



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**Aislamiento de hongos tolerantes a metales
pesados a partir de desechos
mineros.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

María del Pilar Díaz Pérez

ASESORADA POR M. C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

1994

T
OR100
D5
E.1

T
QR100
D5
C.1



1080076892



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**Aislamiento de hongos tolerantes a metales
pesados a partir de desechos
mineros.**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

María del Pilar Díaz Pérez

ASESORADA POR M. C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

1994

T
GR100
D5



DEDICATORIAS

A DIOS:

Porque me ha dado la dicha de vivir esta vida, llegar a este momento tan anhelado y contar con gente tan maravillosa que ha estado a mi lado.

A MIS PADRES, MARTHA Y MANUEL:

Gracias a ellos por:

Brindarme su amor y comprensión,

Ser un refugio de paz donde puedo tranquilizar mis angustias,

Infundirme valor en los momentos más difíciles y así poder salir adelante,

Apoyar y respetar mis ideas y proyectos,

Compartir mis fracasos pero también mis logros,

Ayudarme a tomar el camino correcto en la vida,

Confiar en mí y estar siempre a mi lado,

Permitirme alcanzar una de mis metas, que de no haber sido por ellos no lo hubiera logrado.

A MIS HERMANAS, LAURA Y ROCIO:

Por creer en mí y darme todo su apoyo de una forma incondicional.

A MIS AMIGOS:

Por brindarme su amistad, compartir los momentos difíciles y los alegres, así como por darme esas palabras alentadoras cuando más lo necesitaba.

A MI ASESOR, EL PROFESOR ISMAEL:

Por su gran ayuda, paciencia y sus acertados consejos.

A mis profesores, a la Facultad de Ciencias Químicas y a toda la gente que de una u otra forma me han apoyado.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	
GENERALIDADES	2
Interacción de los microorganismos con el ambiente	3
Influencia de los factores fisicoquímicos	5
en la toxicidad de metales pesados	6
Resistencia de microorganismos al	
efecto tóxico de los metales	6
Interacción entre metales tóxicos y hongos:	
Precipitación extracelular y acomplejamiento	7
Unión de metales a la pared celular	7
Transporte de cationes metálicos tóxicos	8
Atrapamiento intracelular de metales tóxicos	8
Transformación de metales	9
Remoción de iones metálicos por precipitación	
de la superficie de microorganismos	9
ANTECEDENTES	10
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS PARTICULARES	13
MATERIAL Y METODOS	
Desechos mineros	14
Localización geográfica de Zimapán	14
Aislamiento de los hongos	16
Siembra por suspensión de esporas	16
Prueba de resistencia en placa	17
RESULTADOS	25
DISCUSION	26
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFIA	29

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA No. 1. Dispersión de metales en suelo y agua a nivel mundial	3
TABLA No. 2. Hongos resistentes a metales pesados aislados a partir de desechos mineros	19
TABLA No. 3. Análisis de resistencia de los diferentes hongos analizados.	20
TABLA No. 4. Alteraciones en el color de las colonias	21

INDICE DE FOTOGRAFIAS

	PAGINA
FOTO No. 1. Características macroscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> 2 sembrado en medio AEM adicionado con 500 ppm de plomo	22
FOTO No. 2. Características macroscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> 2 sembrado en medio AEM adicionado con 500 ppm de zinc	23
FOTO No. 3. Características macroscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> 2 sembrado en medio AEM adicionado con 200 ppm de mercurio	24

RESUMEN

Los desechos mineros han inducido una gran variedad de alteraciones ecológicas y ambientales, además de contaminar con metales diversos nichos ecológicos, entre los que se encuentran tierras de cultivo para la obtención de diferentes productos, así como fuentes acuíferas para el consumo humano, aunque estos desechos pueden ser potencialmente aprovechables (obtención de oro, materiales para la construcción, etc.)

Por otro lado, no hay estudios evaluativos de los efectos que los metales pesados contenidos en los jales (desechos mineros) ocasionan al ambiente y a la flora microbiana en general, por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar cepas de hongos tolerantes a diferentes metales pesados a partir de desechos de una mina del pueblo de Zimapán (Hidalgo), para en un futuro tratar de utilizar su biomasa celular para eliminar metales pesados de aguas residuales; sembrando diferentes diluciones de las mismas en Agar Extracto de Malta adicionado con 200 ppm de cobre, e identificando las colonias en Agar Sabouraud Dextrosa.

Posteriormente se realizó la prueba de resistencia en placa con diferentes metales pesados. Se aislaron 5 *Aspergillus flavus* y 2 *Aspergillus fumigatus*, los cuales presentan diferente resistencia a metales pesados. Todos son resistentes a 200 y 500 ppm de plomo, presentan muy poca resistencia a 200 y 500 ppm de plata, mientras que no son resistentes a ninguna concentración de cadmio, arsénico y mercurio. También presentan alteraciones morfológicas (diferentes colores en las colonias)

INTRODUCCION

GENERALIDADES

Los metales han atraído la atención de la ciencia y del público en general dada su reconocida importancia económica, así como los problemas derivados de su uso y explotación industrial. Se ha estimado que, a nivel mundial, el volumen de toneladas de metales pesados liberados en la biósfera anualmente se ha incrementado notablemente en muchos sitios. Los metales han comenzado a acumularse alarmantemente en las cadenas alimenticias y en fuentes de agua antes potable; se calcula que, debido a la cantidad de agua necesaria para diluir los metales a niveles no tóxicos, el problema a nivel mundial es mayor que el representado por la suma total de compuestos orgánicos y radiactivos.

A nivel mundial, los suelos son contaminados por una gran variedad de sustancias y productos naturales o producidos por las actividades humanas, entre las que se encuentran: desechos agrícolas, alimenticios, animales, aserraderos, industrias madereras, basura urbana, lodos de desagües municipales, basura sólida de manufactura metálica, desechos de carboeléctrica, fertilizantes y desperdicios mineros. En la tabla 1 se muestran los valores medios, en miles de toneladas, de la producción de metales contaminantes inducida por la actividad humana, reportada de manera global (Cairns, 1991).

Cuando los ecosistemas sufren alteraciones en sus ciclos biogeoquímicos naturales, principalmente ocasionados por descargas de contaminantes al ambiente, ocurre con frecuencia que los organismos nativos respondan cambiando sus actividades fisiológicas y bioquímicas. Esta respuesta puede ser de tal grado que sólo aquellas especies más tolerantes al contaminante sean las que permanezcan. Dichas poblaciones microbianas son las que van a empezar a repoblar esas zonas contaminadas y que pueden tener uso en la biorremediación y restauración. (Summers y Silver, 1978).

