



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

**AISLAMIENTO DE HONGOS CONTAMINANTES EN AUSENCIA Y
PRESENCIA DE PLOMO A PARTIR DE AGUAS Y
LODOS DEL TANQUE TENORIO**

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

PRESENTA :

ARACELI ROBLES GALVAN

ASESOR: M. C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

MAYO DE 1996

TD
R6
C.



1080076948

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

AISLAMIENTO DE HONGOS
CONTAMINANTES EN
AUSENCIA Y PRESENCIA DE PLOMO
A PARTIR DE AGUAS Y LODOS
DEL TANQUE TENORIO

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

ARACELI ROBLES GALVAN

ASESOR: M. C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

MAYO DE 1996

T
10420
R6





APROBACION DE TEMA DE TESIS

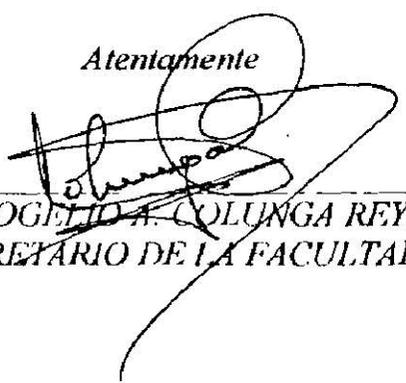
SRITA. ARACELI ROBLES GALVAN

P R E S E N T E:

Por este conducto me permito informar a USTED que el H. Consejo Técnico Consultivo de esta Facultad de Ciencias Químicas, en sesión ordinaria de fecha 19 DE JULIO DE 1995., tuvo a bien aprobar el tema de su tesis profesional titulada: "AISLAMIENTO DE HONGOS CONTAMINANTES EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE PLOMO A PARTIR DE AGUAS Y LODOS DEL TANQUE TENORIO.", mismo que será asesorado por el M.C. JOSE ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ., para la presentación de su examen profesional de **QUÍMICO FARMACOBIOLOGO.**

Sin más por el momento queda de usted.

Atentamente



ING. ROGELIO A. COLUNGA REYNA
SECRETARIO DE LA FACULTAD

San Luis Potosí, S.L.P. a 25 de septiembre de 1995

JURADO ASIGNADO

M. C. DIANA PATRICIA PORTALES PEREZ

M. C. MA. ESTHER FLORES MORENO

Q. F .B. ROSA ELVIA MEDINA NOYOLA

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN :

**LABORATORIO DEL AREA BIOLOGICA
DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI**

TESISTA:

ARACELI ROBLES GALVAN

ASESOR:

M. C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

AGRADECIMIENTO

A ISMAEL :

Por asesorarme en este trabajo,
brindarme su confianza, apoyo y conocimientos,
pero sobre todo, por su valiosa amistad.

DEDICATORIAS

A DIOS :

Por haberme permitido vivir y darme la oportunidad de agradecerle lo que soy, las penas y alegrías que he conocido en su camino.

A MIS PADRES :

A usted Mamá, por su amor y confianza que han sido el soporte de mi vida y de mi carrera.

A mi Papá, a quien le agradezco todo el amor y apoyo que me dió, y los momentos en que se enorgulleció de mí.

A MIS HERMANOS :

Jorge, Ma. del Rosario, Javier, Silvia, Vicente,
Ma. Guadalupe y especialmente a Olivia,
por el cariño, apoyo y comprensión
que recibí de ustedes en esta etapa de mi vida
y en todas las anteriores.

A JAIME :

Por tu amor, por ser motivo de mi vida, y enseñarme
lo hermoso y variado que ésta puede ser.

A MIS AMIGOS :

Verónica, Rocío, Gabriela, Claudia,
Conrado y Rafael, por su amistad, por todos los
momentos que disfruté de su agradable compañía
y por su apoyo y solidaridad en los momentos difíciles.

I N D I C E

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
1.- Contaminación de origen urbano	
2.- Contaminación de origen industrial	3
3.- Contaminación de origen agrícola	
4.- Tanque Tenorio	
5.- Hongos contaminantes	4
JUSTIFICACION	7
OBJETIVOS	9
1.- Objetivo General	
2.- Objetivo Particular	
MEDIOS UTILIZADOS	10
1.- ASD. Agar Sabouraud Dextrosa	
2.- AEM. Agar Extracto de Malta	
3.- Medio de Nigger	11
4.- Agar harina de maíz	
5.- Caldo de Urea	
6.- Medio de Wickerham	12
7.- MM. Medio Mínimo	
MATERIAL Y REACTIVOS	13
METODOLOGIA	15
1.- Obtención de las muestras	
2.- Aislamiento de hongos	
a) Resiembra de colonias levaduriformes y/o filamentosas	
3.- Identificación de hongos	
a) Técnica de la cinta adhesiva	
4.- Identificación de levaduras	16
a) Técnica de la Tinta China. Observación de levaduras encapsuladas	
b) Crecimiento en medio de Nigger	
c) Prueba del tubo germinal (Filamentación en suero)	
d) Cultivo en Agar Harina de Maíz (Producción de clamidoconidios)	
e) Asimilación de urea	
f) Auxanograma	17
(Asimilación de Carbohidratos)	
g) Zimograma (Fermentación de Carbohidratos)	

I N D I C E

(continuación)

5.- Prueba de resistencia en placa	17
6.- Mantenimiento de cepas	
RESULTADOS	19
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFIA	44

I N D I C E D E C U A D R O S

CUADRO No. 1	18
--------------------	----

I N D I C E D E T A B L A S

Tabla No. 1.- Hongos encontrados en las muestras de agua analizadas. Hongos que crecieron en ausencia de 200 ppm de plomo	20
Tabla No. 2.- Hongos encontrados en las muestras de agua analizadas. Hongos resistentes a 200 ppm de plomo	21
Tabla No. 3.- Hongos encontrados en las muestras de lodos analizadas. Hongos que crecieron en ausencia de 200 ppm de plomo	22
Tabla No. 4.- Hongos encontrados en las muestras de lodos analizadas. Hongos resistentes a 200 ppm de plomo	22
Tabla No. 5.- Características macroscópicas de las 14 especies de <i>Penicillium sp</i> aisladas de aguas residuales	23

INDICE DE TABLAS

(continuación)

Tabla No. 6.- Características macroscópicas de las 4 especies de <i>Trichoderma sp</i> aisladas de aguas residuales	24
Tabla No. 7.- Características macroscópicas de 9 especies de hongos aislados de aguas residuales	24
Tabla No. 8.- Características macroscópicas de 7 especies de hongos y levaduras aislados de lodos	25

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1.- Características Microscópicas de <i>Penicillium sp</i>	26
Figura No. 2.- Características Microscópicas de <i>Aspergillus flavus</i>	27
Figura No. 3.- Características Microscópicas de <i>Scopulariopsis sp</i>	28
Figura No. 4.- Características Microscópicas de <i>Mucor sp</i>	29
Figura No. 5.- Características Microscópicas de <i>A. fumigatus</i>	30
Figura No. 6.- Clamidoconidios de <i>C. albicans</i>	31
Figura No. 7.- Resistencia de las diferentes especies de <i>Penicillium sp</i> en presencia de plomo	32
Figura No. 8.- Resistencia de las diferentes especies de <i>Trichoderma sp</i> en presencia de plomo	33
Figura No. 9.- Resistencia de diferentes especies de hongos filamentosos en presencia de plomo	34

INDICE DE FIGURAS

(continuación)

Figura No. 10.- Resistencia de diferentes especies de hongos filamentosos en presencia de plomo.	35
Figura No. 11.- Resistencia de diferentes especies de hongos en presencia de plomo.	36
Figura No. 12.- Características Macroscópicas de <i>Penicillium sp</i>	37
Figura No. 13.- Características Macroscópicas de <i>Penicillium sp</i>	38
Figura No. 14.- Características Macroscópicas de <i>Penicillium sp</i>	39
Figura No. 15.- Características Macroscópicas de <i>C. albicans</i>	40

RESUMEN

En San Luis Potosí se observan alarmantes índices de contaminación del agua debido al acelerado crecimiento urbano, así como el aumento de las operaciones derivadas de la actividad humana.

La laguna del Tanque Tenorio se encuentra al sureste de la ciudad, tiene una extensión de 210 hectáreas aproximadamente, además está situada en una de las principales zonas de recarga del manto acuífero profundo del que se abastece a la ciudad. Esta laguna recibe aguas residuales, principalmente industrias de la ciudad de San Luis Potosí, aunque el tipo de industrias que descargan sus aguas residuales a los canales que alimentan al Tanque es variado, y se piensa que la mayor aportación de los elementos contaminantes provienen de industrias del tipo metalmeccánico, fundición, hules y plásticos, minera, materiales para construcción, alimenticia y química que predominan en la región.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar hongos contaminantes ambientales en ausencia y en presencia de plomo a partir de aguas y lodos cercanos a tierras de cultivo del Tanque Tenorio, cuyas biomásas podrían ser utilizadas en un trabajo posterior como filtros biológicos para tratar de eliminar metales pesados y flúor en solución.

Se obtuvieron muestras de agua y lodos de diferentes zonas del lugar en estudio, en recipientes estériles. Se realizaron diluciones en agua destilada estéril y se sembraron en Agar Extracto de Malta con y sin 200 ppm de plomo, se incubaron durante 5 días a 28°C. Se purificaron las colonias resultantes por resiembras sucesivas en AEM (para hongos) y en ASD (para levaduras) con y sin metal, identificando a los hongos filamentosos por sus características macro y microscópicas y a las levaduras por diferentes pruebas bioquímicas.

