

CAPÍTULO 2. UNA MIRADA AL PAPALOAPAN: FORTALECIMIENTO EN LA EDUCACIÓN AMBIENTAL

Avances de investigación

Lucero, Vázquez Velasco

Leticia Guadalupe Navarro

Universidad del Papaloapan

Resumen

Los mantos de agua son importantes para la vida del planeta, de ellos dependemos todos los seres vivos, el agua constituye uno de los principales compuestos en plantas y animales, de tal forma que resulta esencial para todos los tipos de vida en el planeta; el cuerpo de un humano está conformado por cerca del 60 al 70 % cuando es un adulto joven. Es por ello que la contaminación en este líquido resulta un fenómeno muy preocupante, siendo la ocasionada por metales pesados una de las más recurrentes y que conlleva a una serie de enfermedades y padecimientos. En el río Papaloapan, el cual cruza la ciudad de Tuxtepec, Oaxaca, se han reportado índices elevados de estos contaminantes.

El presente trabajo tuvo como fin identificar algunos hongos microscópicos (presentes en algunos afluentes contaminados de la ciudad) que posiblemente podrían ser usados en la remediación de aguas con problemas de contaminación. La identificación se llevó a cabo por características macro, microscópicas y pruebas especiales que permitieron obtener el género y especie de las cepas seleccionadas.

Palabras clave. Contaminación, Medio Ambiente, Ríos, Hongos, Metales pesados

Introducción.

En la actualidad existen importantes problemas de contaminación que deben ser atendidos con extrema importancia, debido a que los residuos causantes de este problema están ligados con una alta tasa de enfermedades y padecimientos, tanto en individuos, como en los ecosistemas. Dentro de los ecosistemas la contaminación se puede detectar en aire, suelo y agua. Es específicamente

en el agua donde las ciudades vierten los residuos industriales y urbanos, provocando de esta manera la polución de los afluentes con elementos o compuestos químicos tóxicos como metales pesados (plomo, cadmio, mercurio y cromo entre otros), aceites, detergentes, fertilizantes e insecticidas, por mencionar algunos, que son capaces de destruir el equilibrio de los ecosistemas, afectando, de esta manera una amplia diversidad de flora y fauna (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016)

El agua es considerada como un recurso económico para las familias que se dedican a la agricultura o a la pesca. Cuando el agua se contamina, los campos de cultivo de los productores también se ven afectados directamente en sus productos, ya que no pueden ser consumidos o comercializados. Lo anterior influye directamente en la economía y la salud de quienes, al estar en contacto con los diversos contaminantes, pudieran encontrarse en contacto directo con el agua (Beltrán-Pineda y Gómez Rodríguez, 2016).

Los mantos de agua son importantes para la vida del planeta, de ellos dependen gran cantidad de seres vivo en todas las regiones del mundo, es uno de los principales sustentos de las plantas y animales (EFSA 2010; IOM 2004). Cuando el agua entra en contacto con los contaminantes, muchas especies mueren debido a los efectos que estos les pueden provocar. Los efectos dependen de una serie de factores físicos, químicos y biológicos. Solo las especies que puedan generar mecanismos de resistencia para soportar los embates de los agentes contaminantes podrán sobrevivir a diversas concentraciones de estos. Darwin llamó a este fenómeno “selección natural” y sorprendentemente se cumple en todos los casos.

En relación con lo anterior, se ha observado que, a nivel mundial, muchos microorganismos han adquirido resistencia a los contaminantes que el hombre ha desarrollado en los procesos industriales, y que siguen contaminando el agua. Entre ellos se encuentran agentes biológicos que ahora son resistentes a un gran número de desechos tóxicos; a sustancias que consumen el oxígeno del agua; a metales pesados y a materia orgánica persistente; así como sedimentos en suspensión y pesticidas los cuales, en su mayoría, provienen de fuentes no localizadas. Generalmente, los contaminantes son la causa más importante de la pérdida de calidad del agua en todo el mundo (UNESCO, 2017). Pero de forma adicional son muchos microorganismos y

plantas los organismos que han enseñado a los humanos que ellos si son capaces de llegar a adaptarse a medios contaminados, creciendo a concentraciones variadas de una gran variedad de compuestos. Dentro del material genético se encuentra la maquinaria necesaria que les permite, a los organismos resistentes, poder modificar su contenido macromolecular para poder expulsar, metabolizar, secuestrar o evitar la entrada de una gran variedad de elementos y compuestos que, en otros seres, resultan letales.

La contaminación del agua en México.

Existen algunos estados de la República Mexicana como Guanajuato, Nuevo León y Coahuila, que presentan afectaciones en sus suelos por las altas concentraciones de metales pesados. Los metales contaminantes del medio ambiente más importantes en México, dada su toxicidad y abundancia son: cadmio, mercurio, arsénico, plomo y cromo (Covarrubias y Peña Cabriales, 2017), los cuales conllevan a problemáticas en contacto directo en la salud humana. Lo anterior se muestra en la tabla 1.

Tabla. 1 Efectos de los metales pesados en la salud humana (González, 2009; García, 2004).

| Tabla 1. Efectos de los metales pesados en la salud humana (González, 2009; García, 2004). | | |
|--|--|---|
| TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS | | |
| METAL | EFECTO | LIMITES PERMISIBLES (NOM-001-ECOL-1996) |
| Mercurio | Causante del Síndrome de Minamata, es un síndrome neurológico grave y permanente. (González, 2009) | 0.01 mg/L |
| Cadmio | Ocasiona toxicidad hepatorenal. (González, 2009) | 0.2 mg/L |
| Plomo | Origina saturnismo e inhibición de síntesis de hemoglobina (González, 2009). | 0.2 mg/L |
| Cromo | Relacionado con el cáncer de pulmón, este último puede ser biotransformado por el organismo en los humanos a cromo III y de esta manera poseer un papel dentro del metabolismo celular (García, 2004). | 0.5 mg/L |

Elaboración propia, 2020

En conclusión, su efecto es generalizado y ocasiona daños muy severos.

Un factor importante dentro de los procesos de contaminación y toxicidad que afecta en gran medida tanto al medio ambiente, como a los individuos de todas las especies, es la falta de cultura ambiental y conciencia de las personas que habitan en las diversas partes de nuestro país y nuestro planeta. Lo anterior ha propiciado el surgimiento de una situación crítica en el tema del agua, ya que ha repercutido en forma de diferentes problemas económicos, sociales y de salud.

Contaminación con metales pesados.

Los metales pesados son, en general, tóxicos para los seres humanos. Constituyen un grupo de elementos químicos que presentan una densidad alta (5g/mL) en relación con la del agua. Actualmente el término “metal pesado” es utilizado para referirse de una manera amplia a aquellos metales o metaloides con potencial de causar problemas de toxicidad (Alloway, 2013). Los efectos tóxicos de los metales pesados a nivel celular y molecular se deben, principalmente, a su interacción con los grupos sulfhidrilos de las proteínas (Kone, 1990); su acción ionofórica. (Gutknecht, 1981), la cual impide el mantenimiento de los gradientes iónicos y con su gran capacidad para generar radicales libres (Gutknecht, 1981).

El foco de estudio generado a partir de los conocimientos sobre microorganismos y la necesidad de “limpiar” el medio ambiente ha generado metodologías cuyo objetivo es la disminución de contaminantes en agua, aire y tierra. Entre ellas se pueden mencionar técnicas como las de filtrado o saneamiento con lodos activados. Cada una de ellas tiene sus ventajas y sus desventajas. Como procedimiento adicional, y en base a los amplios conocimientos en microbiología y biología molecular se ha establecido la biorremediación, en la cual los recolectores de agentes tóxicos como los metales son los microorganismos, entre ellos las algas, los hongos y las bacterias.

Métodos convencionales y no convencionales de remediación de agua contaminada con metales pesados.

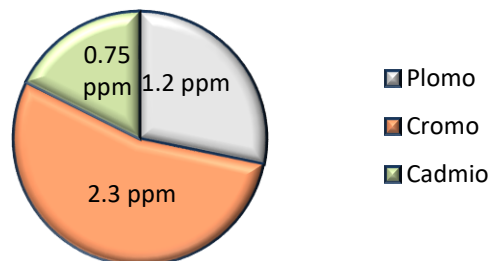
Es importante recalcar el gran impacto ambiental generado por los metales tóxicos, mismos que han llevado a la comunidad científica a desarrollar diferentes tipos de métodos cuyo objetivo principal lo constituye el tratamiento de los efluentes industriales contaminados.