Existen varias razones que justifican el uso de microorganismos y poblaciones microbianas en la evaluación de riesgos ambientales:

- * El importante papel ecológico que estos organismos tienen en los ecosistemas.
- * La gran diversidad trófica contenida en las comunidades microbianas ayudan a evaluar respuestas a contaminantes en muchas especies al mismo tiempo.
- * Los tiempos de reproducción que tienen los microorganismos permiten observar respuestas ante contaminantes en varias generaciones de ellos y las diferentes fases de ciclos de vida de cada uno en un espacio de tiempo corto.

**TABLA No. 1. DISPERSION ANUAL DE METALES
EN SUELO Y AGUA A NIVEL MUNDIAL (Cairns, 1991)**

<i>Metal</i>	<i>Cantidad (Miles de Toneladas)</i>
As	120
Cd	30
Cu	2150
Hg	11
Mo	110
Ni	470
Pb	1160
Sb	72
V	71
Zn	2340

Interacción de los microorganismos con el ambiente

Los microorganismos se encuentran en la naturaleza en contacto con gran variedad de compuestos químicos, algunos de los cuales pueden aprovecharse como nutrientes, mientras que otros, por su concentración o toxicidad, resultan perjudiciales al funcionamiento de las células microbianas. Entre estas sustancias están los iones metálicos y sus derivados, presentes en el ambiente debido a procesos geológicos naturales y por contaminación inducida por el hombre.

Algunos microorganismos poseen la capacidad de interaccionar con algunos iones metálicos. Estos iones pueden dividirse en tres grupos (Silver, 1983)(Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de los iones que interaccionan con los microorganismos (Silver, 1983)

Grupo a) Iones Esenciales:

Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} .

Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} .

Grupo b) Iones Abundantes, Pero Comúnmente No Esenciales:

Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- .

Grupo c) Iones No Esenciales y Tóxicos:

AsO_2^- , AsO_4^{3-} , CrO_4^{2-} , $Cr_2O_7^{2-}$, TeO_3^{2-}

Grupo a) Comprende los iones esenciales para el crecimiento celular. Pueden ser macronutrientes, normalmente requeridos en concentraciones elevadas como el magnesio, potasio, sulfato, fosfato; o micronutrientes necesarios en pequeñas cantidades, como zinc, cobre, cobalto, hierro y níquel. Algunos de los micronutrientes esenciales son sumamente tóxicos cuando sobrepasan las concentraciones requeridas por las células. Para los iones indispensables, los microorganismos han desarrollado sistemas específicos de transporte localizados en la membrana celular, que se encargan de captar los iones del ambiente extracelular y transportarlos al citoplasma para su utilización.

Grupo b) Incluye los iones que, siendo abundantes en la naturaleza, no son esenciales para el desarrollo. En este grupo se encuentran los iones de sodio, calcio y cloruro, para los cuales los microorganismos poseen también vías específicas de transporte de membrana, aunque frecuentemente el flujo de transporte es inverso: Las células excretan los iones del citoplasma hacia el exterior impidiendo su acumulación.

Grupo c) Un tercer grupo de iones abarca aquellos que sin poseer función biológica conocida, ejercen un efecto tóxico sobre los microorganismos. Entre ellos se incluyen varios metales pesados, tales como As, Cd, Hg, Ag, Pb, Te, etc. Los microorganismos, como es de esperarse, no poseen en su membrana sistemas de transporte específicos para estos iones perjudiciales; sin embargo, algunos de ellos, gracias a su similitud química con los iones esenciales, "engañan" a los sistemas fisiológicos de captación y son transportados al citoplasma celular con los consecuentes efectos deletéreos.

Influencia de los Factores Físicoquímicos en la Toxicidad de Metales Pesados

Los componentes ambientales físicos, orgánicos e inorgánicos pueden influir marcadamente en la disponibilidad y toxicidad de los metales pesados en ambientes acuáticos y terrestres (Gadd y Griffiths, 1980; Babich y Stotzky, 1977, 1980).

1) ***El pH.***- Un descenso en el pH incrementa la disponibilidad de los metales pesados, cerca de la neutralidad pueden formar hidróxidos y carbonatos insolubles. Sin embargo, existen ejemplos en los cuales la toxicidad en microorganismos como los hongos no se afecta por cambios de pH (Starkey, 1973), a veces la toxicidad es reducida a un valor de pH cerca de la neutralidad (Babich y Stotzky, 1980) o el más extremo de los casos, ocurre la tolerancia a metales en condiciones ácidas (Starkey, 1973; Stokes y Lindsay, 1979).

2) ***Minerales.***- Los minerales arcillosos, pueden absorber muchos metales pesados y reducir por tanto la toxicidad (Babich y Stotzky, 1977). Esto se debe al potencial de intercambio catiónico tan alto de los minerales arcillosos.

3) ***Materia Orgánica.***- Los disolventes y particularmente la materia orgánica presentes en el ecosistema pueden influir en la movilidad y disponibilidad de los metales pesados y por tanto en su toxicidad. Los tipos de materia orgánica que influyen en la toxicidad de los metales pesados incluyen quelantes sintéticos (ejemplo ácido dicarboxílico, aminoácidos, ácidos húmicos, exudados orgánicos como microbios acuáticos y raíces de plantas), y complejos de sustancias orgánicas solubles (ej., extracto de levadura, peptona y ácidos húmicos). (Babich y Stotzky, 1980)

4) ***Aniones Inorgánicos.***- La composición de aniones inorgánicos en el ambiente influye en la especiación (forma en que un ión o un metal en solución o unido a un sólido y depende de la presencia de ligandos (aniones) con los cuales forma complejos solubles o que pueden estar unidos a un sólido, Stumm, W; y Morgan, J. J; 1981) y, por consiguiente, en la toxicidad de metales pesados en los microbios, formando complejos de coordinación con aniones inorgánicos como hidróxidos y cloruros. (Summer y Silver, 1978).

5) ***Cationes Orgánicos.***- La presencia de éstos puede afectar la toxicidad de metales pesados en microbios, como resultado de la competencia de las formas catiónicas de metales pesados con sitios aniónicos en las superficies celulares. Se conoce que especialmente el magnesio puede disminuir la toxicidad de algunos metales pesados en microbios; por ejemplo, incrementando los niveles de Mg en el medio decrece la toxicidad de Ni en varios hongos filamentosos (Babich y Stotzky, 1980, Armstrong, 1964).

6) ***Dureza del Agua.***- La dureza del agua favorece la precipitación de metales.

7) **La Temperatura.-** Este parámetro afecta la toxicidad de metales pesados en los microorganismos, como resultado del efecto en el estado fisiológico de células.

