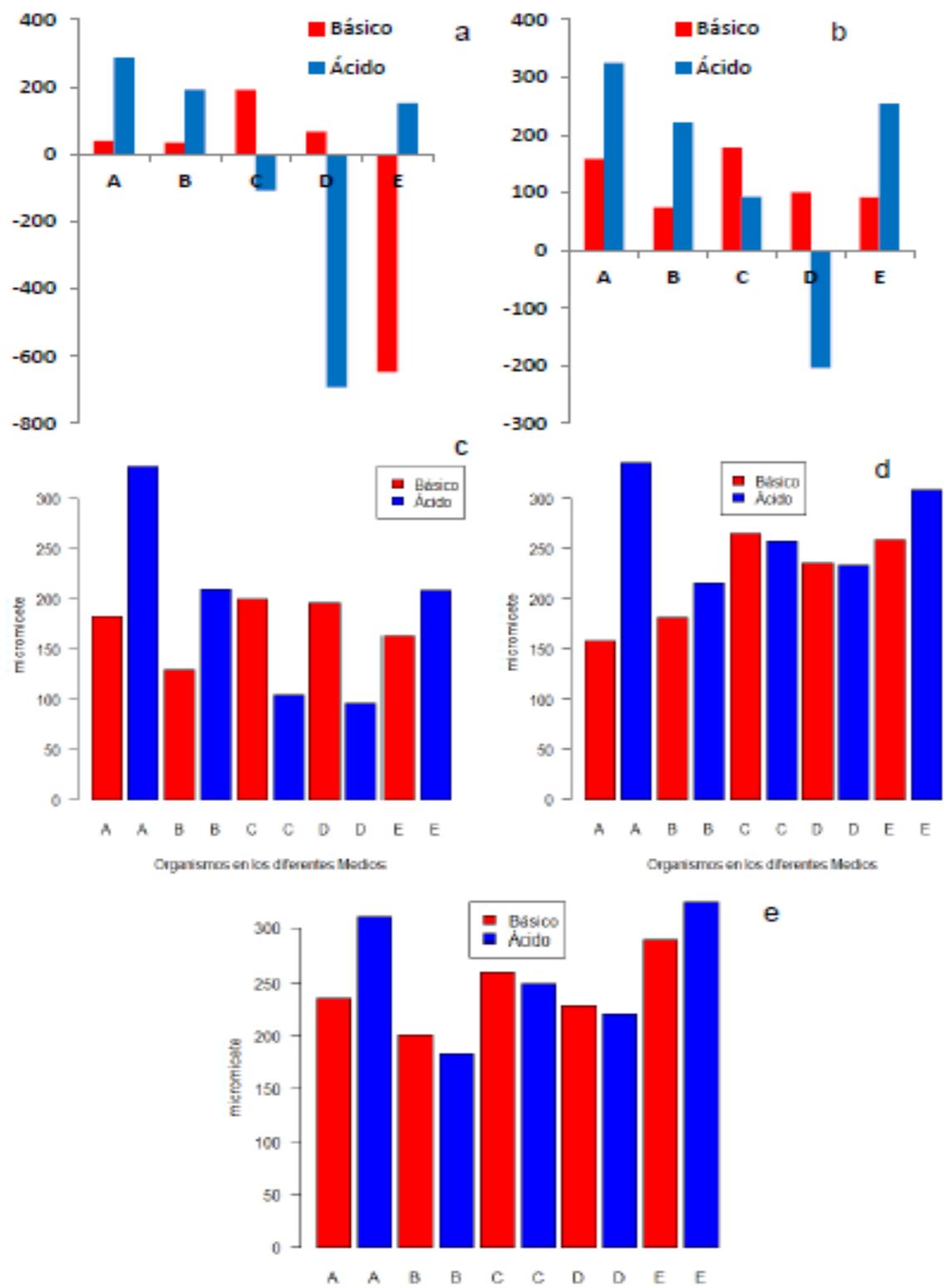


Figura 18. Índice de antagonismo total (Overall Antagonism Index) OAI para cada competidor en los diferentes medios, a= día 3, b= día 5, c= día 7, d= día 12 y e= día 14. A: *F. solani*, B: *Aspergillus* sp. 1, C: *A. fumigatiaffinis*, D: *Aspergillus* sp. 2 y E: *P. lilacinum*

Por ende, la exploración de las bases fisiológicas se realizó para los 4 organismos. Estos fueron sometidos a fermentaciones individuales (*F. solani*; *Aspergillus* sp. 1; *A. fumigatiaffinis* y *Aspergillus* sp. 2) y en co-cultivos (*F. solani*/*Aspergillus* sp. 2; *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2 y *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2), en medio V8 (líquido) y arroz (sólido) con la finalidad de lograr la extracción de sus metabolitos secundarios a pequeña escala. Con lo que se generaron diferentes rendimientos según el tipo de medio, tal como se muestra en la **Fig. 20**, donde se visualiza que el mayor rendimiento ocurrió en los extractos obtenidos del medio sólido.

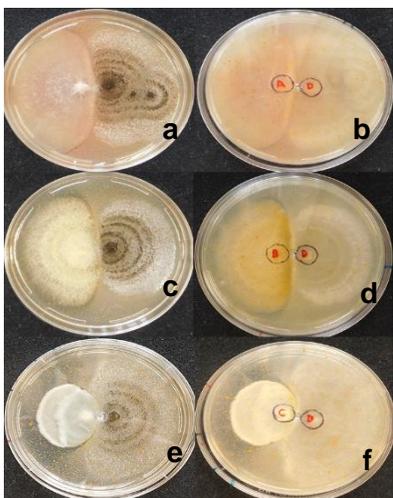


Figura 19. Interacciones seleccionadas para explorar sus bases fisiológicas en medio básico. *F. solani*/*Aspergillus* sp. (a y b), *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. (c y d) y *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. (e y f).

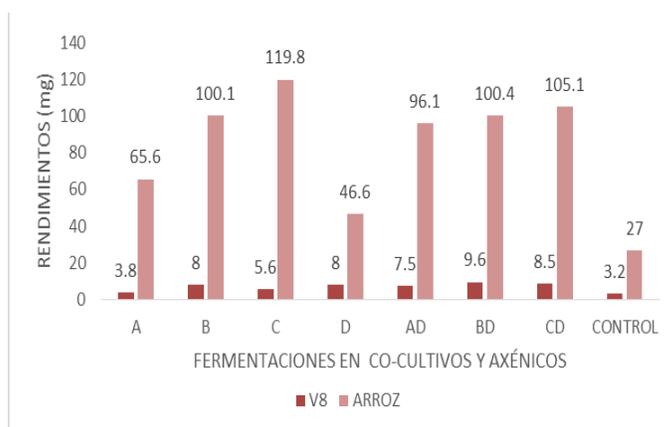


Figura 20. Obtención de extractos a pequeña escala, cultivos axénicos y co-cultivos. A (*F. solani*), B (*Aspergillus* sp. 1), C (*A. fumigatiaffinis*), D (*Aspergillus* sp., sección niger), y AD, BD y CD es la combinación de los antes enunciados. Rojo solido medio liquido (V8) y rojo tenue medio sólido (arroz).

9.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Los datos obtenidos de la exploración de las tres interacciones fueron analizados por HPLC. Técnica con la cual se llevó a cabo la comparación de los perfiles metabolómicos tanto de controles así como de las especies fúngicas particulares y en interacción **Figs. 21-26**. Este paso resultó crucial ya que las señales de *Aspergillus* sp. 2 se mantuvieron en la mayoría de las interacciones. Aunque, en algunos casos, pocos, las señales de esta especie desaparecieron. No obstante, en su mayoría aumentaron o disminuyeron, caso contrario a lo sucedido con las señales de los demás competidores, *F. solani*, *Aspergillus* sp. 1 y *A.*

fumigatiaffinis, ya que estas generalmente desaparecieron en co-cultivo. Además, reportamos señales compartidas entre los organismos que en algunos casos se mantuvieron en los perfiles duales. Ejemplos claros de los patrones antes mencionados se presentan a continuación.

En las **Figs. 21-26**, se muestra que las señales para ambos medios de cultivo en *F. solani* (**Figs. 21 b y 24 b**), *Aspergillus* sp. 1 (**Figs. 22 b y 25 b**) y *A. fumigatiaffinis* (**Figs. 23 b y 30 b**) desaparecieron en mayor medida. A pesar de ello, se hallaron algunos compuestos que se expresaron en los crecimientos duales en medio sólido (co-cultivos de *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2) en la **Fig. 24 b y d** y con relación a *A. fumigatiaffinis*/ *Aspergillus* sp. 2 en la **Fig. 26 b y d**). Para el caso de *Aspergillus* sp. 2 pocas señales dejaron de ser sintetizadas tal como se ve en las **Figs. 21 c y 23 c** en medio V8, y su perfil metabólico dominó en todas las interacciones (**Figs. 21-26**). Algunos compuestos orgánicos compartidos fueron detectados (**Figs. 22 y 24**), en las interacciones de *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2 y *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2 (**Fig. 95**). Por otra parte, identificamos señales nuevas en los bioensayos pareados de *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2 y *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2 (**Figs. 24 d y 25 d**) en medio sólido (arroz).

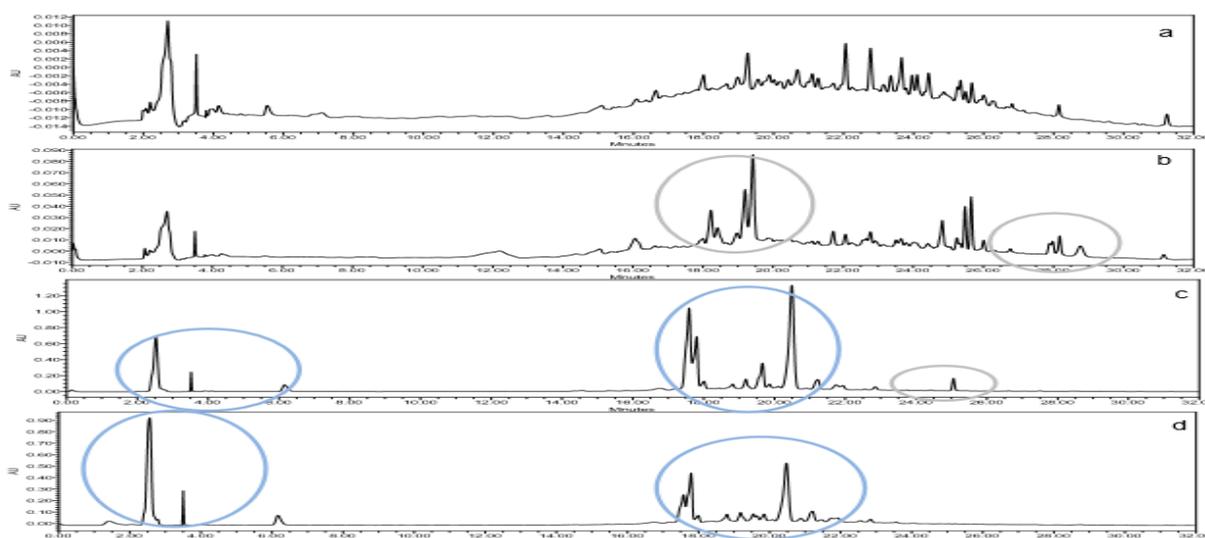


Figura 21. Cromatogramas por HPLC analítico detector UV, $\lambda = 254$ nm. (a) Extracto medio V8. (b) Extracto de *F. solani*. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (d) Extracto de la interacción *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. Flechas — Metabolitos que desaparecen, — Metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecen en interacción.

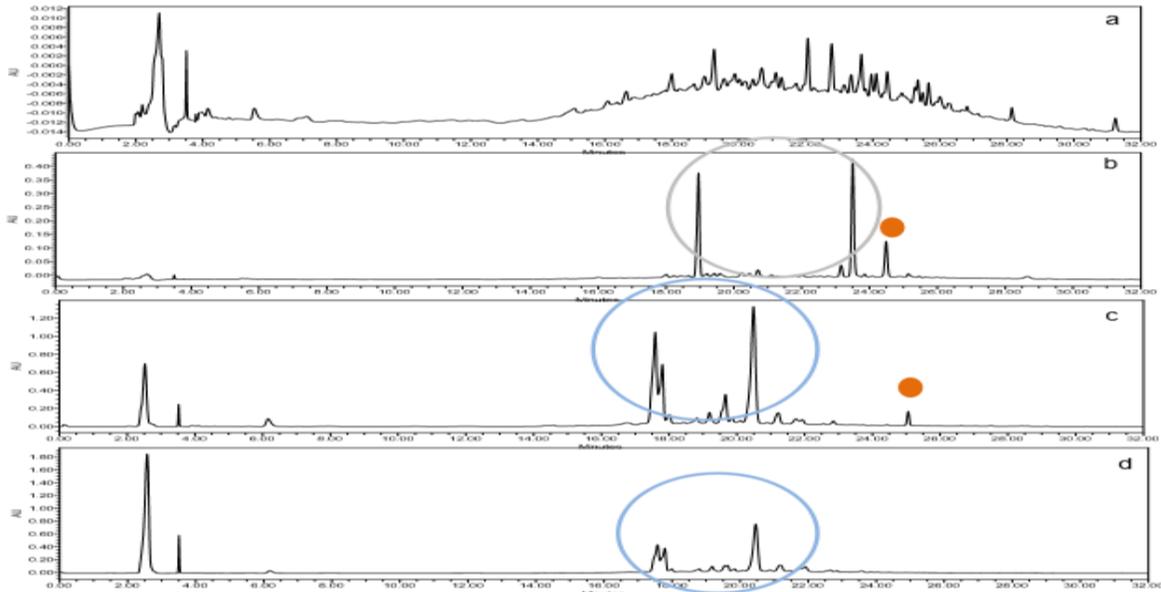


Figura 22. Cromatogramas por HPLC analítico detector UV, $\lambda = 254$ nm. (a) Extracto medio V8. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 1. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (d) Extracto de la interacción *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2. Flechas --- metabolitos que desaparecen, --- metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecen en interacción, --- metabolitos compartidos.

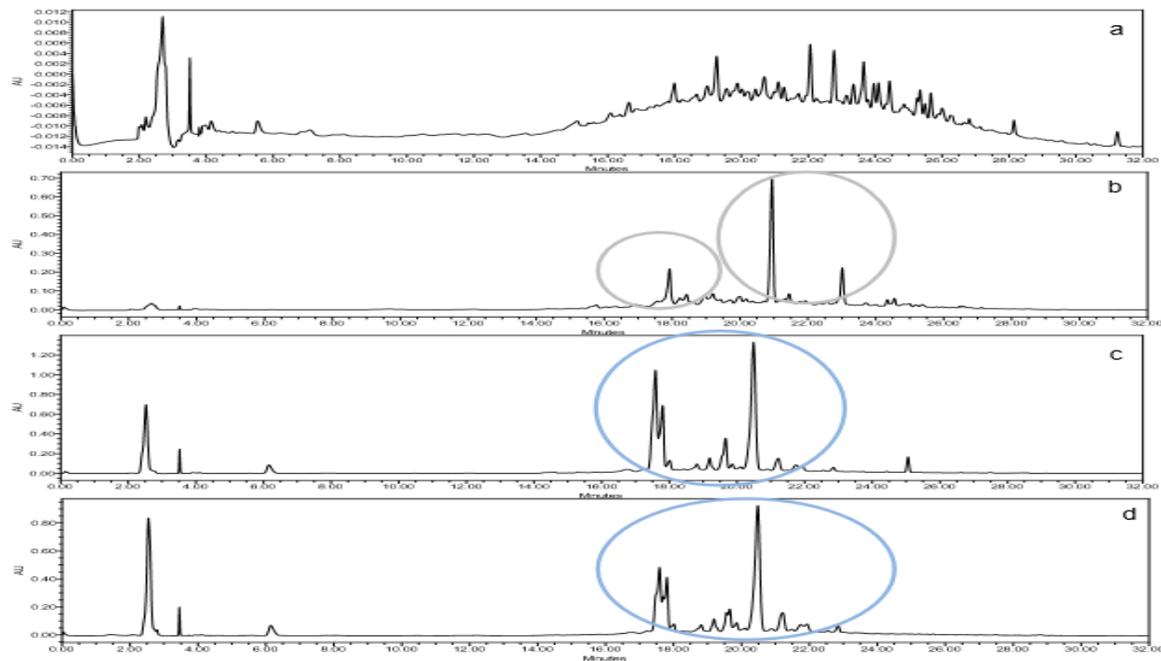


Figura 23. Cromatogramas por HPLC analítico detector UV, $\lambda = 254$ nm. (a) Extracto medio V8. (b) Extracto de *A. fumigatiaffinis*. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (d) Extracto de la interacción *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2. Flechas --- metabolitos que desaparecen, --- metabolitos de *Aspergillus* sp.2 que prevalecen en interacción.

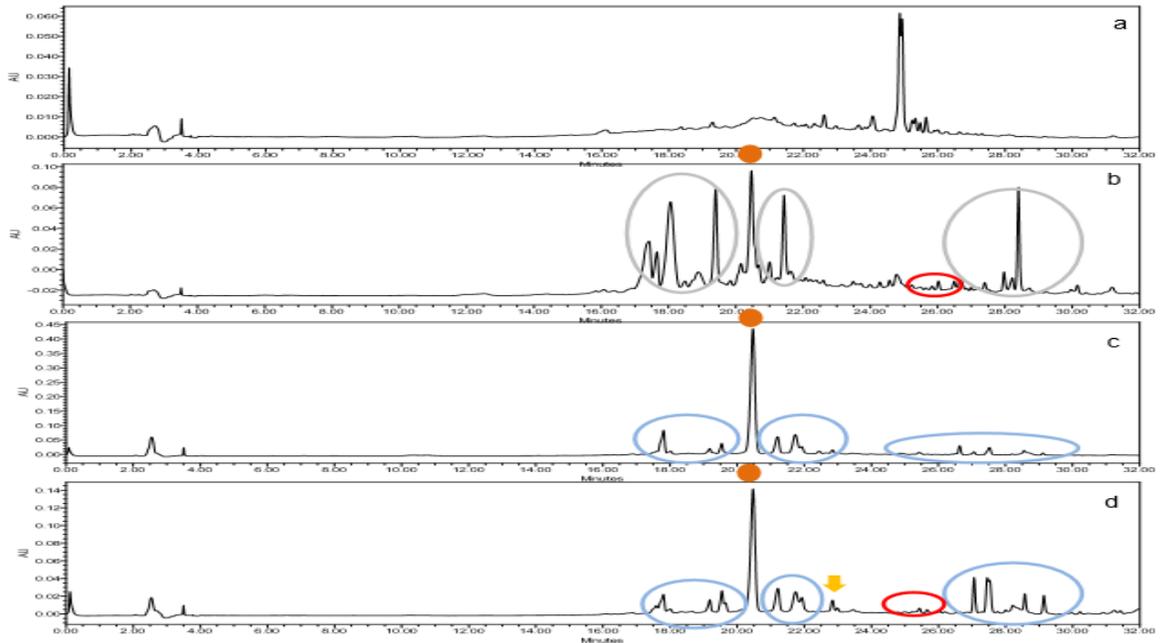


Figura 24. Cromatogramas por HPLC analítico detector UV, $\lambda = 254$ nm. (a) Extracto medio arroz. (b) Extracto de *F. solani*. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (d) Extracto de la interacción *F. solani* /*Aspergillus* sp. 2. Flechas \color{orange} metabolitos compartidos, \color{grey} metabolitos que desaparecen, \color{blue} metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecen en interacción, \color{yellow} metabolitos nuevos en cultivos parados, \color{red} metabolitos de *F. solani* que se mantienen en cultivos duales.

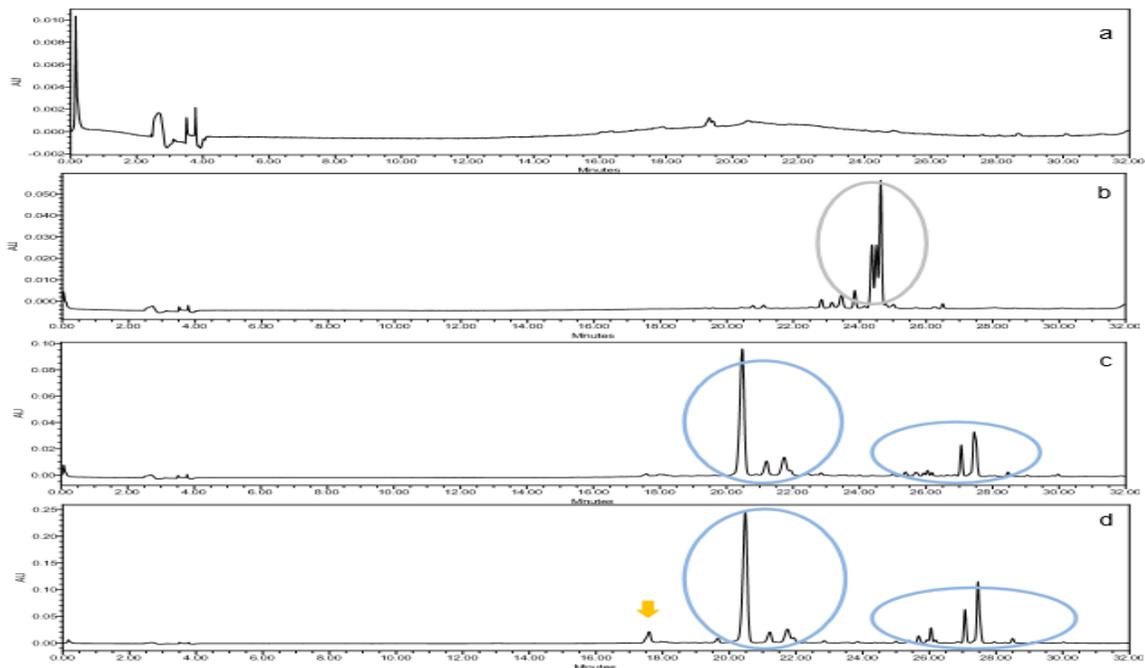


Figura 25. Cromatogramas por HPLC analítico detector UV, $\lambda = 365$ nm. (a) Extracto medio arroz. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 1. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (d) Extracto de la interacción *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2. Flechas \color{grey} etabolitos que desaparecen, \color{blue} metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecen en interacción, \color{yellow} metabolitos nuevos en cultivos parados.

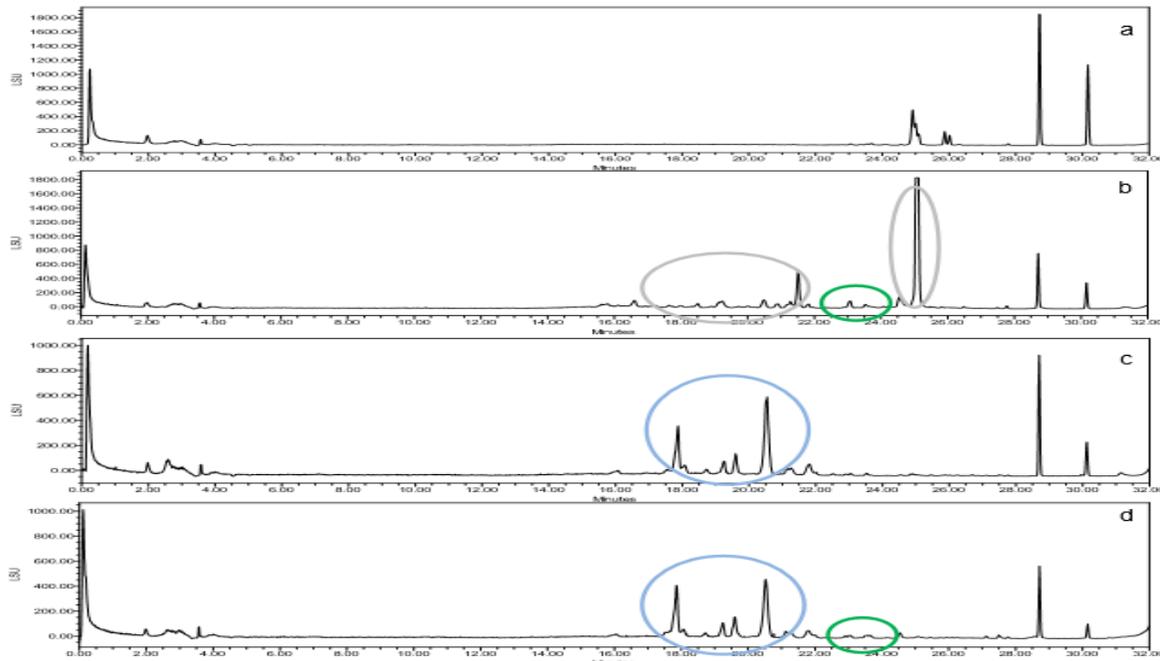


Figura 26. Cromatogramas por HPLC analítico detector ELSD. (a) Extracto, medio arroz. (b) Extracto de *A. fumigatiaffinis*. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (d) Extracto de la interacción *A. fumigatiaffinis* /*Aspergillus* sp. 2. Flechas — metabolitos que desaparecen, — metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecen en interacción, — metabolitos de *A. fumigatiaffinis* que se mantienen en cultivos pareados.

9.3.2 UPLC-PDA-ESIMS: Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a los detectores de arreglo de fotodiodos y de espectrometría de masas por electrospray

Los cromatogramas generados por espectrometría de masas (SM, por sus siglas en inglés) mostraron un patrón similar a los perfiles obtenidos con la técnica cromatográfica. Siendo el perfil metabolómico de *Aspergillus* sp. 2 el dominante en interacción con cualquiera de los competidores, claros ejemplos se pudieron visualizar en las **Figs. 27-38**.

Particularmente se detectaron señales compartidas en algunos cromatogramas del medio V8 (**Figs. 27, 30 y 32**) en el cultivo dual de *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2, en los minutos 7.76, compuesto sintetizado por ambos competidores, en el 9.27 se presenta una señal compartida por ambos organismos, solo que ésta se mantiene en interacción (**Fig. 27**). Respecto a *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2 se reportaron en el tiempo 9.28 min (**Fig. 30**) y en *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2 (**Fig. 32**) en 7.76, 9.27 y 9.86 (min). Los picos que desaparecieron en fermentaciones duales sobre V8 (**Figs. 27 c, 28 c, 29**

c, 30 c, 31 c, 32 c) por mencionar algunos fueron: 7.25, 7.29, 7.43, 7.69, 8.09 y 8.28 producidas por *F. solani*; *Aspergillus* sp. 1 en el tiempo 4.72, 5.01 y 6.35 y en los minutos 5.24, 6.42 y 7.13 relacionados con *A. fumigatiaffinis*. En contraste, hubo picos sintetizados por uno de los competidores que se lograron mantener en interacción tales como: 5.43 por *F. solani* (**Fig. 28 a y c**); 9.86 (**Fig. 27 a y b**), 3.82, 4.50, 4.65, 5.10 (los cuatro datos anteriores en la **Fig. 28 a y b**), 3.63, 3.82 en la **Fig. 29 a y b**, 9.87 (**Fig. 30 a y b**), 3.90, 4.87 (estos últimos en la **Fig. 31 a y b**), producidos por *Aspergillus* sp. 2. En suma se detectó la producción de una señal nueva en el co-cultivos de *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2 en el min 5.44 de la **Fig. 29**.