Algunos de los métodos desarrollados para tratar de remediar este problema se mencionan la precipitación, los métodos de óxido reducción, el intercambio iónico, el tratamiento electroquímico y la aglomeración esférica. Sin embargo, estos métodos han resultado bastante costosos e ineficientes especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja, además de la formación, disposición y almacenamientos de lodos y desechos, originados durante los procesos, lo cual se convierte en un problema mayor a resolver (Jaramillo, 2009). Lo anterior ha dado pie al establecimiento de nuevos métodos de decodificación utilizando microorganismos. Esta nueva tecnología, denominada biorremediación, representa un conjunto de nuevas técnicas que ofrecen bajo costo, alta eficiencia, minimización de productos químicos y aparatos o equipos caros. No se requieren nutrientes adicionales y se garantiza la posibilidad de recuperación de metales (Das, 2010). Dentro de este proceso existen diferentes organismos que se pueden utilizar, como lo son las plantas, las algas, las bacterias y los hongos macro y microscópicos (Das, 2010).

Contaminación del río Papaloapan.

En la ciudad de Tuxtepec, Oaxaca, fueron reportados por primera vez (Galicia, 2013) índices de metales pesados. Los contaminantes encontrados se mencionan en la gráfica 1.

Metales Pesados en el río Papaloapan.



Grafica 1. Metales presentes en el río Papaloapan. Se determinaron tres metales, siendo el cromo el que esta con mayor concentración en las aguas, cadmio en segundo lugar y en ultimo el plomo, rebasando la NOM-001-ECOL-1996, para los tres casos (Galicia, 2013).

La CONABIO en el año 2011 reportó, en el informe del Proyecto FM017, la situación preocupante que se observa en la extensión del río Papaloapan, pese a ser uno de los ríos más caudalosos del país y uno de los más ricos de América, se encuentran graves problemas de contaminación por los desechos químicos que se vierten sin conciencia en él. (Lozano, 2011)

La región de la cuenca del Papaloapan es una zona muy rica en mantos de agua, compuestos por líneas extensas de agua que son importantes para la flora y fauna en el estado. La Comisión Estatal del Agua (CONAGUA) alertó sobre la creciente contaminación del agua que surte a las poblaciones de la Cuenca del Papaloapan. Lo anterior se realizó mediante un estudio técnico de aguas nacionales superficiales en 16 cuencas hidrológicas incluyendo la Región Número 28 correspondiente al Papaloapan. La Comisión reportó un “problema de contaminación generalizado en todas las aguas”. De la misma manera indicó que “Hay presencia de agroquímicos, metales pesados y coliformes”, lo cual es el resultado de varios estudios llevados a cabo en febrero del año 2018 (CONAGUA, 2018).

En este trabajo se hará mención de los hongos, los cuales constituyen el foco de estudio en el cual se enfoca toda la atención.

Mecanismos de resistencia a metales pesados por hongos.

La tolerancia a metales pesados en hongos esta descrita por varios mecanismos de remoción, los cuales se mencionan a continuación. 1) Atrapamiento en la zona de la pared celular; b) a nivel extracelular la quelación o precipitación por secreción de metabolitos; c) procesos intracelulares como la síntesis de proteínas como fitoquelatinas y metalotioneinas, las cuales forman complejos; siendo las últimas las que se han descrito de manera más detallada en la parte molecular. Varios estudios han sugerido una correlación entre tolerancia a metales o a un metal en específico con la captación en los hongos, teniendo en cuenta los locus en cromosomas (Cervantes y Gutiérrez-Corona, 1994), por lo que es importante la capacidad que existe en la implementación de biotecnología y bioingeniería para la optimización de cepas resistentes en la biosíntesis de metalotioninas, fitoquelatinas o compuestos que atrapan los iones tóxicos en el medio

extracelular (Cervantes y Moreno, 1999). La figura 1 muestra los principales mecanismos de los hongos contra los metales pesados.

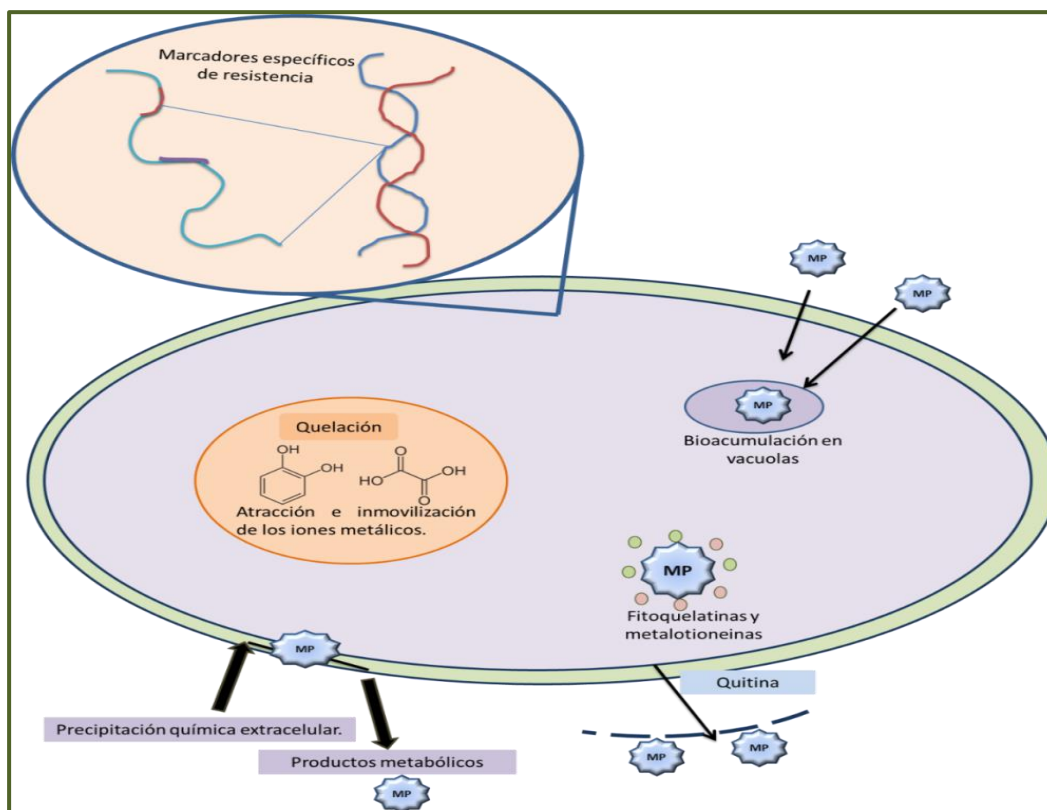


Figura 1. Célula fúngica. Interacción de los metales pesados y mecanismos de resistencia en presencia de estos, ya sea por la quelación, bioacumulación en la vacuola, precipitación por producción de metabolitos, complejos llevados por las metalotioneínas y fitoquelatinas presentes en la célula fúngica (Modificado de Cervantes y Moreno, 1999).

Algunos hongos filamentosos y levaduras han demostrado poseer una capacidad de biorremediación viable para enfrentar los problemas de contaminación por metales pesados (Pillichshammer et al., 1995), debido a que en parte integral de su pared celular hay presencia de polisacáridos como la quitina, los glucanos y el quitosán, que tienen la capacidad de quedar los iones tóxicos (Gutiérrez et al., 1999). Los hongos los captan en la quitina, sin importar que la precipitación sea en la superficie externa de la pared celular o lejos de ella, siendo un mecanismo exitoso para mantener los iones tóxicos fuera del citoplasma, mientras que otros almacenan estos tóxicos en las vacuolas (Wu et al., 2010). Gran variedad de hongos filamentosos y levaduras liberan moléculas con alta afinidad por hierro y pueden unirse de manera directa con los sideróforos y permanecer ligados por largos periodos de tiempo. Lo anterior se conoce como bioacumulación, y es un mecanismo bastante utilizado en algunos microorganismos para la resistencia a metales

pesados. Esta capacidad ha sido desarrollada en función de las condiciones del medio ambiente y el tipo de metal (Cervantes et. al., 2001).