A partir de aguas residuales se obtuvieron los siguientes hongos en ausencia de plomo, se identificaron 9 géneros: *Cladosporium sp* (23.5%), *Absidia sp* (20.6%), *Penicillium sp* (20.6%), *A. niger* (5.9%) y otros en proporciones mas bajas, mientras que en presencia de plomo se identificaron 10 géneros diferentes, siendo los más frecuentes: *Penicillium sp* (44.5%), *Trichoderma sp* (16.7%) y *Alternaria sp* (8.3%). A partir de estas aguas no se obtuvieron levaduras.

A partir de lodos en ausencia de metal se obtuvieron 7 especies de hongos: *Penicillium sp* (72%), *A. niger* (14%) y *A. ochraceus* (14%), no se obtuvieron levaduras, mientras que en presencia de metal se obtuvieron sólo dos géneros de hongos, siendo 7 especies diferentes en total: *Penicillium sp* (57.1 %) y la levadura *C. albicans* (42.8%).

Todas las especies de hongos aisladas en presencia del metal, fueron resistentes al mismo dentro de un rango de 500 a 2000 ppm.

La flora fúngica es muy diversa, la presencia de hongos tolerantes indica contaminación por metales pesados (Acosta y cols., 1993).

I N T R O D U C C I O N

El agua es uno de los elementos esenciales en la vida del hombre y su presencia ha sido y es fundamental para el desarrollo de comunidades, ciudades, centros industriales y de recreación, por lo que es muy importante su conservación en cantidad y calidad para abastecer las necesidades de consumo, cumpliendo con ciertas características que la hacen apta para determinados usos, sin causar ningún riesgo a la industria, agricultura y, primordialmente a la salud humana.

En base a esta imperiosa necesidad de agua, el hombre ha tenido que abastecerse de este recurso tanto de fuentes de aguas superficiales (lagos, ríos y presas), como de aguas subterráneas, las cuales son las de mayor demanda debido a que presentan algunas ventajas importantes sobre el agua superficial, como es el bajo costo de desarrollo de abastecimiento y la adecuada calidad natural sin mucho tratamiento para el consumo humano.

La mayoría de las aguas subterráneas son generalmente de excelente calidad en lo que se refiere a la claridad y color. Raramente parecen estar contaminadas, aún cuando pudieran estarlo; actualmente, el riesgo de contaminación de dichos mantos acuíferos es cada vez mayor alcanzando niveles preocupantes para la salud. Dicha contaminación normalmente es una consecuencia de las actividades del hombre en la superficie, y las causas pueden ser de diversa índole.

Como la laguna del Tanque Tenorio está situada en una de las principales zonas de recarga del manto acuífero profundo del que se abastece de agua a la ciudad (Comisión Nacional del Agua. Propuesto SGAA - 89 - 45), el peligro de infiltraciones y la subsecuente contaminación de los mantos acuíferos subterráneos por la naturaleza de las aguas que se descargan en el Tanque Tenorio (aguas provenientes de industrias del tipo metalmeccánico, fundición, hules y plásticos, minera, materiales para construcción, alimenticia y química) es cada vez mayor, con los potenciales riesgos que presenta para la salud humana.

CONTAMINACION DE ORIGEN URBANO

Las aguas residuales y domésticas, así como los desechos sólidos contienen altas concentraciones de organismos fecales, materia orgánica y de compuestos nitrogenados. Si se descargan o se infiltran al subsuelo, el agua subterránea puede contaminarse por patógenos bacterianos, fúngicos, parásitos y virales, incluyendo aquellos que causan diarreas, tifoidea y hepatitis; por nitratos, amonios, detergentes, desinfectantes y otras sustancias químicas, los cuales pueden convertir el agua en no potable debido a que éstos son patógenos para los humanos.

CONTAMINACION DE ORIGEN INDUSTRIAL

Numerosas industrias producen desechos líquidos, conocidos como efluentes, con concentraciones elevadas de compuestos orgánicos (sólidos sedimentables, celulosa, colorantes, ftalatos, grasas, etc.) peligrosos y metales pesados (arsénico, 11.6 ppm; plomo, 12.5 ppm; cadmio, 36 ppm; mercurio, 0.5 ppm; etc.). Aún a muy bajas concentraciones, algunas de estas sustancias químicas son tóxicas. En muchas ocasiones, dichos efluentes se descargan en el ambiente sin ningún tratamiento previo para reducir sus efectos nocivos. Estos efluentes penetran en el agua subterránea por infiltración de las lagunas, de fosas y de ríos o de lixiviación de deposiciones en la tierra antes o durante su uso industrial, como resultado de derrames o fugas de los tanques y tuberías.

CONTAMINACION DE ORIGEN AGRICOLA

Las prácticas agrícolas siempre ejercen una gran influencia sobre la calidad del agua subterránea y pueden causar problemas serios bajo ciertas circunstancias. Su influencia es grande porque normalmente se realizan sobre áreas de recarga de acuíferos. De especial preocupación es la práctica del monocultivo por muchos años sobre áreas extensas, con grandes aplicaciones de fertilizantes químicos y plaguicidas.

La descarga de efluentes sin control, proveniente de la cría intensiva de ganado, como materia orgánica y aguas de lavado, también puede producir localmente una contaminación orgánica significativa del agua subterránea. Además, se han detectado trazas de metales pesados en abonos y otros residuos orgánicos animales que contribuyen a la contaminación de estas aguas.

Por otra parte, cada día aumenta la demanda de agua requerida para consumo humano, industrial, agrícola, etc., y consecuentemente la generación de aguas residuales también aumenta. El aumento de volumen y el grado de contaminación de las aguas residuales hacen difícil su tratamiento, por lo que se tienen numerosos problemas para su manejo y control.

TANQUE TENORIO

Esta laguna, se encuentra ubicada en el municipio de Soledad de Graciano Sánchez, y es una laguna de captación de aguas residuales, que recibe un elevado volumen de descargas de aguas residuales, de las cuales el 60% es de procedencia urbana y un 40% de origen industrial; la zona industrial cuenta con más de 200 empresas entre las que destacan las minero-metalúrgicas, las textiles y las químicas.

Se han realizado algunos estudios en esta laguna, por ejemplo, Salas y Siller (1990) analizaron los parámetros fisicoquímicos, la genotoxicidad de las aguas afectadas y el contenido de metales pesados, encontrando un alto índice de contaminación por grasas, aceites, detergentes y coliformes totales, además de que los parámetros como Demanda bioquímica de oxígeno (DBO), Demanda química de oxígeno (DQO), Nitrógeno amoniacal (N-NH₃), etc., presentan índices mayores de lo normal. En cuanto a la genotoxicidad, esto se realizó en base a la producción de micronúcleos en células meióticas de la planta *Tradescantia*, encontrando que sí hay presencia de mutagénesis. Con respecto a los metales pesados se encontró Plomo (12.5 ppm), Arsénico (11.6 ppm), Mercurio (<0.5 ppm) y Cadmio (36 ppm de metal disuelto).

Posteriormente Montante y cols., (1995) encontraron concentraciones promedio de plomo de 51.8 ppm en las zonas muestreadas. Realizaron un estudio geoquímico de elementos traza en la misma laguna, encontrando que se detectó un alto contenido orgánico medido a través de la DBOs y la DQO en el agua de esta laguna artificial. La diferencia marcada entre estos dos parámetros puede ser explicada en parte por el origen industrial de las aguas residuales pero, sobre todo por la descomposición activa que se observó *in situ* y que puede afectar principalmente a la materia orgánica biodegradable.

La alta concentración de sales, fosfatos y sulfatos, bicarbonatos y carbonatos provienen de la propia agua residual. Sin embargo, el perfil de carbonatos/bicarbonatos que muestra un máximo cerca de la superficie del sedimento podría sugerir una disolución importante de los carbonatos del suelo en los primeros centímetros, fenómeno que se ve apoyado por una disminución del pH en el sedimento. Variaciones en las concentraciones de carbonatos, así como de sulfatos y sulfuros, que parecen ser considerables en los estratos superiores del sedimento, tienen una influencia muy seguramente en el comportamiento de los elementos traza que son fijados por el sedimento. Las concentraciones de aniones mayores son similares a las observadas en la columna de agua, aunque en general son más altas en esta última.

HONGOS CONTAMINANTES

Características de algunos hongos contaminantes:

Absidia sp:

Descripción macroscópica: tamaño ilimitado, tiende a llenar los tubos y cajas de Petri. En un inicio (2 a 3 días) es de color blanco, posteriormente toma una tonalidad blanco-grisáceo. Es de aspecto vellosos-algodonoso seco. No presenta pigmento.

Descripción microscópica: Micelio microsifonado de aproximadamente 4 a 8 μm de diámetro, hialino y cenocítico; rara vez presenta rizoides rudimentarios. Presenta esporangiosporas o endosporas redondas, de 2 a 4 μm de diámetro, esporangióforos largos; lo característico es la columnela que es grande y en forma de "pera". El esporangio es redondo y mide entre 10 a 70 μm de diámetro.

Alternaria sp:

Descripción macroscópica: las colonias se desarrollan con bastante rapidez, tomando color blanco grisáceo al comienzo y oscureciéndose con el tiempo. El reverso es negro. La superficie es lanosa o flocosa, presentando zonas de color gris más claro y los bordes de la colonia de igual color.