En medio sólido las señales compartidas fueron: 3.82 y 3.90, que además se conservaron durante la interacción de los organismos *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2 (**Fig. 37**). Las que desaparecieron en fermentaciones pareadas ocurrieron en los minutos: 4.35, 5.24, 5.62 (**Fig. 33 c**) secretadas por *F. solani*; unas cuantas de *Aspergillus* sp. 2: 7.27, 7.45, 7.62 y 8.04 (min) vistas en la **Fig. 34** en co-cultivo con *F. solani*; con respecto a *A. fumigatiaffinis* en la **Fig. 37 c** fue notoria la pérdida de los picos 5.48 y 6.36, así como 7.14 y 7.35 presentes en la **Fig. 38 c**.

Del mismo modo que en el medio V8 se mantuvieron metabolitos producidos por alguno de los organismos interactuantes durante las fermentaciones pareadas como fue el caso de la interacción *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2 en donde el primero mantuvo un pico en el tiempo 5.94 (**Fig. 33 a y c**); en el co-cultivo de *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2, *A. fumigatiaffinis* expresó picos en 6.23 min y 6.43 min (**Fig. 37 a y c**). Las señales producidas por *Aspergillus* sp. 2 fueron dominantes al estar con cualquiera de los competidores y este patrón fue notorio en la mayoría de las figuras (**Figs. 33-38**). Cabe destacar que se localizó una mayor producción de señales nuevas (**Figs. 33 a, 35 a y 38 a**) en el medio sólido.

Al término de las comparaciones constatamos que el perfil metabolómico de *Aspergillus* sp. 2 destacó por sobre los demás en ambos medios de cultivo.

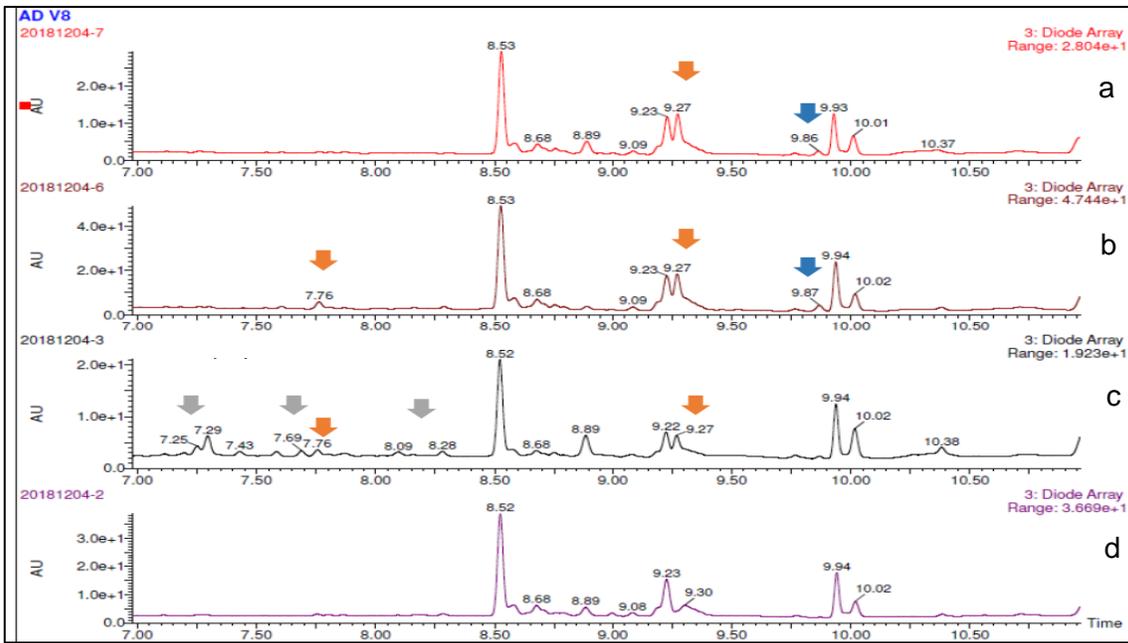


Figura 27. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *F. solani*. (d) Extracto V8. Flechas ▶ metabolitos compartidos, ▶ metabolitos que desaparecieron, ▶ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción.

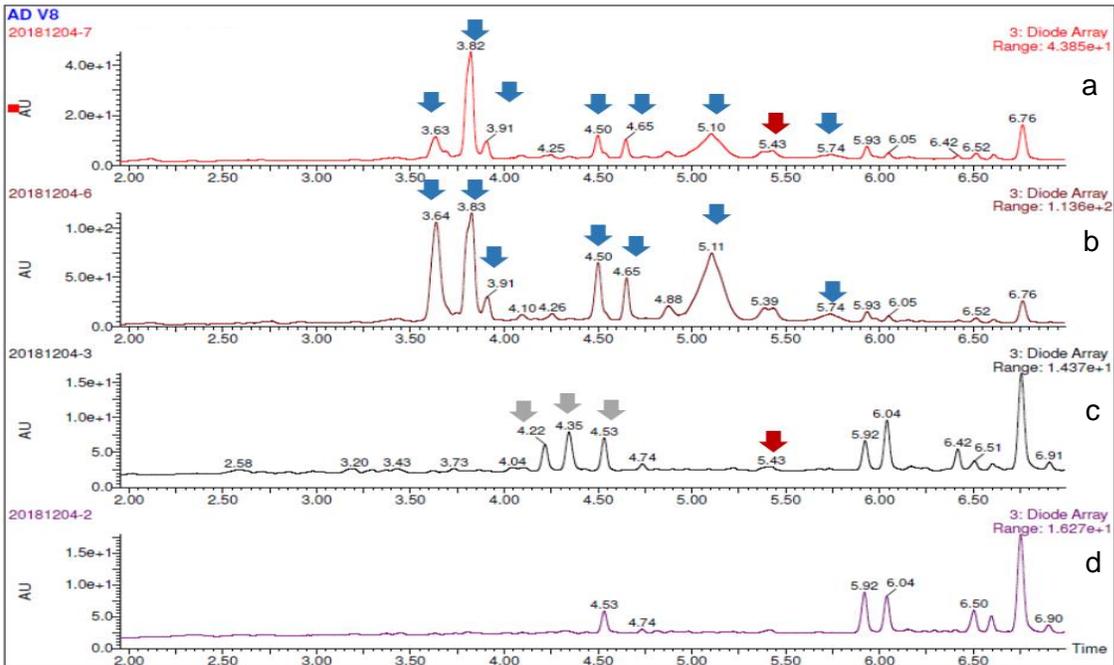


Figura 28. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *F. solani*. (d) Extracto V8. Flechas ▶ metabolitos de *F. solani* que se mantuvieron en cultivos duales, ▶ metabolitos que desaparecieron, ▶ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción.

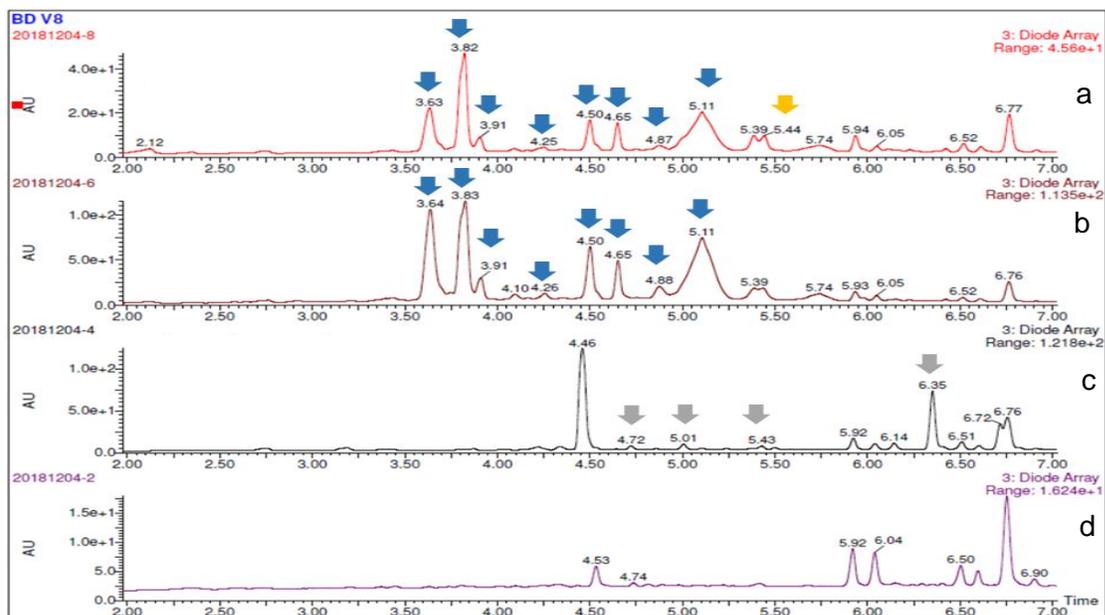


Figura 29. Cromatogramas UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *Aspergillus* sp. 1 /*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 1. (d) Extracto V8. Flechas ▶ metabolitos nuevos en cultivos pareados (a), ▶ metabolitos que desaparecieron, ▶ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción.

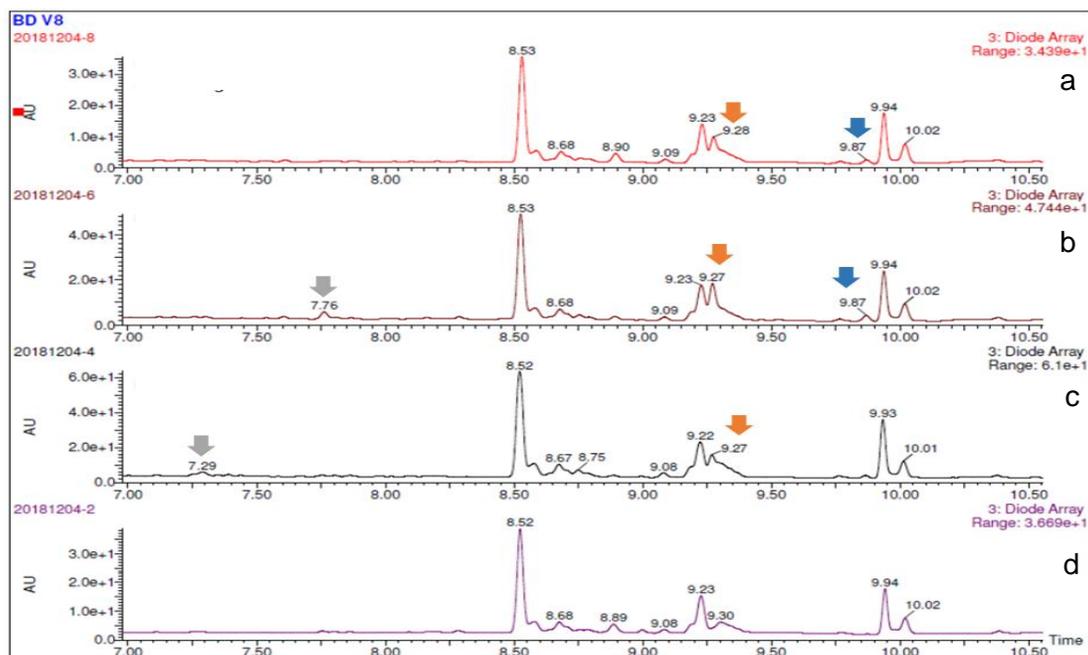


Figura 30. Cromatogramas UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *Aspergillus* sp. 1 /*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 1. (d) Extracto V8. Flechas ▶ metabolitos compartidos y ▶ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción.

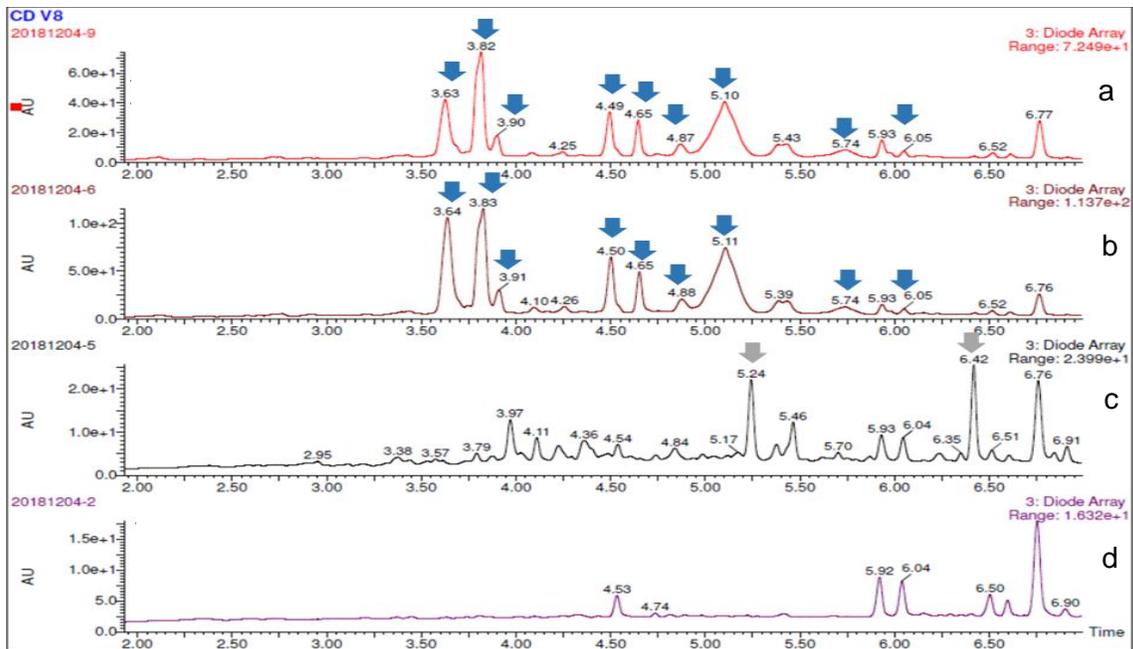


Figura 31. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *A. fumigatiaffinis*. (d) Extracto V8. Flechas \blacktriangleleft metabolitos que desaparecieron y \blacktriangleright metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción.

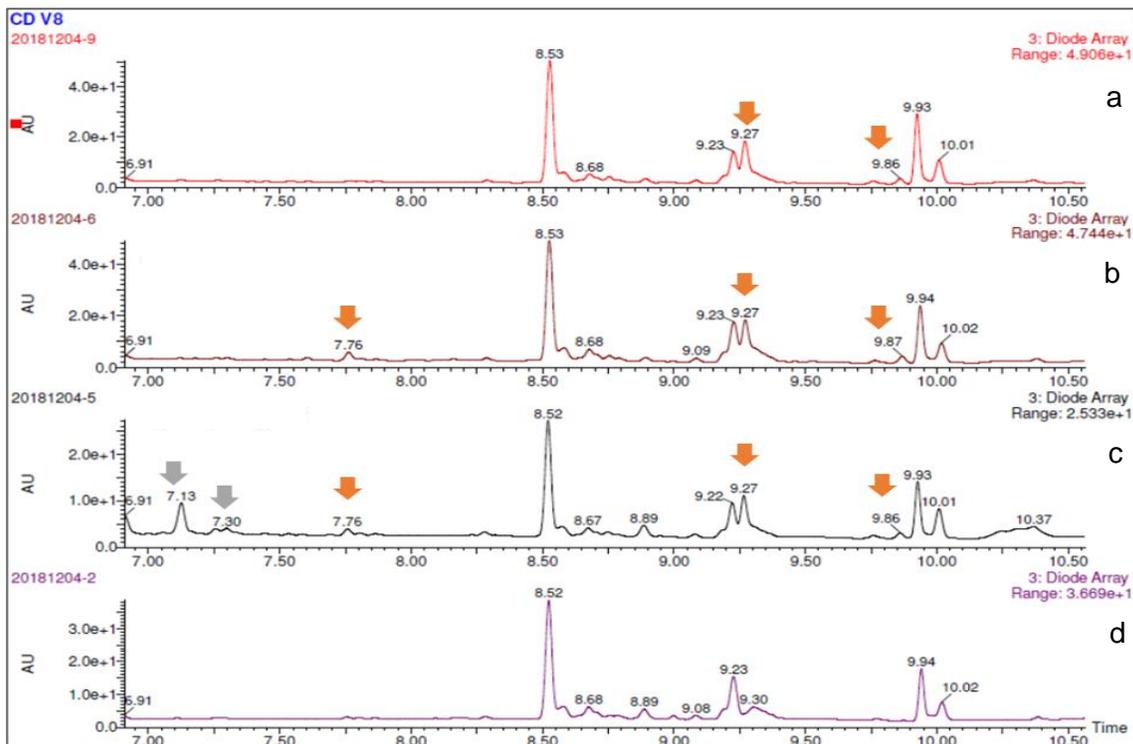


Figura 32. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *A. fumigatiaffinis*/*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *A. fumigatiaffinis*. (d) Extracto V8. Flechas \blacktriangleright metabolitos compartidos.

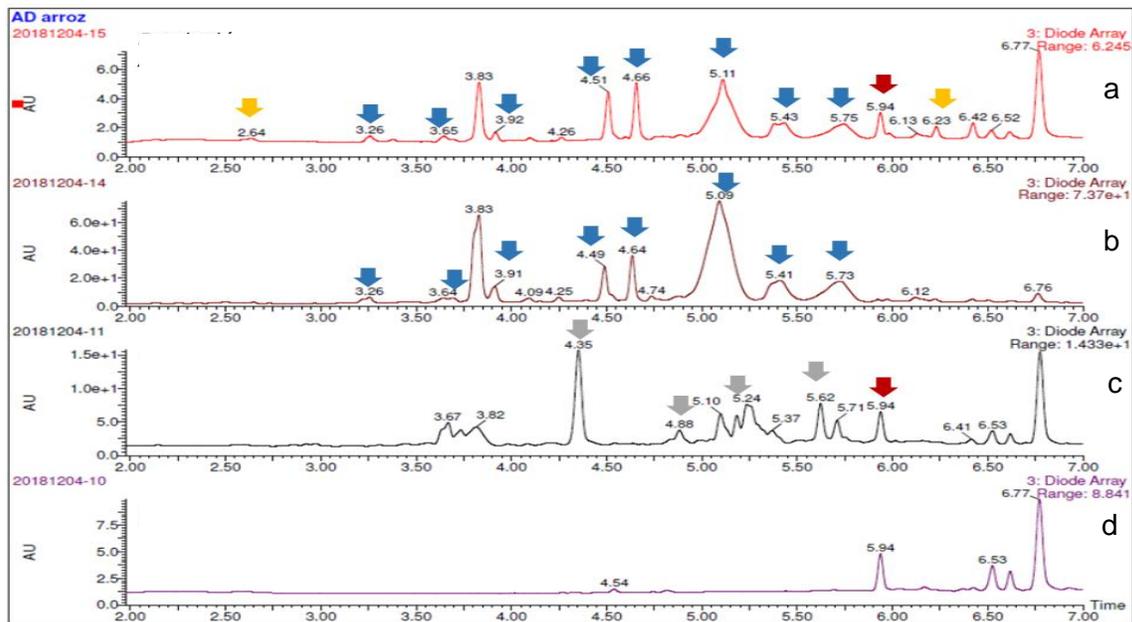


Figura 33. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *F. solani*. (d) Extracto Arroz. Flechas ▶ metabolitos de *F. solani* que se mantuvieron en cultivos duales, ▶ metabolitos que desaparecieron, ▶ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción y ▶ metabolitos nuevos en cultivos pareados.

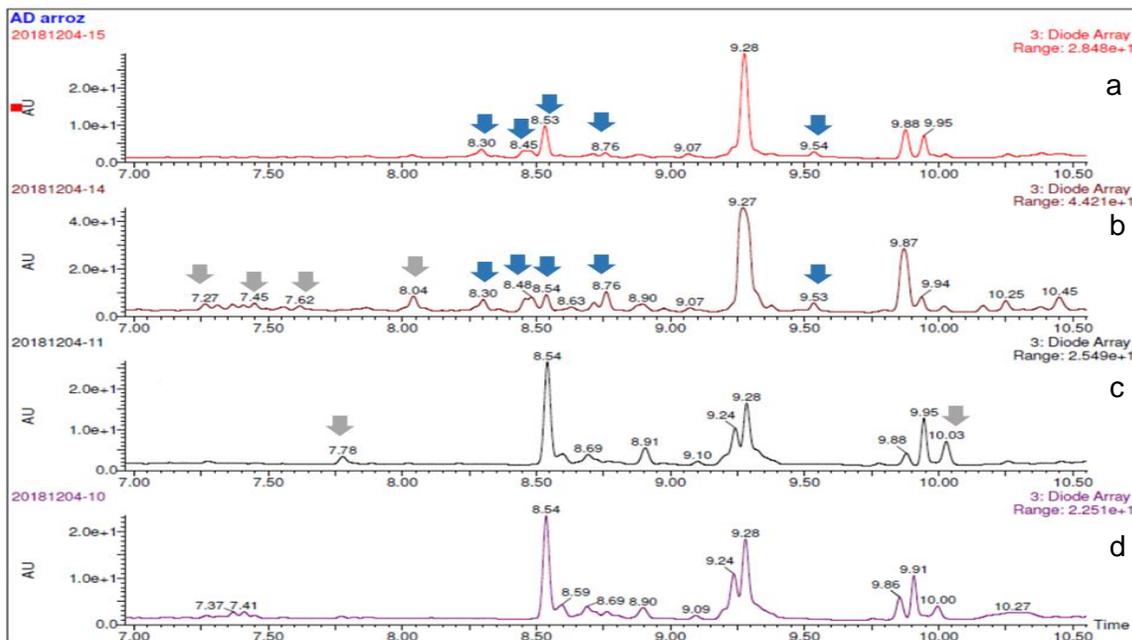


Figura 34. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *F. solani*/*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *F. solani*. (d) Extracto Arroz. Flechas ▶ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción y ▶ metabolitos que desaparecieron.

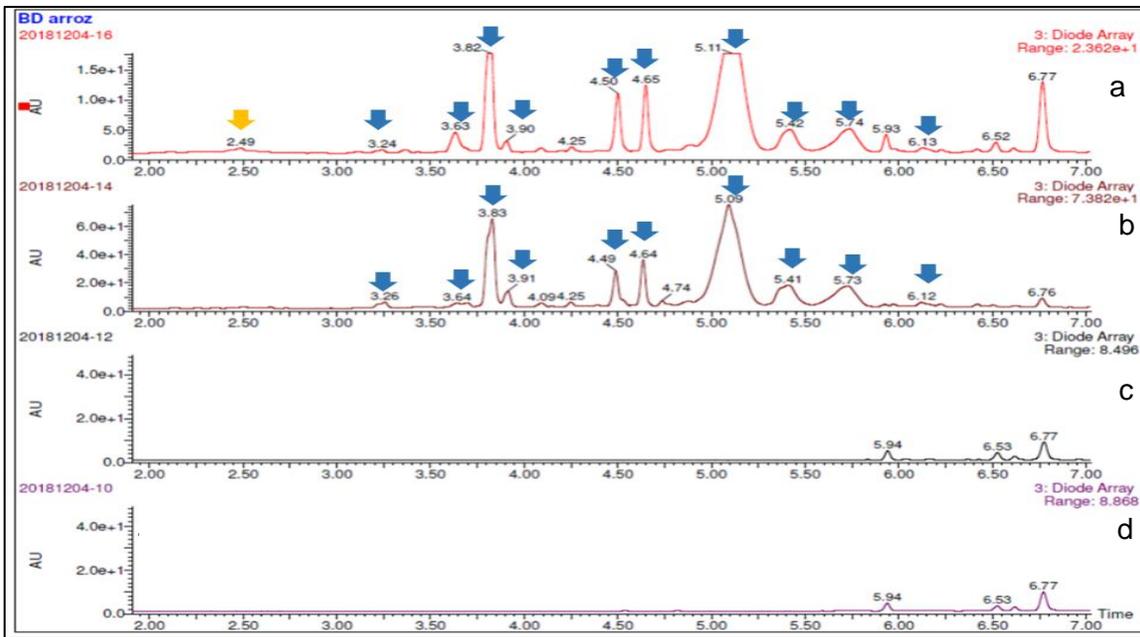


Figura 35. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *Aspergillus* sp. 1 /*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 1. (d) Extracto Arroz. Flechas ➡ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción y ➡ metabolitos nuevos en cultivos pareados.

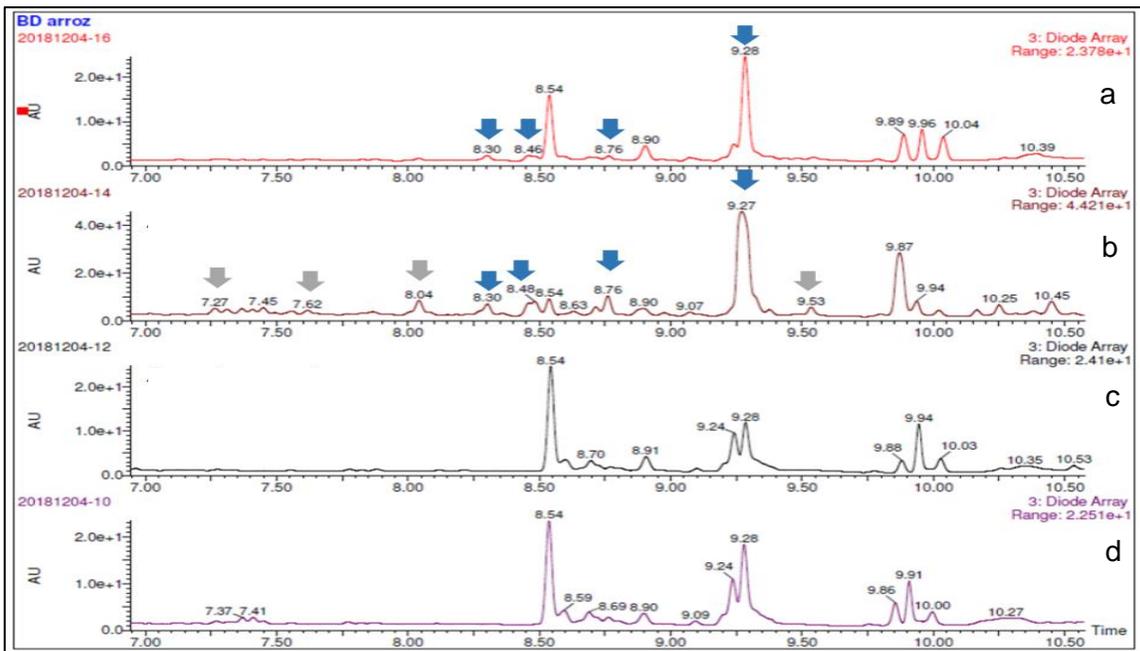


Figura 36. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *Aspergillus* sp. 1 /*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *Aspergillus* sp. 1. (d) Extracto Arroz. Flechas ➡ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción y ➡ metabolitos que desaparecieron.