El catecol que es un quelante natural en los hongos y desempeña diversas funciones. Como mecanismos de defensa puede funcionar atrayendo al interior de la célula fúngica el ion metálico, en donde el ácido oxálico es capaz de inmovilizarlos para formar sales de oxalato en forma de cristales, lo que ocasiona que la disponibilidad de los iones baje (Sierra, 2007).

Materiales y métodos.

Recolección de muestra.

Se seleccionaron tres afluentes de la región de la cuenca del Papaloapan con indicios de contaminación y, con frascos estériles, se procedió a la tomar muestras de tres puntos estratégicos, entre los cuales se encontraban las orillas y el centro de cada afluente. Se tomaron alícuotas de las muestras de agua las que fueron sembradas para seleccionar las cepas de interés. Cada muestra fue filtrada, para eliminar los residuos sólidos, usando gazas estériles. La figura 2 ilustra la metodología empleada para realizar la recolección de las muestras de agua.

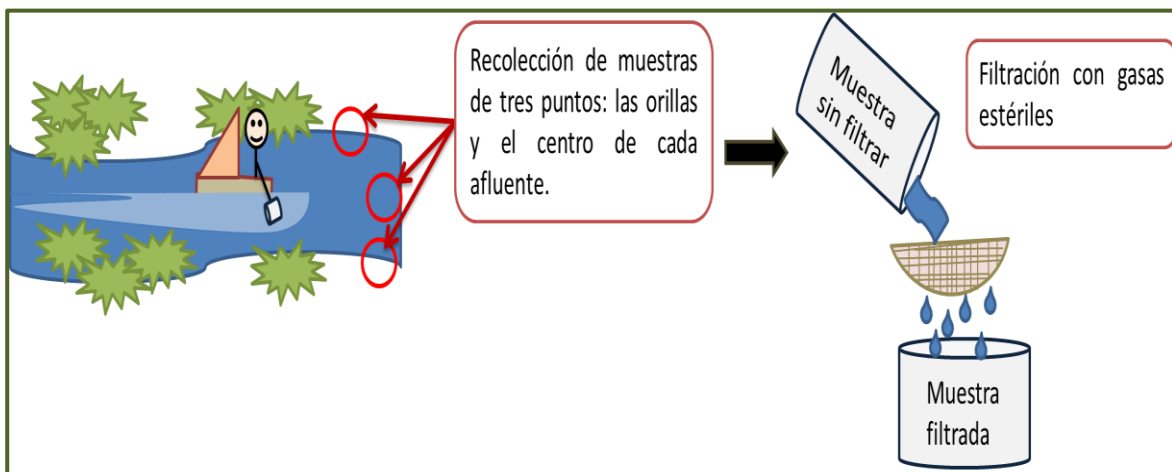


Figura 2. Recolección de muestras. Se filtraron las muestras de la recolección de las áreas seleccionadas en los sitios (Fuente: Elaborado por Lucero Vázquez Velasco, 2019).

Selección de hongos.

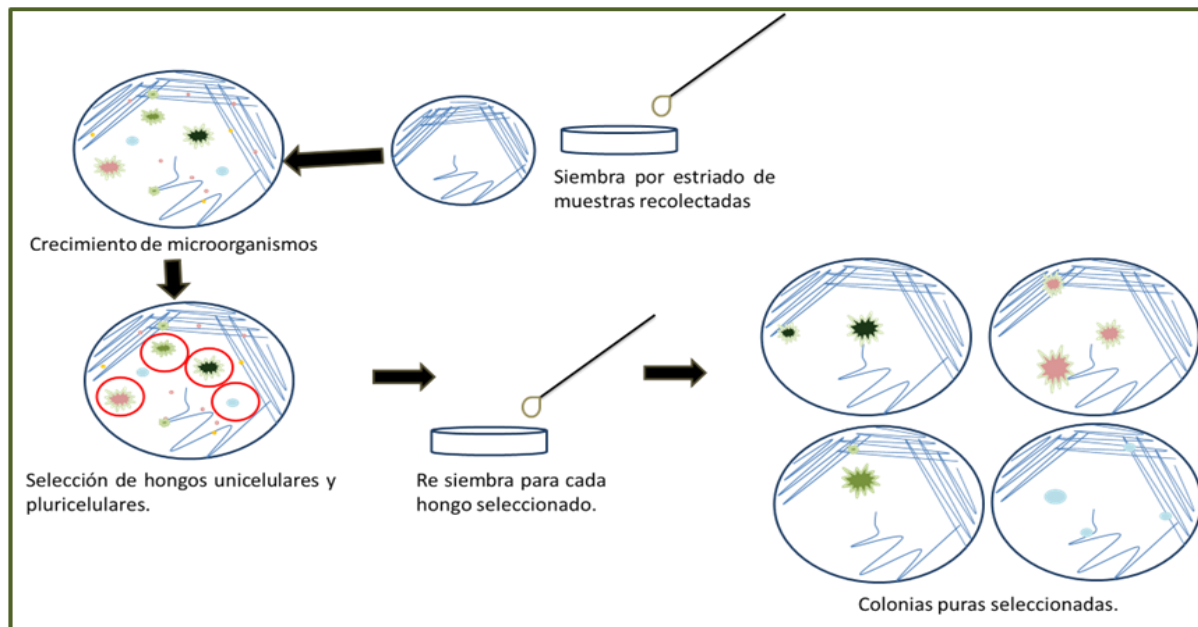


Figura 3. Siembra. Se sembraron las muestras de la recolección, tanto las filtradas y sin filtrar para observar las diferencias en ambos casos, se seleccionó finalmente los hongos y levaduras a estudiar (Fuente: Elaborado por Lucero Vázquez Velasco, 2019).

Alícuotas de las diferentes muestras de agua fueron sembradas en un medio sólido de Agar Papa Dextrosa (PDA) que es selectivo para hongos filamentosos y levaduriformes. En una campana de flujo laminar se realizó la siembra de cada filtrado mediante la técnica de estriado para tratar de separar lo más posible las diferentes capas microbianas presentes en las muestras (hongos, levaduras y bacterias). Se incubaron de 25 a 35°C y se fueron realizando observaciones cada 24 horas hasta su crecimiento. Transcurrido el tiempo se seleccionaron los hongos que presentaban características morfológicas importantes a simple vista, tanto en coloración, tamaño y que no estuvieran contaminados por otros hongos, bacterias o levaduras. La figura 3 muestra la metodología empleada. Al realizar este primer aislamiento se pudieron diferenciar varios tipos coloniales, presumiblemente compuestos por bacterias y/o levaduras. Las colonias correspondientes a los hongos tardaron aproximadamente de 4 a 5 días para poder detectarse en las cajas Petri. Una vez que sucedió lo anterior, las cajas fueron incubadas unos días más hasta poder diferenciar las colonias y apostar a que se trataran de hongos. Aun cuando se utilizó un

medio para hongos, se pudo observar crecimiento bacteriano, lo cual indica la gran cantidad de microbiota existente en las muestras de agua.

Identificación de las cepas de hongos.

Las cepas seleccionadas fueron identificadas mediante pruebas morfológicas y MALDI-TOF MS, en colaboración con la Q.F.B Andrea Rangel Cordero del Laboratorio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ).

Evaluación de características macro y microscópicas

Se evaluaron las características coloniales tomando en cuenta el tamaño de las colonias (diámetro), el color y el tiempo de crecimiento. Se tomaron muestras de cada una de las colonias que posiblemente podrían ser hongos y se observaron sus características microscópicas (hifas, esporas y coloración) empleando azul de algodón (lactofenol). Se procedió a cortar cuadros de cinta adhesiva y con esta se tomó un fragmento del cultivo tocando levemente la superficie del hongo.

Una vez realizado lo anterior la cinta se colocó en un portaobjetos que contenía una gota de azul de algodón y se colocó un cubreobjetos para su vista al microscopio, se utilizaron los objetivos de 10x, 20x, 40x y en algunos casos 100x. Lo anterior dependió del tamaño del hongo (**Fig.4**). Se utilizó el libro “Medical Important fungi: A guide to identification” 5ta Edición. Davise H. Larone y el “Atlas micológico” para la identificación de los hongos, tanto por sus características macroscópicas como microscópicas.