8) **Potencial Oxido-Reducción.-** El potencial redox (E) del ambiente puede afectar la disponibilidad y toxicidad de los metales pesados. En los ambientes reductores el E es negativo; sin embargo, en los ambientes oxidantes el E es positivo. Los metales pesados depositados en el ambiente con E (-) pueden combinarse con S^{2-} para formar sulfuros que no están disponibles para los microbios y por lo tanto no son tóxicos. El potencial redox afecta las cargas de los metales; por ejemplo, el Cr puede existir como Cr^{3+} ó Cr^{6+} , dependiendo del potencial redox en que se encuentre. El Cr^{6+} es más tóxico que el Cr^{3+} para el crecimiento del micelio y germinación de esporas de *Rizopus stolonifer.*, *Trichoderma viride*, *Penicillium verniculatum*, y *Aspergillus giganteus* (Babich y col., 1977). Interacciones similares con los metales pueden ocurrir con componentes de medios de cultivo utilizados en el laboratorio con aniones, cationes, y sustancias como agar, peptona y extracto de levadura o agentes acomplejantes como el ácido etilendiaminotetraacético y ácido cítrico

Resistencia de Microorganismos al Efecto Tóxico de los Metales

La presencia de metales pesados en el ambiente ejerce un efecto inhibitorio sobre los microorganismos pero, por otro lado, hace que se desarrollen variantes resistentes al efecto tóxico de aquellos. Dos mecanismos fundamentalmente diferentes son responsables para la acumulación de metales pesados por microorganismos: a) la absorción, que es una captura intracelular con sistemas de transporte activo; b) la adsorción, un proceso de unión pasiva a estructuras externas como la pared celular, la cápsula y materiales extracelulares como polisacáridos. Ambos mecanismos se han detectado durante la acumulación de plata por los hongos (Belly y Kidd, 1982).

En general, el mecanismo de acción tóxica de los metales pesados es el bloqueo o interferencia de la función de las proteínas; es decir, ocurre el desplazamiento de activadores o cofactores, necesarios para la síntesis o acción de una determinada proteína, lo que ocurre con el desplazamiento de algunos oligoelementos metálicos indispensables para que se complementen algunas reacciones enzimáticas como ocurre con los grupos sulfhidrilo. Otras interacciones importantes referentes a la toxicidad son los complejamiento con vitaminas y con ácidos nucleicos.

INTERACCION ENTRE METALES TOXICOS Y HONGOS

Precipitación Extracelular y Acomplejamiento

Muchos hongos producen compuestos extracelulares que precipitan los metales pesados. El ácido cítrico puede quelar metales y el ácido oxálico puede interactuar con iones metálicos para formar cristales de oxalato insoluble alrededor de las paredes celulares y en el medio (Murphy y Levy, 1983; Sutter y col., 1983). Las levaduras pueden producir H₂S precipitando a los metales como sulfuros insolubles, predominantemente alrededor de las paredes celulares. Se ha descrito que en cepas de *S. cerevisiae* crecidas en medio con cobre resultan colonias que pueden formar sulfuro de cobre (Ashida y col., 1983). Muchos hongos y levaduras presentan moléculas con alta afinidad para enlazar hierro, llamadas sideróforos (Senesi y cols; 1987).

Unión de Metales a la Pared Celular

La pared celular es el primer sitio de interacción con especies metálicas; la remoción de metales de la solución depende del tipo y concentración del metal, factores ambientales y biomasa. La asociación de algunos iones metálicos a las paredes de los hongos puede deberse a: la carga del mismo, a la absorción, al acomplejamiento, precipitación y cristalización (Mullen y col., 1992). La pared celular está compuesta por polisacáridos, algunos de los cuales están asociados a proteínas o con otros componentes que incluyen lípidos y melaninas. Todos los hongos filamentosos a excepción de los *Oomycetes* contienen quitina y quitosana, las cuales son polímeros de N-acetilglucosamina y D-glucosamina, respectivamente.

La quitina y la quitosana participan en la bioabsorción de metales en la pared celular de los hongos; el contenido de estos polisacáridos puede variar durante las diferentes etapas de desarrollo de los hongos. (Bartnicki García, 1968)

Se conoce una variedad de iones metálicos que son unidos por la quitina, aunque el Ca²⁺ y Mg²⁺ no son atrapados (Muzzarelli y col., 1986).

Los pigmentos de hongos (melaninas) se encuentran como depósitos dentro y/o en el exterior de la pared celular. Los polímeros fenólicos y melaninas de hongos contienen unidades fenólicas, péptidos, carbohidratos, hidrocarburos alifáticos y ácidos, los cuales presentan muchos posibles sitios de unión a metales (Saiz-Jiménez y Shafizadeh, 1984; Senesi y cols., 1987; Sakaguchi y Nakajima, 1987).

Transporte de Cationes Metálicos Tóxicos

Las membranas plasmática y vacuolar son los principales sitios de transporte de metales en hongos. (Sanders, 1988).

Las ATPasas de la membrana plasmática y vacuolar están asociadas al transporte de iones, con la compartimentalización intracelular y la regulación de pH intracelular (Jones and Gadd, 1990). El transporte acarreador de K^+ fué el primero en describirse, aunque incluye otros iones como Rb^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ y NH_4^+ pueden ser transportados con baja afinidad (Jennings y col. 1958; Armstrong, 1964). mientras que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} pueden ser acarreados por la vía de transporte de K^+ , ya que la afinidad por este catión es muy baja (Borst-Pawels, 1981).

Atrapamiento Intracelular de Metales Tóxicos

Otros mecanismos de interacción entre metales tóxicos y hongos , incluyen:

a) Proteínas y péptidos de hongos filamentosos y levaduras que son capaces de quelar metales .

Los hongos sintetizan proteínas de bajo peso molecular (10 kilodaltones) llamadas metalotioneínas, las cuales son ricas en cisteína, y que se sintetizan en presencia de metales. Estas proteínas están ampliamente distribuidas por todos los organismos vivientes (mamíferos incluyendo humanos, plantas, hongos y cianobacterias). Se ha propuesto que están involucradas en una gran variedad de procesos celulares que incluyen: almacenaje de metales, eliminación de metales, diferenciación, control y metabolismo, y respuesta a la luz ultravioleta. (Cervantes y Gutiérrez, 1994)

b) Compartimentalización vacuolar. Las vacuolas de los hongos son organelos con diferentes funciones como degradación macromolecular, almacenamiento de metabolitos y de iones de citosol y homeostasis (Wiemken, y cols., 1979; Jones y Gadd, 1990).

Las vacuolas de los hongos tienen un papel importante en la regulación de las concentraciones citosólicas de algunos iones metálicos, por medio de funciones esenciales metabólicas y por eliminación de iones potencialmente tóxicos. Muchos iones, incluyendo el fosfato inorgánico así como cationes monovalentes y divalentes, se encuentran preferentemente en las vacuolas (Ohsumi y col., 1988). Los polifosfatos tienen una función importante en la compartimentalización de iones y su biosíntesis está acompañada de una acumulación de Mg^{2+} o Mn^{2+} en la vacuola (Okorokov y col., 1980). El Zn^{2+} acumulado en las vacuolas de las levaduras se encuentra asociado con los polifosfatos.