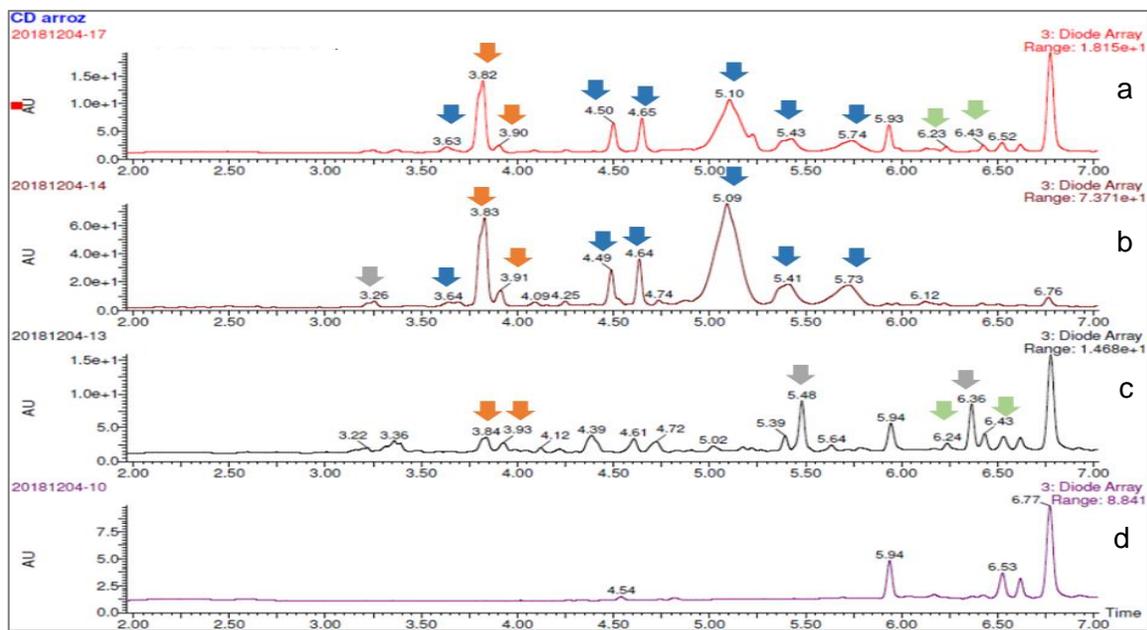


Figura 37. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *A. fumigatus*/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *A. fumigatus* /*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *A. fumigatus*. (d) Extracto Arroz. Flechas ▶ metabolitos compartidos, ▶ ■ señales que desaparecieron, ▶ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción, ▶ metabolitos de *A. fumigatus* que se mantuvieron en cultivos duales.

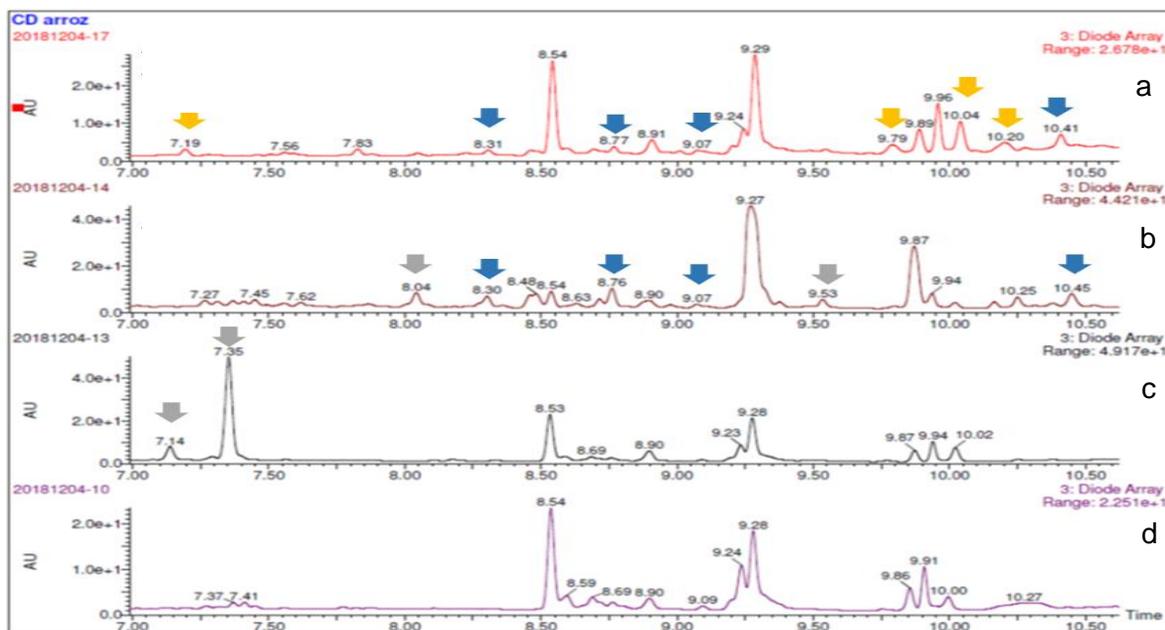


Figura 38. Cromatogramas en el UV generados por la técnica UPLC-PDA-ESIMS del co-cultivo *A. fumigatus*/*Aspergillus* sp. 2. (a) Extracto de co-cultivo *A. fumigatus* /*Aspergillus* sp. 2. (b) Extracto de *Aspergillus* sp. 2. (c) Extracto de *A. fumigatus*. (d) Extracto Arroz. Flechas ▶ metabolitos de *Aspergillus* sp. 2 que prevalecieron en interacción, ▶ metabolitos nuevos en cultivos pareados y ▶ metabolitos que desaparecieron.

9.3.3 UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS: Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a los detectores de arreglo de fotodiodos y de espectrometría de masas de alta resolución por electrospray y fragmentación masas-masas

Con la técnica de masas exactas fue posible la extracción de los siguientes cromatogramas concentrados en las **Figs. 39-50** con la intensidad, el tiempo de retención y la masa de algunos de los analitos cargados de manera positiva y negativa. Con referencia al medio sólido en la interacción *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2 se presentan las **Figs. 39 y 40** donde se muestran señales de *Aspergillus* sp. 2 que se expresaron en la interacción con los siguientes aniones: 332.137, 351.2533, 363.2693 (**Fig. 39**) y cationes: 291.1340, 288.1225, 285.2054 (**Fig. 40**). Se localizaron analitos compartidos que también se originaron en el medio de cultivo (**Figs. 39 y 40**) los aniones 329.2338 y 295.2276 (**Fig. 39**) y cationes 297.2419 y 531.40 (**Fig. 40**), también ubicamos la presencia de un catión (464.1772, **Fig. 39**) producido por *F. solani* que al estar en interacción dejó de ser sintetizado.

Bajo estas mismas condiciones se encontraron los siguientes iones referentes al co-cultivo *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2 y en éste, observamos varias señales pertenecientes a *Aspergillus* sp. 2 que se denotaron en el experimento con la siguiente carga negativa (**Fig. 41**): 289.1196, 332.1135, 299.1863, 351.2546, 353.2704 y con carga positiva (**Fig. 42**): 291.1339 y 288.124. Aunado a esto situamos analitos novedosos sintetizados durante la interacción como: 299.1863, 591.1517, 573.1412, 349.2388, 325.2380, 327.2909 (**Fig. 41**, ESI-), 254.1382, 301.2010, 285.2053, 287.0920, 589.1698, 520.3398 y 377.2105 (**Fig. 42**, ESI+). Igualmente, en el ensayo *A. fumigatiaffinis*/ *Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus* sp. 2 destacó con la presencia de los aniones 332.1134, 353.2703, 351.2545 (**Fig. 43**) y los cationes 288.1225 (**Fig. 44**). Contrariamente, *A. fumigatiaffinis* produjo la señal 698.2062 que se desvaneció en cultivo pareado (**Fig. 44**). Hay que resaltar el hallazgo de iones nuevos en las **Figs. 43 y 44** como: 301.2007, 285.2054, 287.0910 (ESI+) y 213.1133, 313.2387 y 296.2275 (ESI-).

En fermentaciones líquidas, medio V8, en el ensayo de *F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus* sp. 2 conservó sus iones en la fermentación pareada tal como se visualiza en las **Figs. 45 y 50** con las cargas: 332.1135 (ESI-) y

288.1226 (ESI+). Contrario a esto, sus aniones 591.1516 y 259.0244 dejaron de producirse en el experimento (*F. solani*/ *Aspergillus* sp. 2). Aunque se detectaron analitos nuevos en co-cultivo; 322.1435 (ESI+); y compartidos, como: 629.2902, 265.1483, 295.2276, 325.1851 (ESI-), 391.2299 y 296.2577 (ESI+). En cuanto al co-cultivo *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus* sp. 2 mantuvo las señales 332.1135, 291.1510, 259.0244 (**Fig. 47**, ESI-), 288.1226, 287.0917 (**Fig. 48** ESI+). No obstante, dejó de producir el anión 289.0716 y el catión 593.1667 (Figuras 47 y 48 en el mismo orden), suceso similar ocurrió con *Aspergillus* sp. 1 quien suprimió la síntesis de las señales 205.0869, 269.0457, 303.0066 (**Fig. 47**, ESI-) y 292.1387 (**Fig. 48**, ESI+). En suma, tal como en la interacción anterior se logró el hallazgo de una señal novedosa durante la prueba *Aspergillus* sp. 1/ *Aspergillus* sp. 2; 93.2494 (**Fig. 48**, ESI+); y dos picos compartidos; 311.1686 y 325.1839 (**Fig. 47**, ESI-).

Finalmente, en el cultivo pareado de *A. fumigatiaffinis*/ *Aspergillus* sp. 2 percibimos un mayor número de señales generadas por *Aspergillus* sp. 2 como: 332.1135, 591.1516 (**Fig. 49**, ESI-), 288.1226 y 287.0919 (**Fig. 50**, ESI+); algunas que se observaron en todos los extractos como: 311.1684, 325.1851 (**Fig. 49**, ESI) y 391.2299 (**Fig. 50**, ESI+); una señal expresada por *A. fumigatiaffinis* que fue reprimida en fermentación dual (458.2773, ESI-) tal como se visualiza en la **Fig. 49** y un analito identificado durante la coexistencia de estos organismos (322.1436, ESI+), **Fig. 50**.

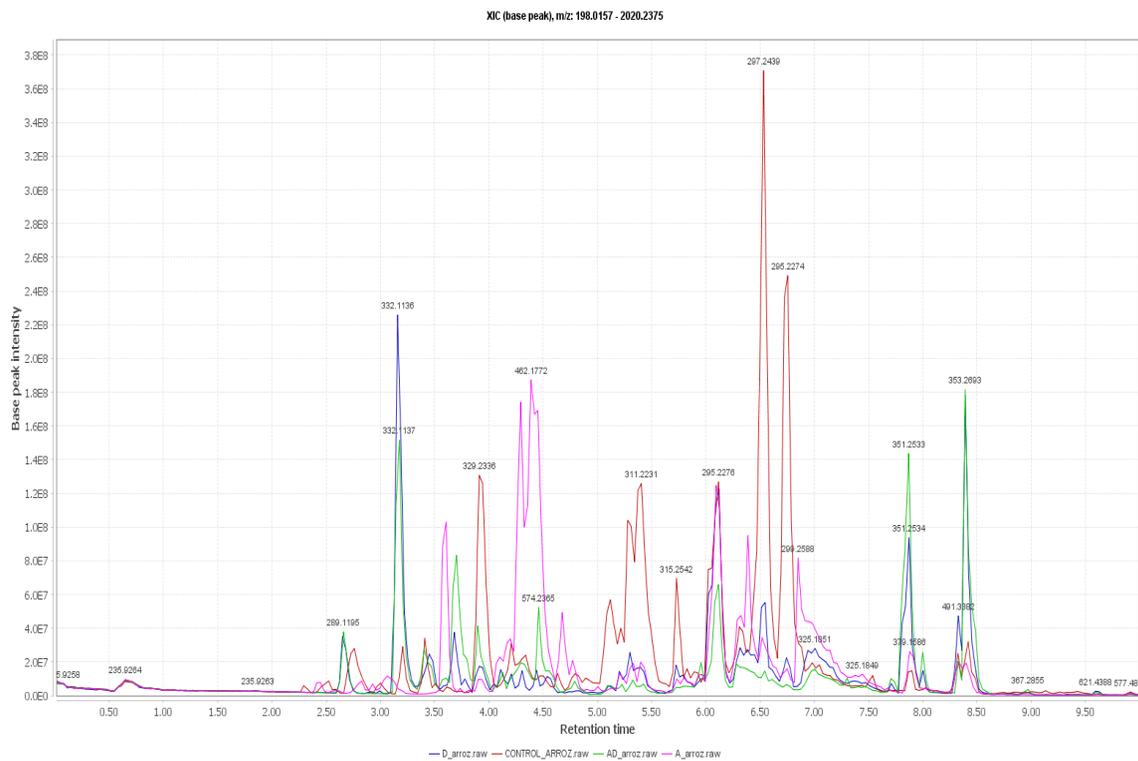


Figura 39. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus sp. 2/Fusarium solani* en medio de arroz ESI (-). D_arroz: Metabolitos de *Aspergillus sp. 2*; CONTROL_ARROZ: Extracto del medio sólido; AD_arroz: Metabolitos de la interacción *Aspergillus sp. 2/Fusarium solani*; A_arroz: Metabolitos de *Fusarium solani*.

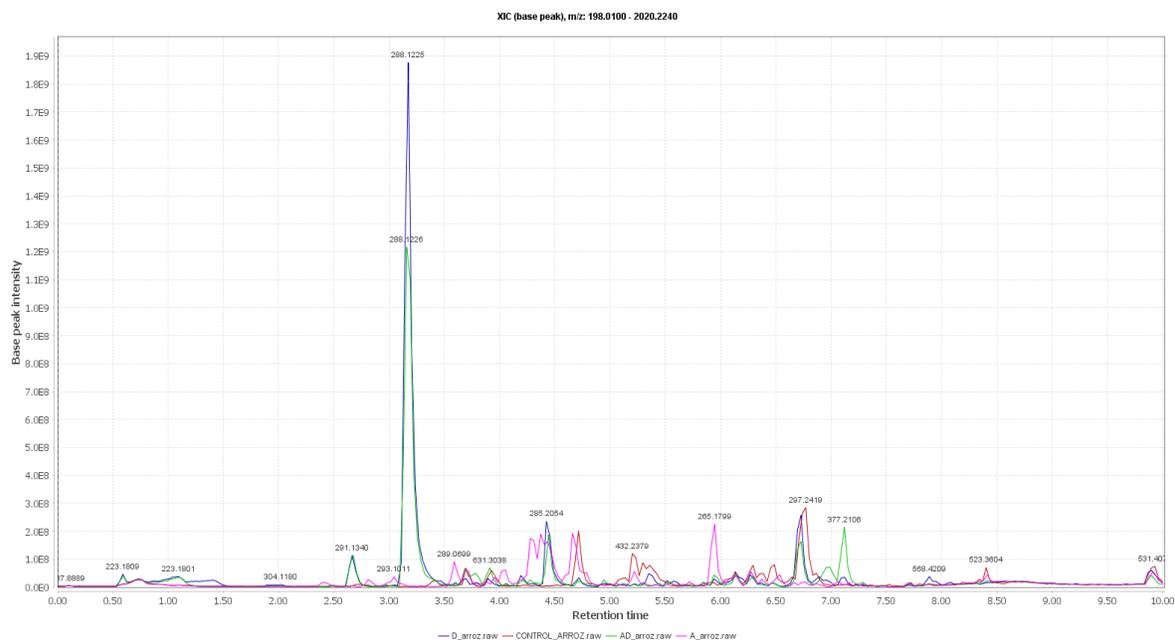


Figura 40. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus sp. 2/Fusarium solani* en medio de arroz ESI (+). D_arroz: Metabolitos de *Aspergillus sp. 2*; CONTROL_ARROZ: Extracto del medio sólido; AD_arroz: Metabolitos de la interacción *Aspergillus sp. 2/Fusarium solani*; A_arroz: Metabolitos de *Fusarium solani*.

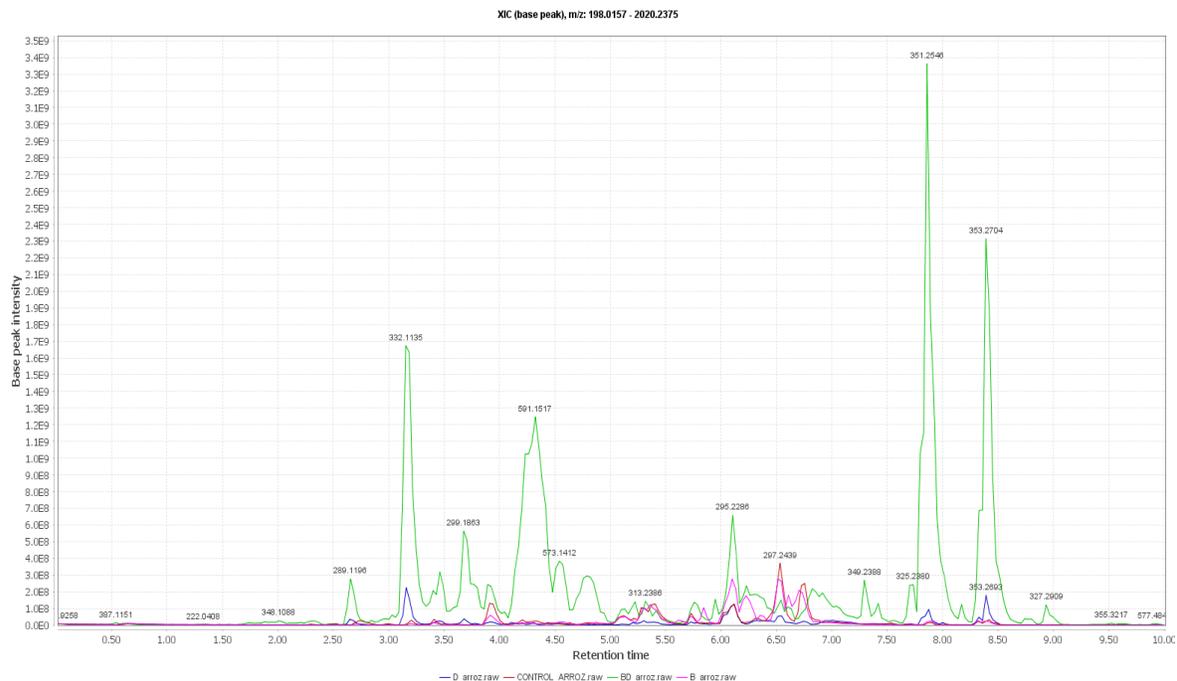


Figura 41. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Aspergillus* sp. 1 en medio de arroz ESI (-). D_arroz: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 2; CONTROL_ARROZ: Extracto de arroz; BD_arroz: Metabolitos de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Aspergillus* sp. 1; B_arroz: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 1.

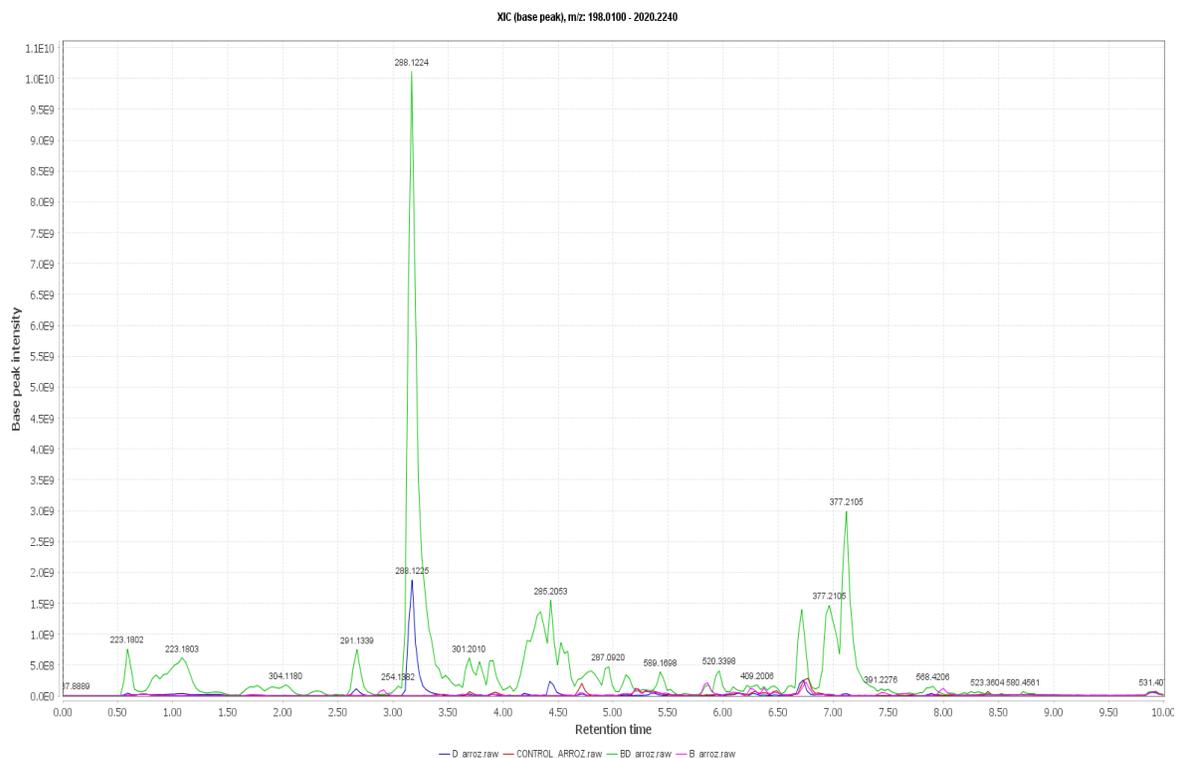


Figura 42. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Aspergillus* sp. 1 en medio de arroz ESI (+). D_arroz: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 2; CONTROL_ARROZ: Extracto de arroz; BD_arroz: Metabolitos de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Aspergillus* sp. 1; B_arroz: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 1.

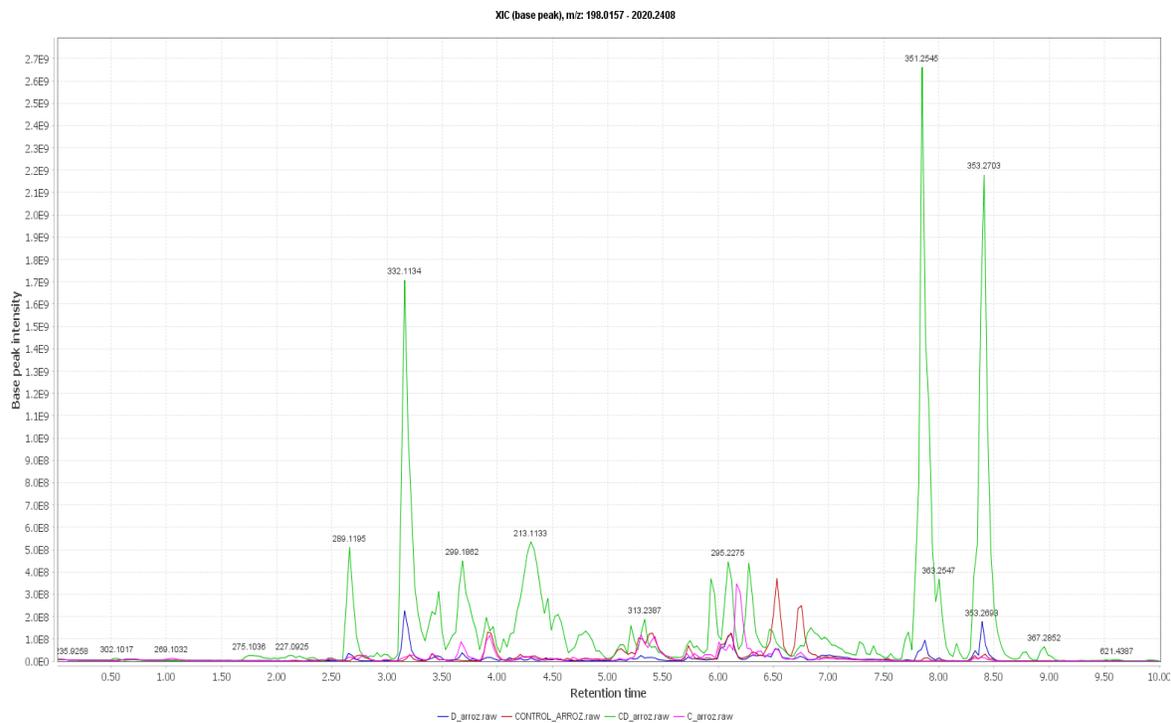


Figura 43. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus sp. 2/Aspergillus fumigatiae* en medio de arroz ESI (-). D_arroz: Metabolitos de *Aspergillus sp. 2*; CONTROL_ARROZ: Extracto de arroz; CD_arroz: Metabolitos de la interacción *Aspergillus sp. 2/Aspergillus fumigatiae*; C_arroz: Metabolitos de *Aspergillus fumigatiae*.