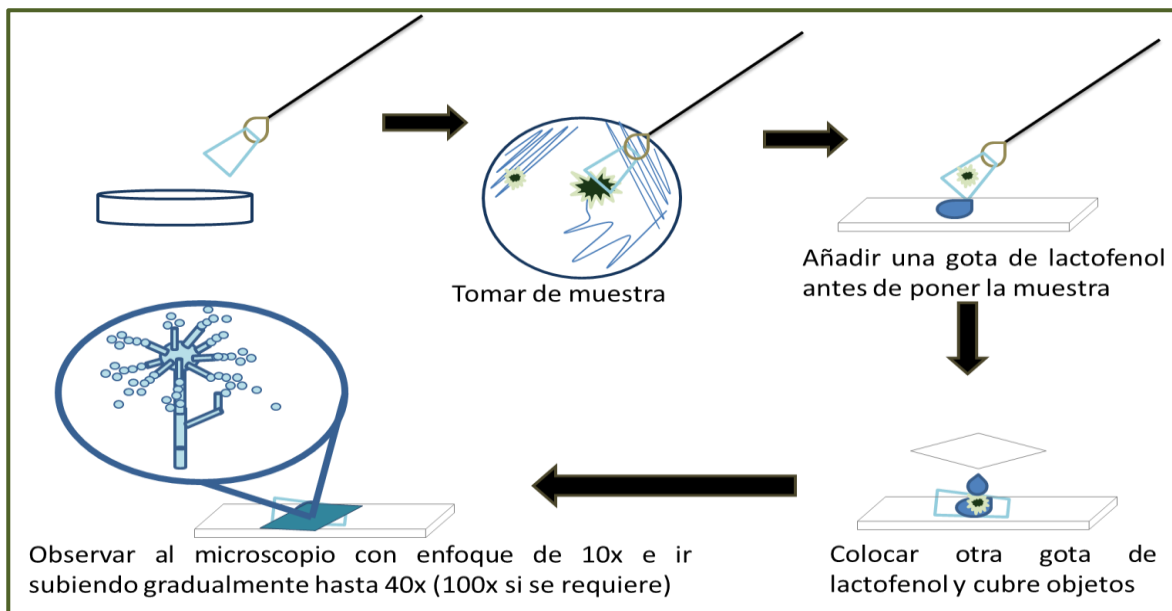


Figura 4. Evaluación de características microscópicas (Fuente: Elaborado por Lucero Vázquez Velasco, 2019).

VITEK2

Para la identificación del hongo levaduriforme se utilizó el equipo de diagnóstico *in vitro* VITEK2 BIOMÉRIEUX utilizando tarjetas AST YEAST de la misma marca del equipo, se procedió con la metodología del fabricante en el caso de cultivos de Agar Sabouraud Dextrosa (SDA), incubando a 35°C por 18 horas en el tiempo del cultivo.

MALDI TOF

Se incubó, de 24 a 48 horas previas a la prueba, una muestra del hongo en un frasco estéril que contenía 10 mL de una solución al 4% del medio líquido SD. Posteriormente este se selló con parafilm y se agitó de forma constante en una placa con la finalidad de que el crecimiento fuera más uniforme. Al finalizar el tiempo de incubación, el frasco se quitó de la placa de agitación y se dejó reposar 15 minutos. Se retiró el medio líquido con una pipeta de transferencia estéril, hasta que solo quedó el hongo en el fondo del frasco de cultivo. La figura 5 muestra el procedimiento empleado.

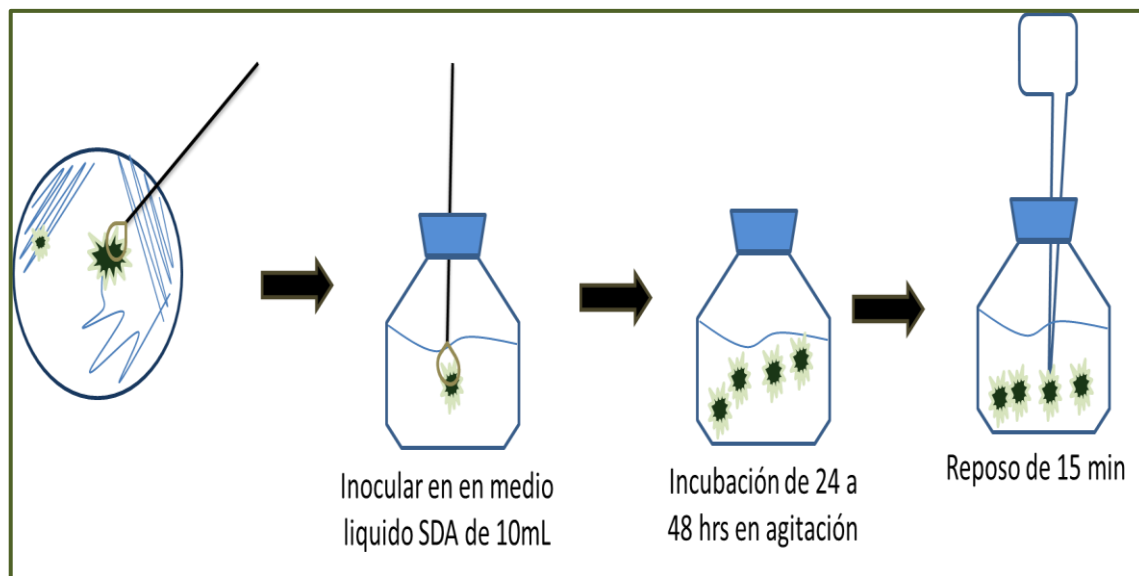


Figura 5. Inoculación y crecimiento de los hongos (Fuente: Elaborado por Lucero Vázquez Velasco, 2019).

Se transfirieron alícuotas a tubos Ependorff de 1.5 mL y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. Posteriormente se retiró el caldo lo más posible cuidando de no tocar el botón recién formado. Este se lavó con agua Milli-Q® (Agua ultrapura) y se puso en vortex por 1 minuto, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 2min y se retiró el sobrenadante quedándose únicamente con el botón. Este paso se repitió por segunda vez. Se realizó un tercer lavado con agua HPLC y puso en vortex por 1 minuto. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos y se retiró el exceso de agua con una pipeta y una punta con filtro. Posteriormente se invirtieron los tubos Eppenforff abiertos sobre un papel absorbente para quitar lo más posible el exceso de agua, se esperaron 10 minutos más y a cada tubo se le adicionaron 300 µL de agua HPLC para homogeneizar en un vortex por 30 segundos a velocidad media. En el mismo tubo se adicionaron 900 µL de etanol grado HPLC (EtOH HPLC) y nuevamente se homogeneizo en un vortex por 30 segundos y los tubos se colocaron en una centrifuga a 14,000 rpm por 2 min. Finalmente se retiró el sobrenadante y se colocaron los tubos Eppendorf con la tapa abierta en una estufa a 65°C para secar mejor la muestra, durante 5 minutos. Cada minuto se revisaban los tubos para evitar dañar las proteínas. La figura 6 muestra el procedimiento.

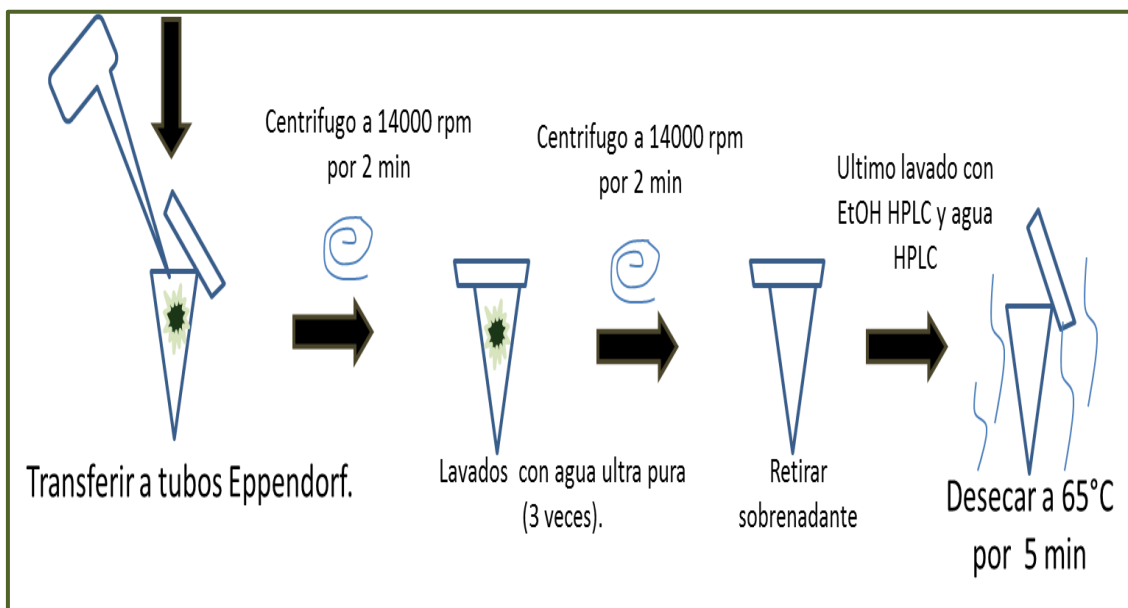


Figura 6. Serie de lavados para retirar el medio de cultivo (Fuente: Elaborado por Lucero Vázquez Velasco, 2019).