Descripción microscópica: se observan hifas de paredes oscuras ramificadas y tabicadas, con conidióforos de diferente longitud simples y agrupados, de color marrón. Estos conidióforos dan origen a una cadena de conidios de color marrón oscuro, pluricelulares, con septos longitudinales y transversales. Los macroconidios jóvenes son los más distales. Algunos de los conidios presentan en su extremo una especie de apéndice. Estos conidios se denominan muriformes o dictioconidios.

Aspergillus flavus:

Descripción macroscópica: las colonias crecen rápidamente en cinco días a 25°C y tienen un micelio séreo, algodonoso y bien desarrollado que presenta cierta tonalidad de amarillo, marrón o verde-amarillo cuando madura.

Descripción microscópica: las vesículas miden de 20 a 60 µm, son globosas y la esporulación ocurre en toda la superficie. Las fiálides se originan en la vesícula (uniseriado) o en una hilera primaria de métulas que dan origen a fiálides en la vesícula. Las fiálides a su vez dan origen a cortas cadenas o masas globulosas de conidias elípticas a esféricas, de 3 a 5 µm de diámetro y de color amarillo o amarillo-anaranjado que se tornan equinulados con el tiempo.

Aspergillus fumigatus:

Descripción macroscópica: crece en 2 a 6 días en medios sin cicloheximida. La colonia crece con un borde evidente, es vellosa y blanca durante el crecimiento precoz, pero luego se hace aterciopelada o granulosa y de color azul-verde a gris-verde por la producción de conidios pigmentados. El reverso de la colonia tiene un color blanco a crema.

Descripción microscópica: las hifas son hialinas y tabicadas. La longitud de los conidióforos es moderada y tiene una célula pie característica en su base. Las vesículas tienen forma de cúpula y la mitad a dos tercios de la superficie está cubierta por una hilera de fiálides desde las cuales salen largas cadenas de conidias globulosas, de 2 a 3 µm de diámetro, con tendencia a mantenerse en manojos paralelos hacia el centro. Los cultivos pueden tolerar temperaturas de hasta 45°C.

Aspergillus niger:

Descripción macroscópica: colonia blanca que puede volverse amarilla, pero rápidamente desarrolla un efecto de pimienta negra sobre la superficie a medida que se producen conidias, que pueden volverse tan densas con el tiempo

como para producir una nata negra. El reverso de la colonia queda de color gamusa o crema, un aspecto que diferencia al *A. niger* de los mohos dematiáceos.

Descripción microscópica: las hifas son tabicadas y los conidióforos son largos y lisos. La vesícula es esférica y da origen a grandes métulas y fiálides más pequeñas de las cuales se producen conidias negras, que oscurecen la superficie de la vesícula.

Aspergillus ochraceus:

Descripción macroscópica: El color característico de las especies aisladas en granos es el ocre; existen dos especies con este color *A. ochraceus* Wilhem y *A. ostianus* Wehmer. Estas dos especies se pueden distinguir entre sí por sus características microscópicas.

Descripción microscópica: presenta esclerocios de color rosa a púrpura y sus conidios son globosos de 2.5 a 3.0 μm .

Cladosporium sp:

Descripción macroscópica: de tamaño ilimitado, cubre todo el medio de cultivo. La colonia es plana, seca, aterciopelada, con algunos surcos. Es de color verde oscuro. Presenta pigmento negro difusible al medio.

Descripción microscópica: el micelio es microsifonado, de aproximadamente 2 a 4 μm de diámetro, septado y obscuro (café verdoso), algunas cepas forman cuerpos nodulares. Presenta microconidias, dispuestas en hormodendrum corto, conidióforo corto.

Penicillium sp:

Descripción macroscópica: las colonias son de crecimiento rápido, de color obscuro o verde, a veces blancas.

Descripción microscópica: La mayoría producen muchos conidióforos. Se observan fiálides solas o agrupadas a partir de métulas. Los conidióforos son hialinos y pueden tener paredes lisas o arrugadas. Los conidios son globosos, elipsoidales, cilíndricos o fusiformes, a veces son hialinos o grises.

Trichoderma sp:

Descripción macroscópica: las colonias son de crecimiento rápido, al principio blancas y esponjosas y después cambian a color verde, se les puede confundir con *Penicillium*, requiere la luz para esporular, *Penicillium*, no la requiere.

Descripción microscópica: presenta conidióforos hialinos ramificados pero no en verticilios, los conidios son verdes, algunas veces hialinos y nacen en racimos terminales de fiálides individuales o en grupo.

Candida albicans:

Descripción macroscópica: colonias blanco cremosas o amarillentas; lisas y brillantes, de consistencia blanda, que en 48 hrs alcanzan de 3 a 5 mm de diámetro, olor *sui generis* a levadura; al envejecer las colonias se tornan mates, rugosas, con pliegues, esto es en medio Agar Glucosado y Peptonado de Sabouraud a 37°C.

Descripción microscópica: se observan formas unicelulares, esféricas u ovoides; sin cápsula ni pigmento carotenoides, de paredes lisas y su tamaño varía entre 3 a 6 y 6 a 12 μm . A estas células se les denomina blastoconidios (o blastosporas), donde su reproducción se realiza por gemación unipolar o multipolar. En medios especiales (Agar Harina de Maíz con Tween 80) se originan brotes alargados llamados pseudohifas; así como también se producen los típicos y característicos clamidoconidios (o clamidosporas) terminales, que se desarrollan sobre hifas cortas y más gruesas, de forma esférica, pared gruesa y de diámetro de 10 a 15 μm .

Otra característica morfológica es la producción en el suero sanguíneo de tubos germinativos, un apéndice elongado que crece hacia afuera, y tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble de largo de la célula levaduriforme; esto ocurre después de 120 minutos a 37°C.

J U S T I F I C A C I O N

Se han realizado algunos estudios sobre la contaminación en el Tanque Tenorio (Salas y Siller, 1990; Díaz Barriga y cols., 1990; Montante Montelongo y cols., 1995), encontrando que ésta es de gran magnitud, presentando entre otras cosas prevalencia de condiciones anaerobias, alta concentración de sustancias químicas, materia orgánica, grandes concentraciones de metales pesados principalmente cadmio y plomo pero no se ha reportado la presencia de hongos en esta laguna, por lo que sería de interés:

- 1.- Determinar la población fúngica de la laguna, para conocer los hongos más frecuentes.
- 2.- Identificar levaduras (de las cuales hay muy pocos reportes de su aislamiento a partir de zonas con altos índices de contaminación por metales pesados).
- 3.- Analizar la resistencia a diferentes concentraciones de plomo en los hongos y levaduras obtenidos.

La resistencia al plomo de los hongos y levaduras es un indicador de la presencia del metal, así como un parámetro de los cambios ecológicos inducidos por los metales contaminantes, y también el desarrollo de variantes resistentes de hongos a los mismos (García Meza y cols., 1995).

En este trabajo, se utilizará plomo debido a que en los últimos reportes se indica que la contaminación por el mismo está aumentando (Ramos y Gutiérrez, 1995; Gutiérrez y Domínguez, 1995). Además se ha descrito que el control de la contaminación por plomo es uno de los principales problemas de la actualidad (Branckman, 1990). El consumo anual de este metal es de 3 millones de toneladas, se utiliza en la producción de acumuladores eléctricos y baterías, gasolina, en la industria de la construcción, municiones y en cubiertas de cable entre otros usos. Las corrientes de agua de esas industrias, son fuentes de contaminación ya que contienen niveles de metales que presentan riesgos de contaminación y para la salud humana (Niv y cols., 1993).

En la literatura hay reportes de aislamientos de microorganismos resistentes a metales pesados como: una cepa de *Cryptococcus albidus* aislado de zonas mineras de Guanajuato resistente a plata (Mendoza y cols., 1994) o el aislamiento de *Thiobacillus ferrooxidans* en suelos ricos en azufre (Espejo y Romero, 1987) o resistente a altas concentraciones de arsénico (Orrantía y cols., 1995), también se ha reportado el aislamiento de hongos tolerantes a metales pesados a partir de desechos mineros (Díaz Pérez, 1994).

Finalmente, las biomasas de los hongos aislados podrían ser utilizadas como filtros biológicos para tratar de eliminar metales pesados en solución, pues se han reportado algunas biomasas fúngicas con diferentes resultados, por ejemplo: Acosta y cols. (1995) con *A. flavus*, Holan y Volesky estudiaron la eliminación de plomo con algas marinas, o Sag y cols., (1993) el mismo metal con *Rhizopus arrhizus*, o con *Penicillium sp* (Niv y cols., 1993), Soto y Brizuela (1996) con diferentes especies de *Aspergillus* y un lodo obtenido de la laguna del tanque Tenorio estudiaron la captación de metales pesados y flúor en solución, con resultados satisfactorios.

O B J E T I V O G E N E R A L

Determinar la presencia de hongos y levaduras contaminantes en ausencia y presencia de plomo en aguas y lodos de zonas cercanas a tierras de cultivo del Tanque Tenorio.

O B J E T I V O P A R T I C U L A R

Analizar la resistencia de los hongos y levaduras obtenidos a diferentes concentraciones de plomo

MEDIOS UTILIZADOS

ASD. AGAR SABOURAUD DEXTROSA

FORMULA: Para 1 000 ml de agua destilada.