Transformación de Metales

Los hongos, así como otros microorganismos, pueden efectuar transformaciones químicas de metales, por ejemplo: oxidación, reducción, metilación y desalquilación (Gadd, 1992a). Algunas enzimas efectúan transformaciones de metales a formas menos tóxicas y/o más volátiles que la original. Existen bacterias resistentes a mercurio, como consecuencia de la operación de un mecanismo de reducción mediada por un plásmido de Hg^{2+} a Hg^0 . En hongos y levaduras ocurre algo similar (Vonk y Sijpesteijn, 1973; Brunker y bott, 1974), pues se ha observado que ocurre la reducción de Ag^+ a Ag^0 , la cual es depositada alrededor de las células (Kierans y col., 1990). Los metales tóxicos como Hg, Pb, Tl, Pd, Pt, Au, Sn y Cr, y metaloides como As y Se, pueden ser metilados por microorganismos (Thayler y Brickman, 1982).

Remoción de iones metálicos por precipitación de la superficie de microorganismos

La precipitación de complejos de metal insoluble ocurre a través de las enzimas sulfato reductasas asociadas a membranas (Summers y Silver, 1978) o a través de la biosíntesis de agentes oxidantes, como oxígeno o peróxido de hidrógeno (Pearson, 1968). La reducción de sulfato a sulfuro y la difusión de O_2 y H_2O_2 a través de la membrana celular provista en la región de alta reactividad, donde los metales pueden ser acomplejados y precipitados. Muchas bacterias precipitan la plata como Ag_2S en la superficie celular.

ANTECEDENTES

Muchos metales pesados son tóxicos para los organismos vivos, y el interés sobre ellos se incrementa día con día, debido a la contaminación del aire, agua y suelo. Dicha contaminación puede alterar la estructura de la comunidad de bacterias, hongos y algas presentes, en comparación con las áreas no contaminadas. Hay algunas especies que pueden proliferar en ambas condiciones. Se ha propuesto que el cambio de la estructura de la comunidad de los hongos, puede deberse a su habilidad para tolerar la presencia de metales pesados, es decir, hay más especies de hongos tolerantes en sitios contaminados que en zonas de control, o bien, que las cepas de áreas contaminadas están más adaptadas para crecer en altas concentraciones de metales que las mismas especies de zonas sin metales, y en la literatura se ha descrito el aislamiento de algunos hongos resistentes a metales pesados, entre los que se encuentran: *Penicillium thomi*, *Fusarium oxysporum*, *Cunninghamella sp.*, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Trichoderma sp.*, *Cladosporium sp.*, *Helmintosporium sp.* y *Cryptococcus sp.* (Brown y Smith, 1976; Acosta y cols., 1993; Babich y Stotzky, 1977; Minney y Quirk, 1985).

Por otra parte, y debido en gran parte a la explotación minera en Guanajuato, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo (Zimapán), Nacozari, etc., los metales comenzaron a acumularse alarmantemente en las diferentes fuentes de alimentos y de agua potable, siendo los desechos mineros los principales responsables (se ha descrito que en la actualidad se arrojan aproximadamente 3000 toneladas de desechos mineros/día en la República Mexicana), pues los procesos de obtención de los mismos generan una enorme cantidad de los mismos (95-99% del material procesado), los cuales se conocen como "jales". (Guiza, 1949)

Los jales son polvos grisáceos o blancos de tamaño de partícula de 0.246 a 0.045 mm, compuestos principalmente por cuarzo (65 - 70% SiO₂) y de aquellos minerales que no son extraídos en los procesos de beneficio (Guiza, 1949). No obstante de ser considerados como desechos, los jales son potencialmente aprovechables ya que aún contienen pequeñas cantidades de oro (0.5 g/ton.). Además del gran contenido de cuarzo y feldespatos que son minerales útiles en la industria de la cerámica. El aprovechamiento de jales se inició utilizándolos como materiales de construcción. En la industria cementera se pueden utilizar gracias a su gran contenido de sílice (mayor de 75%).

No existen evaluaciones de los efectos que los metales pesados en los jales ocasionan al ambiente y a la flora en general; sin embargo se han realizado algunos estudios de las afectaciones que las industrias mineras ocasionan al ambiente. En estas se ha encontrado que los problemas de contaminación por metales pesados son causadas por las formas metálicas solubles o las que se encuentran débilmente enlazadas a la matriz mineral, ya que se encuentran fácilmente disponibles para las especies nativas (Gómez, 1989).

La ecología de restauración, propone que la regeneración de zonas afectadas debe realizarse usando comunidades nativas de microorganismos de las zonas afectadas para tratar de obtener las poblaciones microbianas originales de dichas zonas, como ya se ha hecho en la biorremediación de algunos desechos mineros (Hossner y Hons, 1992). Por lo anterior sería de interés tratar de identificar algunos de los microorganismos presentes en estos desechos mineros y determinar si presentan resistencia a diferentes metales pesados.

OBJETIVO GENERAL

Aislar cepas de hongos a partir de desechos mineros y caracterizarlas en términos de resistencia a metales pesados, para, en un futuro, tratar de implementar filtros biológicos para la eliminación de los mismos metales.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar si los desechos mineros a analizar presentan hongos resistentes a metales pesados.

Identificar las diferentes especies de hongos presentes en los desechos mineros.

Caracterizar en base a su resistencia ante diferentes metales pesados, los diversos hongos aislados.

MATERIAL Y METODOS

Desechos mineros.

Las muestras se obtuvieron a partir de desechos mineros de la mina de La Esperanza, del pueblo de Zimapán, estado de Hidalgo, las cuales fueron aisladas de las siguientes fuentes:

Fuente:

- Concentrado de cobre.
- Cola jale de zinc.
- Concentrado de plomo.
- Cola jale de plomo.
- Jale de zinc.

LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DE ZIMAPAN (Simons y cols., 1957)

El distrito de Zimapán se encuentra en la parte occidental del Estado de Hidalgo, en el sureste de la parte central de México y como a 153 kilómetros en línea recta de la Ciudad de México. Zimapán es un poblado de algunos miles de habitantes y el centro de la actividad minera del distrito. Sus coordenadas geográficas son aproximadamente de 20°45' de latitud N. y 99°23' de longitud W. La carretera pavimentada entre la Ciudad de México y Laredo Texas, pasa por Zimapán en un punto a 207 kilómetros de la Ciudad de México. Una carretera transitable en todo tiempo se extiende al noreste de Zimapán, con un desarrollo de 15 kilómetros hasta las minas Lomo de Toro y Los Balcones.