En un frasco ámbar se procedió a preparar una solución al 70% de ácido fórmico. Este fue usado para realizar una serie de lavados mediante centrifugación usando entre 30 y 50 μL . Las muestras se dejaron reposar de 10 a 15 min el ácido fórmico. Una vez transcurrido el tiempo se agregó, al mismo tubo, acetonitrilo en la misma proporción que el ácido fórmico al 70% y se dejó en reposo por otros 10 a 15 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se colocaron en un vortex por 1 minuto y se centrifugaron a 14,000 rpm por 2 minutos. Se tomó con una micropipeta y se le colocó una punta con filtro, con ella 1 μL del sobrenadante se agregó a la placa de MALDI-TOF, se dejó secar y se colocó la matriz orgánica, de nueva cuenta se dejó secar y se procedió a meter al equipo para la lectura. La figura 7 muestra los pasos que se siguieron en esta técnica.

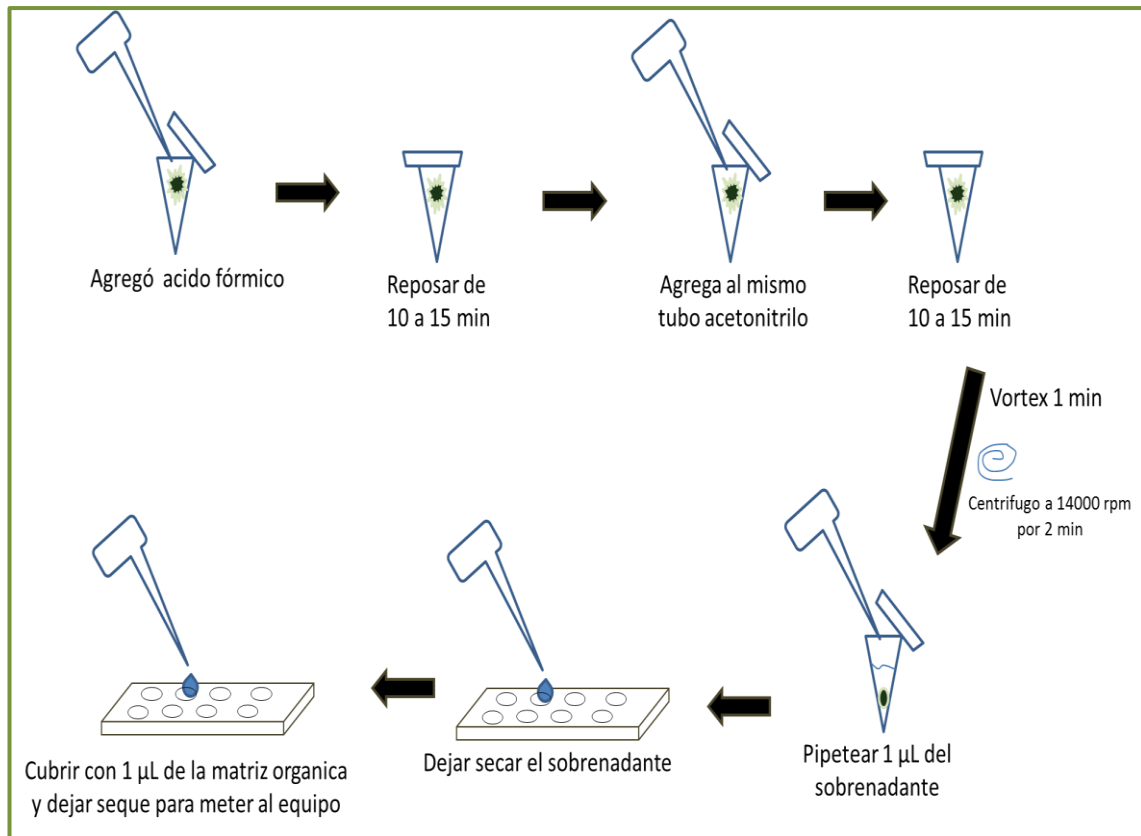


Figura 7. Extracción de proteínas para lectura en placa de metal, en el equipo MALDI-TOF MS (Fuente: Elaborado por Lucero Vázquez Velasco, 2019)

Resultados

A partir de las muestras de agua de los lugares seleccionados que fueron tomadas en el río Papaloapan ($18^{\circ}07'9.6097''N$ $96^{\circ}11'77885.263''E$), Laguna, Col. Linda Vista ($18^{\circ}03'04.6''N$ $96^{\circ}08'14.7''E$) y Arroyo San Jacinto, Col. Moderna ($18^{\circ}03'44.5''N$ $96^{\circ}08'39.0''E$) (**Imagen 1.**), localidades pertenecientes a la ciudad de San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca; se realizó la siembra en placa para posteriormente aislar las colonias de interés. Se hicieron 15 aislamientos para diferenciar los desarrollos levaduriformes, filamentos y bacterianos de cada uno de los aislados. De esta identificación se determinaron 4 aislamientos fúngicos, por lo que cada uno se enumeró en orden, agregando la H correspondiente a hongo y L correspondiente a levadura,

seguida del número del aislado, Se trabajó con los aislados H2, H5, H6 Y L3, de acuerdo a sus características morfológicas, por lo cual se llevó a la siguiente etapa de caracterización e identificación de las cepas encontradas.