	(g)
Peptona especial	10.0
Dextrosa	40.0
Agar - Agar	15.0

METODO DE PREPARACION:

Rehidratar 65 g del medio de cultivo en 1 litro de agua destilada. Calentar hasta punto de ebullición para disolver el medio por completo. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos, y distribuir en las cajas de Petri.

Para obtener ASD adicionado con 200 ppm de plomo (ASD-Pb), se añaden 200 ppm de plomo, en forma de nitrato de plomo (PbNO₃), al medio de cultivo antes de distribuirlo en las cajas de Petri.

AEM. AGAR EXTRACTO DE MALTA

FORMULA: Para 1 000 ml de agua destilada.

	(g)
Extracto de Malta	12.75
Dextrina	2.75
Glicerina	2.35
Peptona de Gelatina	0.78
Agar	15.00
pH final	4.6 ± 0.2

METODO DE PREPARACION:

Suspender 33.6 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar perfectamente. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave de 118 a 121°C durante 15 minutos y distribuirlo en las cajas de Petri.

Para obtener AEM adicionado con 200 ppm de plomo (AEM-Pb), se añaden 200 ppm de plomo, en forma de nitrato de plomo (PbNO₃), al medio de cultivo antes de distribuirlo en las cajas de Petri.

Para las pruebas de resistencia en placa, se utilizó el mismo medio adicionado de cantidades crecientes de nitrato de plomo (de 200 a 2000 ppm), incubando los cultivos de 72 a 96 horas a 28°C, y comparando el crecimiento obtenido con el mismo medio sin adición de metal.

MEDIO DE NIGGER. MEDIO DE ALPISTE NEGRO AGAR

FORMULA: Para 1 000 ml de agua destilada.

(g)

Alpiste negro o	
Nigger pulverizado	70
Cloranfenicol	0.05
Agar bacteriológico	20

METODO DE PREPARACION:

Remojar el alpiste negro en 1 litro de agua destilada, hervir durante 30 minutos. Posteriormente filtrar en gasa y papel filtro. Disolver el agar y aforar a 1 litro con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 110°C durante 15 minutos. Distribuir en cajas de Petri esterilizadas.

AGAR HARINA DE MAIZ

FORMULA: Para 1 000 ml de agua destilada.

(g)

Harina de maíz	40
Agar base	20

METODO DE PREPARACION:

Se pesan 40 g de Harina de maíz y se disuelven en 1 litro de agua destilada, se hierve durante 60 min y se filtra en gasa. Se añaden 20 g de agar base y se afora a 1 litro. Esterilizar a 10 lb de presión por 20 min. Distribuir en cajas de Petri esterilizadas.

CALDO UREA

FORMULA: Para 1 000 ml de agua destilada.

(g)

Extracto de levadura	0.1
Urea	20.0
Fosfato monopotásico	9.1
Fosfato de sodio	9.5
Rojo de fenol	0.01
pH final 6.8 ± 0.2	

METODO DE PREPARACION:

Rehidratar 38.7 g del polvo en 1000 ml de H₂O destilada, sin calentar, cuando el polvo se haya disuelto, esterilizar por filtración. Distribuir en pequeños tubos en cantidades de 0.5 a 2 ml. Esterilizarse en autoclave de 5 a 8 lb de presión durante 15 min.

MEDIO DE WICKERHAM

FORMULA: Para 1 000 ml de agua destilada.

	(g)
Extracto de levadura	4.5
Peptona	7.5

METODO DE PREPARACION:

Disolver el extracto de levadura y la peptona en 1000 ml de agua destilada, añadir rojo de bromocresol y agregar unas gotas de hidróxido de sodio al 1% hasta tomar un color rojo naranja intenso. Colocar 4 ml de este medio en tubos de ensaye de 12 por 150 con tapón de rosca y esterilizar a 0.6 atm de presión por 15 minutos. Añadir 1 ml de la solución de azúcares a utilizar al 6% previamente esterilizadas a 0.75 atm (10 lb) por 15 minutos.

MM. MEDIO MINIMO

FORMULA: Para 1 000 ml de agua destilada.

	(g)
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 fierro-heptahidratado	0.001
Sulfato de zinc-heptahidratado	0.0018
Sulfato de manganeso-heptahidratado	0.0030

METODO DE PREPARACION:

Para obtener Medio Mínimo adicionado con 200 ppm de plomo (MM-Pb). Se añade el plomo en forma de nitrato de plomo ($PbNO_3$), al medio de cultivo antes de distribuirlo, ya que los hongos pierden su resistencia a los metales pesados si se conservan y/o subcultivan en medios de cultivo sin metales pesados.

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL DE CRISTALERIA

Agitador
Cajas de Petri de vidrio
Campanas de vidrio (Tubo de Durham invertido)
Cubreobjetos
Embudo
Matraces 250, 500, 1000 ml
Pipetas 1, 5, 10 ml
Pipeta Pasteur
Portaobjetos
Probetas 50, 100, 1000 ml
Tubos de ensaye 13 x 100
Tubos de ensaye 15 ml aprox.
Tubos de Wickerham
Vasos de precipitado 250, 500 ml

VARIOS

Asa micológica
Cámara de Neubauer
Pipeteador para pipeta Pasteur
Espátula
Gasa
Mechero de Bunsen
Micropipetas 200 μ l, 1 ml
Papel filtro
Recipientes esterilizados con tapa
Reloj
Tripié

EQUIPO

Autoclave
Balanza analítica
Balanza granataria
Baño serológico (YAMATO, SHAKING BATH.
CONSTANT TEMPERATURE. MODEL BT-25)
Centrífuga
Estufa bacteriológica (FELISA)
Microscopio binocular
Muestreador Tipo Gravity
Refrigerador

REACTIVOS Y SUSTANCIAS

Agar base
Agua destilada
Agua destilada estéril
Alpiste negro
Caldo de urea
Carbohidratos: glucosa, maltosa, galactosa, sacarosa, lactosa
Dextrosa
Harina de maíz
Hidróxido de sodio (NaOH) al 1%
Indicador Azul de algodón lactofenol
Indicador de rojo de bromocresol
Medio de Agar Extracto de Malta
Medio de Agar Sabouraud Dextrosa
Nitrato de plomo ($PbNO_3$)
Solución salina al 0.85% estéril
Sulfato de magnesio-heptahidratado
Sulfato de fierro-heptahidratado
Sulfato de zinc-heptahidratado
Sulfato de manganeso-heptahidratado
Sulfato de cobre
Suero humano
Tinta China
Tween 80

M E T O D O L O G I A

OBTENCION DE LAS MUESTRAS

En recipientes previamente esterilizados, se tomó una muestra de agua (aproximadamente a 30 cm por debajo de la superficie) y una de lodos (ésta con un muestreador tipo Gravity) de cada una de las 4 zonas cercanas a tierras de cultivo del Tanque Tenorio (siendo 4 muestras en total), se taparon, guardaron en bolsas de plástico y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento. Las muestras de aguas y lodos fueron colectadas en el mes de Septiembre de 1994. Cabe mencionar que se han reportado 7 sitios de muestreo distribuidos en la laguna (Montante y cols., 1995) de los cuales se tomó el sitio más cercano a zonas de cultivo (sitio S), recolectando 4 muestras de aguas y lodos que abarcan la superficie del sitio elegido.

AISLAMIENTO DE LOS HONGOS

Se tomaron 1 ml de agua y 1 gramo de lodo y se colocaron por separado en tubos de ensaye conteniendo 9 ml de agua destilada estéril y se agitaron para homogenizar las muestras. Posteriormente, se hicieron diluciones de éstas con agua destilada estéril (Resultando las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000), se tomaron alícuotas de 100 μ l de cada una de las mismas, las cuales se sembraron por duplicado en Agar Extracto de Malta adicionando 200 ppm de plomo (AEM-Pb) (dosis a la cual se considera que un organismo es resistente al metal: Cervantes y Gutiérrez, 1994) y en Agar Extracto de Malta (AEM), se incubaron a 28°C durante 7 días. Las colonias resultantes de hongos filamentosos se purificaron por resiembras sucesivas en AEM-Pb y AEM. Las colonias de levaduras obtenidas se purificaron a su vez en ASD-Pb y ASD.

RESIEMBRA DE COLONIAS LEVADURIFORMES Y/O FILAMENTOSAS

METODO GENERAL:

Las colonias desarrolladas se resiembran tomando un pequeño fragmento de la costra o los filamentos, con el asa esterilizada previamente a la flama y colocando por medio de picaduras en tres lugares diferentes en un tubo con medio inclinado o en caja de Petri, si se trata de colonias filamentosas, y por medio de estrias si se trata de levaduras. Se incuban durante 48 a 96 hrs para su desarrollo.

IDENTIFICACION DE HONGOS

Las cepas puras de los hongos filamentosos se identificaron por sus características macro y microscópicas en ASD (Técnica de la cinta adhesiva).

TECNICA DE LA CINTA ADHESIVA

Esterilizar a la flama el asa micológica y dejar enfriar. Pegar al asa micológica un fragmento de cinta adhesiva transparente con la parte adhesiva hacia afuera e introducirla en tubos y cajas de Petri, hasta tocar por la parte adhesiva de la cinta a la colonia a investigar. Desprender el fragmento de la cinta adhesiva sobre un portaobjetos con una gota de colorante (azul de algodón lactofenol) y colocar el cubreobjetos. Observar al microscopio.