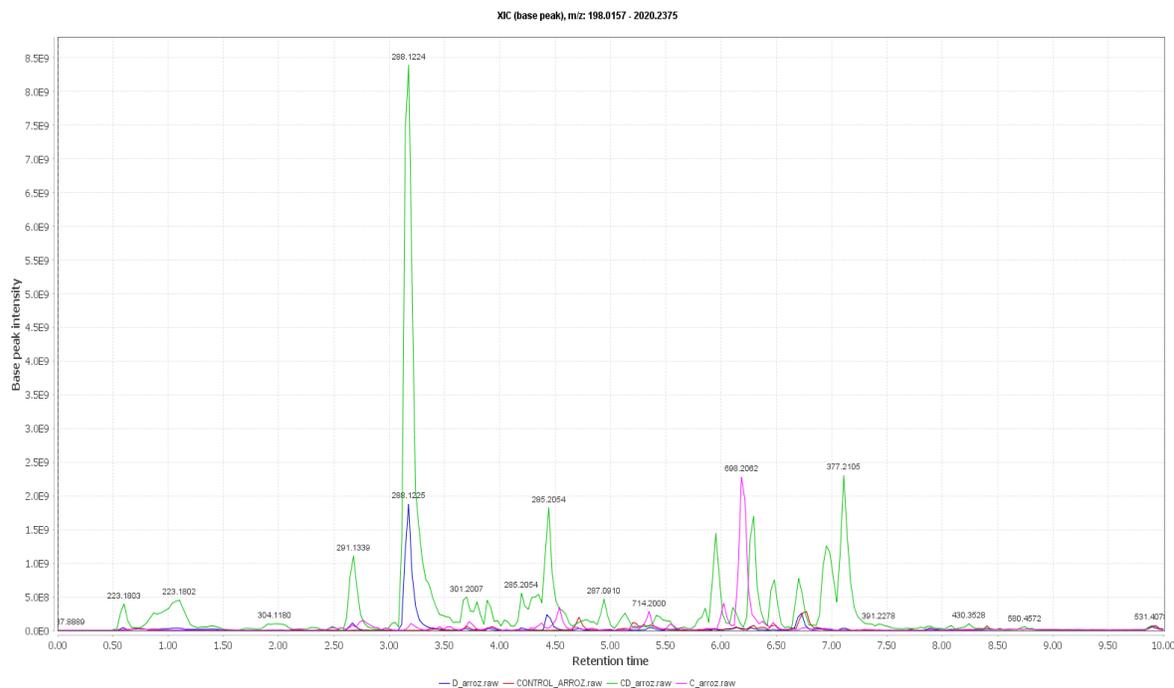


Figura 44. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus sp. 2/Aspergillus fumigatiae* en medio de arroz ESI (+). D_arroz: Metabolitos de *Aspergillus sp. 2*; CONTROL_ARROZ: Extracto de arroz; CD_arroz: Metabolitos de la interacción *Aspergillus sp. 2/Aspergillus fumigatiae*; C_arroz: Metabolitos de *Aspergillus fumigatiae*.

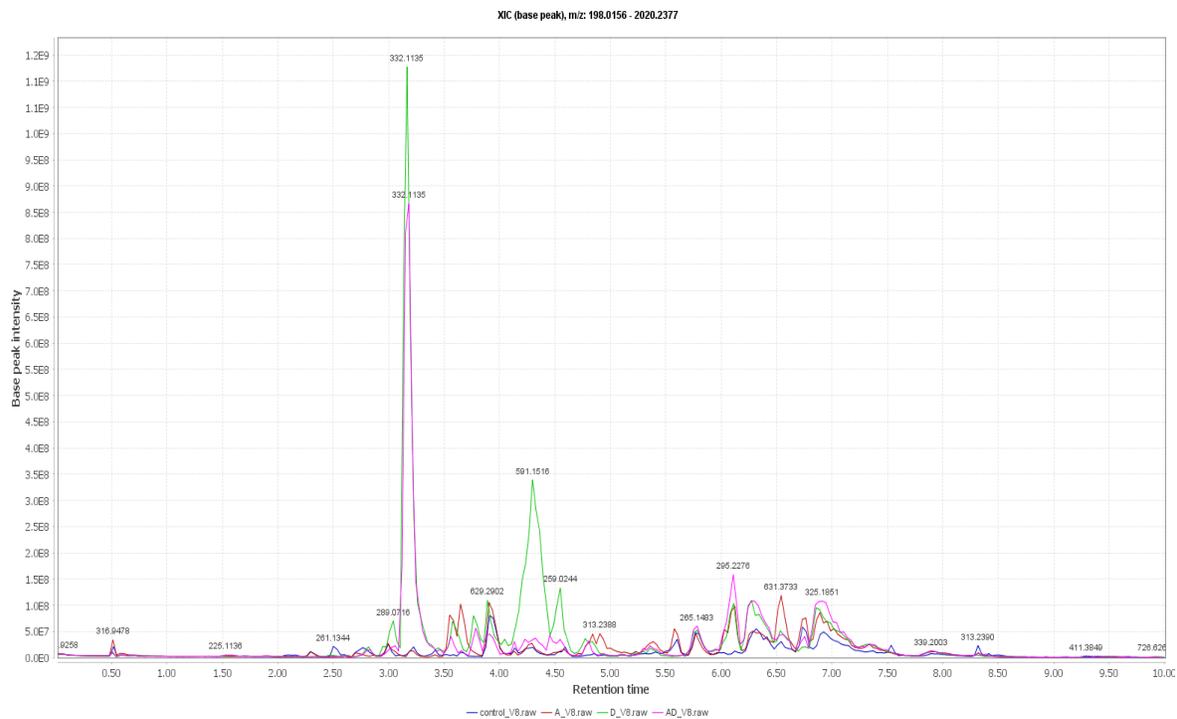


Figura 45. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Fusarium solani* en medio V8, ESI (-). D_V8: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 2; control_V8: Extracto del medio sólido; AD_V8: Metabolitos de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Fusarium solani*; A_V8: Metabolitos de *Fusarium solani*.

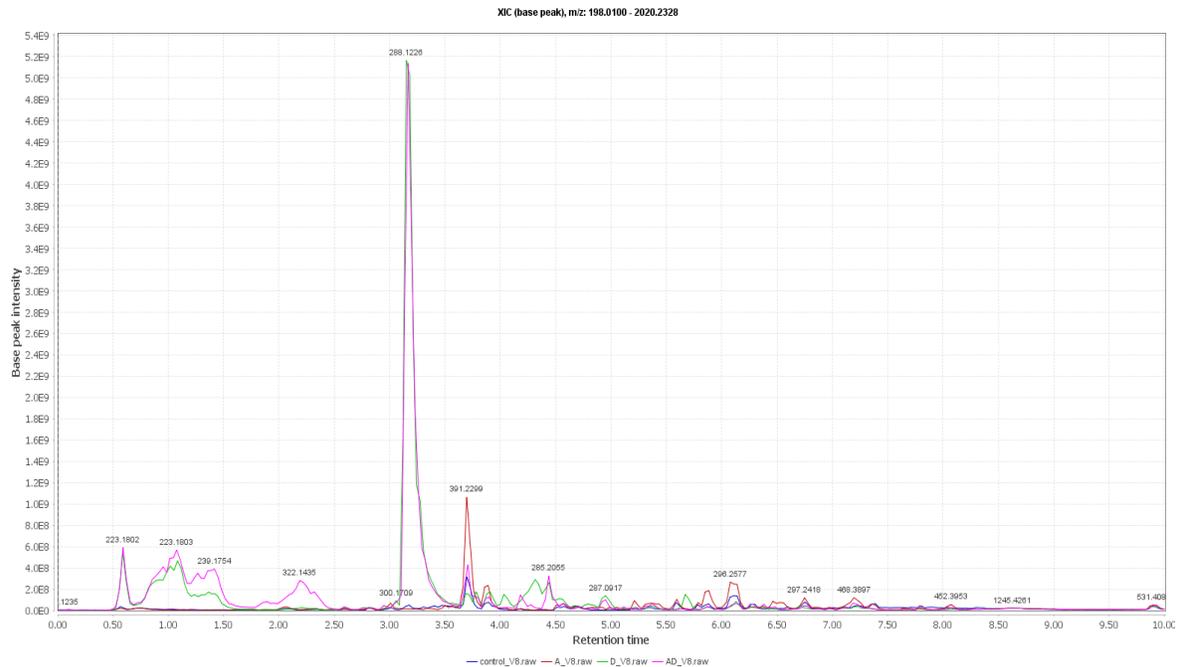


Figura 46. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Fusarium solani* en medio V8, ESI (+). D_V8: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 2; control_V8: Extracto del medio sólido; AD_V8: Metabolitos de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Fusarium solani*; A_V8: Metabolitos de *Fusarium solani*.

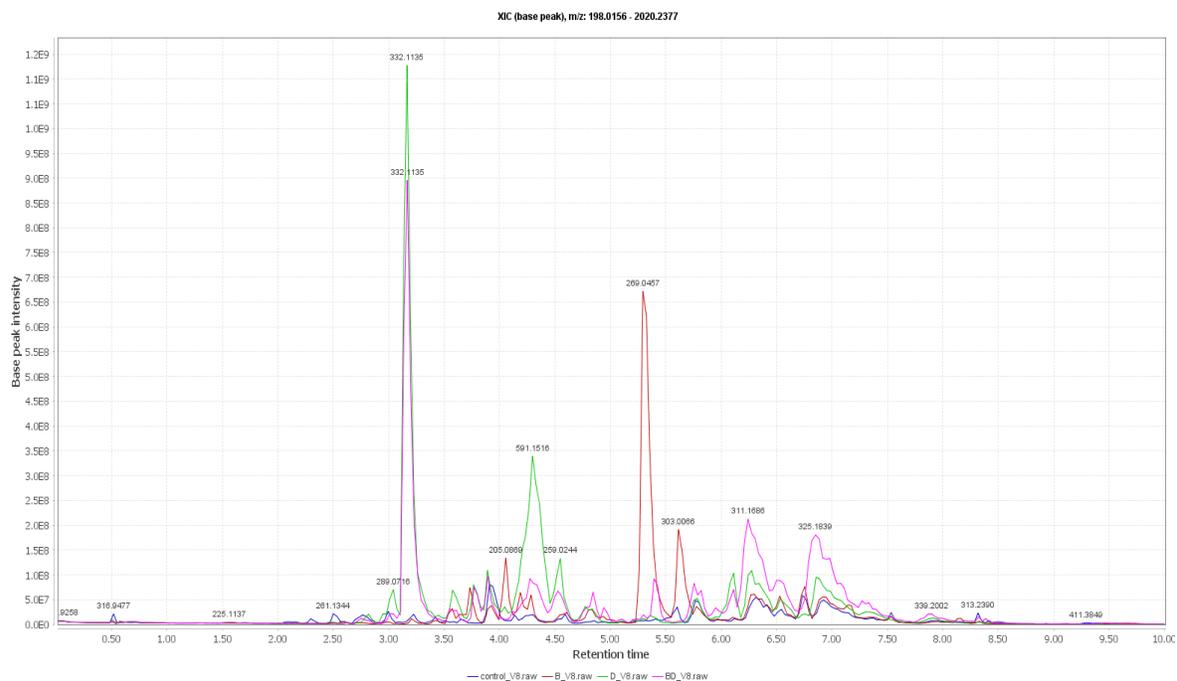


Figura 47. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Aspergillus* sp. 1 en medio V8, ESI (-). D_V8: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 2; control_V8: Extracto de arroz; BD_V8: Metabolitos de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Aspergillus* sp. 1; B_V8: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 1.

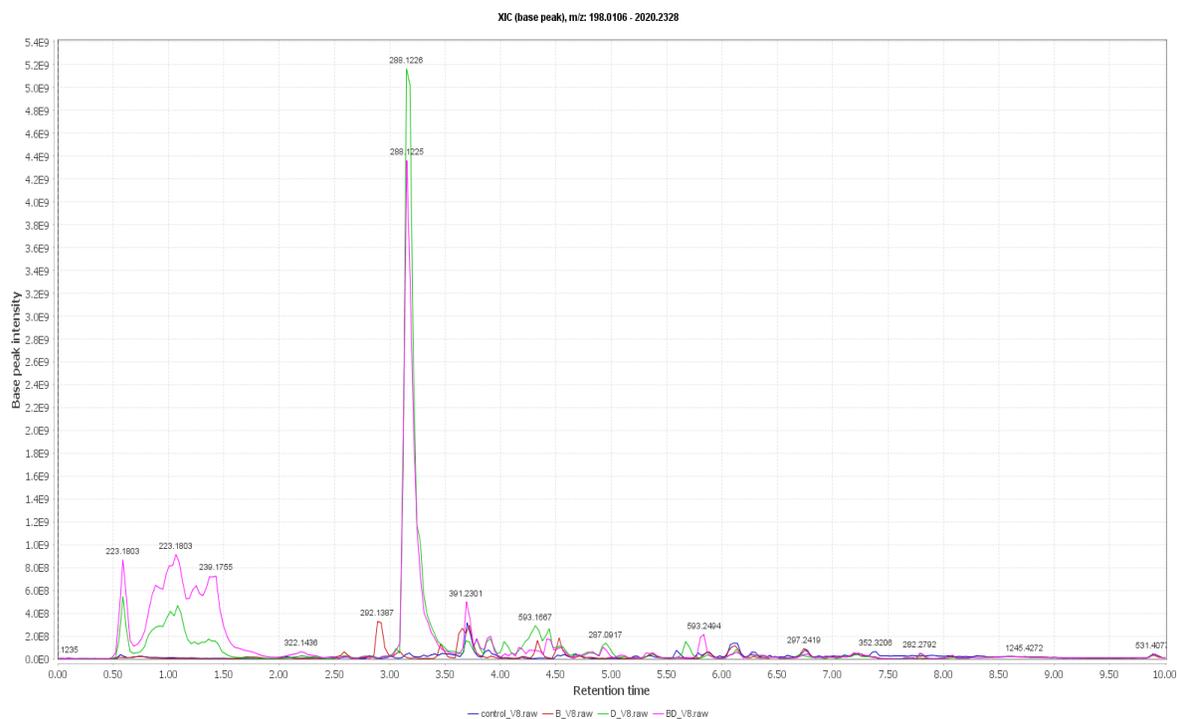


Figura 48. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Aspergillus* sp. 1 en medio V8, ESI (+). D_V8: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 2; control_V8: Extracto de arroz; BD_V8: Metabolitos de la interacción *Aspergillus* sp. 2/*Aspergillus* sp. 1; B_V8: Metabolitos de *Aspergillus* sp. 1.

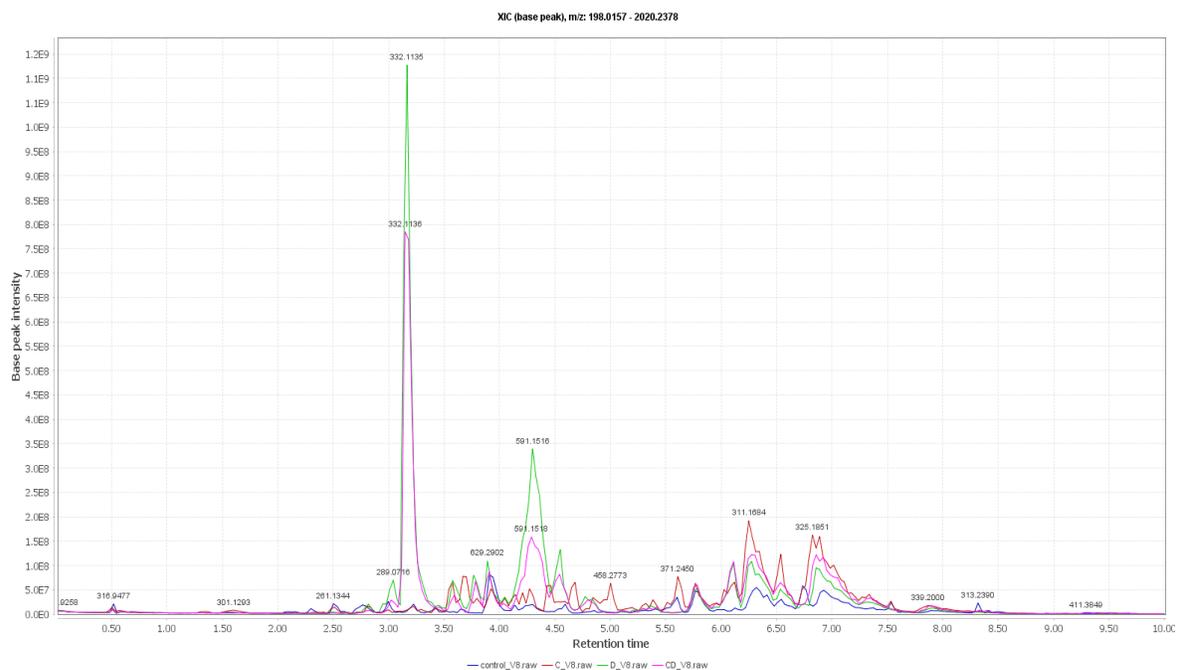


Figura 49. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus sp. 2/Aspergillus fumigatiaffinis* en medio V8, ESI (-). D_V8: Metabolitos de *Aspergillus sp. 2*; control_V8: Extracto Del medio V8; CD_V8: Metabolitos de la interacción *Aspergillus sp. 2/Aspergillus fumigatiaffinis*; C_V8: Metabolitos de *Aspergillus fumigatiaffinis*.

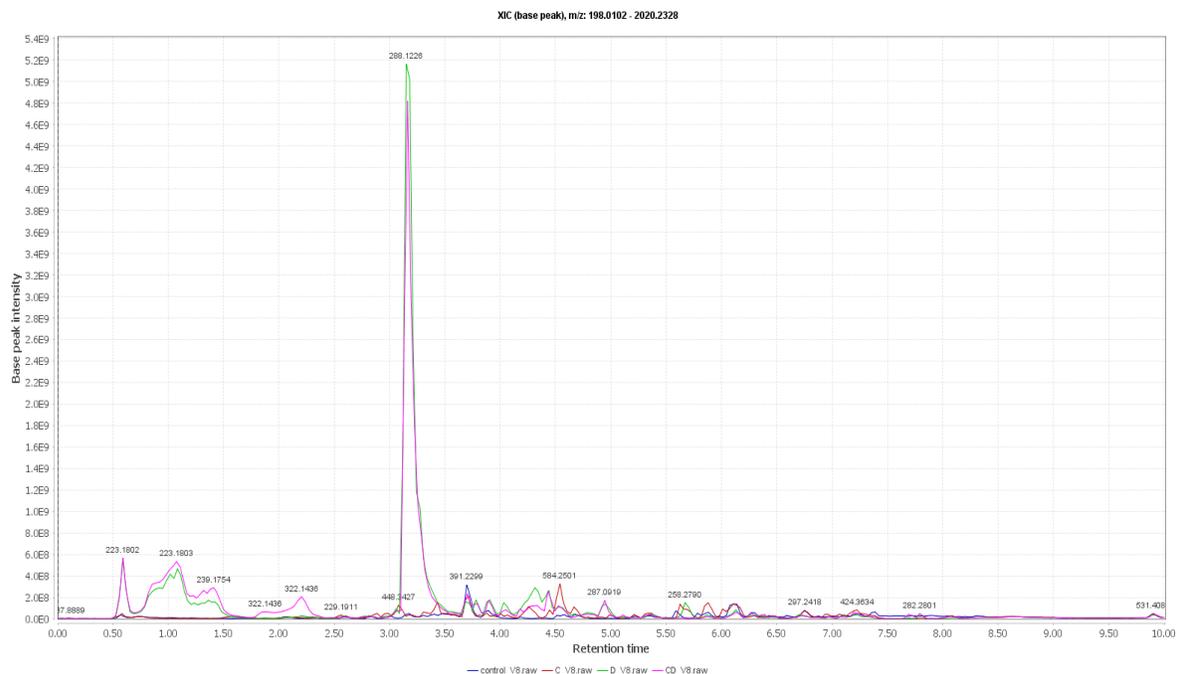


Figura 50. Cromatograma generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la interacción *Aspergillus sp. 2/Aspergillus fumigatiaffinis* en medio V8, ESI (-). D_V8: Metabolitos de *Aspergillus sp. 2*; control_V8: Extracto Del medio V8; CD_V8: Metabolitos de la interacción *Aspergillus sp. 2/Aspergillus fumigatiaffinis*; C_V8: Metabolitos de *Aspergillus fumigatiaffinis*.

10 DISCUSIÓN

10.1 Diversidad de micromicetes saprobios en el jal El Fraile

Dentro de los objetivos que alberga el presente trabajo se estipuló el aislamiento de la diversidad de micromicetes, término con el que hacemos alusión a la riqueza y composición de especies (Bermudez et al., 2014) u organismos fúngicos capaces de sobrevivir en condiciones *in vitro*. Este enfoque permite la evaluación de una fracción de la diversidad presente en los ambientes (Stefani et al., 2015) y su exploración *a posteriori*. Durante la presente investigación fue posible el aislamiento de 511 organismos fúngicos agrupados en 77 morfotipos, de los cuales el 41.29% de aislados y el 64.93% de morfotipos se obtuvieron del medio V8 agar. A pesar de las condiciones poco favorables para el establecimiento de vida en jales mineros (Delfín-Alcalá & Durán-de-Bazúa, 2008), según la literatura. Estos datos confirman la gran capacidad que tienen la microbiota para adaptarse a condiciones de estrés constate (Sánchez et al., 2014) como son las variaciones del pH y la alta concentración de metales pesados (condiciones comunes en relaves mineros) (Delfín-Alcalá & Durán-de-Bazúa, 2008; Huang et al., 2012). Dicha capacidad adaptativa quizás se relaciona con la habilidad de emplear los metales como micronutrientes (Sánchez et al., 2014) y por su alta tasa de propagación en la rizósfera, siendo organismos importantes del complejo microbiano en sitios con alto impacto de contaminación (Sampedro et al., 2004; Morgan et al., 2005; Arredondo-Solórzano et al., 2016).

Compaginado a ello, el alto número de organismos encontrados fue posible gracias a la implementación y modificación de la técnica directa de Waskman, que permitió el desarrollo del micelio que se encuentra inmerso en las partículas del sedimento, favoreciendo el crecimiento de organismos de lento (aquellos que optimizan sus recursos) y rápido crecimiento (Chesters & Thorton, 1956). Así mismo el mayor número de micromicetes aislados y morfotipos con el medio V8, lo atribuimos a que en este medio se concentra un número superior de carbohidratos, vitaminas y minerales, en comparación con CMA que contiene

carbohidratos y minerales en menor proporción y PDA donde destaca el almidón (**Tabla A1, anexos**).

Al contrastar el número de aislados, 511, obtenidos en “El Fraile” con el trabajo de [Li et al. \(2012\)](#), donde se recuperaron 495 hongos endófitos, obtenidos de plantas presentes en yacimientos mineros en Yunnan, China es notoria la similitud entre la cantidad de organismos. Hay que destacar que para este estudio se realizaron muestreos a nivel rizósfera de una sola especie de gimnosperma determinada en trabajos anteriores como *Cupressus Lindleyi*; en contraste con [Li et al. \(2012\)](#) donde se analizaron seis.

El total de morfotipos hallados (77) fue representativo ya que en sitios con impacto de contaminación similar, como es el caso de un suelo de uso agrícola tratados con aguas residuales se reportaron los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Monilia* y *Trichoderma*, [Zafar et al. \(2007\)](#). Mientras que en una mina de China los aislados se agruparon en 20 géneros dentro de los cuales se encontraron *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* [Li et al. \(2012\)](#), y en el trabajo de [Delfín-Alcalá & Durán-de-Bazúa \(2008\)](#), realizado en una mina rica en piritas, las especies encontradas fueron: *A. nidulans*, *Chladobotryum mycophyllum*, y colonias del género *Fusarium* y *Penicillium*. A partir de esto, podemos sugerir que “El Fraile” concentra una alta diversidad de especies, que aunque el objetivo del presente trabajo no incluyó la determinación taxonómica y molecular de todos los organismos encontrados nuestra asignación en 77 morfotipos son indicios de una alta diversidad. En suma, concluimos nuestras identificaciones con los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, coincidiendo con hallazgos reportados en los trabajos ya antes mencionados ([Zafar et al., 2007](#); [Delfín-Alcalá & Durán-de-Bazúa, 2008](#); [Li et al., 2012](#); [Sánchez et al., 2014](#)).

Cabe señalar que la determinación molecular de las 5 especies fue posible gracias al análisis de dos regiones genéticas: ITS y β -tubulina. La inclusión de ésta última (β -tubulina) fue una decisión crucial ya que permitió identificar las especies *Aspergillus* sp. 1, de la sección flavi, y *A. fumigatiaffinis*, de la sección fumigatus ([Hong et al., 2005](#)). Esto, debido a que es un marcador con una alta resolución; a

comparación de la región ITS; para especies del género *Aspergillus* (Mirhendi et al., 2016; Lamboni et al., 2016). A pesar de que se enfrentaron algunas dificultades durante la amplificación asociadas a la complejidad de modelo biológico estudiado (e.g. altas concentraciones de polisacáridos y pigmentos que pueden precipitar con el ADN o provocar su co-precipitación) (Lee et al., 2017), se logró culminar las determinaciones con cinco especies: *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2, *A. fumigati*affinis, *Fusarium solani* y *Purpureocillium lilacinum*.

En primera instancia detectamos que los tres géneros (*Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*) corresponden a hongos filamentosos capaces de secretar una alta diversidad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales poseen actividades biológicas prominentes para el control y la adaptación del micromicete a su nicho ecológico (Chatterjee et al., 2016). Además, constan de características particulares que les provee cierta plasticidad para cambiar de un estilo de vida a otro aún siendo endófitos o patógenos (Xie et al., 2016) tal como lo ratifica Selosse et al. (2018).

Fusarium es un género cosmopolita de hongos filamentosos ascomicetos que incluye muchos patógenos de plantas productores de toxinas con importancia agrícola (Ma et al., 2013). El complejo de especies de *Fusarium solani* es uno de los grupos más extendidos de hongos filamentosos que se estudian de forma intensiva debido a su capacidad para causar enfermedades tanto en plantas como en humanos. Sin embargo, son principalmente hongos asociados al suelo y las plantas que se caracterizan por una considerable plasticidad ecológica que, además del estilo de vida patógeno, suelen aparecer como saprobios y endófitos (Šišić et al., 2018; Schroers et al., 2016). En otras palabras estos hongos pueden cambiar fácilmente entre un estilo de vida y otro (Padhi et al., 2016).

Se ha evidenciado que el género *Fusarium* tiene gran potencial para producir una gran variedad de metabolitos secundarios. Alrededor de 40 familias estructurales distintas, como los tricotecenos, fumonisinas y las enniatinas; micotoxinas que contribuyen a la patogénesis de las plantas; aunque algunas familias (como las fumonisinas y los tricotecenos) consisten en decenas de análogos diferentes (Ma et al., 2013).