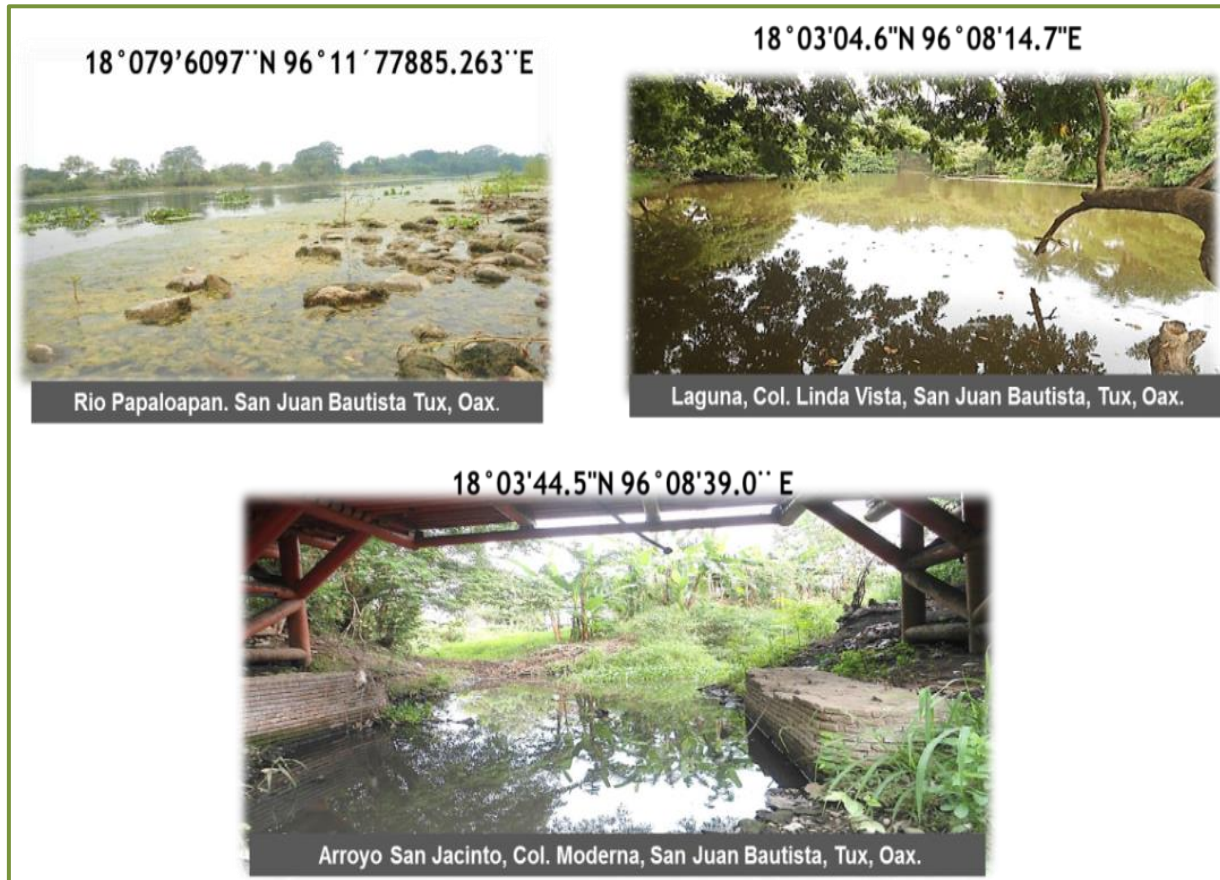


Imagen 1. Sitios estratégicos de recolección de afluentes contaminados, en la ciudad de San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca. Región del Papaloapan. (Acervo personal, Lucero Vázquez Velasco, 2018)

Caracterización de los aislamientos obtenidos.

Las características macroscópicas y microscópicas de las 4 cepas de interés son presentadas en las siguientes figuras. Se utilizó el libro “Medical Important fungi: A guide to identification” 5ta Edición. Davise H. Larone y el “Atlas micológico” del INCMISZ para la identificación de los hongos, tanto de manera macroscópica como microscópica. Las cepas caracterizadas fueron H2 (Aspergillus sp), H5 (Penicillium sp), H6 (Penicillium sp) Y L3 (Cándida sp).

Cepa H5 (*Penicillium sp.*)

Macro morfología: Tamaño de 1.81 cm en crecimiento de 6 días, color verde, superficie umbilicada, textura aterciopelada, liberación de pigmento amarillo.

Micro morfología: Hifa tabicada hialina. Conidios en ramificación y esporas en hilera.

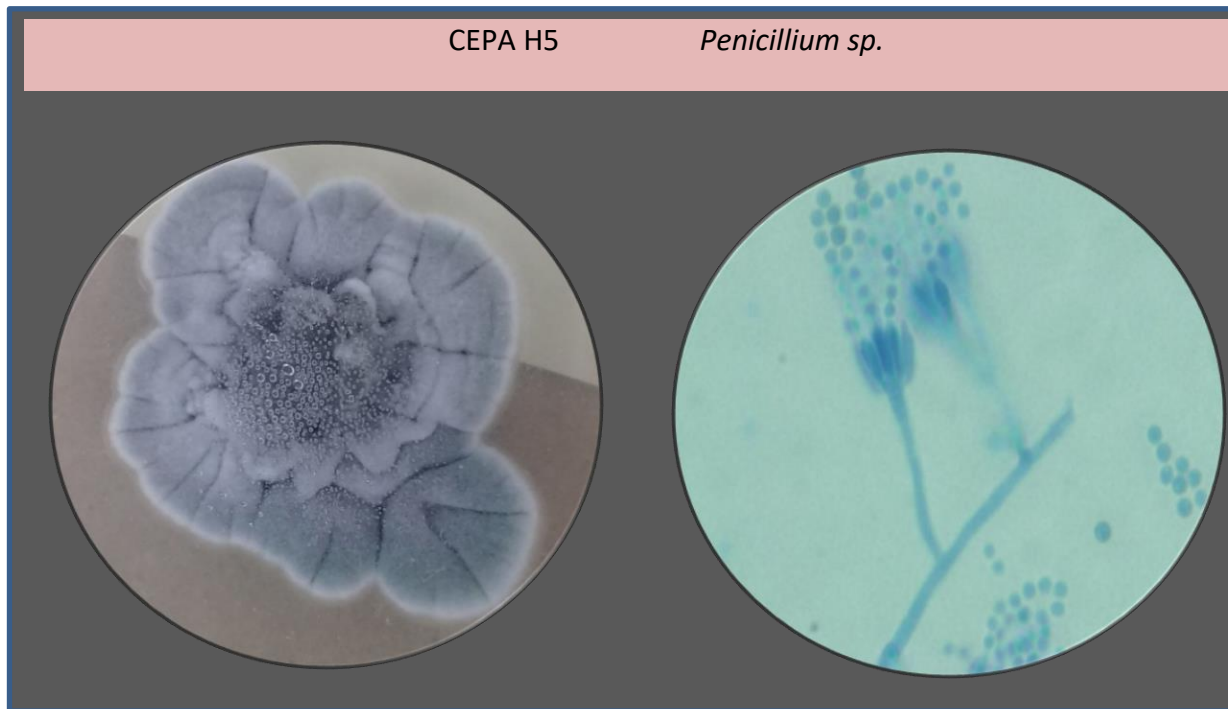


Imagen 2. Macro y micro morfología de la cepa H5 correspondiente a *Penicillium sp.* (Lucero Vázquez. Acervo personal, 2018).

Cepa H6 (*Penicillium sp.*)

Macro morfología: Crecimiento de 1.56 cm en 6 días, color rosa claro, textura algodonosa sin pigmento, superficie convexa.

Micro morfología: hifas septadas hialinas, fialides en forma de frasco y conidias globulosas.

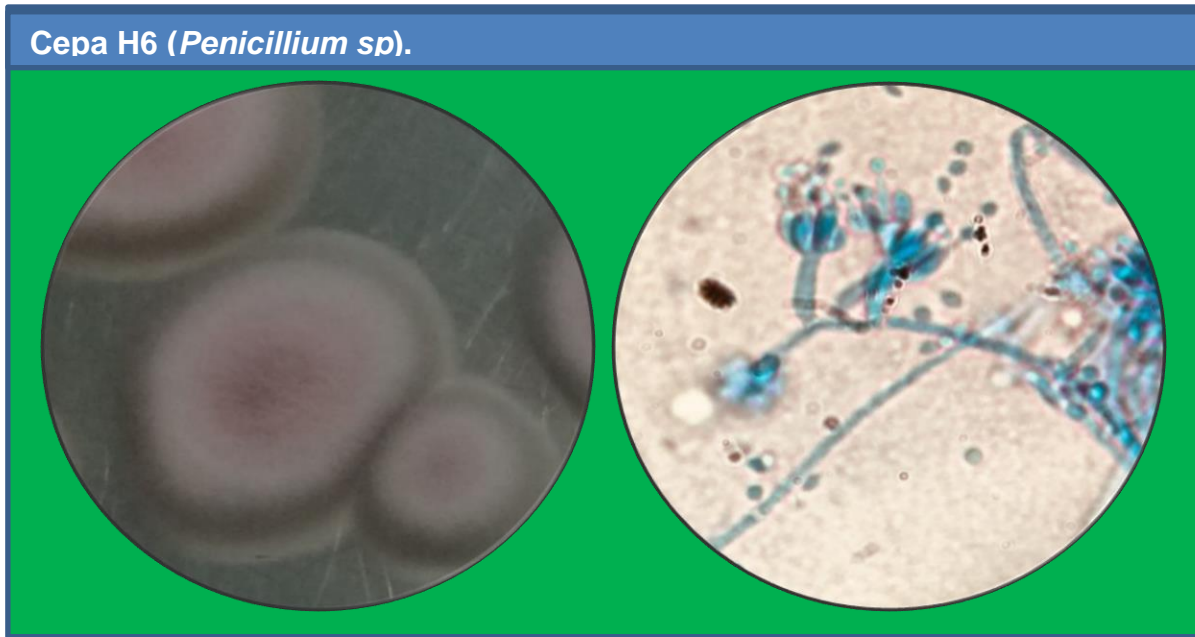


Imagen 3. Macro y micro morfología de la cepa H6 correspondiente a *Penicillium* sp (Lucero Vázquez Velasco, Acervo personal, 2018).