IDENTIFICACION DE LEVADURAS

Las cepas de levaduras obtenidas se identificaron mediante las siguientes técnicas: Tinta China y Crecimiento en medio de Nigger para *Cryptococcus sp*; Prueba del Tubo Germinal, Cultivo en Agar Harina de Maíz, Asimilación de Urea, Auxanograma y Zimograma.

TECNICA DE LA TINTA CHINA (OBSERVACION DE LEVADURAS ENCAPSULADAS)

Se realizó un frotis, para el cual se tomó una asada de la colonia a analizar y se fijó al mechero y posteriormente se tiñó con tinta china y se observó al microscopio.

CRECIMIENTO EN MEDIO DE NIGGER

Se inculó una asada por estria de cada cepa a analizar en medio de Nigger y se incubó a 28°C durante 14 a 21 días, se observó la producción de melanina de las diferentes cepas por la producción de un pigmento oscuro en las colonias en crecimiento.

PRUEBA DEL TUBO GERMINAL (FILAMENTACION EN SUERO)

Para esta prueba, se utilizó suero humano de un individuo sano como agente inductor, colocando 0.5 ml en un tubo de ensaye para cada muestra, inmediatamente se añaden 1×10^6 levaduras/ml (las cuales se cuantificaron en una cámara de Neubauer con diluciones apropiadas) para un volumen final de 0.5 ml y se incuban en un baño serológico de 37°C durante 2 a 3hrs, posteriormente, se toma una gota de la suspensión y se coloca sobre un portaobjetos observándose al microscopio para comprobar la formación de tubos germinales. Se utilizó un control positivo de *Candida albicans* para la formación del tubo germinal, y un control negativo de la misma levadura sin la adición de suero.

CULTIVO EN AGAR HARINA DE MAÍZ (PRODUCCION DE CLAMIDOCONIDIOS)

Para este medio se realiza una siembra por estria de las muestras a analizar en cajas de Petri, agregando sobre la superficie sembrada una gota de Tween 80 (agente tensoactivo) al 0.02% para inducir a las levaduras a la formación de clamidoconidios; posteriormente se coloca un cubreobjetos, y se incuba en la estufa bacteriológica a 25°C durante 72 hrs, observando al microscopio la formación de los clamidoconidios. Se utilizó un control positivo de *C. albicans* y un control negativo de *C. tropicalis*.

ASIMILACION DE UREA

Se tomó una asada de cada cepa en estudio y se sembró en caldo urea a 37°C durante 4 a 6 días, observando la producción de ureasa por un cambio de color en el medio, el cual vira de anaranjado a rosa fuerte, indicando la producción de ureasa de las cepas estudiadas.

AUXANOGRAMA (ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS)

Fundamento :

El crecimiento que llevan a cabo las levaduras con un carbohidrato diferente como única fuente de carbono, se observa por la turbidez o la formación de un precipitado después de centrifugar a 3 000 rpm durante 5 min. Para esto, se utilizan los mismos tubos de Wickerham sin tubos de Durham ni indicador de pH en las mismas condiciones mencionadas para la fermentación de carbohidratos.

ZIMOGRAMA (FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS)

Fundamento :

La fermentación que realizan las levaduras se detecta en un medio de cultivo adecuado que contiene un carbohidrato como sustrato único, mediante la producción de gas, en tanto que la producción de ácido no indica fermentación. Para su realización, se utilizan tubos Wickerham y tubos de Durham, éstos últimos se colocan en forma invertida dentro de los tubos de Wickerham para posteriormente agregar a cada uno 4 ml de medio de Wickerham con indicador de rojo de bromocresol, después se añade 1 ml de cada carbohidrato (glucosa, maltosa, galactosa, sacarosa y lactosa) a utilizar en diferentes tubos de prueba con sus respectivos controles positivos y negativos.

Posteriormente, se añade a cada tubo empleado para la fermentación de los diferentes carbohidratos, 3×10^6 levaduras/ml, y se incuban a 37°C durante 48 hrs y finalmente se lee la producción de ácido por el cambio de color del indicador en el medio de cultivo y la producción de gas por la eliminación del líquido de los tubos de Durham, en comparación con los controles.

PRUEBA DE RESISTENCIA EN PLACA

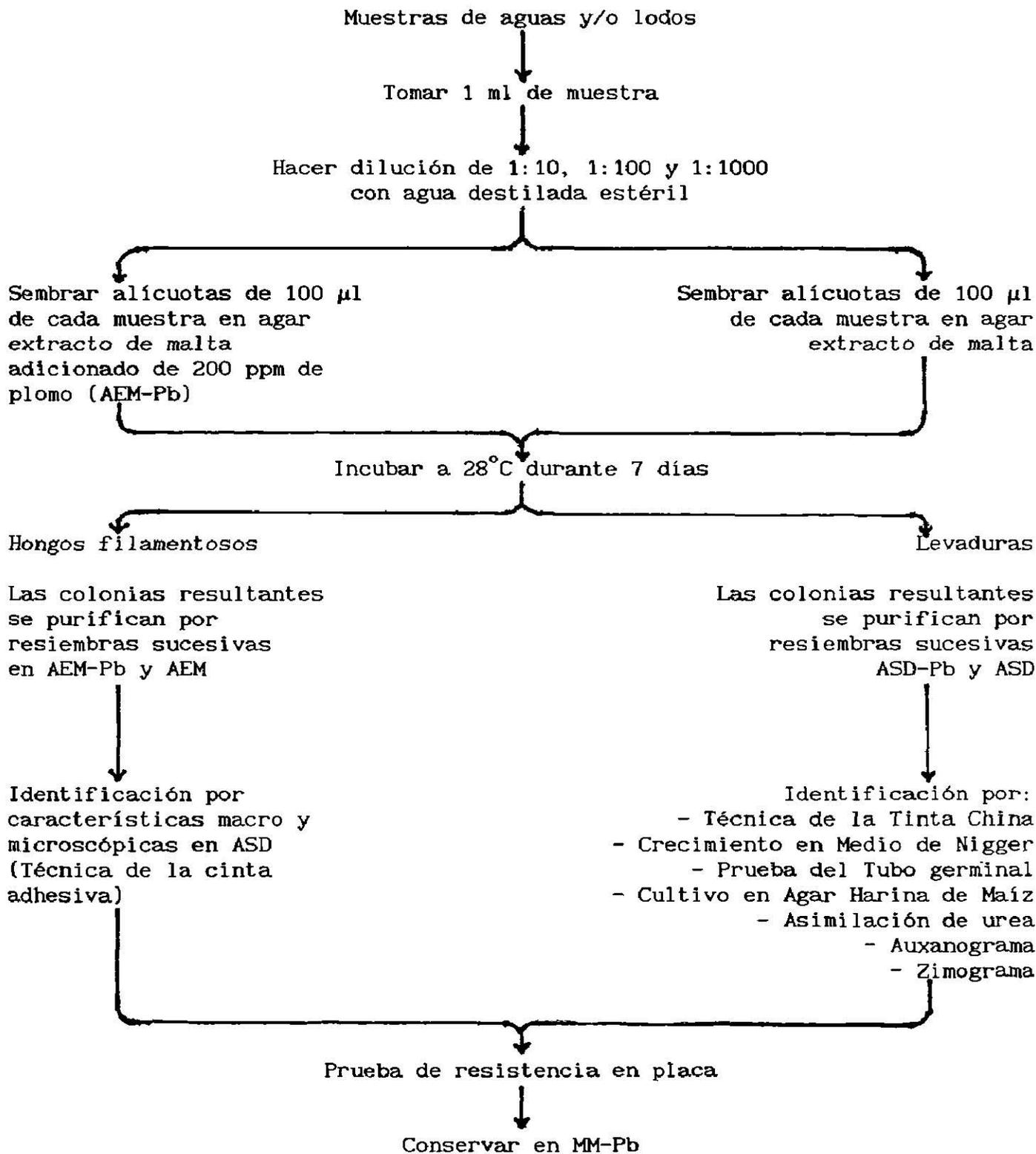
Se prepararon cajas de Petri con 20 ml de AEM adicionado con 200, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 y 2000 ppm de nitrato de plomo, las cuales se guardaron en refrigeración hasta su uso. Posteriormente, las placas preparadas se inocularon en la parte central con 1×10^6 conidias y/o levaduras del hongo correspondiente y se incubaron a 28°C . Cuando la caja control (que contenía medio de AEM sin plomo) alcanzó el máximo crecimiento (96-120 hrs) y se comparó el crecimiento de las placas restantes con respecto al control. Lo anterior se realizó con objeto de valorar la resistencia a plomo de los hongos y levaduras aislados.

MANTENIMIENTO DE CEPAS

Las cepas obtenidas tanto de hongos filamentosos como de levaduras se inocularon por picadura en un Medio Mínimo a base de sales adicionado de 200 ppm de plomo (MM-Pb) y se incubaron a 28°C hasta obtener un crecimiento óptimo, al cabo del cual se refrigeraron a 4°C para su mantenimiento.

NOTA: Esta metodología se resume en el cuadro de la siguiente página.

Cuadro No. 1.- Metodología utilizada



RESULTADOS

HONGOS AISLADOS:

1.- A partir de muestras de agua analizadas:

a) En la Tabla No. 1 se presentan los hongos que crecieron en ausencia de plomo, de los cuales se encontraron 34 especies, siendo los más frecuentes *Cladosporium sp* (23.5%), *Absidia sp* (20.6%) y *Penicillium sp* (20.6%), no se encontraron levaduras.

b) En la Tabla No. 2 se presentan los hongos que crecieron en presencia de 200 ppm de plomo, identificando 36 especies (figuras 1-4), de las cuales las más frecuentes fueron: *Penicillium sp* (44.5%) y *Trichoderma sp* (16.7%), no se obtuvieron levaduras.