Purpureocillium lilacinum, nombrado anteriormente *Paecilomyces lilacinus* (Castillo et al., 2014), ha sufrido numerosos cambios en su taxonomía. Esto debido a que en una reciente revisión taxonómica realizada por Luangsa-ard et al. (2011) se encontraron diferencias entre *Paecilomyces lilacinum* y la especie tipo del género *Paecilomyces* (*P. variotii*). De modo que, se le asignó un nuevo género llamado *Purpureocillium* y se propuso la combinación *P. lilacinum*. Es un hongo ubicuo, saprobio filamentoso, comúnmente aislado del suelo, vegetación en descomposición, insectos, nematodos y aire de laboratorio, y es una causa de infección en el hombre y otros vertebrados (Luangsa-ard et al., 2011; Wang et al., 2016). Este hongo emplea estilos de vida flexibles como saprobio del suelo, endófito de plantas, y patógeno (principalmente de nematodos) (Wang et al., 2016). Aunque es más común encontrarlo como un componente de la microbiota del suelo (Luangsa-ard et al., 2011). Además, se ha demostrado el impacto negativo de *P. lilacinum* en la humanidad en forma de infecciones de importancia médica (Luangsa-ard et al., 2011). Sin embargo, también hay una gran cantidad de literatura sobre su uso en el control de plagas de nematodos e insectos (Luangsa-ard et al., 2011; Castillo et al., 2014) y es considerado principalmente como un hongo nematófago, parasitante de huevos, específicamente contra el nematodo de nudo de la raíz, *Meloidogyne incognita* (Castillo et al., 2014). *Purpureocillium lilacinum* es considerado como uno de los antagonistas más prometedores para el control de los nematodos del nudo de la raíz, del quiste y otros parásitos de plantas (Rumbos et al., 2003; Park et al., 2004, Wang et al., 2016). Sus enzimas hidrolíticas (proteasas y quitinasas) y la producción de metabolitos secundarios (leucinostatinas) son un mecanismo para infectar a los nematodos y son responsables de sus actividades ovicidas (Park et al., 2004; Wang et al., 2016). De la misma manera, se han aislado otros metabolitos secundarios novedosos como la paecilomida alcaloide de piridona, (compuesto que se produjo en interacción con *Salmonella typhimurium*); y dos heterodímeros de xantona-antraquinona, acremoxantona (Wang et al., 2016).

Por otro lado, la distribución de las especies de *Aspergillus sensu lato*, en el suelo ha sido ampliamente estudiada en todo el mundo (Giusiano et al., 2017) y

con ello se han obtenido beneficios industriales y económicos a partir del uso de las especies o de sus metabolitos (Huang et al., 2019). Las especies de este género, son principalmente saprobias estando presentes en las comunidades fúngicas de diversos ambientes. Son componentes normales de los desechos orgánicos, pero pueden ser agentes patógenos oportunistas.

El género *Aspergillus* incluye varios grupos taxonómicamente complejos, por ejemplo: la sección flavi, fumigati y niger. Algunas de las cuales han sido implicadas en enfermedades humanas (Mirhendi et al., 2016). *Aspergillus* sección flavi contiene algunas de las especies más importantes del género, en términos de biotecnología, alimentos y salud. Son comunes en los cultivos, y algunas de ellas producen varias micotoxinas, como las aflatoxinas, el ácido 3-nitropropiónico, el ácido tenuazónico, el ácido ciclopiazónico y las aflatoxinas B1 y B2. Dentro de esta sección se encuentra *Aspergillus* sp. 1 especie que en el presente trabajo se reporta de un jal minero (Larsen et al., 2007).

La sección fumigati es una de las más ricas en especies e incluye taxa relevantes para la medicina, farmacología, biotecnología, alimentos y micología del suelo. En la actualidad, la sección consta de 51 taxones. *A. fumigatus* es la especie de *Aspergillus* patógena humana oportunista más importante, y puede causar enfermedades en humanos y animales. Se ha informado que *A. fumigatus* produce una gran cantidad de extrolitos (metabolitos secundarios y otros metabolitos secretados), incluyendo la gliotoxina, un metabolito muy tóxico, que parece estar implicado en el proceso de infección (Larsen et al., 2007).

El éxito de muchos aislados patógenos de *A. fumigatus* y otros está directamente relacionado con su capacidad para producir metabolitos secundarios potentes y activos, como parte de su sistema de defensa y para la adaptación a los entornos del huésped. *A. fumigati*affinis es una especie con la capacidad de producir extrolitos como la aurantina, cicloecinulina, ácido helvólico, neosartorina, palitantina, piriropirofenos, entre otros (Hong et al., 2005).

Aspergillus, sección nigri (conocidos como *Aspergillus* negros) (Mirhendi et al., 2016), se encuentran entre los hongos más omnipresentes. Las especies de la sección nigri son patógenos importantes de los cultivos y están comúnmente

involucradas en el deterioro de los alimentos almacenados y otros materiales orgánicos. Las especies de esta sección se utilizan ampliamente en biotecnología para la producción de enzimas y ácidos orgánicos y para la biosorción de sustancias de efluentes industriales y la biorremediación de suelos contaminados ([Horn et al., 2013](#); [Mirhendi et al., 2016](#); [Lamboni et al., 2016](#)).

Lo anterior debido a que varias especies producen ocratoxina A y fumonisina B2, B4 y B6 micotoxinas que son de particular interés para las industrias de la uva y el café, así como numerosos compuestos con actividades poco investigadas. La especie *A. tubingensis*, a fin a nuestra especie *Aspergillus* sp. 2, *sensu stricto* es la segunda más común dentro de la sección niger ([Horn et al., 2013](#); [Mirhendi et al., 2016](#); [Lamboni et al., 2016](#)). Se ha reportado un extracto obtenido de la especie *A. tubingensis* (*Aspergillus* sp. 2) con propiedades citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer y es a partir del fraccionamiento guiado por bioensayos, de este extracto, que se aisló una nueva nafto-c-pirona dimérica llamada asperpirona D, un péptido cíclico fuertemente citotóxico, malformina A1, funalenona y nueve nafto-c-pirones conocidos. Además, una investigación previa de los esclerocios de especies cercanas permitió obtener tres nuevas aflavininas, una de las cuales mostró actividad insecticida ([Zhang, 2007](#)).

10.2 Efecto del pH sobre el crecimiento fúngico y sus interacciones

10.2.1 El pH sobre el crecimiento fúngico de los cultivos pareados

En interacción, los hongos crecieron menos que de manera individual debido posiblemente a la constante lucha por los recursos ([Chen et al., 2018](#)). Las interacciones pareadas reflejaron que a pesar de que se da una disminución, en área, todos los organismos mantuvieron un crecimiento continuo. Por lo que podemos decir que los organismos alcanzaron un equilibrio entre la supervivencia y crecimiento a tal grado que fue posible su coexistencia ([HilleRisLambers et al., 2012](#); [Morón-Ríos et al., 2017](#)).

Las interacciones intraespecíficas de *F. solani*, *Aspergillus* sp. 1, *A. sp. 2*, *A. fumigatiaffinis* y *P. lilacinum* manifestaron un crecimiento similar, para ambos

medios. Estudios han revelado que la diversidad genética de las especies, presenta ciertas similitudes entre organismos de la misma especie (González-Torres & Gabaldón, 2018), puede decirse que cuanto más cercanas sean las especies habrá una mayor competencia por los mismos recursos (Ghoul & Mitri, 2016). De este modo, se explicaría el crecimiento tan parecido en ambos individuos, en donde ninguno cede. Por el contrario, en interacciones interespecíficas generalmente, uno de los competidores resultó más favorecido en cuanto a desarrollo sucedió que atribuimos a que en este tipo de interacciones interespecíficas las variaciones son más marcadas (González-Torres & Gabaldón, 2018). Ya que tratamos con diferentes especies lo que hace más probable que ocurran cambios notorios en este tipo de interacciones. Debido a que las diferencias en la capacidad de combate entre competidores será alta y muy posiblemente habrá un competidor más combativo con mayores probabilidades de dominar (Hiscox et al., 2018), que es justo lo que vemos en las imágenes de nuestros bioensayos.

También se encontró un crecimiento similar en co-cultivos interespecíficos entre *F. solani*, *Aspergillus* sp. 1 y *Aspergillus* sp. 2 en medio con pH básico. Hallazgos han demostrado que estos miembros tienen la capacidad de secretar un vasto número de compuestos orgánicos. El género *Fusarium*, por ejemplo tiene un gran potencial para producir alrededor de 40 familias de metabolitos secundarios dentro de las que destacan algunas micotoxinas como los tricotecenos y las fumonisinas (Ma et al., 2013). Además, Villanueva (2017) en un estudio demostró la capacidad antifúngica y antioomiceto de organismos de este género por medio de ácido fusárico; 9,10-deshidrofusárico y bikaverina. Entretanto, *Aspergillus* sp. 1 es una especie de la sección flavi por lo que potencialmente es capaz de sintetizar varios metabolitos fúngicos como la ocratoxina A y aflatoxinas (micotoxinas) (Frisvad et al., 2019), así como *Aspergillus* sp. 2 potencialmente podría secretar ocratoxina A y fumonisina B2, B4 y B6, micotoxinas (Horn et al., 2013; Mirhendi et al., 2016; Lamboni et al., 2016). Este potencial fisiológico permite considerar a estas tres especies como organismos competitivos haciendo posible un crecimiento similar. Si bien, *F. solani* presentó aptitudes de competencia con *Aspergillus* sp. 2

en tratamiento básico, este (*F. solani*) se vio afectado con el mismo competidor en pH ácido debido a las alteraciones generadas a su crecimiento en un pH de 3, según lo reportado por [Sánchez-Rangel et al. \(2018\)](#).

Aspergillus fumigatiaffinis y *P. lilacinum* al ser sometidos a ambas condiciones de pH, mostraron menores crecimientos en interacciones interespecíficas. En consecuencia estos dos genotipos son menos combativos. No obstante, en el bioensayo en donde estas dos especies se involucran (*A. fumigatiaffinis*/*P. lilacinum*) *A. fumigatiaffinis* sobresalió. Quizá los metabolitos fúngicos que emergen de *P. lilacinum* no provocan algún daño en el crecimiento del interactuante, adicionalmente *P. lilacinum* mantuvo un reducido crecimiento tanto en interacciones como en crecimientos individuales. Ambas cualidades expresadas por este organismo permitieron que *A. fumigatiaffinis* resultara beneficiado.

Al contrastar los datos de los tratamientos observamos de manera general hubo mejores crecimientos en el medio alcalino con un pH de 8. Se ha dicho que la mayoría de los hongos filamentosos crecen a un pH de 3 a 8 ([Sugiharto, 2019](#)), pero tienen un pH óptimo, que va de 5 a 9 sin mostrar inhibición significativa en su crecimiento, ([Rousk et al., 2010](#)). De ahí los resultados obtenidos, ya que en nuestros tratamientos incluimos un pH de 3, más ácido que el reportado como óptimo. Cabe mencionar que el pH del área de muestreo osciló entre 6.6-8 ([M. Patiño, comunicación personal, junio de 2019](#)), circunstancia que pudo haber influido en un mejor desarrollo en medio básico y que pudo provocar un shock para el organismo al haber disminuido drásticamente la condición del pH de su entorno ([Baidoo, 2019](#)), como son la tensión en las funciones celulares, la alteración de la disposición de nutrientes, la función de las proteínas y el potencial de la membrana ([Selving & alspaugh, 2011](#)).

Con relación a las mayores áreas de crecimiento en el medio alcalino, [Selving & Alspaugh \(2011\)](#) y [Vylkova, \(2017\)](#) han mencionado que los hongos, generalmente alcalinizan o aumentan el pH de su entorno a un ritmo lento, pero constante, lo que evoca la preferencia de este grupo hacia un ambiente más alcalino. Ya que a efectos de éste, se favorecen procesos morfogénicos y

reproductivos como la germinación, el crecimiento de hifas y la formación de cuerpos fructíferos (Vylkova, 2017), además de influir en diversos procesos biológicos que involucran la activación de múltiples vías metabólicas, que activan la acción coordinada de numerosas proteínas (Virgilio et al., 2017) como es el caso de las proteínas de transporte que ayudan al paso de nutrientes y metabolitos (Baidoo, 2019). En contraste, los crecimientos reducidos en pH ácido pueden entenderse si retomamos lo ya mencionado sobre la preferencia de los hongos a condiciones básicas. En tal sentido creemos que estimulados por el crecimiento, los micromicetes afectados en medio ácido primero ajustaron el pH del medio de cultivo, hasta llegar a un rango más favorable para cubrir sus necesidades básicas. Y en este proceso puede que hayan sintetizado algún metabolito secundario que les permitiera llevar a cabo ese ajuste. Con el fin de reconocer que organismos fueron afectados, con que interactuante y a partir de que día, se efectuaron pruebas de ANOVA y Tukey para cada día registrado.

Las pruebas exhibieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de algunos cultivos pareados. Para el día 3 las áreas de crecimiento eran similares a excepción del de *Aspergillus* sp. 2 cuando coexistió con *F. solani* en medio ácido ya que reflejó un mayor crecimiento. Para el día 5 la mayoría de las áreas fueron diferentes, sin contar las de *Aspergillus* sp. 2 al estar con *F. solani* y con *P. lilacinum*, simultáneamente ocurrió lo mismo con *P. lilacinum* al estar con los diferentes interactuantes (interacciones inter- e intraespecíficas). Este patrón se mantuvo, el único cambio registrado para el día 7 fue que el desarrollo fúngico de *Aspergillus* sp. 2 con *P. lilacinum* fue diferente entre ambos medios. Para lograr comprender esta situación hay que decir que el crecimiento o desarrollo de los microorganismos suele dividirse en 4 fases que son: la fase de retraso o establecimiento, crecimiento exponencial, fase estacionaria y muerte (Baidoo, 2019). Partiendo de esta división es posible sugerir la similitud reportada para el día 3 a la fase de retraso. Caracterizada por la ausencia o crecimiento despreciable, pero de suma importancia por las actividades, metabólicas que se dan y que son cruciales para la viabilidad de un organismo. La duración de esta fase se ve influenciada por la capacidad del organismo para adaptarse

rápidamente a su entorno, por lo tanto la prolongación del organismo en la fase de retraso es estimulada por la alteración de ciertas condiciones como es el pH (Baidoo, 2019).

A partir del día 12 se da un cambio notorio, ya que tenemos 14 áreas con crecimiento similar y 11 diferentes. Esto lo podemos atribuir a que nuestros micromicetes en medio ácido permanecieron por más tiempo en la fase de retraso y que para lograr salir de este estancamiento tuvieron que superar el estrés metabólico intrínseco y extrínseco, que repercutió de manera negativa en su fisiología y por lo tanto detuvo el crecimiento. Desde esta perspectiva, una vez liberada la etapa de retraso podemos inferir que las interacciones en medio básico pasaron rápidamente a una fase de crecimiento exponencial debido a las condiciones favorables que proporciona un metabolismo más eficiente. Que ocurre cuando el organismo en cuestión alcanza la homeostasis metabólica aumentando la tasa de crecimiento permitiéndole la competencia por los recursos (Baidoo, 2019).

Llegado el momento, los organismos fúngicos expuestos a un medio ácido lograron acondicionar el pH para conseguir un crecimiento similar que el observado para el medio básico, que es lo que estaríamos viendo en el día 14, con más similitudes (19) que diferencias (6), algo similar a lo ya reportado en el día 3. En otras palabras pese a las condiciones adversas que se dan para los micromicetes en un pH de 3, estos, logran llegar a una fase exponencial, pero con mayor retardo sucedida de una fase estacionaria punto en el que los crecimientos en el último día registrado son semejantes.

Hay que agregar que el crecimiento de *P. lilacinum* no se vio perjudicado con ninguno de los competidores, por lo que no se detectaron diferencias entre tratamientos. Dhakar et al. (2013), ha reportado que varias especies del género *Penicillium* logran tolerar un pH de 2 a 14. *Aspergillus* sp. 2 al estar con *F. solani* a partir del día 5 mostró una alta similitud en su crecimiento y lo mantuvo hasta culminar la fase experimental en las dos condiciones de pH. Al respecto, se ha documentado la facultad de algunas especies del género *Aspergillus* (*A. nidulans* y *A. niger*) de secretar fosfatasa ácida en condiciones ácidas y fosfatasa

alcalinas en ambientes alcalinos (Vylkova, 2017; Manteau et al., 2003). Esto nos lleva a las vías de señalización bioquímicas de las cuales, se ha reportado una alta susceptibilidad hacia el pH (Keller et al., 2005; Rousk et al., 2010), ya que según sea el estímulo recibido les proporcionará a los micromicetes la cualidad de producir compuestos orgánicos ácidos o alcalinos según sea el requerimiento (Vylkova, 2017) de la señal recibida. Ante un pH alcalino o neutro se activa la vía alcalina, por su parte la vía ácido débil es activada con un pH ligeramente ácido u ácido. En cualquiera de los casos se producirán diferentes respuestas químicas que generaran la producción de algún compuesto orgánico bajo dichas condiciones (Fox & Howlett, 2008; Selving & Alspaugh, 2011), que es lo que podría estar sucediendo con estos dos organismos en las interacciones antes dichas.

Por su parte, *F. solani* al coexistir con *Aspergillus* sp. 2 en medio ácido disminuye su crecimiento significativamente. Algo muy similar reportaron Sánchez-Rangel et al. (2018), en donde el crecimiento del microorganismo (*Fusarium* sp.) se atrofió en pH ácido (pH 3.0), dejando una mayor disponibilidad de recurso para el competidor (*Aspergillus* sp. 2).

10.2.2 El pH en las interacciones fúngicas

Los PI (porcentajes de inhibición) evidenciaron contadas interacciones de neutralismo con relación al organismo *Aspergillus* sp. 1 en pH 8 y a *A. fumigatiaffinis* en pH 3, a nivel interespecífico e intraespecífico (de manera correspondiente), que pudo darse debido a que la respuesta de la interacción no haya sido evidente entre los organismos (Chen et al., 2018).

De igual manera en ambas condiciones de pH, se encontraron posibles sinergias o interacciones de beneficio para uno de los organismos. Puesto que cuando se detectaba una sinergia el otro organismo expresaba antagonismo, tal es el caso de *F. solani* (relación inter- e intraespecíficas), *Aspergillus* sp. 1 (relación intraespecífica) y *P. lilacinum* (relación inter- e intraespecíficas) al estar en tratamiento con pH 3.0. Y en medio básico (pH 8.0) paso algo similar, pero con *A. fumigatiaffinis* (relación inter- e intraespecíficas), con *Aspergillus* sp. 2 (relación

inter- e intraespecíficas) y con *P. lilacinum* (al coexistir con *A. fumigatiiformis*). De acuerdo con [Chen et al. \(2018\)](#) y la teoría de mercado biológico de [Wernerer et al. \(2014\)](#), dentro de las interacciones de sinergia pueden darse diferentes estrategias entre organismos para maximizar las ganancias de los recursos y servicios, posiblemente esta respuesta se relaciona con la fase de establecimiento y adaptación de los organismos al medio. Una vez adaptados y al ya no requerir cooperar, porque ya se tiene el acceso a los nutrientes ([Ghoul & Mitri, 2016](#)), disminuye la cooperación provocando un cambio en la interacción tal como sucedió con el transcurso de los días.

Se identificó que en los dos tratamientos, para todos los bioensayos después de los primeros días (3, 5 y en algunos casos hasta el día 7) las interacciones culminaron en antagonismo, con algunas variaciones. Cuando uno de los competidores aumentaba en el otro organismo disminuía el porcentaje de antagonismo. Y al parecer las sinergias duraron un poco más en el medio ácido. En este sentido podemos resaltar que, a pesar de encontrar sinergias al finalizar las pruebas todos los organismos resultaron ser antagónicos tendencia que se prolongó en la mayoría de los días evaluados. De acuerdo con [Wernerer et al. \(2014\)](#) este tipo de estrategia es favorecida en lugar de la cooperación puesto que resulta más viable eliminar la competencia ya que de este modo se dispone de mayores recursos y servicios para el individuo más antagónico. Esta mecánica es mejor conocida como "Efecto Gadjil" el cual también es fuertemente moldeado por la disponibilidad de nutrientes ([Bending, 2003](#)). Hay que subrayar que esta respuesta pudo verse bastante influida a causa de la falta o reducción de espacio que hay en una caja de Petri por lo que los competidores no podían escapar y les resultó más viable mantener su fenotipo agresivo ([Ghoul & Mitri, 2016](#)) que según [Fernández & Kennedy, 2016](#) el estilo de vida saprobio que les posiciona dentro de los principales descomponedores primarios hace que sean altamente antagónicos entre ellos. En esta competencia se incluye la competencia por explotación, que se produce cuando el uso de un recurso por una especie reduce su disponibilidad para otra especie, y la competencia por interferencia, que se produce cuando una

especie restringe directamente el crecimiento o la propagación de un competidor por antibiosis, ambas van de la mano ([Chatterjee et al., 2016](#); [Hiscox et al., 2018](#)).

Al mismo tiempo, hay que considerar la respuesta del organismo en cuestión ya que ésta a su vez será modulada según la combinación de las especies involucradas y el estímulo generado por el pH en función de lo cual los micelios podrán producir compuestos orgánicos, volátiles o difusibles (COV y DOC) ([Fox & Howlett, 2008](#); [Morón-Ríos et al., 2017](#); [Hiscox et al., 2018](#)) con los cuales logran inhibir el crecimiento de la competencia y actuarán como mecanismo defensivo y de ataque ([Hiscox et al., 2018](#)). Con esto, se propicia una reacción diferente entre microorganismos que coexisten y consecuentemente interacciones diferentes entre los tratamientos y cambiantes a lo largo de los días. Según [Ghoul & Mitri, 2016](#) una vez que el espacio físico y el nicho son divididos, la competencia puede disminuir a través de una reducción en la fuerza de la interacción, que sucede con el tiempo (hecho que ocurre comúnmente en estructuras sólidas como el agar) y que puede conducir a relaciones simbióticas. Con esto resulta más sencillo entender porque se da una disminución en los PI, es decir, disminuyen los porcentajes de antagonismo con el paso de los días. Y a su vez esta reducción se da a mayor velocidad, para algunos organismos en medio básico o ácido repercutiendo en los cambios de posición del organismo con el mayor OAI, durante los experimentos.

De tal manera que al final de esta investigación *F. solani* y *P. lilacinum* presentaron un mayor OAI en el medio ácido, pero en este su crecimiento fue limitado. De manera opuesta *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2 y *A. fumigatiaffinis* tuvieron un OAI mayor en medio básico así como un mejor crecimiento. Por lo anterior, resultan confusos los valores de *F. solani* y *P. lilacinum* sin embargo, una posible explicación puede estar dada con base a los hallazgos de [Passamani et al. \(2014\)](#) donde se reporta que las condiciones óptimas de pH para el crecimiento de los hongos no concuerdan precisamente con una mayor producción de compuestos orgánicos, en su caso el pH bajo estimuló una mayor producción de compuestos tóxicos. En función de este trabajo, puede ser que nuestros

organismos con un nivel de antagonismo mayor en co-cultivos ácidos sigan este patrón.

10.3 Exploración de las bases fisiológicas de tres interacciones

Con base a la mayor efectividad para la obtención de extracto, el medio sólido resultó ser el más viable ya que en éste se da una adecuada circulación de oxígeno y brindando un mejor soporte micelial que está asociada con la producción de metabolitos secundarios en grandes cantidades ([Robinson et al., 2001](#)). La producción de pigmentos visibles de las tres interacciones (*F. solani*/*Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus* sp. 1/*Aspergillus* sp. 2 y *A. fumigati*/*Aspergillus* sp. 2) exploradas por técnicas metabolómicas, en medio con pH básico pudo deberse a lo mencionado por [Selving & Alspaugh \(2011\)](#); [Vylkova, \(2017\)](#) y [Baidoo \(2019\)](#) que aluden al pH alcalino ser una variable que les permite mayor estabilidad a los organismos fúngicos y que repercute en su fisiología. Desde esta perspectiva, [Vrabi et al. \(2012\)](#) mencionan que valores de pH más alcalinos promueven un mayor agotamiento de energía resultando en la excreción exacerbada de compuestos orgánicos; hipótesis distinguida como "metabolismo de desbordamiento o sobreproducción de metabolitos".

Los resultados metabolómicos obtenidos mediante HPLC y SM, concuerdan con los resultados de [Chatterjee et al. \(2016\)](#) donde las huellas metabólicas generadas por la técnica de HPLC-MS revelaron un aumento drástico en la diversidad de metabolitos secretados por hongos en cultivos duales. Al respecto, investigaciones recientes relacionan este aumento en la síntesis de metabolitos con una posible activación mediante el co-cultivo de hongos con otros microorganismos. Nuestros resultados mostraron algunos metabolitos compartidos entre organismos y otros propios de un organismo en particular, así como la disminución o aumento de algunas señales y la aparición de otras durante la interacción. Sin embargo, lo más destacable durante este proceso fue que el perfil metabolómico de *Aspergillus* sp. 2 se expresó en mayor medida y se mantuvo en los extractos producidos en la interacción, con cualquiera de los competidores.

La prevalencia de las señales de *Aspergillus* sp. 2 podría estar relacionada con la competencia. Esta competencia, al ser impulsada, estimula una mayor producción de metabolitos secundarios con la finalidad de disminuir o inhibir la producción de los metabolitos producidos por el competidor. En otras palabras, ciertos organismos debido a la competencia recurrente responden a desafíos bióticos al secretar un gran número de metabolitos con diferentes modos de acción aumentando la posibilidad de que algunos de estos metabolitos supriman al competidor ([Chatterjee et al., 2016](#)). Otra posible explicación, es la biotransformación que se define como el proceso por medio del cual el organismo en cuestión tiene la capacidad de reutilizar los compuestos orgánicos producidos de manera extracelular por el otro competidor con la finalidad de optimizar el uso de su energía y convertirlo en un metabolito que le sea funcional ([Chatterjee et al., 2016](#); [Baidoo, 2019](#)).

11 CONCLUSIONES

Los micromicetes evaluados en los bioensayos de interacción representan potencialmente un componente relevante de las comunidades fúngicas en relaves mineros, ya que los tres géneros (*Aspergillus*, *Fusarium* y *Purpureocillium*) han sido reportados previamente de jales mineros en China y el Estado de México, además de estar presentes en suelos agrícolas de la India con alta concentración de metales pesados.

Los resultados de los bioensayos de interacción sugirieron que el medio con pH ácido afecta negativamente el crecimiento de los cinco micromicetes estudiados en relación con el medio de pH básico. Debido a que bajo estas condiciones (pH ácido) se ven afectadas funciones vitales para la supervivencia tales como la reproducción y la fisiología del hongo. No obstante, el desarrollo fúngico fue constante en ambos medios, de tal manera que al culminar los experimentos, muchas de las áreas de crecimiento no difirieron significativamente.