Ambas cepas, la H5 y H6 podrían corresponder al género *Penicillium*, sin embargo, no necesariamente a la misma especie. Como se puede observar en las dos imágenes ni la morfología colonial es diferentes, en una es umbilicada y aterciopelada mientras que en la otra es algodonosa y sin pigmento. Se han reportado con las siguientes características.

Clasificación taxonómica Reino: Fungi; Phylum: Ascomycota; Clase: Eufungi; Orden: Eurotiales; Familia: Trichomaceae y Género: *Penicillium* Habitats naturales Con una sola excepción (*Penicillium marneffe*, hongo termodimórfico), los miembros del género *Penicillium* son hongos filamentosos. Las especies de *Penicillium* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se hallan en el suelo, la vegetación caída, el aire y el suelo.

Cepa H2 (*Aspergillus* sp)

Macro morfología: crecimiento de 2.6 cm en 4 días, color verde limón fuerte, textura pulverulenta, sin pigmento, superficie plana.

Micro morfología: Conidióforo compuesto por una vesícula en el extremo de una hifa, con fiálides y esporas.

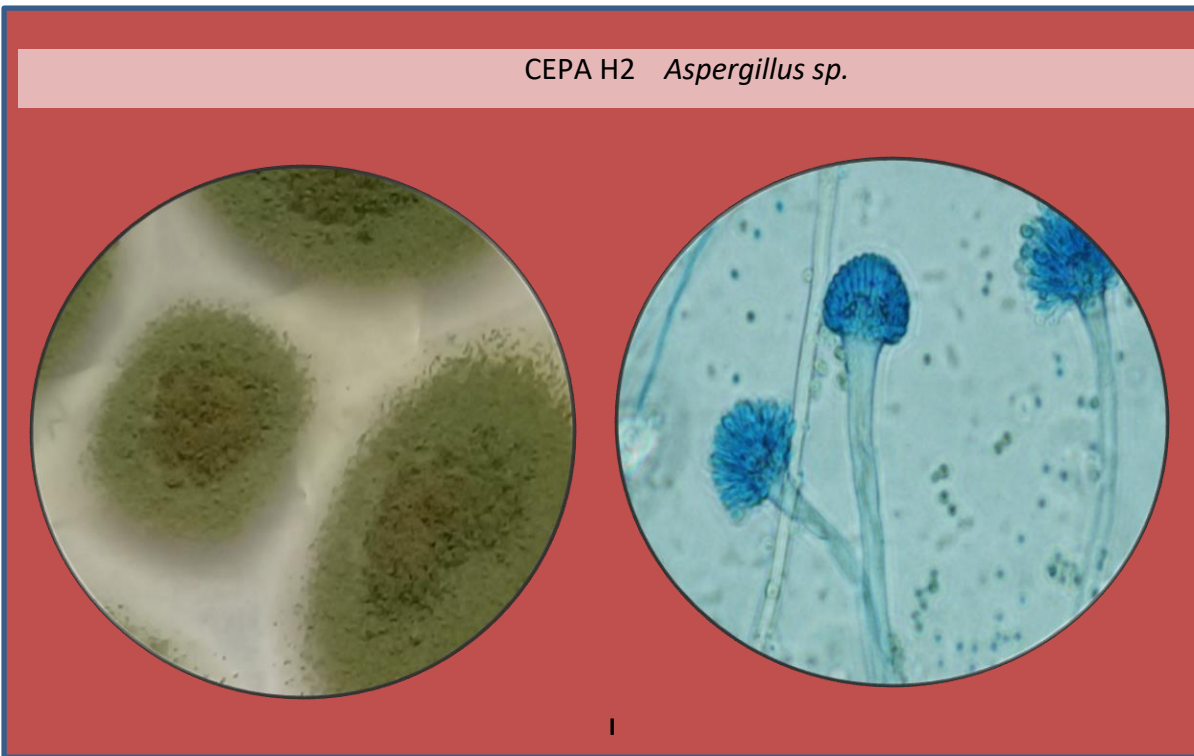


Imagen 4. Macro y micro morfología de la cepa H2 correspondiente a *Aspergillus sp.* (Lucero Vázquez, acervo personal, 2018)

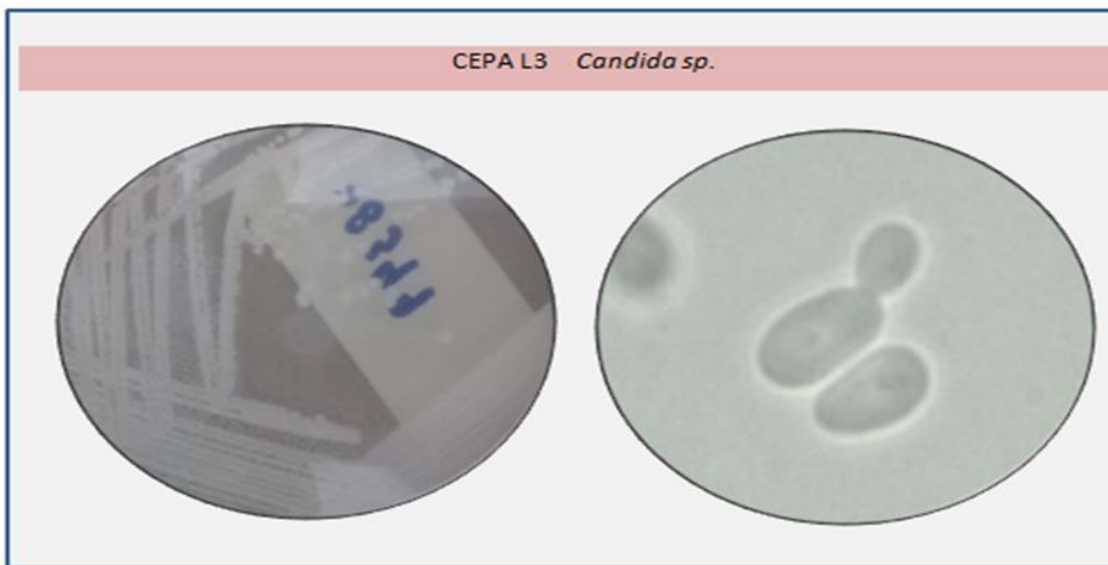
Dentro del género *Aspergillus* se han producido importantes cambios en su taxonomía y la de sus teleomorfos. Desde 1965, el texto por excelencia sobre el género ha sido "The genus *Aspergillus*" de Raper y Fennell. En esta monografía se aceptaban 132 especies subdivididas en 18 grupos. Debido a extensivos estudios se ha reclasificado el género y lo han dividido en 6 subgéneros, cada uno de los cuales dividido a su vez en una o más secciones. Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, por lo que el hombre se encuentra expuesto constantemente a su inhalación.

Cepa L3 (*Cándida sp.*)

Macro morfología: Color blanco, forma circular, elevación convexa en la colonia, borde entero, superficie lisa, aspecto húmedo, consistencia suave, colonia mate y translúcidas.

Micro morfología: Pseudomicelio unicelular presente, en su mayoría abundante, que consiste en cadenas ramificadas de células ovales o alargadas.

Imagen 5. Macro y micro morfología de la cepa L3 correspondiente a *Candida sp.* (Lucero Vázquez, Acervo personal, 2018)