2.- A partir de muestras de lodos analizadas:

a) En ausencia del metal se obtuvieron 7 especies, con mayor porcentaje de *Penicillium sp* (57.1%), *A. niger*, *A. ochraceus* y *Cladosporium sp* en la misma proporción (14.3%) (Tabla No. 3), no se obtuvieron levaduras.

b) En presencia de 200 ppm de plomo obtuvieron 7 especies de hongos los cuales fueron de sólo 2 géneros: el hongo filamentoso *Penicillium sp* (57.1%) y la levadura *C. albicans* (42.8%) (Tabla No. 4).

Por otra parte, todas las cepas identificadas, presentaron diferentes características macroscópicas entre las que se encuentran: diversos colores, aspectos, texturas y crecimiento en presencia de plomo (Tablas No. 5 a 8).

PRUEBA DE RESISTENCIA EN PLACA A PLOMO:

La Prueba de resistencia en placa a plomo se realizó contra un control de *Penicillium sp* cuya resistencia a plomo está probada (Acosta y cols., 1995).

1.- A partir de las muestras de agua analizadas:

Se encontró que de las 14 especies de *Penicillium sp*, 9 crecen bien a 2000 ppm de plomo, 3 a 1500 y 2 a 1000 (Figura No. 7), mientras que las 4 especies de *Trichoderma* aisladas crecieron a 1000 ppm de plomo (Figura No. 8), los 2 *A. flavus*, el *Cladosporium sp* y el *Mucor sp* crecen bien a 2000 ppm de plomo y los demás hongos aislados presentan resistencias entre 500 y 1500 ppm de plomo, siendo los menos resistentes 2 especies de *Alternaria sp* y 2 de *Acremonium sp* (Figuras 9 y 10).

2.- A partir de las muestras de lodos analizadas:

Se encontró que de las 4 especies de *Penicillium sp*, 2 crecen bien a 2000 ppm de plomo, 1 a 1500 y 1 a 1000 ppm, mientras que de las 3 especies de *Candida albicans* 2 crecen bien a 2000 ppm de plomo y una a 1500 ppm (Figura No. 11).

Finalmente, en las figuras 12 a 15 se muestran algunos cultivos de hongos en presencia de diferentes concentraciones de plomo.

Tabla No. 1.- HONGOS ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS DE AGUA ANALIZADAS
HONGOS QUE CRECIERON EN AUSENCIA DE 200 ppm DE PLOMO

HONGO	NUMERO DE ESPECIES AISLADAS	PORCENTAJE (%)
<i>Cladosporium sp</i>	8	23.53
<i>Absidia sp</i>	7	20.58
<i>Penicillium sp</i>	7	20.58
<i>Aspergillus niger</i>	2	5.88
<i>Aspergillus terreus</i>	2	5.88
<i>Trichoderma sp</i>	2	5.88
<i>Aspergillus flavus</i>	1	2.94
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	2.94
<i>Aureobasidium sp</i>	1	2.94
<i>Alternaria sp</i>	1	2.94
<i>Paecilomyces sp</i>	1	2.94
<i>Scopulariopsis sp</i>	1	2.94

EN BASE A 34 ESPECIES AISLADAS.

Tabla No. 2.- HONGOS ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS DE AGUA ANALIZADAS
HONGOS RESISTENTES A 200 ppm DE PLOMO

HONGO	NUMERO DE ESPECIES AISLADAS	PORCENTAJE (%)
<i>Penicillium sp</i>	16	44.44
<i>Trichoderma sp</i>	6	16.66
<i>Alternaria sp</i>	3	8.33
<i>Acremonium sp</i>	2	5.55
<i>Aspergillus flavus</i>	2	5.55
<i>Paecilomyces sp</i>	2	5.55
<i>Scopulariopsis sp</i>	2	5.55
<i>Cladosporium sp</i>	1	2.77
<i>Fusarium sp</i>	1	2.77
<i>Mucor sp</i>	1	2.77

EN BASE A 36 ESPECIES AISLADAS

Tabla No. 3.- HONGOS ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS DE LODOS ANALIZADAS.
HONGOS QUE CRECIERON EN AUSENCIA DE 200 ppm DE PLOMO

HONGO	NUMERO DE ESPECIES AISLADAS	PORCENTAJE (%)
<i>Penicillium sp</i>	4	57.14
<i>Aspergillus niger</i>	1	14.28
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	14.28
<i>Cladosporium sp</i>	1	14.28

EN BASE A 7 ESPECIES AISLADAS

Tabla No. 4.- HONGOS ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS DE LODOS ANALIZADAS.
HONGOS RESISTENTES A 200 ppm DE PLOMO

HONGO	NUMERO DE ESPECIES AISLADAS	PORCENTAJE (%)
<i>Penicillium sp</i>	4	57.14
<i>Candida albicans</i>	3	42.85

EN BASE A 7 ESPECIES AISLADAS

Tabla No. 5.- CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LAS 14 ESPECIES DE *Penicillium sp* AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES (4 - 5 DIAS DE INCUBACION. 28°C. AEM)

NUMERO	COLOR	ASPECTO	RESISTENCIA A PLOMO (PPM)
1	verde obscuro	polvoso	2 000
2	verde claro	húmedo	2 000
3	verde-azul	polvoso	2 000
4	blanco	algodonoso	2 000
5	verde-blanco	algodonoso	2 000
6	verde-amarillo	húmedo	2 000
7	blanco	polvoso	2 000
8	verde claro	polvoso	2 000
9	verde claro	algodonoso	2 000
10	verde oscuro	polvoso	1 500
11	verde oscuro	algodonoso	1 500
12	blanco	algodonoso	1 500
13	verde oscuro	polvoso	1 000
14	verde-amarillo	algodonoso	1 000

Tabla No. 6.- CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LAS 4 ESPECIES DE *Trichoderma sp* AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES (4 - 5 DIAS DE INCUBACION. 28°C. AEM)

NUMERO	COLOR	ASPECTO	RESISTENCIA A PLOMO (PPM)
1	verde seco	rugoso	1 000
2	gris	rugoso	1 000
3	verde oscuro	rugoso	1 000
4	blanco	rugoso	1 000

Tabla No. 7.- CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LAS 9 ESPECIES DE HONGOS AISLADOS DE AGUAS RESIDUALES (4 - 5 DIAS DE INCUBACION. 28°C. AEM)

NUMERO	ESPECIE	COLOR	ASPECTO	RESISTENCIA A PLOMO (PPM)
1	<i>A. flavus-1</i>	verde-amarillo	polvoso	2 000
2	<i>A. flavus-2</i>	verde-blanco	aterciopelado	2 000
3	<i>Alternaria sp-1</i>	gris claro	aterciopelado	1 500
4	<i>Paecilomyces sp-1</i>	verde seco	polvoso	1 000
5	<i>Paecilomyces sp-2</i>	verde oscuro	algodonoso	1 000
6	<i>Alternaria sp-2</i>	gris oscuro	aterciopelado	500
7	<i>Alternaria sp-3</i>	gris claro	aterciopelado	500
8	<i>Acremonium sp-1</i>	blanco-amarillo	velloso	500
9	<i>Acremonium sp-2</i>	blanco-naranja	velloso	500

Tabla No. 8.- CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LAS 7 ESPECIES DE HONGOS Y LEVADURAS AISLADOS DE LODOS RESIDUALES (4 - 5 DIAS DE INCUBACION. 28°C. AEM)

NUMERO	ESPECIE	COLOR	ASPECTO	RESISTENCIA A PLOMO (PPM)
1	<i>Penicillium sp-1</i>	verde claro	polvoso	2 000
2	<i>Penicillium sp-2</i>	verde-amarillo	polvoso	2 000
3	<i>C. albicans-1</i>	café oscuro	cremoso	2 000
4	<i>C. albicans-2</i>	negro	cremoso	2 000
5	<i>Penicillium sp-3</i>	verde-azul	algodonoso	1 500
6	<i>C. albicans-3</i>	café oscuro	cremoso	1 500
7	<i>Penicillium sp-4</i>	verde claro	polvoso	1 000