Con lo que se sugiere que estos micromicetes son capaces de adaptarse el estrés ambiental provocado por el pH.

La respuesta de *F. solani*, *Aspergillus* sp. 1, *A. fumigatiaffinis*, *Aspergillus* sp. 2 y *P. lilacinum* a los co-cultivos fue variable a lo largo del tiempo, incluyendo sinergias durante los primeros días, que se prolongaron por más tiempo en el medio ácido, pero culminaron en antagonismos después de los siete días. Con lo que se puede decir que, la estabilidad y la diversidad de respuestas en las interacciones, dependen en gran medida de las condiciones ambientales como el pH y la naturaleza de los organismos interactuantes.

Los datos de metabolómica evidenciaron que las especies fúngicas bioactivas analizadas presentan perfiles metabolómicos distintos, los cuales cambiaron durante las interacciones pareadas mostrando la presencia de compuestos producidos *de novo*. Por lo tanto, se puede decir que los metabolitos secundarios modulan las interacciones de sus productores con otros organismos mediante respuestas químicas reguladas por el pH y la especie fúngica con la que se compete. Cabe destacar que el perfil metabolómico de *Aspergillus* sp. 2 sección niger sobresalió por la prevalencia de sus metabolitos secundarios en todas las interacciones. Por lo que puede ser un organismo con potencial antifúngico dada su capacidad de inhibir o biotransformar los metabolitos secundarios producidos por sus interactuantes.

Finalmente, la hipótesis se cumplió dado que el pH originó diferencias significativas en el crecimiento de los micromicetes evaluados. Sin embargo, el crecimiento óptimo de los organismos se registró en pH básico, contrario a lo esperado. Este resultado puede deberse a que el área de colecta presentaba un pH de entre 6.5 a 9 y a que bajo estas condiciones los hongos pueden cumplir funciones básicas facilitando el crecimiento. De forma concluyente nuestros resultados demostraron la influencia del pH en las interacciones a nivel inter- e intraespecífico de las cinco especies fúngicas evaluadas.

12 PERSPECTIVAS

- Los resultados de los bioensayos y metabolómica sugieren que los micromicetes evaluados tienen un gran potencial como agentes biorremediadores, por su capacidad de tolerar condiciones extremas y contrastantes de pH. Por ello, se sugiere realizar estudios detallados para explorar su respuesta metabólica a la presencia de metales pesados y otros contaminantes.
- La exploración de más intervalos de pH en los bioensayos resulta inminente dado que esta variable genera respuestas fisiológicas diferentes, que pueden influir en la síntesis de compuestos específicos con potencial bioactivo. Lo que proporcionaría información aún más precisa de las especies fúngicas.
- La investigación de los perfiles metabolómicos en pH ácido y básico de los cinco organismos, objeto de estudio es crucial ya que de este modo podremos contrastar los metabolitos encontrados e identificar los generados durante una condición y otra. Lo que permitirá entender de manera puntual como influye esta variable en su fisiología.
- A partir de la extracción de los pesos moleculares, de los picos base, cargados de forma negativa y positiva obtenidos por la técnica de espectrometría de masas exactas, UPLC-PDA-HRMS-MS / MS, se podría realizar un análisis de varianza, por ejemplo Análisis de Componentes Principales (PCA) para detectar los compuestos orgánicos compartidos, los producidos por los organismos de manera individual y los sintetizados en interacción. Consecuentemente, se podrían seleccionar para su estudio detallado aquellos compuestos producidos *de novo* en interacción.
- Con los pesos moleculares realizar comparaciones con un diccionario de productos naturales y una base de datos (MarinLite) dirigido a pequeñas moléculas de hongos y bacterias para la determinación de los metabolitos fúngicos. Ya que dentro de estos podría hallarse algún compuesto nuevo o con algún potencial de interés.

13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, C.L., Osorio, N., & Montoya, M.M. (2013). Molecular Identification of Microorganisms Associated to the Rhizosphere of Vanilla Plants in Colombia. *Acta biol. Colomb*, 8(2), 293-306.
- Arismendi S., Nolberto, Andrade S, Nancy, Riegel Sch, Ricardo, & Carrillo LI, Roberto. (2010). Presence of a Phytoplasma Associated with Witches'-Broom Disease in *Ugni molinae* Turcz. and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer Determined by DAPI, PCR, and DNA Sequencing. *Chilean journal of agricultural research*, 70(1), 26-33.
- Arredondo-Solórzano, R.J., Aguilar-Méndez, M.J. & Noriega-Luna, B. (2016). Aislamiento y caracterización de microorganismos nativos de muestras de suelos contaminados con residuos mineros. *Verano de la investigación Científica*, 2 (1), 522-526.
- Badri, D., Weir T., Lelie, D. & Vivanco, J. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 642-650.
- Baidoo, E.E.K. (Ed.). (2019). *Microbial Metabolomics Methods and Protocols*. Nueva York, U.S.A: Humana Press.
- Bending, G.D. (2003). Litter Decomposition, Ectomycorrhizal Roots and the 'Gadgil' Effect. *New Phytologist*, 158(2), 228-229.
- Berg, G. & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 1-13.
- Bermudez, G., De Longhi, A., Díaz, S., Gavidía, V. (2014) La transposición del concepto de diversidad biológica. Un estudio sobre los libros de texto de la educación secundaria española. *Enseñanza de las Ciencias*, 32(3), 285-302.
- Blackwell, M., Hibbett, D.S., Taylor, J.W., & Spatafora J.W. (2006). Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia*, 98(6), 829-837.
- Brakhage, A. A. (2012). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21-32.

- Brockhurst, M. A., Chapman, T., King, K. C., Mank, J. E., Paterson, S., & Hurst, G. D. D. (2014). Running with the Red Queen: the role of biotic conflicts in evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1797), 20141382–20141382.
- Buchanan, R.L., & S, J.C. (1975). Effect of Initial pH on Aflatoxin Production. *Applied Microbiology*, 30(6), 1050-1051.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447–459.
- Camiña, R.E. (2018). Actividad antimicrobiana y estudios de dereplicación y químicos de hongos saprófitos de Cuatro Ciénegas, Coahuila. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México.
- Castillo Lopez, D., Zhu-Salzman, K., Ek-Ramos, M. J., & Sword, G. A. (2014). The Entomopathogenic Fungal Endophytes *Purpureocillium lilacinum* (Formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* Negatively Affect Cotton Aphid Reproduction under Both Greenhouse and Field Conditions. *PLOS ONE*, 9(8), e103891.
- Cerón, L.E., & Aristizábal F.A. Nitrogen and phosphorus cycles dynamics in soils. *Rev. Colomb. Biotechnol*, 14(1), 285-295.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E. & Larsen J. (2016). *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), 1-17.
- Cotty, P.J.(1988). Aflatoxin and sclerotical production by *Aspergillus flavus*: influence of Ph. *Physiology and Biochemistry*, 78(9), 1250-1253.
- Crowther, T. W., Boddy, L., & Hefin Jones, T. (2012). Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus–grazer interactions. *The ISME Journal*, 6(11), 1992–2001.
- Chamoun, R., Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2015). Identification of signatory secondary metabolites during mycoparasitism of *Rhizoctonia solani* by *Stachybotrys elegans*. *Frontiers in Microbiology*, 6(353), 1-11.
- Chanda, A., Roze, L. V., Kang, S., Artymovich, K. A., Hicks, G. R., Raikhel, N. V., ... Linz, J. E. (2009). A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(46), 19533–19538.

- Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee P., & Karlovsky P. (2016). Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology*, 16(83), 1-13.
- Chen, Y., Pu, G., Lian, B., Pei, X., Huang, G., Wang, Q. & Lv, Y. (2018). Interactions between Two Fungi Strains during Litter Decomposition through a Microcosm Experiment: Different Degradative Enzyme Activities. *Advances in Enzyme Research*, 6(01), 1-9.
- Chesters, C. G. C., & Thornton, R. H. (1956). A comparison of techniques for isolating soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 39(3), 301–313.
- De Filippis, F., Laiola, M., Blaiotta, G., & Ercolini, D. (2017). Different Amplicon Targets for Sequencing-Based Studies of Fungal Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), 1-9.
- De Jaeger, N., Declerck, S., & De La Providencia, I. E. (2010). Mycoparasitism of arbuscular mycorrhizal fungi: a pathway for the entry of saprotrophic fungi into roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 73 (2) 312–322.
- Delfín-Alcalá, I. & Durán-de-Bazúa, M. (2008). La microbiota presente en un desecho minero, como opción de restauración de jales microbiota present in a mining waste, as an option for mine tailing dams restoration. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, 1 (4), 1-9.
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., ... Wick, L. Y. (2018). Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 335–352.
- Dhakar, K., Sharma, A., & Pandey, A. (2013). Cold, pH and salt tolerant *Penicillium* spp. inhabit the high altitude soils in Himalaya, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1315–1324.
- Domsch, K.H., Gams, W., & Anderson, T.-H. (1993). *Compendium of soil fungi*, vol. 1. Academic Press London: IHW-Verlag.

- Doyle, JJ y JL Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Einax, E., & Voigt K. (2003). Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(3), 185–194.
- El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B. M., Cech, N. B., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2013). High-Resolution MS, MS/MS, and UV Database of Fungal Secondary Metabolites as a Dereplication Protocol for Bioactive Natural Products. *Journal of Natural Products*, 76(9), 1709–1716.
- Estrada-Luna, A. A., Chagolla, A., Ramos H.E., Guerrero, A. & Ruiz, J. (2010). Identification of proteins secreted by the fungus *Ustilago maydis* (DeCandole) Corda (Basidiomycete) grown under *in vitro* conditions. *Revista Electrónica Nova Scientia*, 4(2), 104 – 130.
- Fajardo, C.A. (2018). Actividad antimicrobiana e ascomicetos selectos de México. (Tesis de maestria). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México.
- Fernández, A. (2014). Contaminación en suelos de la provincia de Buenos Aires con el herbicida organofosforado (glifosato): impacto sobre la comunidad de hongos filamentosos. (Tesis doctoral), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos.
- Fernandez, C. W., & Kennedy, P. G. (2015). Revisiting the “Gadgil effect”: do interguild fungal interactions control carbon cycling in forest soils? *New Phytologist*, 209(4), 1382–1394.
- Fox, E. M., & Howlett, B. J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 481–487.
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A. J., ... Houbraken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1–63.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., & Thrane, U. (1989). Analysis and Screening for Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Fungal Cultures by Thin-Layer

- Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18(3), 331-335.
- Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*, 24(10), 833–845.
- Gibson, A. K., Drown, D. M., & Lively, C. M. (2015). The Red Queen's Race: An Experimental Card Game to Teach Coevolution. *Evolution: Education and Outreach*, 8(1), 1-9.
- Giusiano, G. E., Piontelli, E., Fernández, M. S., Mangiaterra, M. L., Cattana, M. E., Kocsubé, S., & Varga, J. (2017). Biodiversity of species of *Aspergillus* section Fumigati in semi-desert soils in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 247–254.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323–1330.
- Gómez-Bernal, J. M., Santana-Carillo, J., Romero-Martin, F., Armienta-Hernández, M. A., Morton-Bermea, O. & Ruiz-Huerta, E. A. (2010). Plantas de sitios contaminados con desechos mineros en Taxco, Guerrero, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 87,131-133.
- González-Torres, P., & Gabaldón, T. (2018). Genome Variation in the Model Halophilic Bacterium *Salinibacter ruber*. *Frontiers in Microbiology*, 9(1499), 1-17.
- Harvey, D. (2000). *Modern analytical chemistry*. DePauw University, Estados Unidos de América. McGraw-Hill.
- Hatje, V., Pedreira, R.M.A., de Rezende, C.E., Schettini, C.A.F., de Souza, G.C., Marin D.C., & Hackspacher, P.C. (2017). The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *SCIENTIFIC REPORTS*, 7(1), 1-13.
- Herrera, T., & Ulloa, M. (2004). *El reino de los hongos micología básica y aplicada*. Distrito Federal, Mexico: Universidad Nacional Autónoma de Mexico y Fondo de Cultura Económica.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547.

- HilleRisLambers, J., Adler, P. B., Harpole, W. S., Levine, J. M., & Mayfield, M. M. (2012). Rethinking Community Assembly through the Lens of Coexistence Theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 227–248.
- Hinsinger, P., Gobran, G., Gregory, P., & Wenzel, W. (2005). Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist*, 168(2), 293–303.
- Hiscox, J., O’Leary, J., & Boddy, L. (2018). Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. *Studies in Mycology*, 89, 117–124.
- Hong, S.-B., Go, S.-J., Shin, H.-D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316–1329.
- Horn, B. W., Olarte, R. A., Peterson, S. W., & Carbone, I. (2013). Sexual reproduction in *Aspergillus tubingensis* from section Nigri. *Mycologia*, 105(5), 1153–1163.
- Huang, D., Song, Y., Liu, Y., & Qin, Y. (2019). A new strain of *Aspergillus tubingensis* for high-activity pectinase production, BIOTECHNOLOGY AND INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, 50(1), 53-65.
- Huang, L., Baumgartl, T. & Mulligan, D. (2012). Is rhizosphere remediation sufficient for sustainable revegetation of mine tailings? *Annals of Botany*, 110(2), 223–238.
- Jančič, S., Frisvad, J. C., Kocev, D., Gostinčar, C., Džeroski, S., & Gunde-Cimerman, N. (2016). Production of Secondary Metabolites in Extreme Environments: Food- and Airborne *Wallemia* spp. Produce Toxic Metabolites at Hypersaline Conditions. *PLOS ONE*, 11(12), e0169116.
- Jayasiri, S. C., Hyde, K. D., Ariyawansa, H. A., Bhat, J., Buyck, B., Cai, L., ... Promputtha, I. (2015). The Faces of Fungi database: fungal names linked with morphology, phylogeny and human impacts. *Fungal Diversity*, 74(1), 3–18.
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937–947.
- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., ... Larsson, K.-H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22(21), 5271–5277.

- Lamboni, Y., Nielsen, K. F., Linnemann, A. R., Gezgin, Y., Hell, K., Nout, M. J. R., ... Frisvad, J. C. (2016). Diversity in Secondary Metabolites Including Mycotoxins from Strains of *Aspergillus* Section Nigri Isolated from Raw Cashew Nuts from Benin, West Africa. *PLOS ONE*, 11(10), 1-14.
- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F., Hansen, M. A. E., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2007). Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section Fumigati. *Medical Mycology*, 45(3), 225–232.
- Lee, M.-K., Park H.-S., Han, K.-H., Hong, S.-B., & Yu, J.-H. (2017). High molecular weight genomic DNA mini-prep for filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 104, 1-5.
- Lenhart, K., Bunge, M., Ratering, S., Neu, T. R., Schüttmann, I., Greule, M., ... Keppler, F. (2012). Evidence for methane production by saprotrophic fungi. *Nature Communications*, 3(1).
- Li, H., Li, D., He, C., Zhou, Z., Mei, T., Xu, H. (2012). Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal ecology*, 5 (2012), 309 -315.
- Lively, C. M. (2010). A Review of Red Queen Models for the Persistence of Obligate Sexual Reproduction. *Journal of Heredity*, 101(Supplement 1), S13–S20.
- Luangsa-ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S.-B., Borman, A., Hywel-Jones, N., & Samson, R. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important
- Ma, L.-J., Geiser, D., Proctor, R., Rooney, A., O'Donnell, K., Trail, F., ... Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annu Rev Microbiol*, 63, 399-416.
- Maeda, K., Spor, A., Edel-Hermann, V., Heraud, C., Breuil, M. C., Bizouard, F., ... Philippot, L. (2015). N₂O production, a widespread trait in fungi. *Scientific reports*, 5(9697), 1-7.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., & Legendre, L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 359-366.
- Mas, A., Jamshidi, S., Lagadeuc, Y., Eveillard, D., & Vandenkoornhuyse, P. (2016). Beyond the Black Queen Hypothesis. *The ISME Journal*, 10(9), 2085–2091.

- McLean, N., van der Jeugd, H. P., & van de Pol, M. (2018). High intra-specific variation in avian body condition responses to climate limits generalisation across species. *PLOS ONE*, *13*(2), e0192401.
- Meier, I., Avis, P., & Phillips, R. (2012). Fungal communities influence root exudation rates in pine seedlings. *FEMS Microbiol Ecol*, *83* (3), 585–595.
- Méndez-Ramírez, M. & Armienta, M. A. (2012). Distribución de Fe, Zn, Pb, Cu, Cd y As originada por residuos mineros y aguas residuales en un transecto del Río Taxco en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, *29*(2), 450-462.
- Mier, T., Rivera-Becerril, F., Ayala-Zermeño, M.A., Tiriello, C., Aguilar, S.O., & Ulloa, M. (2013). *Manual: Metodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos 2013*. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biología.
- Millberg, H., Boberg, J., & Stenlid, J. (2015). Changes in fungal community of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles along a latitudinal gradient in Sweden. *Fungal Ecology*, *17*, 126–139.
- Mirhendi, H., Zarei, F., Motamedi, M., & Nouripour-Sisakht, S. (2016). *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* as the dominant black *Aspergillus*, use of simple PCR-RFLP for preliminary differentiation. *Journal de Mycologie Médicale*, *26*(1), 9–16.
- Mishra, V.K. (2010). In vitro Antagonism of Trichoderma Species against Pythium aphanidermatum. *Journal of Phytology*, *2*(9), 28-35.
- Morgan, J. A. W., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *56*(417), 1729–1739.
- Morón-Ríos, A., Gómez-Cornelio, S., Ortega-Morales, B.O., De la Rosa-García, S., Partida-Martínez, L.P., Quintana, P., ...González-Gómez, S. (2017) Interactions between abundant fungal species influence the fungal community assemblage on limestone. *PLOS ONE*, *12*(12), e0188443.
- Morris, J. J., Lenski, R. E., & Zinser, E. R. (2012). The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *mBio*, *3*(2), 1-7.

- Muszevska, A., Stepniewska-Dziubinska, M. M., Steczkiewicz, K., Pawlowska, J., Dziedzic, A. & Ginalski, K. (2017). Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Scientific Reports*, 7(9147), 1-12.
- Nieuwenhuis, B. P. S. & James, T.Y. (2016). The frequency of sex in fungi. *Phil. R. Soc., B* 371(20150540), 1- 12.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis, AS-07: Contenido de materia orgánica y AS-20: Determinación de aniones solubles (carbonatos, bicarbonatos, cloruros y sulfatos) en el extracto de saturación. Diario Oficial de la Federación, México CDMX.
- Padhi, S., Panda, M. K., Das, D., & Tayung, K. (2016). ITS2 RNA secondary structure analysis reveals close affinity between endophytic and pathogenic fungi: A case study in *Fusarium* species. *Annals of Microbiology*, 66(2), 625–633.
- Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Lett*, 321(2),141–149.
- Park, J.-O., Hargreaves, J. R., McConville, E. J., Stirling, G. R., Ghisalberti, E. L., & Sivasithamparam, K. (2004). Production of leucinostatins and nematocidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 271–276.
- Passamani, F. R. F., Hernandez, T., Lopes, N. A., Bastos, S. C., Santiago, W. D., Cardoso, M. das G., & Batista, L. R. (2014). Effect of Temperature, Water Activity, and pH on Growth and Production of Ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. *Journal of Food Protection*, 77(11), 1947–1952.
- Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (2002). Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 426–446.
- Pereira, G., Herrera, J., Machuca, A., & Sánchez, M. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radfata*. *BOSQUE*, 28(3), 215-219.
- Pontón J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol.*, 25(2), 78-82.

- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C. & Campos, A. (2006). Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología Aplicada*, 5(1,2), 149-155.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reinhold-Hurek, B., Bunger, W., Burbano, C. S., Sabale, M. & Hurek, T. (2015). Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Rev. Phytopathol.*53(1), 403-424.
- Rengel, Z. & Marschner, P. (2005). Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist*, 168(2), 305–312.
- Robinson, T., Singh, D., & Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3), 284–289.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., ... Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4(10), 1340–1351.
- Rousk, J., Brookes, P. C., & Baath, E. (2011). Fungal and bacterial growth responses to N fertilization and pH in the 150-year “Park Grass” UK grassland experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1), 89–99.
- Rugova, A., Puschenreiter, M., Koellensperger, G. & Hann, S. (2017). Elucidating rhizosphere processes by mass spectrometry - A review. *Analytica Chimica Acta*, 956, 1-13.
- Ruiz, E. A. & Armienta, M. A. (2012). Acumulaci3n de ars3nico y metales pesados en maız en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 28(2), 103-117.
- Rumbos, C., Reimann, S., Kiewnick, S., & Sikora, R.A. (2006). Interactions of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 with the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: Implications for *Meloidogyne incognita* control on tomato, *Biocontrol Science and Technology*, 16(9), 981-986.

- Sampedro, I., Romero, C., Ocampo, J., Brenes, M. & García, I. (2004). Removal of Monomeric Phenols in Dry Mill Olive Residue by Saprobic Fungi. *J. Agric.Food Chem.*, 52(14), 4487–4492.
- Sánchez, J.G., Marrugo, J.L., & Urango, I.D. Biosorción simultanea de plomo y cadmio en solución acuosa por biomasa de hongos *Penicillium* sp. *TEMAS AGRARIOS*, 19(1), 63 – 72.
- Sánchez-Rangel, D., Hernández-Domínguez, E.-E., Pérez-Torres, C.-A., Ortiz-Castro, R., Villafán, E., Rodríguez-Haas, B., ... Ibarra-Laclette, E. (2018). Environmental pH modulates transcriptomic responses in the fungus *Fusarium* sp. associated with KSHB *Euwallacea* sp. near *forficatus*. *BMC Genomics*, 19(1).
- Schroers, H.-J., Samuels, G. J., Zhang, N., Short, D. P. G., Juba, J., & Geiser, D. M. (2016). Epitypification of *Fusisporium* (*Fusarium*) *solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 108(4), 806–819.
- Selosse, M.A., Schneider-Maunoury, L. & Martos, F. (2018). Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytologist*, 217(3), 968-972.
- Selvig, K., & Alspaugh, J. A. (2011). pH Response Pathways in Fungi: Adapting to Host-derived and Environmental Signals. *Mycobiology*, 39(4), 249–256.
- Shearer, C. A. (1995). Fungal competition. *Can. J. Bot.* 73(1): S1259-S1264.
- Šišić, A., Al-Hatmi, A. M. S., Baćanović-Šišić, J., Ahmed, S. A., Dennenmoser, D., de Hoog, G. S., & Finckh, M. R. (2018). Two new species of the *Fusarium solani* species complex isolated from compost and hibiscus (*Hibiscus* sp.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(10), 1785-1805.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., & Crouch, S.R. (2008). *Principios de analisis instrumental, sexta edición*. Distrito Federal, México: Cengage Learning.
- Šnajdr, J., Dobiášová, P., Větrovský, T., Valášková, V., Alawi, A., Boddy, L., & Baldrian, P. (2011). Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(1), 80–90.
- Spatafora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.L., ...

- Stajich, J.E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046.
- Stefani, F. O. P., Bell, T. H., Marchand, C., de la Providencia, I. E., El Yassimi, A., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2015). Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLOS ONE*, 10(6), 1-16.
- Stubbendieck, R. M., Vargas-Bautista, C. & Straight P.D. (2016). Bacterial Communities: Interactions to Scale. *Frontiers in Microbiology*, 7(1234), 1-19.
- Sugiharto, S. (2019). A review of filamentous fungi in broiler production. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 1-8.
- Talavera, O., Armienta, M. A., García, J. & Flores, N. (2006). Geochemistry of leachates from the El Fraile sulfide tailings piles in Taxco, Guerrero, southern Mexico. *Environmental Geochemistry and Health*, 28(3), 243–255.
- Tarnita, C. E. (2017). The ecology and evolution of social behavior in microbes. *The Journal of Experimental Biology*, 220(1), 18–24.
- Torres, D. E., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Guevara-Fefer, P., Márquez-Guzmán, G. J., & Pérez-Martínez, C. (2017). *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. *PLOS ONE*, 12(1), 1.16.
- Ulloa, M., & Halin, R.T. (2006). *Nuevo diccionario ilustrado de micología*. Minnesota, U.S.A: The American Phytopathological Society.
- VanderMolen, K. M., Raja, H. A., El-Elimat, T., & Oberlies, N. H. (2013). Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*, 3(71), 1-7.
- Velez, P., Espinosa-Asuar, L., Figueroa, M., Gasca-Pineda, J., Aguirre-von-Wobeser, E., Eguiarte, L. E., ... Souza, V. (2018). Nutrient Dependent Cross-Kingdom Interactions: Fungi and Bacteria From an Oligotrophic Desert Oasis. *Frontiers in Microbiology*, 9(1755), 1-15.
- Velez, P., Gasca-Pineda, J., Rosique-Gil, E., Eguiarte, L. E., Espinosa-Asuar, L., & Souza, V. (2016). Microfungal oasis in an oligotrophic desert: diversity patterns and

community structure in three freshwater systems of Cuatro Ciénegas, Mexico. *PeerJ*, 4, e2064.

- Villanueva, R. (2017). Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antioomiceto de hongos endófitos con potencial antifúngico aislados de *Mimosa affginis* y *Sapium macrocarpum*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México.
- Villavicencio, V. (2013). Identificación molecular de aislados de hongos nematófagos asociados a *Meloidogyne hapla* Chitwood. (Tesis Ingeniero agrónomo). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Agronomía, Chile.
- Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., ... Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48 (6) 705–711.
- Virgilio, S., Cupertino, F. B., Ambrosio, D. L., & Bertolini, M. C. (2017). Regulation of the reserve carbohydrate metabolism by alkaline pH and calcium in *Neurospora crassa* reveals a possible cross-regulation of both signaling pathways. *BMC Genomics*, 18(1), 1-15.
- Vrabl, P., Fuchs, V., Pichler, B., Schinagl, C. W., & Burgstaller, W. (2012). Organic Acid Excretion in *Penicillium ochrochloron* Increases with Ambient pH. *Frontiers in microbiology*, 3, (121), 1-10.
- Vylkova, S. (2017). Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. *PLOS Pathogens*, 13(2), e1006149.
- Wang, G., Liu, Z., Lin, R., Li, E., Mao, Z., Ling, J., ... Xie, B. (2016). Biosynthesis of Antibiotic Leucinostatins in Bio-control Fungus *Purpureocillium lilacinum* and Their Inhibition on Phytophthora Revealed by Genome Mining. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005685.
- Warcup, J.H. (1950). The soil –plate method for isolation of fungi from soil. *Nature*, 166(4211), 117-118.