Zimapán se encuentra situado cerca del centro de un pequeño valle rodeado de montañas a una altitud de 1770 m. Las montañas vecinas tienen una altitud máxima de 2684 m. en el cerro de San Nicolás, el que se presenta en forma de un pico muy elevado casi al norte del poblado y en la Cordillera Oriente-Poniente conocido localmente como Sierra de El Monte, la cual forma el flanco norte del Valle de Zimapán.

MINERALOGIA

Minerales existentes en el Distrito de Zimapán:

Actinolita	$\text{Ca}_2(\text{Mg,Fe})_5(\text{Si}_4\text{O}_{11})(\text{OH})_2$
Adamita	$\text{Zn}_3\text{As}_2\text{O}_8 \cdot \text{Zn}(\text{OH})_2$
Apatita	$(\text{CaF})\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3$
Barita	BaSO_4
Calcita	CaCO_3
Calcopiritita	CuFeS_2
Esfarelita	ZnS
Fluorita	CaF_2
Galena	PbS
Hematita	Fe_2O_3
Limonita	$2\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Opalo	$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
Pirita	FeS_2
Sanidina	KAlSi_3O_8
Siderita	FeCO_3
Tremolina	$\text{Ca}_2\text{Mg}_5(\text{OH}_2)(\text{Si}_4\text{O}_{11})_2$
Vanadinita	$(\text{PbCl})\text{Pb}_4(\text{VO}_4)_3$
Yeso	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Zoisita	$\text{M}\text{Ca}_2\text{Al}_3\text{Si}_3\text{O}_{13}$

Además, también se han encontrado metales preciosos entre los que se encuentran oro y plata.

AISLAMIENTO DE LOS HONGOS

Se pesó 1 gramo de cada desecho minero y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 9 mililitros de agua desionizada estéril y se agitó para homogenizar la muestra. Posteriormente, se hicieron diluciones de ésta con la misma agua (1:10, 1:100 y 1:1000), tomando alícuotas de 100µl de cada una de las mismas, las cuales se sembraron por duplicado en agar extracto de Malta adicionado con 200 ppm de cobre (AEM-Cu), incubando a 28°C durante 3 días y las colonias resultantes se purificaron por resiembras sucesivas en AEM-Cu, y una vez purificados se inocularon por picadura en medio mínimo con cobre (MM-Cu) y se incubaron a 28°C hasta obtener un crecimiento óptimo, al cabo del cual se refrigeraron a 4°C para su mantenimiento. Las cepas puras se identificaron por sus características macro y microscópicas cultivadas en Agar de Dextrosa Sabouraud (ASD).

SIEMBRA POR SUSPENSION DE ESPORAS

Las esporas se obtuvieron a partir de cultivos puros, desarrollados en tubos con MM-Cu, las cuales se resuspendieron en 5 ml de agua destilada estéril, centrifugados a 2,500 rpm y lavados dos veces por el mismo procedimiento. Las esporas se cuantificaron en un hematocitómetro, y se tomaron alícuotas de 1,000,000 esporas y se sembraron en el centro de una caja de Petri con AEM adicionado con diferentes metales.

MEDIO MINIMO

Componente	Concentración (g/l)
Agar bacteriológico	20.00
Dextrosa	20.00
Fosfato ácido de potasio	6.00
Nitrato de amonio	1.80
Sulfato de magnesio-heptahidratado	1.00
Sulfato de hierro-heptahidratado	0.001
Sulfato de zinc-heptahidratado	0.0018
Sulfato de manganeso-heptahidratado	0.0030

A este medio se le añaden 200 miligramos de sulfato de cobre y/o sulfato de zinc-heptahidratado, ya que los hongos pierden su resistencia a los metales pesados si se conservan y/o subcultivan en medios de cultivo sin metales pesados.

PRUEBA DE RESISTENCIA EN PLACA.

Se prepararon cajas de Petri con 20 ml de AEM adicionado con las sales de los diferentes metales, los cuales se guardaron en refrigeración hasta su uso. Las placas preparadas, se inocularon con 1,000,000 esporas del hongo correspondiente, se espatularon y se incubaron a 28°C. Cuando la caja control alcanzó el máximo crecimiento (72-96 horas), y se comparó el crecimiento de las placas restantes con respecto al control, el cual fue la cepa del hongo correspondiente en el mismo medio sin metal. Lo anterior se realizó con el objeto de valorar la resistencia a diferentes metales divalentes de los hongos aislados.

Una vez purificadas las cepas, se subcultivaron para su conservación en medio mínimo, adicionada del metal correspondiente.

AGAR EXTRACTO DE MALTA

A este medio de cultivo se le adicionaron las siguientes sales metálicas:

a.- Sulfato de cobre pentahidratado, a una concentración de 200 ppm. Utilizado para el aislamiento, purificación y caracterización de las cepas (características macro y/o microscópicas de los hongos que crecieron en estos medios de cultivo).

b.- Sulfato de cobre pentahidratado, a una concentración de 200 y 500 ppm. Utilizado para la prueba de resistencia a cobre en placa.

c.- Cloruro de mercurio, a una concentración de 200 y 500 ppm. Utilizado para la prueba de resistencia a mercurio en placa.

d.- Nitrato de plomo, a una concentración de 200 y 500 ppm. Utilizado para la prueba de resistencia a plomo en placa.

e.- Sulfato de zinc heptahidratado, a una concentración de 200 y 500 ppm. Utilizado para la prueba de resistencia a zinc en placa.

f.- Trióxido de arsénico, a una concentración de 200 y 500 ppm. Utilizado para la prueba de resistencia a arsénico en placa.

g.- Nitrato de plata, a una concentración de 200 y 500 ppm. Utilizado para la prueba de resistencia a plata en placa.

NOTA: Las sales de los metales antes mencionadas, fueron adicionadas inmediatamente después de la esterilización del medio y antes de vaciarlo a las cajas de Petri.

AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Componente	Concentración (g/l)
Peptona de caseína	10
Dextrosa	20
Agar purificado	20

pH = 5.7 ± 0.2

Este medio se utilizó para la identificación de las cepas.