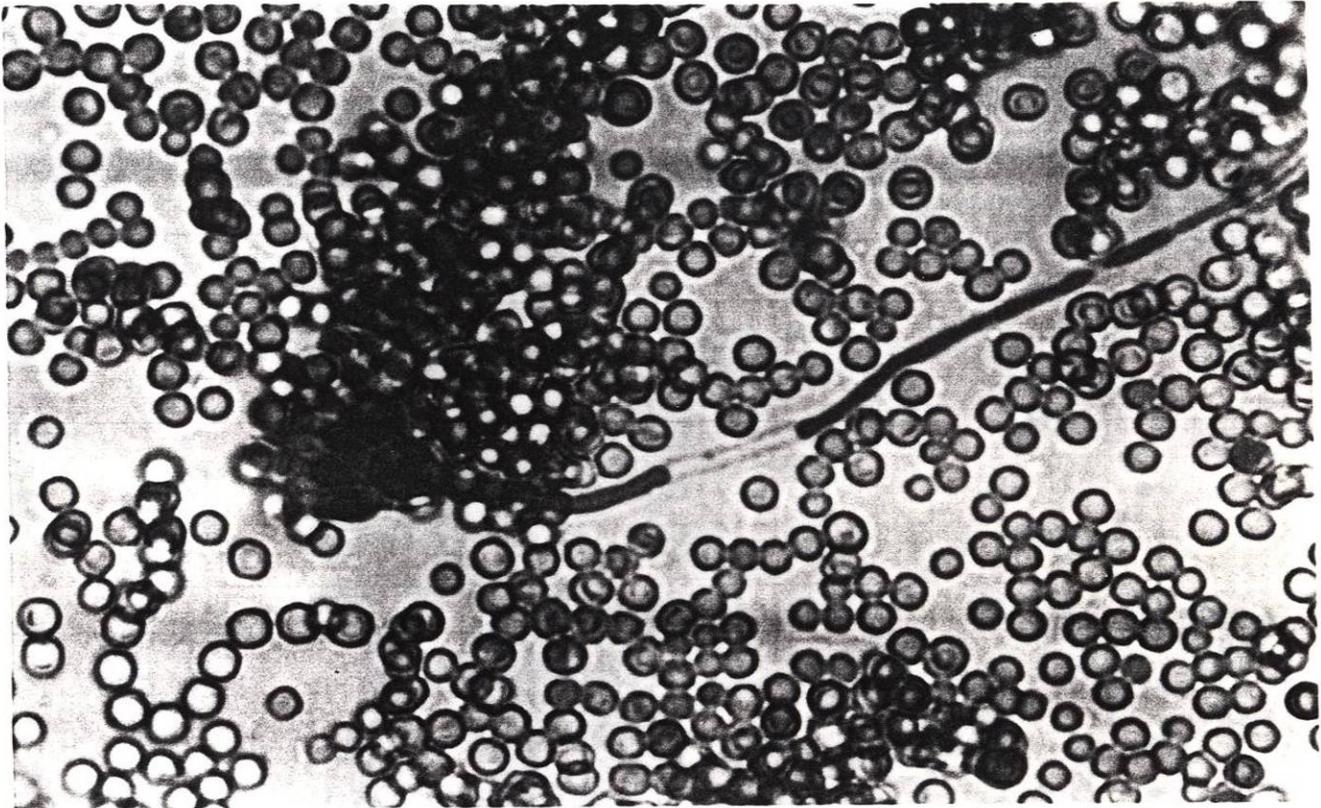


Figura No. 1.- Características microscópicas de *Penicillium sp*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

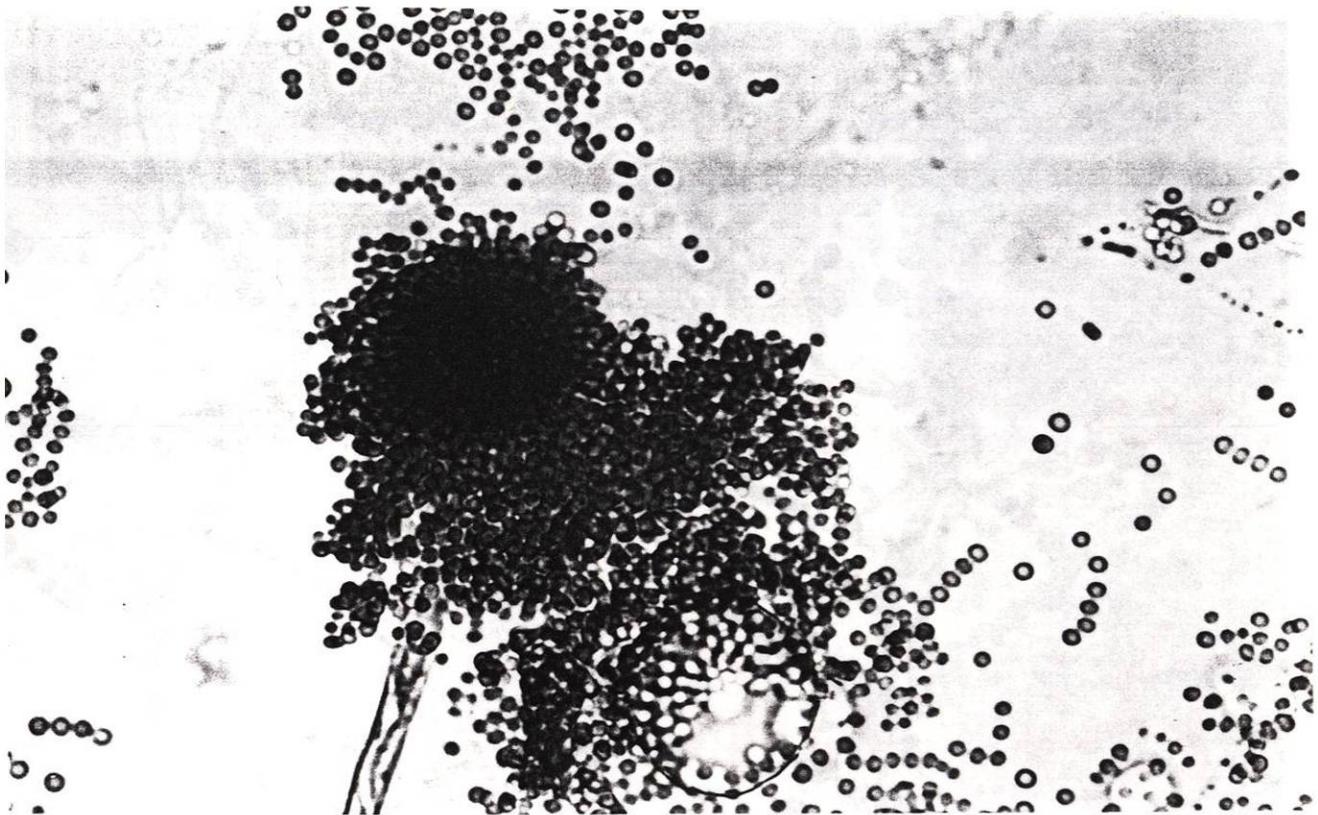


Figura No. 2.- Características microscópicas de *Aspergillus flavus*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

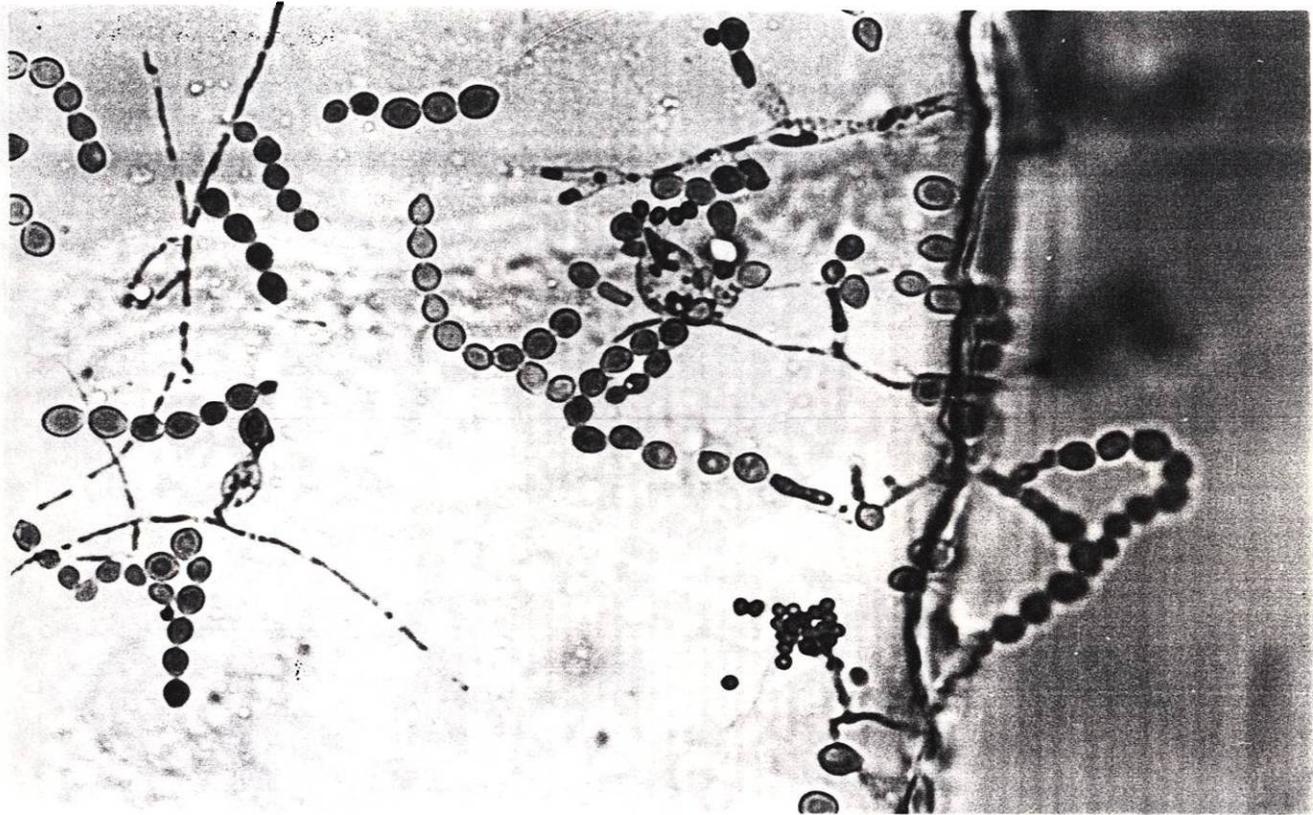


Figura No. 3.- Características microscópicas de *Scopulariopsis sp*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