- Wenera, G. D., Strassmann, J. E., Ivens, A. B., Engelmoera, D. J., Verbruggen E., Queller D.C., Noë R., Collins N., Hammerstein P. & Kiers E.T. (2014) Evolution of microbial markets. *PNAS*, 111(4), 1237–1244.
- West, S. A., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A. & Griffin, A.S. (2007). The Social Lives of Microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38(53), 33-77.
- Wężowicz, K., Rozpądek, P., & Turnau, K. (2017). Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. *Mycorrhiza*, 27(5), 499–511.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322.
- Xie, X.-G., Dai, C.-C., Li, X.-G., Wu, J.-R., Wu, Q.-Q., & Wang, X.-X. (2016). Reduction of soil-borne pathogen *Fusarium solani* reproduction in soil enriched with phenolic acids by inoculation of endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. *BioControl*, 62(1), 111–123.
- Yeverino, I.R. (2019). Obtención de metabolitos biodinámicos a partir de hongos selectos la reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México.
- Zafar, S., Aqil, F., & Ahmad, I. (2007). Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 98(13), 2557–2561.
- Zhan, J., Gunaherath, G. M. K. B., Wijeratne, E. M. K., & Gunatilaka, A. A. L. (2007). Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*. *Phytochemistry*, 68(3), 368–372.

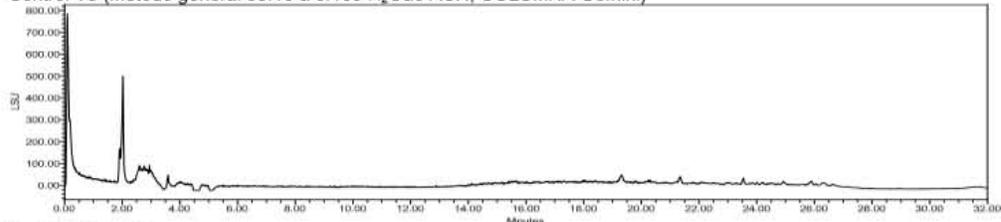
14 ANEXOS

Tabla A1. Componentes y nutrientes de los medios de cultivo.

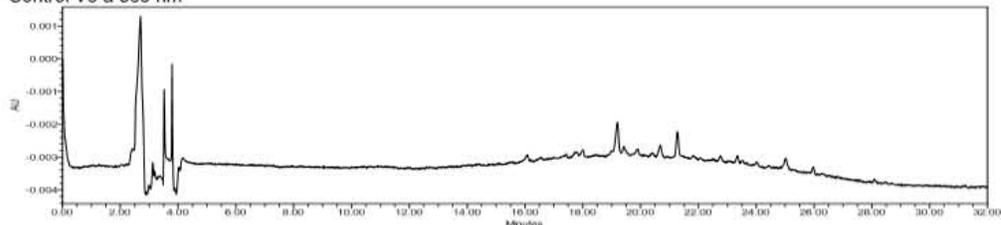
Medio de cultivo	Componentes del medio	Nutrientes
PDA (1L)	200 g papa	NA
	20 g dextrosa	NA
	15 g agar	NA
CMA (1L)	40 g harina de maíz	9 g contienen: Carbohidratos 8.5g Sodio 16 mg
	15 g agar	-
V8 Agar (1L)	60 ml jugo V8	240 ml contienen: Proteínas 1g Carbohidratos 9 g Fibra dietética 1g Azúcares totales 4 g Sodio 915 mg
	15 g agar	-

Cromatogramas HPLC del medio de cultivo V8 (pH 8) y Arroz. La nomenclatura de los organismos es la siguiente: A= *Fusarium solani*, B= *Aspergillus* sp. 1, C= *Aspergillus fumigatiaffinis*, D= *Aspergillus* sp. 2 y E= *Purpureocillium lilacinum*.

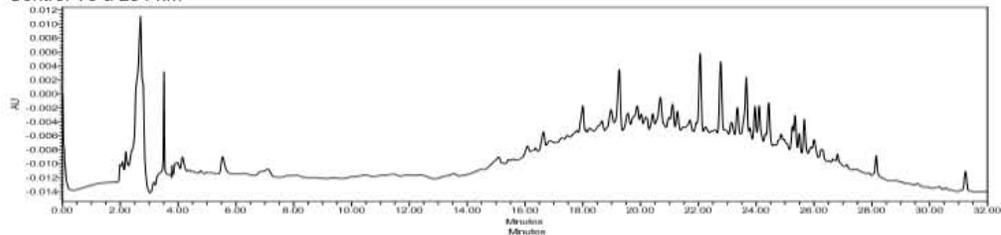
Control V8 (Metodo general 85:15 a 0:100 H₂Oac-ACN, COLUMNA Gemini)



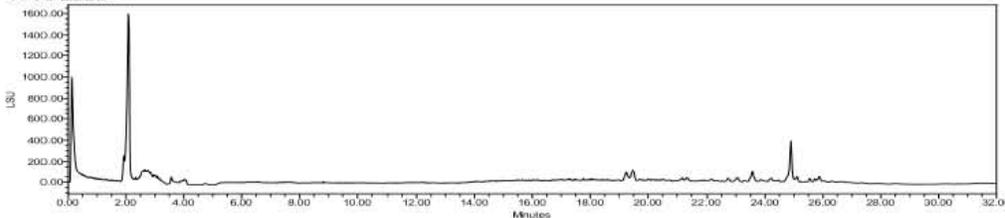
Control V8 a 365 nm



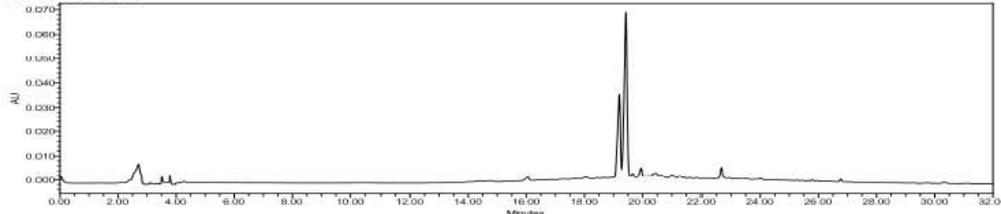
Control V8 a 254 nm



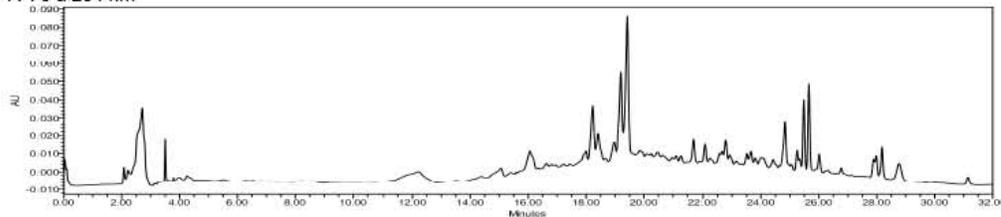
A V8 ELSD



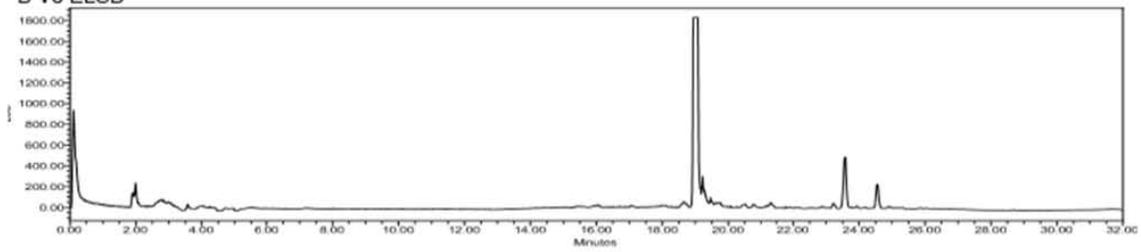
Λ V8 a 365 nm



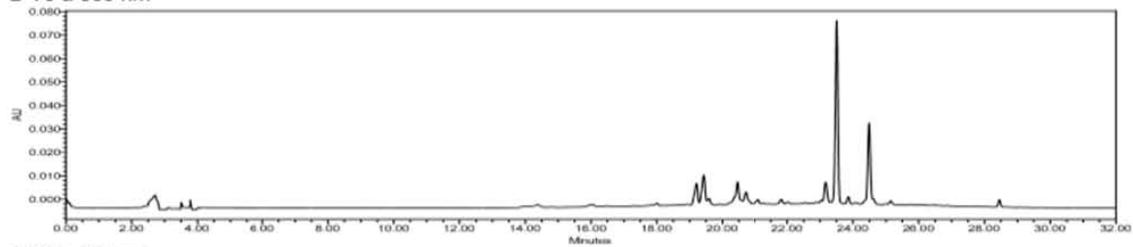
A V8 a 254 nm



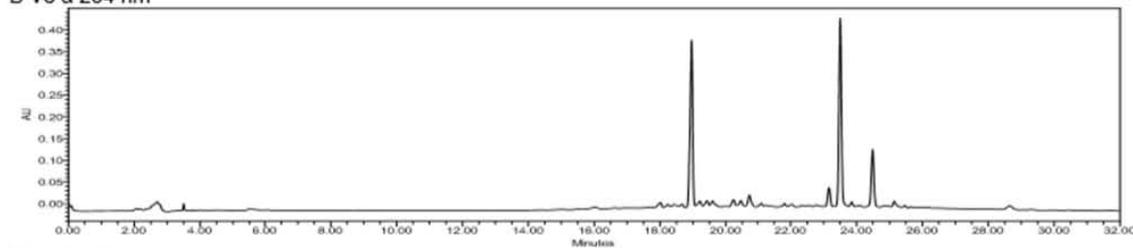
B V8 ELSD



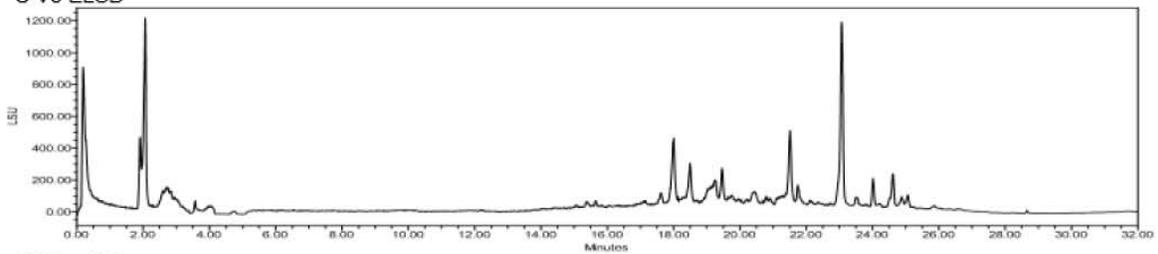
B V8 a 365 nm



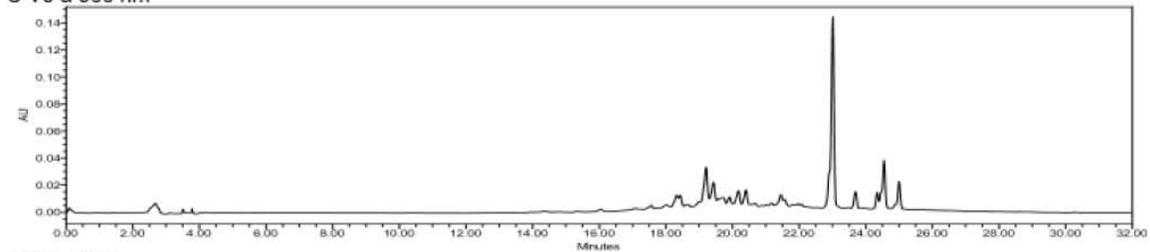
B V8 a 254 nm



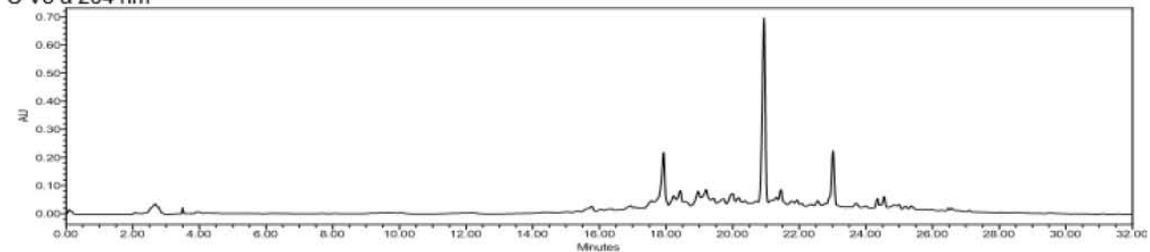
C V8 ELSD

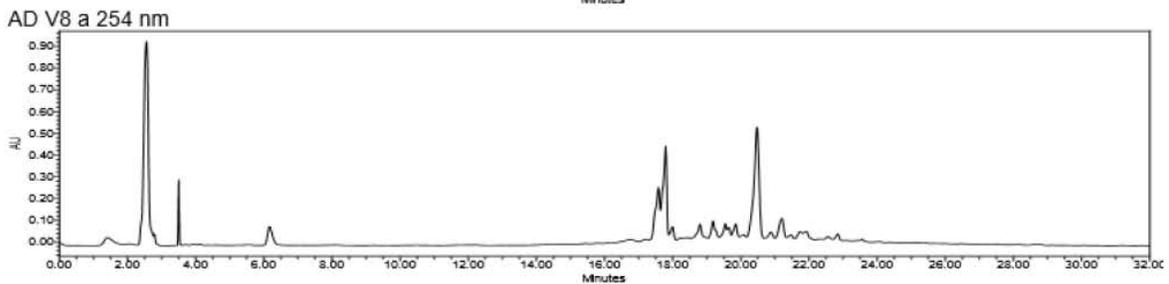
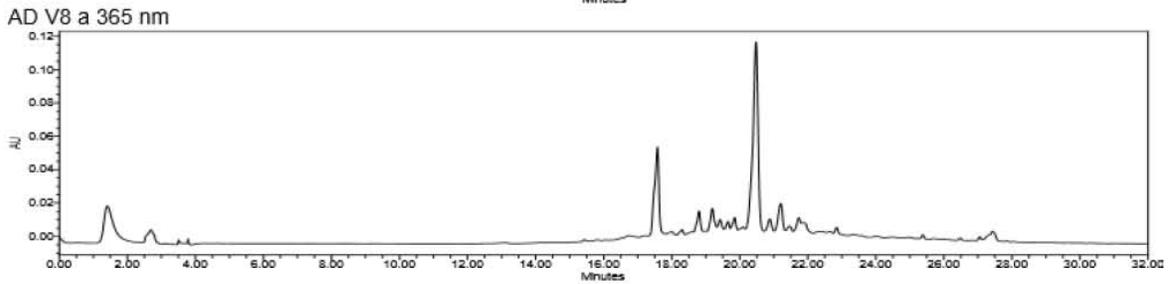
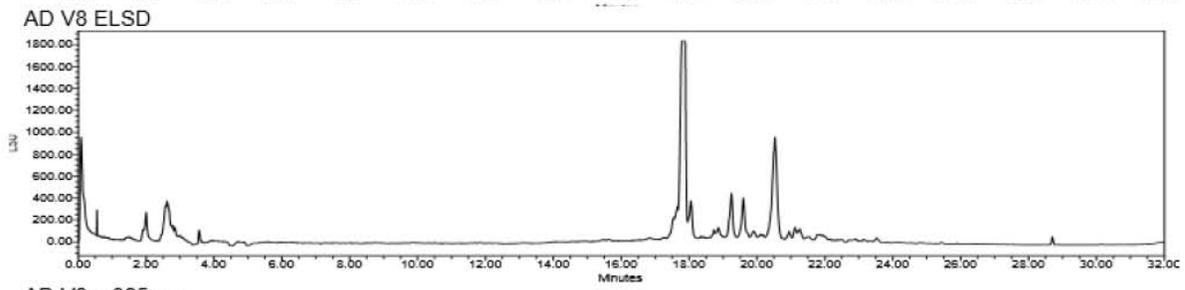
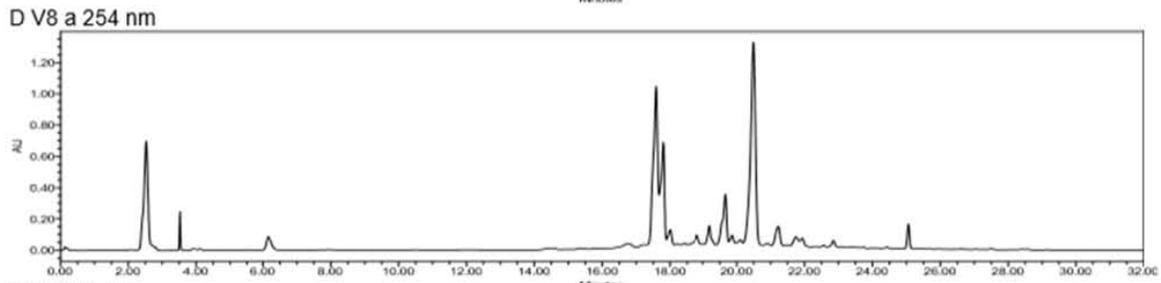
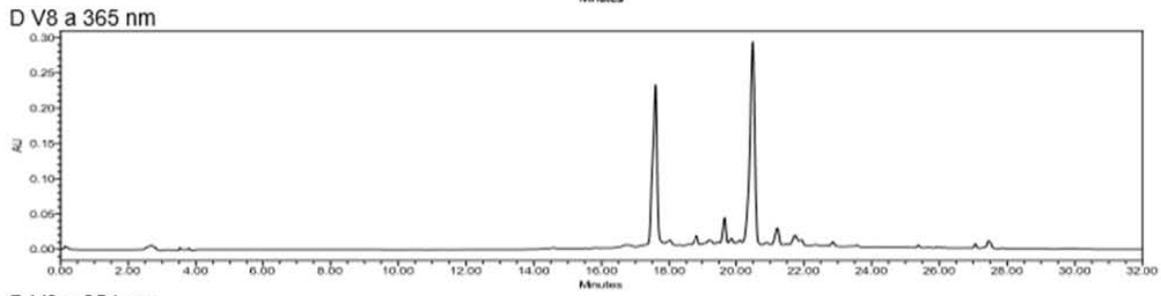
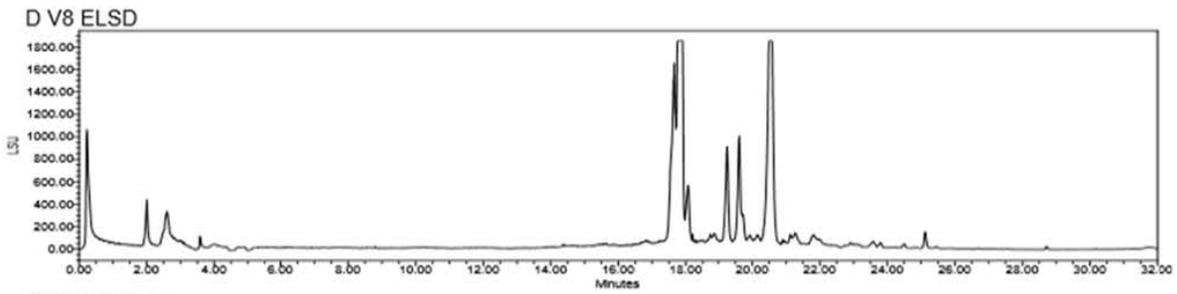


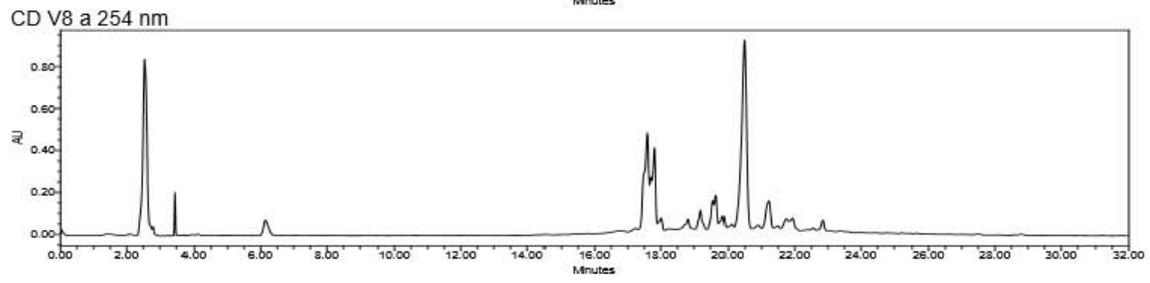
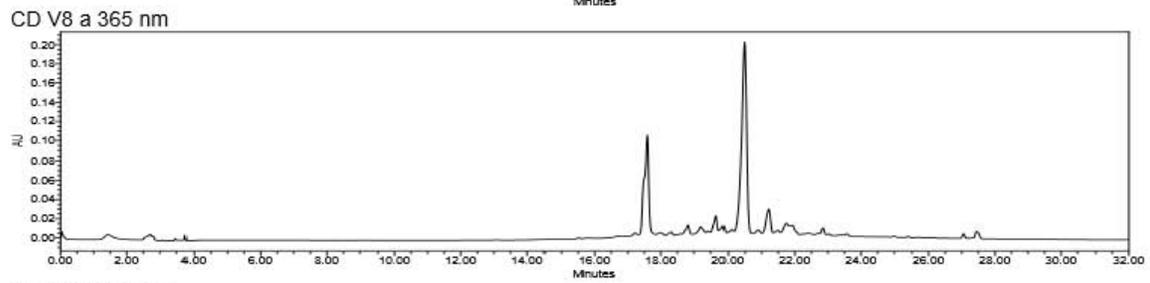
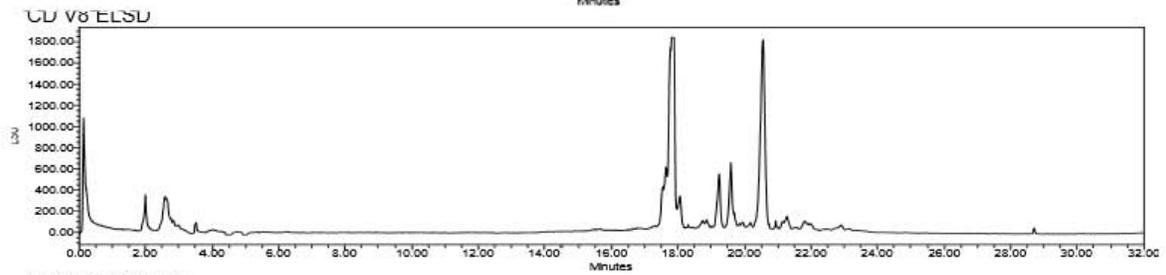
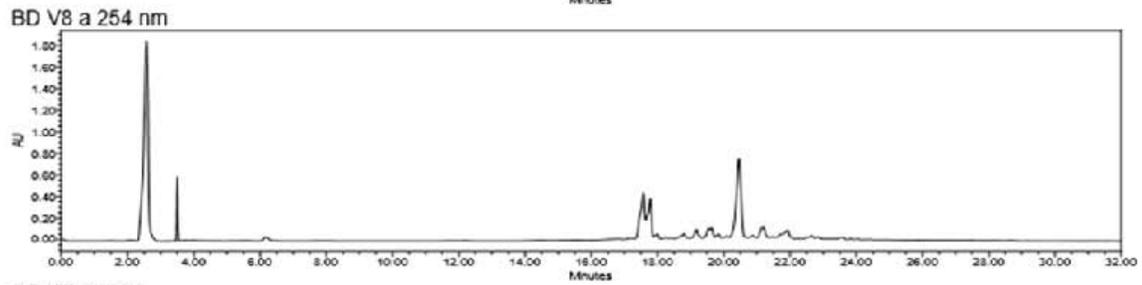
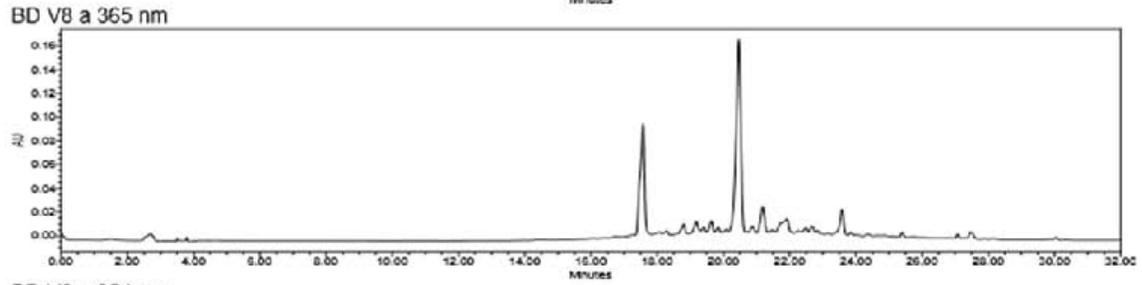
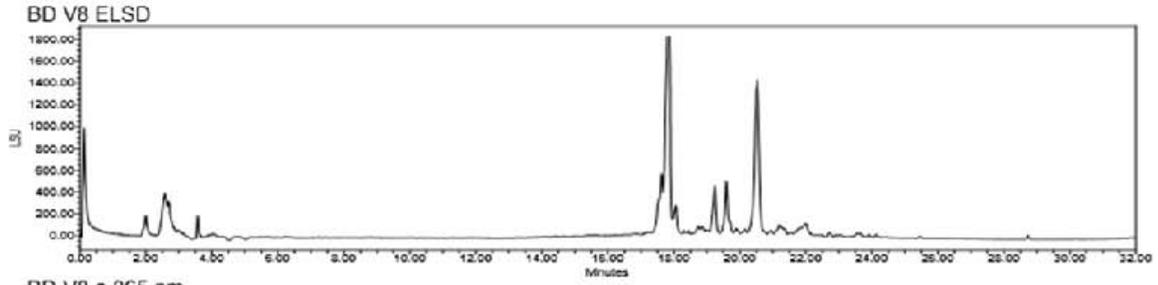
C V8 a 365 nm