TABLA No. 2. Hongos resistentes a metales pesados aislados a partir de desechos mineros (AEM-Cu, 3 días a 28°C)

Hongo Aislado	Fuente	*Dilución
<i>Aspergillus flavus</i> 1	Cola Jale de zinc	1:10
<i>Aspergillus flavus</i> 2	Concentrado de cobre	1:100
<i>Aspergillus flavus</i> 3	Jale cola de cobre	1:100
<i>Aspergillus flavus</i> 4	Jale de zinc	1:1000
<i>Aspergillus flavus</i> 5	Cola jale de zinc	1:100
<i>Aspergillus fumigatus</i> 1	Jale cola de cobre	1:10
<i>Aspergillus fumigatus</i> 2	Jale cola de cobre	1:1000

* Mayor dilución a la cual se observó crecimiento del hongo correspondiente

TABLA No. 3 Análisis de resistencia a metales pesados de los diferentes hongos aislados

Concentración del metal ppm	Aspergillus flavus 1	Aspergillus flavus 2	Aspergillus flavus 3	Aspergillus flavus 4	Aspergillus flavus 5	Aspergillus fumigatus 1	Aspergillus fumigatus 2
Cd 200	-	-	-	-	-	-	-
Cd 500	-	-	-	-	-	-	-
Pb 200	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pb 500	++	++	++	++	++	++	++
Cu 200	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cu 500	-	-	-	-	-	-	-
Zn 200	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Zn 500	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
As 200	-	-	-	-	-	-	-
As 500	-	-	-	-	-	-	-
Hg 200	-	-	-	-	-	-	-
Hg 500	-	-	-	-	-	-	-
Ag 200	++	+	++	++	++	++	+
Ag 500	+	+	+	+	+	+	+

Diámetro de crecimiento (cm):

- = 0.0 - 0.5 cm
+ = 0.6 - 2.5 cm

++ = 2.6 - 5.0 cm
+++ = 5.1 - 7.5 cm

++++ = 7.6 - 9.0 cm

TABLA No. 4 Alteraciones en el color de las colonias

Hongo	Metal	Color
<i>A. flavus</i> 1 al 5	Plomo	Amarillo-verdoso
<i>A. flavus</i> 1 al 5	Cobre	Verde oscuro
<i>A. flavus</i> 1 al 5	Zinc	Verde
<i>A. flavus</i> 1 al 5	Plata	Blanco
<i>A. fumigatus</i> 1 y 2	Plomo	Amarillo-verdoso
<i>A. fumigatus</i> 1 y 2	Cobre	Verde oscuro
<i>A. fumigatus</i> 1 y 2	Zinc	Verde
<i>A. fumigatus</i> 1 y 2	Plata	Blanco

A. flavus control color verde, *A. fumigatus* control color verde.



FOTO No. 1 Características macroscópicas de *Aspergillus flavus* 2
crecido en agar extracto de malta, 96-120 hrs, 28°C

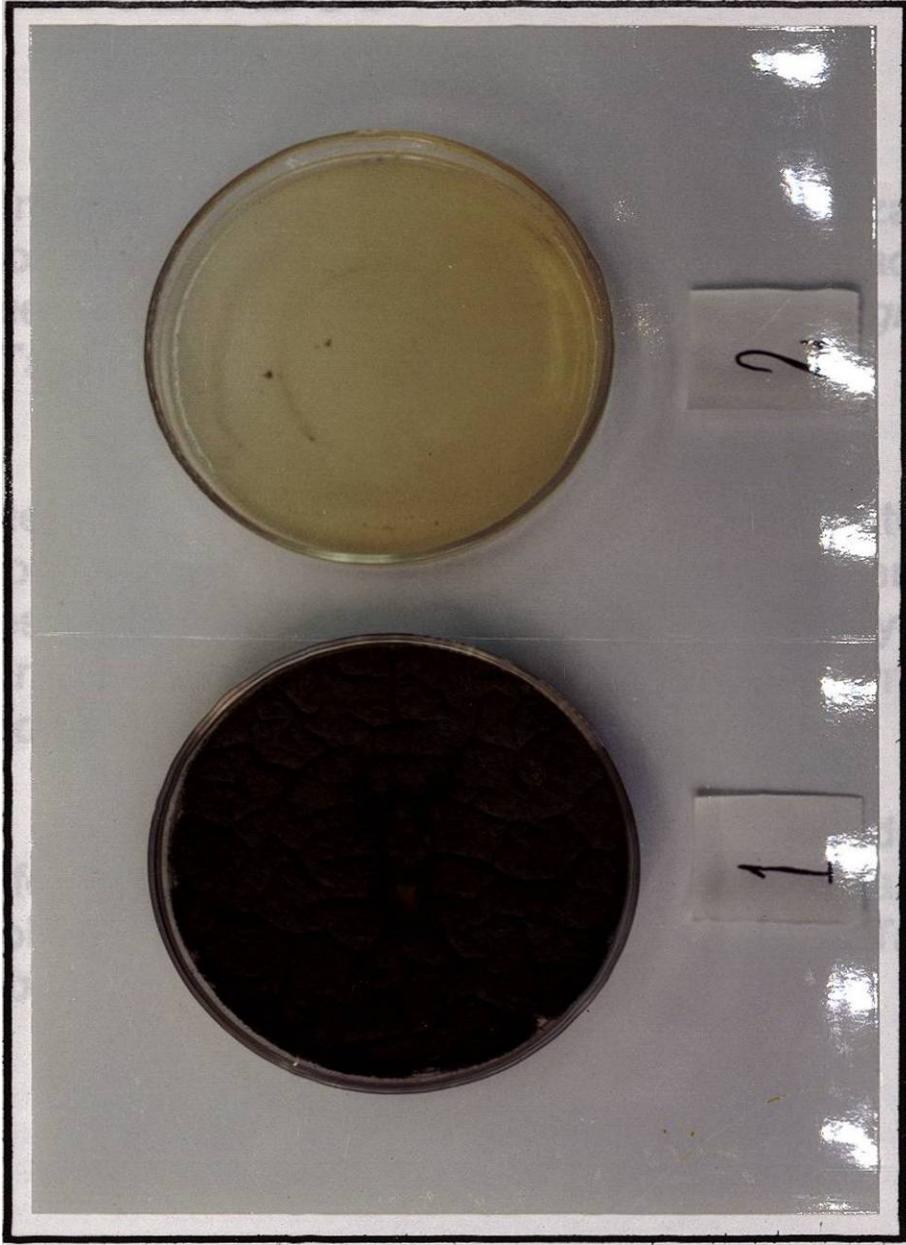
1. Control positivo (medio sin metal)
2. Medio AEM adicionado con 500 ppm de plomo



FOTO No. 2 Características macroscópicas de *Aspergillus flavus* 2 (40X)

crecido en agar extracto de malta, 36-120 hrs, 28°C

- 1. Control positivo (medio sin metal)**
- 2. Medio AEM adicionado con 500 ppm de zinc**



**FOTO No. 3 Características macroscópicas de *Aspergillus flavus* 2 (40X)
crecido en agar extracto de malta, 96-120 hrs, 28°C**

- 1. Control positivo (medio sin metal)**
- 2. Medio AEM adicionado con 200 ppm de mercurio**

RESULTADOS

En este trabajo, se aislaron y caracterizaron 7 hongos con resistencia a diferentes metales pesados, los cuales fueron 5 *Aspergillus flavus* y 2 *Aspergillus fumigatus* (Tabla No. 2).

Estos hongos presentan diferentes resistencias a metales pesados, pues todos son resistentes a 200 y 500 ppm de zinc y plomo (Tabla No. 3), presentan muy poca resistencia a 200 y 500 ppm de plata, y no presentan ninguna resistencia a cadmio arsénico y mercurio (Tabla No. 3).