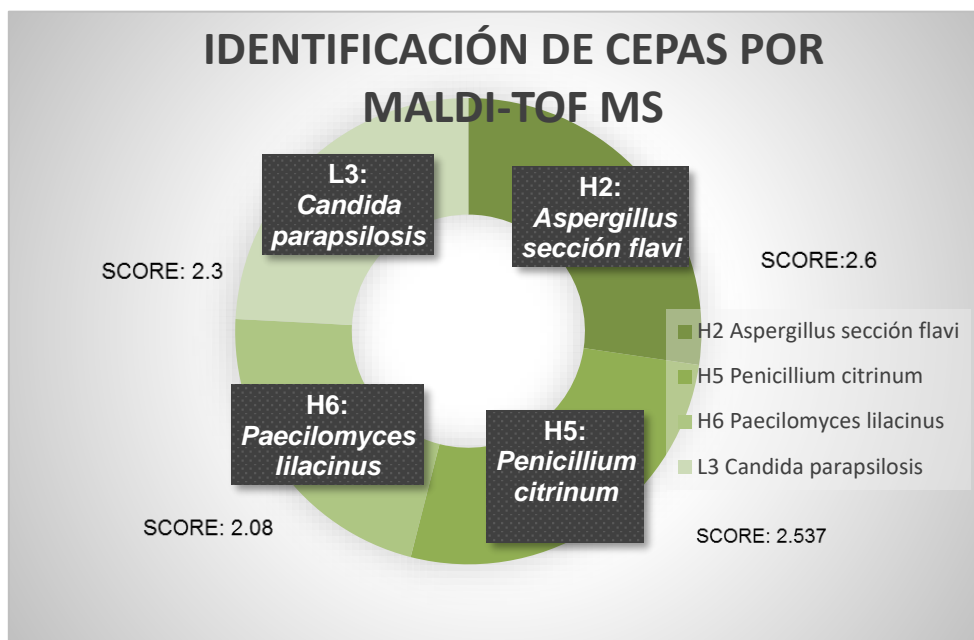
En el género *Cándida* están incluidas 81 especies. La formación de pseudomicelio se encuentra en la mayoría de las especies y variedades. Frecuentemente el pseudomicelio se diferencia en pseudohifa y blastoforos, pudiendo formarse con verdadero micelio y clamidiosporos. Los artrosporos, ascosporos, teliosporos y balistosporos no son encontrados. En cuanto al metabolismo, muchas especies de *Cándida* presentan habilidades fermentativas y oxidativas, mientras que otras son estrictamente oxidativas. Todos los carbohidratos fermentados son asimilados, sin embargo, no todas las especies con habilidades asimilativas son también fermentativas.

El género *Cándida* provoca candidiasis, la cual es un grupo de enfermedades frecuentes e incluso se puede afirmar que prácticamente todas las personas a lo largo de su vida la padecerán alguna vez. Existen tres tipos de micosis humanas: superficiales, intermedias y profundas. Las más habituales son las superficiales y las candidiasis.

Identificación de cepas:

Las cepas H2, H5 y H6 de hongos filamentosos fueron identificadas por la técnica de MALDI-TOF del equipo Bruker®, con la librería (BK) (MBT_DB_5627_MSP list, Filamentous Fungi Library 1.0, Bruker Daltonics), por lo que existe una buena identificación, ya que el fabricante indica que scores mayores a 1.9 son bastante confiables en la identificación del género y especie en hongos y en levaduras. (Maldonado et. al., 2017). La gráfica 2 muestra la técnica empleada.

En el caso de la cepa L3, también se utilizó el equipo de tarjetas YST de VITEK2 Biomeriux para obtener una segunda identificación aún más confiable, demostrando una confiabilidad del 94% en la identificación de género y especie.



Grafica 2. Identificación por MALDI-TOF MS (Fuente: Elaborado por Lucero Vázquez Velasco, 2019)

Conclusiones.

1. La contaminación ambiental está originando que muchos microorganismos comiencen a expresar mecanismos de resistencia, los cuales se están estudiando para poder implementar técnicas de biorremediación para eliminar tóxicos como los metales pesados.
2. La selección de las cepas se llevó a cabo en base a la macro y micro morfología presentada en cada caja, posterior a la siembra de muestras recolectadas, siendo la siembra por picadura la

mejor técnica para la siembra de hongos filamentosos y la siembra por estriado para re siembra en levadura.

3. La cepa H2 (*Asperillus* sección flavi), L3 (*Candida parapsilosis*), H5 (*Penicillium citrinum*) y H6 (*Paecilomyces lilacinus*) seleccionadas, se identificaron de manera satisfactoria, con buenos resultados en identificación de género y especie por MALDI-TOF MS, siendo de gran ayuda la librería proporcionada por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran.

Perspectivas

Aún quedan varias actividades que se pueden desarrollar para integrar el trabajo en la implementación de los microorganismos encontrados, para investigación de resistencia a metales pesados. Conociendo los mecanismos de detoxificación y remoción de estos contaminantes.

Determinación de la capacidad de absorción de metales pesados, con ensayos en cada cepa encontrada.

Que genes actúan en la resistencia de metales pesados, para potencializar su capacidad.

Evaluar los procesos de resistencia y susceptibilidad hacia los metales mencionados para tratar, posteriormente, de usarlos como posibles organismos secuestradores de metales pesados en un proceso de biorremediación.

Referencias.

Alloway, B. J. (2013). Heavy Metals in Soils - Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. In Springer.com (3rd ed., pp. 97–141). Recuperado de <https://www.springer.com/gp/book/9789400744691>

Beltrán-Pineda, M. E., y Gómez Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. Revista Facultad de Ciencias Básicas, 12(2), 172–197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>

- Cervantes, C., y Gutiérrez-Corona, F. (1994). Copper Resistance Mechanisms in Bacteria and Fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2), 121–137. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00083.x>
- Cervantes C. y Moreno Sánchez R. (1999) “Contaminación ambiental por metales pesados” México: A. G. T. Editor, S. A. ISBN-968-463-093-X
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., y Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 335–347. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x>
- CONAGUA. (2018). DOF - Diario Oficial de la Federación. Recuperado October 09, 2019, de [Dof.gob.mx](http://www.dof.gob.mx) website: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5512819&fecha=12/02/2018
- Covarrubias, S. A., y Peña Cabriales, J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(esp01), 7–21. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.esp01.01>
- Das, N. (2010). Recovery of precious metals through biosorption — A review. *Hydrometallurgy*, 103(1–4), 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.03.016>
- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA) (2010). Recuperado de European Food Safety Dietary reference values for wáter, *EFSA Journal*. 8(3): 1459-1507. Authority website: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1459>
- Galicia. J. A. (2013). “Efecto de la exposición a plomo en bacterias aisladas de afluentes contaminados”, (pp. 76, 86-88). Universidad del Papaloapan.
- García Hernández, M. (2004). “Aislamiento e identificación de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados en una planta de tratamientos de agua

residual”, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas (pp. 3–11).

González Rico, D., Martín-González, A., Díaz, S., de Lucas, P., y Gutiérrez, J.-C. (2009). Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 149(1), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.016>

Gutiérrez Corona F., Obregón Herrera A. y Cano Canchola C. (1999). Resistencia a los metales pesados en hongos. En I. Cervantes C. y Moreno R., *Contaminación ambiental por metales pesados* (pp. 78-97). México: A. G. T. Editor, S. A.

Gutknecht, 1981; Karniski, L. (1921). “Hg²⁺ and Cu⁺ Are Ionophores, Mediating Cl⁻/OH⁻ Exchange in Liposomes and Rabbit Renal Brush Border Membranes”. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(27).

Jaramillo, L. F. Sala, S. I. García, J. C. González, M. I. Frascaroli, S. Bellú, F. Mangiameli, P. Blanes, M. H. Mogetta, V. Andreu, A. M. Atria, and J. M. Salas, (2010). “Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho,” *An. la Real Soc. Española Química*, vol. 106, no. 2, pp. 114-120

Kone, B. C., Brenner, R. M., & Gullans, S. R. (1990). Sulfhydryl-reactive heavy metals increase cell membrane K⁺ and Ca²⁺ transport in renal proximal tubule. *The Journal of Membrane Biology*, 113(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/bf01869600>

Lozano Ramos, J. M., Soto Galera. E. (2017). Actualización del inventario de peces dulceacuícolas del río Papaloapan, Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, 2011, Informe final SNIB CONABIO proyecto No. FM017. México D. F

Maldonado I., García Ramírez D., Striebeck P., Lafage M., Fernández Canigia L., (2017) “Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales”, *Revista Argentina de Microbiología*, Volume 49, Issue 1, Pages 7-14, ISSN 0325-7541, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.001>.

- OM (Institute of Medicine of the National Academies). (2004). Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate. National Academies Press, Washington, DC., (4), 73–185.
- Pillichshammer, M., Pümpel, T., Pöder, R., Eller, K., Klima, J., & Schinner, F. (1995). Biosorption of Chromium to Fungi. *Biometals*, 8(2), 117–121. <https://doi.org/10.1007/bf00142010>
- Sierra Álvarez, M. R. (2007). Fungal bioleaching of metals in preservative-treated wood. *Process Biochemistry*, 42(5), 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.01.019>
- UNESCO. (2019). WWAP | Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Retrieved July 14, 2017, from Unesco.org website: <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/>
- Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., & Ruan, C. (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*, 174(1–3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.113>