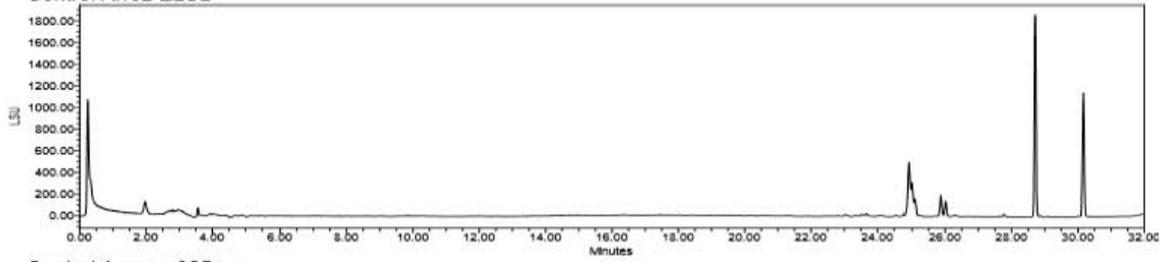
C V8 a 254 nm



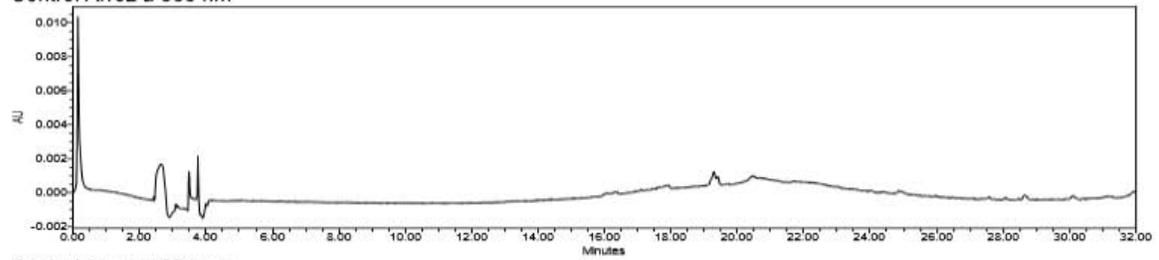




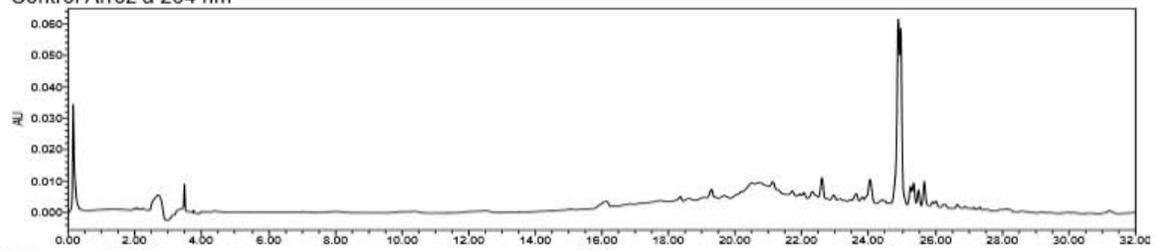
Control Arroz ELSD



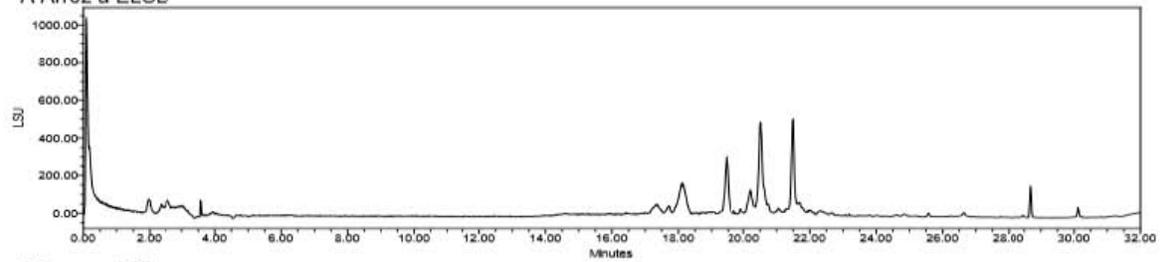
Control Arroz a 365 nm



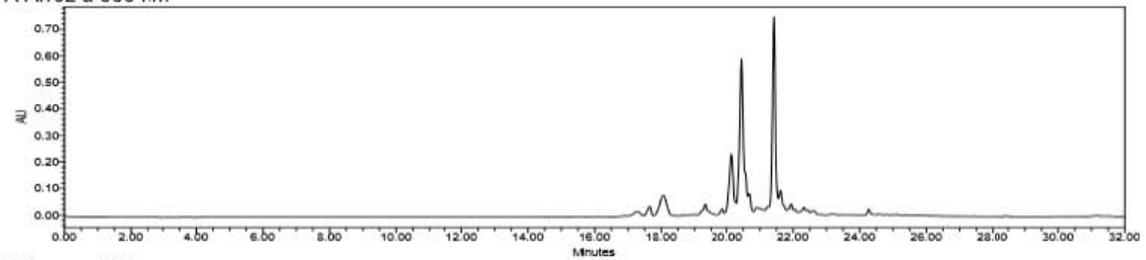
Control Arroz a 254 nm



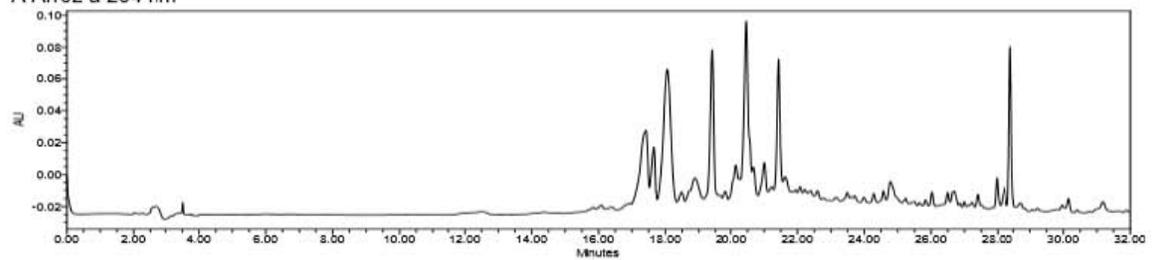
A Arroz a ELSD



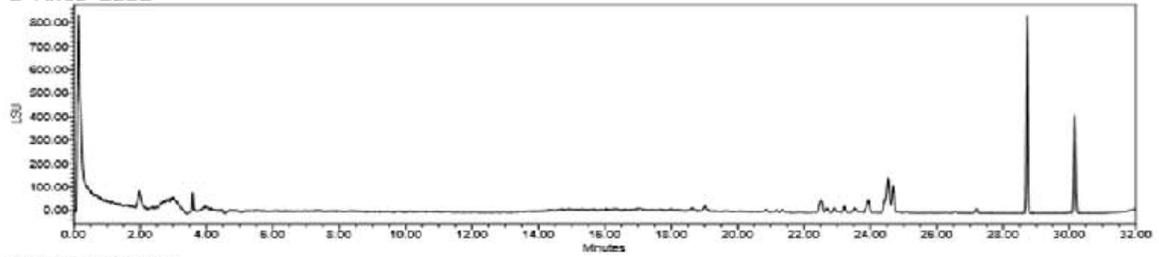
A Arroz a 365 nm



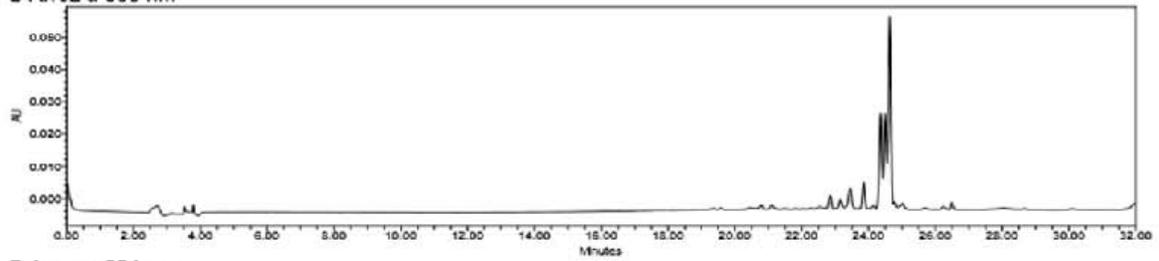
A Arroz a 254 nm



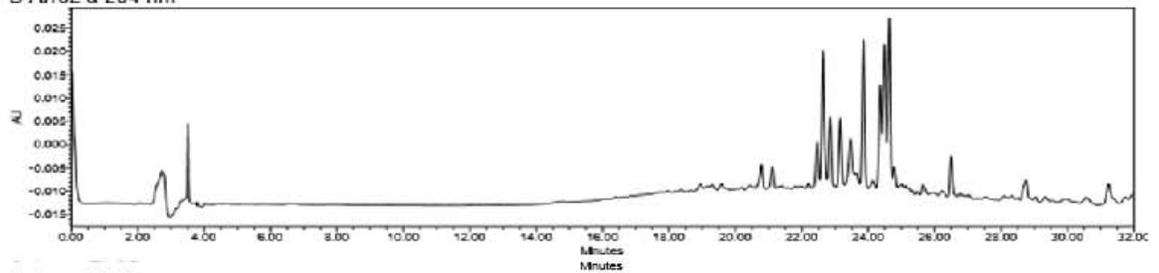
B Arroz ELSD



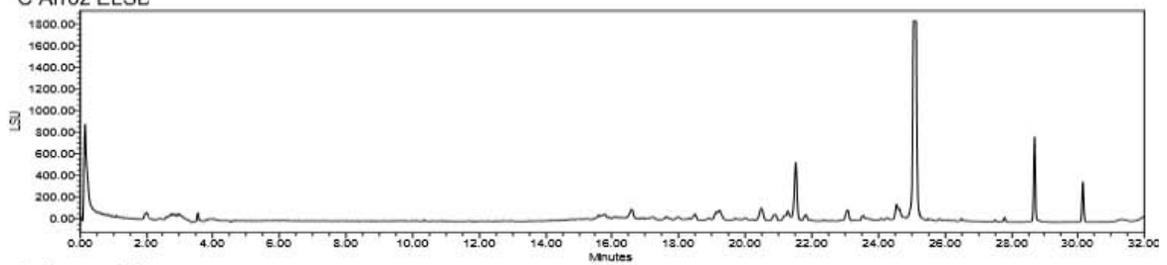
B Arroz a 365 nm



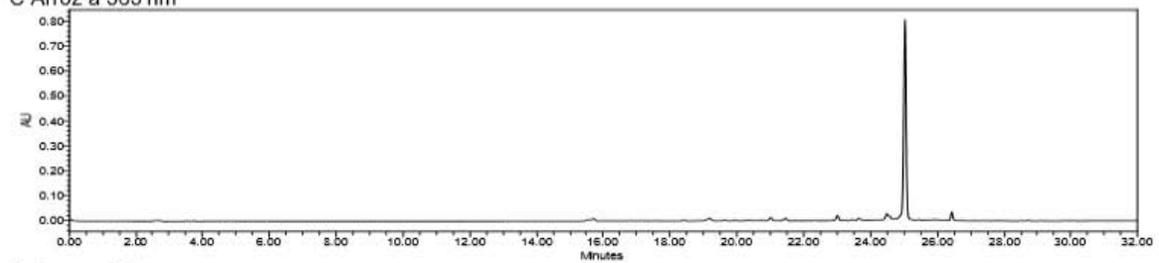
B Arroz a 254 nm



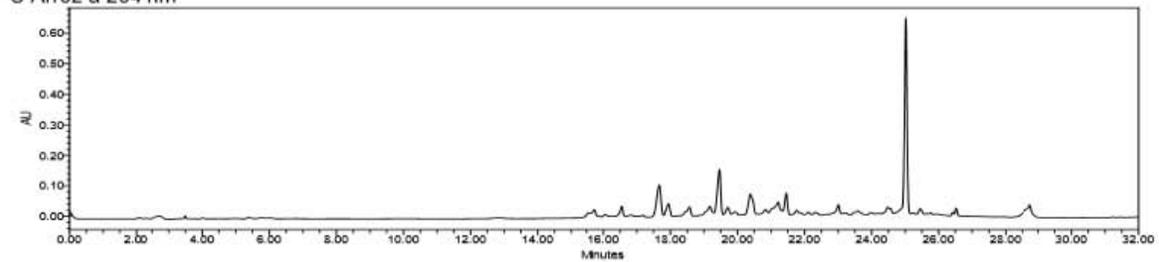
C Arroz ELSD



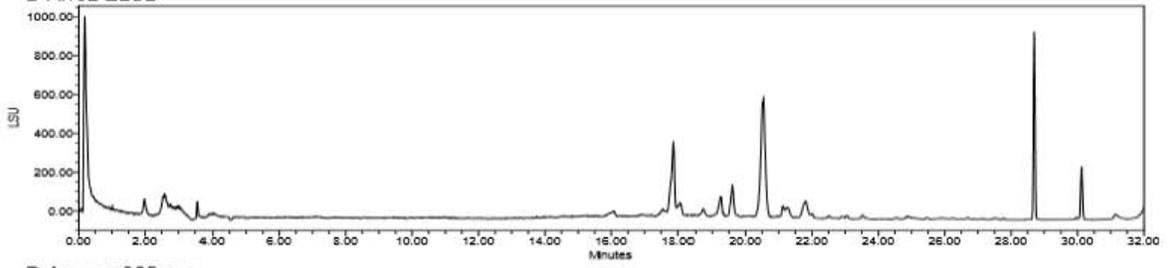
C Arroz a 365 nm



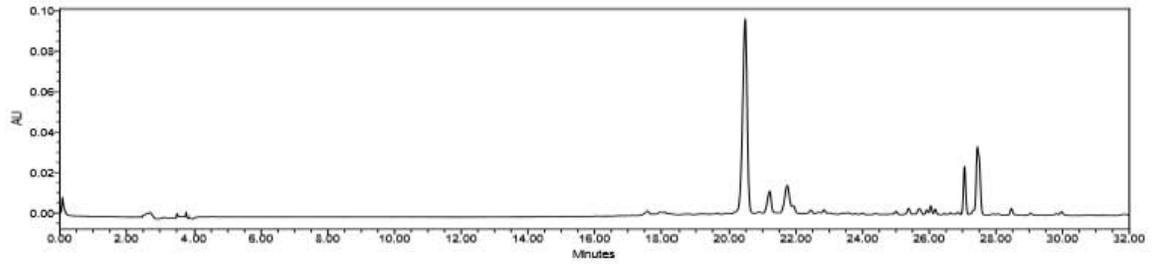
C Arroz a 254 nm



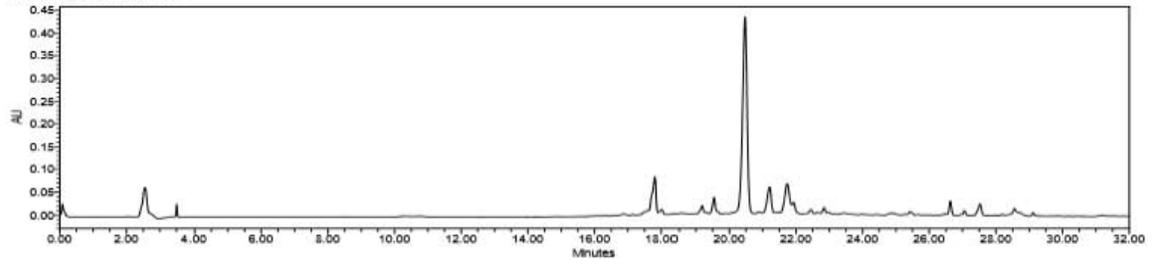
D Arroz ELSD



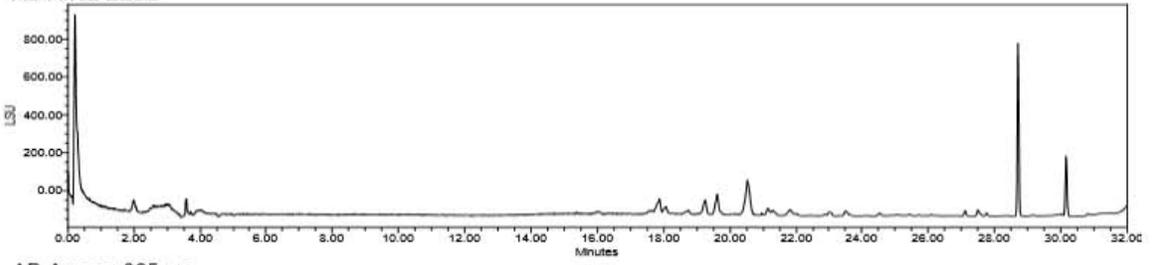
D Arroz a 365 nm



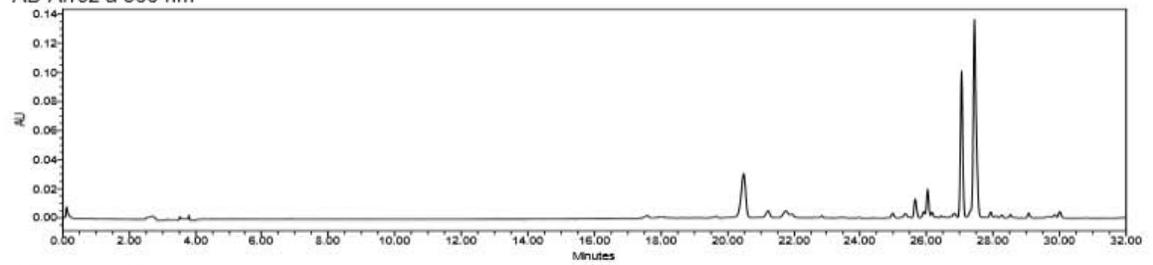
D Arroz a 254 nm



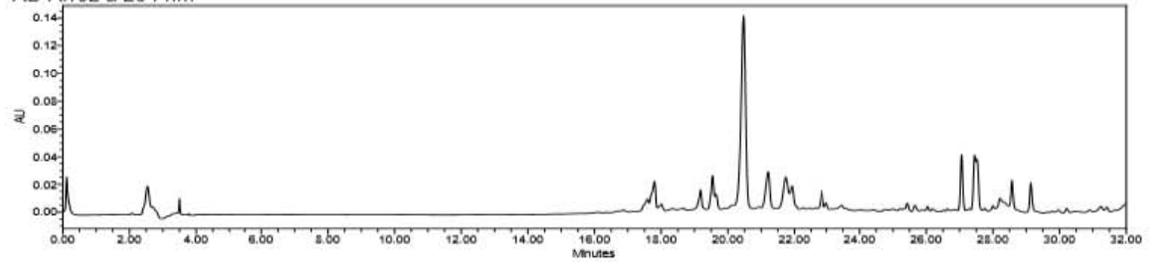
AD Arroz ELSD



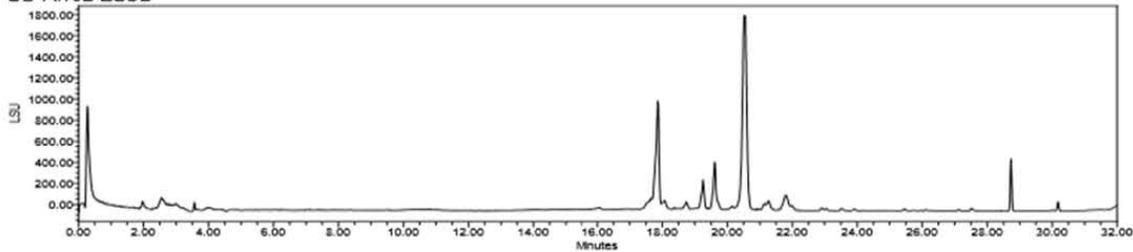
AD Arroz a 365 nm



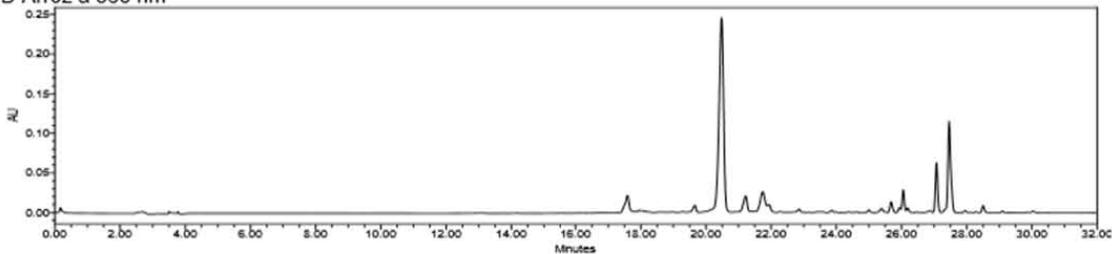
AD Arroz a 254 nm



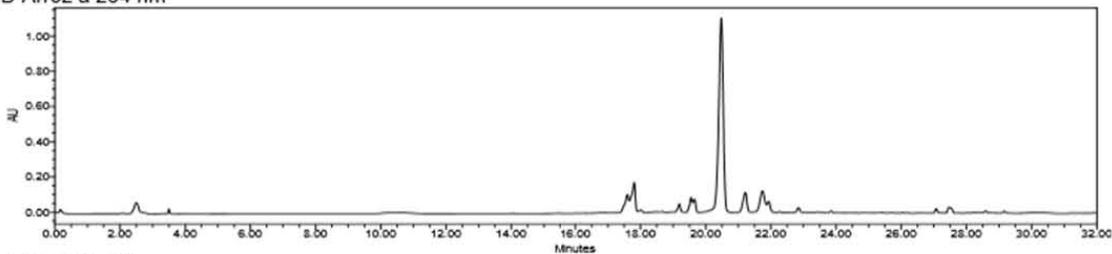
BD Arroz ELSD



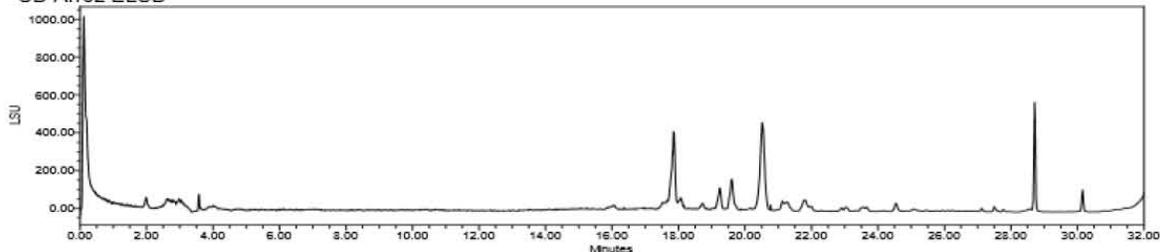
BD Arroz a 365 nm



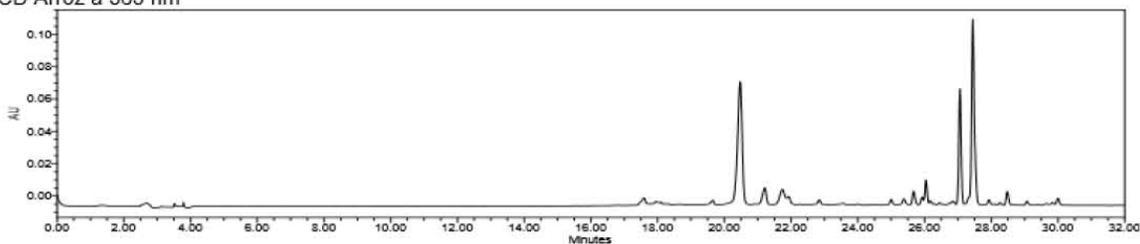
BD Arroz a 254 nm



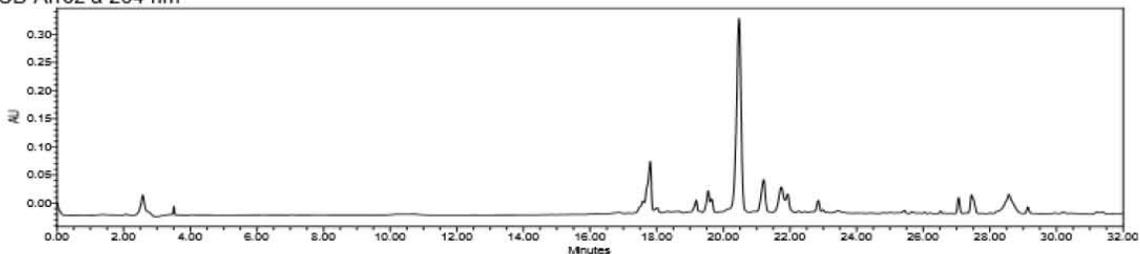
CD Arroz ELSD



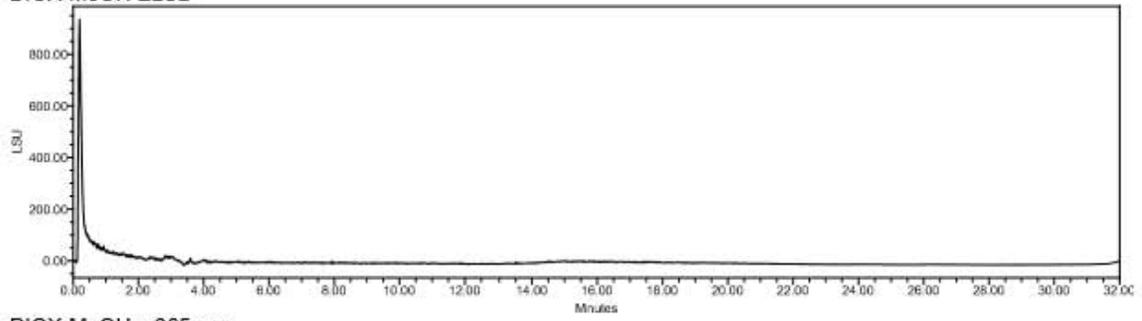
CD Arroz a 365 nm



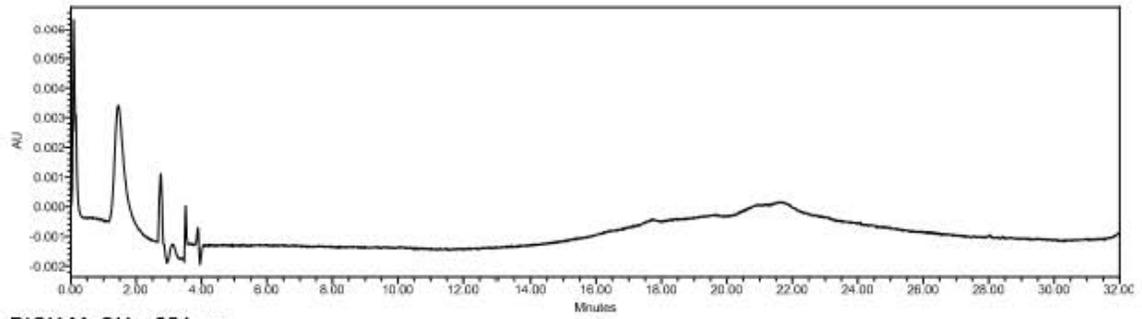
CD Arroz a 254 nm



DIOX-MeOH ELSD



DIOX-MeOH a 365 nm



DIOX-MeOH a 254 nm