Por otra parte, los hongos aislados, presentan diferentes características macroscópicas, (diferentes colores en comparación al control). (Tabla No. 4 y Fotografías Nos. 1 y 2).

DISCUSION

La actividad minera ha ocasionado serios problemas ambientales por contaminación en agua, aire y suelo (Hossner y Hons, 1992). Los residuos mineros contienen una gran cantidad de metales. En la bibliografía se han reportado gran cantidad de microorganismos que son capaces de absorber y/o adsorber iones metálicos, entre ellos se incluyen bacterias resistentes a Ag^+ como *Pseudomonas sp.* (Belly y Kidd, 1982), el hongo hipomiceto *Phoma sp.* (Pümpel y Schinner, 1986) y otros organismos capaces de resistir otros iones metálicos, entre ellos algas (Coleman y col., 1971), plantas (Grill y col., 1985), así como células de mamíferos (Glanville y col., 1981). En algunos casos dichas propiedades de unión de metales por organismos han sido utilizadas para remover aquellos de aguas residuales y otras fuentes (Brierley y Brierley, 1983; Volesky, 1981 y Gadd, 1993); ello ha conducido a propuestas acerca del uso de la biomasa microbiana para la remoción de metales pesados como método alternativo a las técnicas fisicoquímicas (De Rome y Gadd, 1987). En la bibliografía se encuentran varios trabajos que proponen la aplicación de biomasa de hongos para regenerar zonas contaminadas por metales pesados, así para descontaminar aguas con gran contenido de metales (Nordgren y col., 1985; Galun y col., 1983; Shanlakadze y col., 1988).

En el presente trabajo se realizó un estudio de los hongos que habitan en los residuos mineros (La Esperanza de Zimapán, Hidalgo) y se les probó resistencia a varios metales. Dicho estudio se hizo con la finalidad de conocer la población de hongos habitantes de los jales mineros y probar su resistencia a metales, pues en la literatura casi no hay trabajos al respecto, aunque por ejemplo Ramos y Cols., (1993) realizaron un estudio de microalgas que crecen sobre desechos de minas de oro y plata en Guanajuato, encontrando que la microalga *Cladophora glomerata*, puede crecer en presencia de cobre, plomo y zinc, y Cortés Penagos y Cols., (1993) aislaron una cepa de *Trichoderma viride* de desechos mineros del Estado de Michoacán, resistente a cobre y plata.

En este trabajo, se aislaron 7 hongos resistentes a metales pesados (plomo cobre y zinc), los cuales fueron 5 *Aspegillus flavus* y 2 *Aspergillus fumigatus*; lo que coincide con algunos reportes de la literatura, entre los que se encuentran los de Ramos y Cols. (1993) y Cortés Penagos y Cols. (1993).

Los 7 hongos aislados presentan resistencia a 200 y 500 ppm de plomo y zinc, a 200 ppm de cobre y poca resistencia a plata, coincidiendo con algunos reportes de la literatura (Cortés Penagos y Cols., 1993; Acosta y Cols., 1993; Acosta y Cols., 1994).

Finalmente, los resultados obtenidos, indican el cambio de la microflora debido a la contaminación por desechos mineros, alterando el ecosistema, erosionando los suelos, así como el aumento en los índices de contaminación por metales pesados de los mantos acuíferos, principalmente en zonas mineras, lo cual coincide con lo reportado por Ramos y Cols., (1993) en el estado de Guanajuato.

CONCLUSIONES

1.- Se aislaron 7 hongos resistentes a metales pesados (5 *Aspergillus flavus* y 2 *Aspergillus fumigatus*) a partir de desechos mineros.

2.- Todos los hongos presentan patrones de resistencia y sensibilidad semejantes.

3.- Los 7 hongos son resistentes a 200 y 500 ppm de plomo y zinc, y a 200 ppm de cobre.

4.- Todos los hongos son poco resistentes a 200 y 500 ppm de plata.

5.- Ninguno de los hongos estudiados son resistentes a 200 y 500 ppm de cadmio, arsénico y mercurio.

6.- Los hongos analizados presentan alteraciones macroscópicas (color).

7.- De las fuentes de fierro y concentrado de plomo no se obtuvo ningún hongo resistente a metales pesados.

BIBLIOGRAFIA:

* Acosta I., García, G., Torre, M. E., y Moctezuma, M. G. (1993). Aislamiento de contaminantes mineros ambientales resistentes a metales pesados y su potencial uso como bioadsorbentes naturales. *Biotecnología*. Vol. 3 No. 3 y 4. pp AM 1 AM-7.

* Acosta, I., García, M. G., Torre, M. E., Zacarías C., Mendoza, J., Olivares, J. J., Vázquez, E., Díaz, P., Martínez V., Fuentes, L., y Moctezuma, M. G. El uso de la biomasa celular de hongos filamentosos en la eliminación de metales pesados en aguas residuales. Tercer Simposio Iberoamericano de Ecología y Medio Ambiente. En prensa.

* Ashida, J., Higashi, N., Kikuchi, T. (1983). An electronmicroscopic study precipitation by copper-resistant yeast cells. *Protoplasma* 57: 37-44.

* Armstrong, W., (1964). Discrimination between alkali metal cations by yeast. *Journal of General Physiology* 48: 61-71.

* Babich, H. y Stotzky, G. (1977). Reductions in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 696-705.

* Babich, H. y Stotzky, G. (1977). Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacterium in soil influence of clay mineral and pH. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 1059-1066.

* Babich, H. y Stotzky, G. (1980). Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology* 8: 99-145.

*Bartinicki García, S. (1968). Chemistry of fungal cell wall. *Annual Review of Microbiology*. 22

* Bell A. A., Wheeler, M. H. (1986). Biosynthesis and Functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* 24: 411-451.

* Belly, R. T. y Kidd, G. C. (1982). Silver resistance in microorganisms. *Developments in Industrial Microbiology*. 23: 567-577.

* Bilinsky, C. A., Miller, J. J. (1983). Translocation of zinc from vacuole to nucleus during yeast meiosis. *Canadian Journal of Cytology and Genetics* 25: 88-127.

* Borst-Pauwels, G. W. (1981). Ion transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 650: 88-127.

* Brown, T. A. y Smith, D. G. (1976). The effects of silver nitrate on the growth and ultrastructure of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Microbios letters* 3: 155-162.

* Brunker, R. L., Bott, T. L. (1974). Reduction of mercury to the elemental state by yeast. *Applied Microbiology* 27: 870-873.

* Cairns, John (1991). The status of the theoretical and applied science of restoration ecology. *The Environmental Professional*, 13: 186-194.

* Cervantes, C. y Gutiérrez Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 14. 121-138.

* Cortés Penagos y Cols. (1993). Mecanismos de resistencia a metales pesados en *Trichoderma* sp. *Biología*. Vol. 3 y 4. Pp AM 214-AM 223.

* Fogel, S., Welch, J. W., Maloney, D. H. (1988). The molecular genetics of copper resistance in *Saccharomyces cerevisiae* paradigm for non-conventional yeast. *Journal of Basic Microbiology* 28: 147-160.

* Gadd, G. M. (1992) Microbial control of heavy metal pollution. In: Fry, J. C. Gadd, G. M., Herbert, R. A., Jones, C. W., Watson-Crick. *Microbial Control of Environmental Pollution*. 59-88.

* Gómez, P. J. (1989). Estudio de los residuos sólidos y aguas de una zona minera y su efecto sobre el ambiente. Tesis M. en C., Química Inorgánica; Fac de Química UNAM.

* Guiza, B. (1949). Estudio Geológico del Distrito Minero de Guanajuato (Zona Veta Madre). *Boletín 22, Instituto Nacional para la Investigación de Recursos Minerales*.

* Hammer, D. H. (1986). Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 913-951.

* Hossner, L. R., Hons, F. M. (1992). Reclamation of Mine Tailings in *Advances in soil Science, Vol. 17 Soil Restoration*. Edited by R. Lal and E. A. Stewart. *Spring-Verlag*.

* Jennings, D. H., Hooper, D. C., Rotstein, A. (1958). The participation of phosphate in the formation the carrier for the transport of Mg^{2+} and Mn^{2+} ions into cells. *Journal of General Physiology* 41: 1019-1026.

* Jones, R. P., Gadd, G. M. (1990). Ionic nutrition of yeast the physiological mechanisms involved and applications for biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology* 12: 402-418.

* Kierans, M., Staines, A. M., Bennett, H., Gadd, G. M. (1991). Silver tolerance and accumulation in yeast. *Biology of Metals* 4: 100-106.

* Lindengren, C. C. and Lindengren, G. (1973). Oxidative detoxification of thallium in the yeast mitochondria. *Antonie van Leeuwenhoek; Journal of Microbiology and Serology* 39: 351-353.

* Minney, S. F., Quirk, A. V. (1985). Growth and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* at different cadmium concentrations. *Microbio* 42: 37-44.

* Mullen, M. D., Wolf, D. C., Beveridge, T. J., Bailey, G. W. (1992). Sorption of heavy metals by soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 129-135.

* Murphy, R. J., Levy, J. F. (1983). Production of copper oxalate by some copper tolerance fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81: 165-168.

* Muzzarelli, R. A. A., Bregani, F. Sigon, F. (1986). Chelating abilities amino acids glucans and sugar acids glucans derived from chitosan. En: Eccles, H., Hund, S., eds, *Immobilisation of ions by biosorption*. Chichester: Ellis Horwood, 173-182.

* Newby, P. J. and Gadd, G. M. (1987). Synnema induction in *Penicillium wniculosum* by tributyltin compounds. *Transactions of the British Mycological Society* 89: 381-384.

* Olson, I. and Brinckman, 1981. Volatilization of mercury by *Tiobacillus ferrooxidans*. *Curr microbiol.* 5:115

* Oshumi, Y. Kitamono, K., Anraku, Y. (1988). Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *Journal of Bacteriology* 170: 2676-2682.

* Okorokov, L. A., Lincho, L. P., Kulaev, I. S. (1980) Vacuoles: main compartments of potassium, manganese and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *Journal of Bacteriology* 144: 661-665.

* Pearson, R. G. (1968) Hard and soft acids and bases, HBAB, Part. 1. *J. Chem. Educ.*, 45. 581.

* Ramos, R., Sosa, L. y Gutiérrez, M. (1993). Microalgas que crecen sobre desechos de minas de oro y plata. *Biología No. 3 y 4 pp. AM 232-Am 235.*

* Sakaguchi T., Nakajima, A. (1987). Accumulation of uranium by biopigments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 40: 133-141.

* Saiz-Jiménez, C. Shafizadeh, F. (1984) Iron and binding by fungal phenolic polymers: an electron spin resonance study. *Current Microbiology* 10. 281-286.

* Sanders, D. (1988) Fungi. Solute transport in plants cells and tissues. Harlow: Longman 106-165.

* Senesi, N., Sposito, G., Martin, P. (1987). Copper (II) and Iron (III) complexation by humic acid-like polymers (melanins) from soil fungi. *The Science of Total Environment* 62: 439-457.

* Silver, S., (1983). Bacterial Interactions with Mineral Cations and Anions: Good Ions y Bad, en Westbroek, P. and E. W. de Jong (editors), *Biomining and Biological Metal Accumulation*, D. Reidel, Dordrecht, Holanda. pp. 437-457.

* Simons, S. Frank y Mapes, V. Eduardo. (1957). Geología y yacimientos minerales del distrito minero de Zimapán, Hidalgo. Pág(s): 19-24, 129- 137. *Boletín No. 40.*

* Starkey, R. L. (1973). Effect of pH on the toxicity of copper to *Scytalidium sp.*, a copper tolerant fungus, and some other fungi. *Journal of General Microbiology* 78: 217-225.

* Stokes, P. M., y Lindsay, J. E. (1979). Copper tolerance and accumulation en *Penicillium ochro-chloron* isolated from copper-plating solution. *Microbia* 71: 796-806.

* Strandberg, G. W., Shumate, S. E., Parrott, J. R. (1981). Microbial cells as bioabsorbents for heavy metal: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomona aerioginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 237-245.

* Stumm, W., y Morgan, J. J. (1981). *Aquatic Chemistry*. Chapter 5 Precipitation and Dissolution, pp 240. Ed Wiley Interscience.

* Summers y Silver (1978). Microbial transformation of metals, *En. Rev. Microbial* 32, 637.

* Sutter, H. P., Jones EBG, Walchli, O. (1983). The mechanisms of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.). *Cke and Poria caillantii* (Pers.) Fr. *Material and Organismen* 18: 243-263.

* Thayer y Brickman (1982). The biological methylation of metals and metalloids, en F. G. A. Stone y R. West, Eds., *Advances in Organometallic Chemistry*, Vol. 20 Academic, New York, p 313.

* Venkateswerlu, G., Stotzky, G. (1989). Binding of metals by cell wall of *Cunninghamella blakeleeana* grow in the presence of copper or cobalt. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31: 619-625.

* Volesky, B. (1990). *Biosorption of heavy metals*. Boca Raton: CRC Press.

* Vonk y Sijpesteijn (1973). Studies on the methylation of mercuri chloride by pure cultures of bacteria and fungi. *Antonie Van Leewenhoek Journal of Microbiology and Serology*. 39: 505-513.

* Wiemken, A., Schellenberg, M. Urench, K. (1979). Vacuoles: the sole compartaments of digestive enzymes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 123: 23-25.