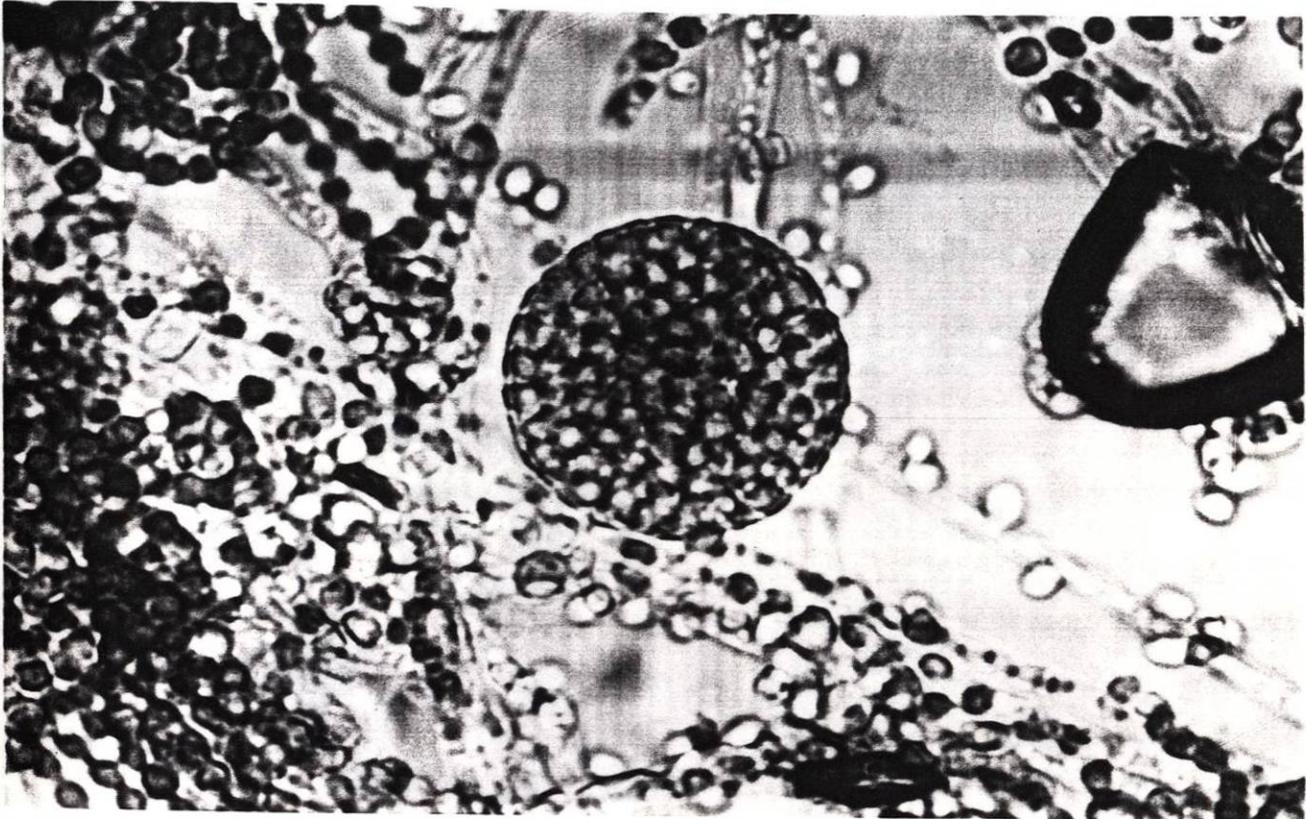


Figura No. 4.- Características microscópicas de *Mucor sp*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

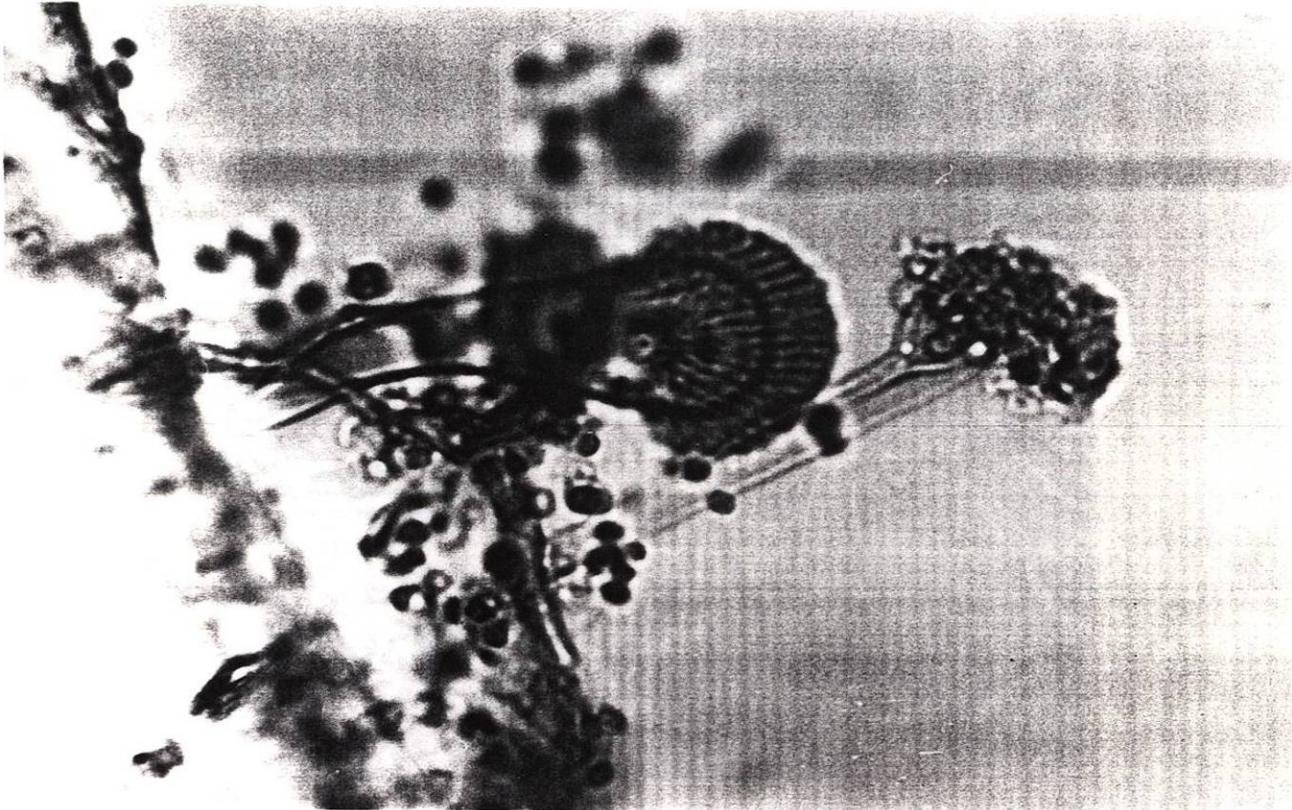


Figura No. 5.- Características microscópicas de *A. fumigatus*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

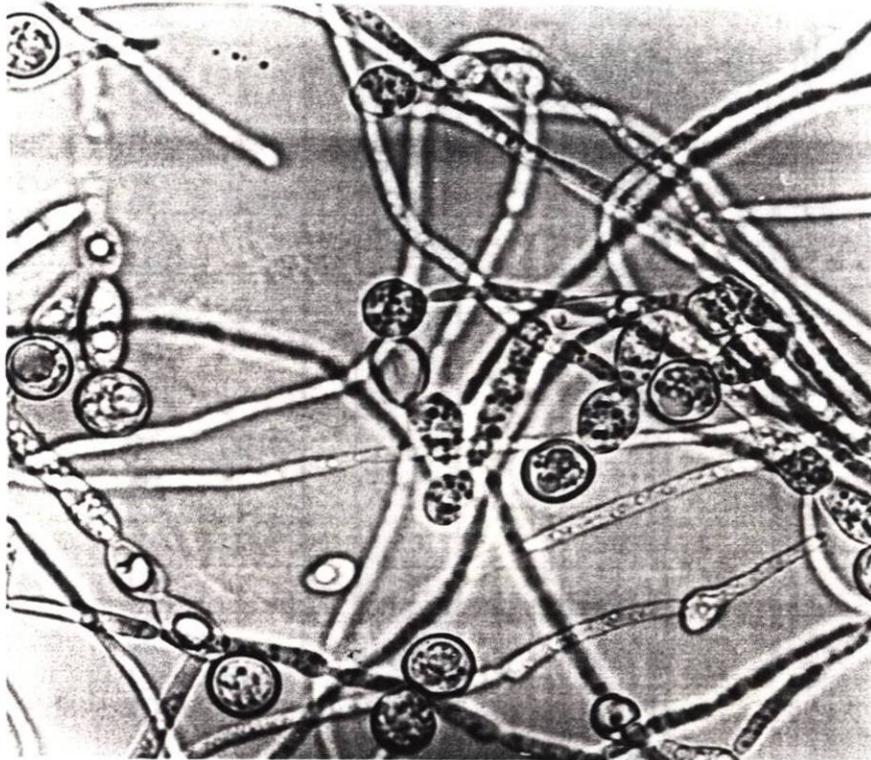


Figura No. 6.- Clamidoconidios de *C. albicans*
Agar harina de maíz en presencia de Tween 80
7 días a 28°C

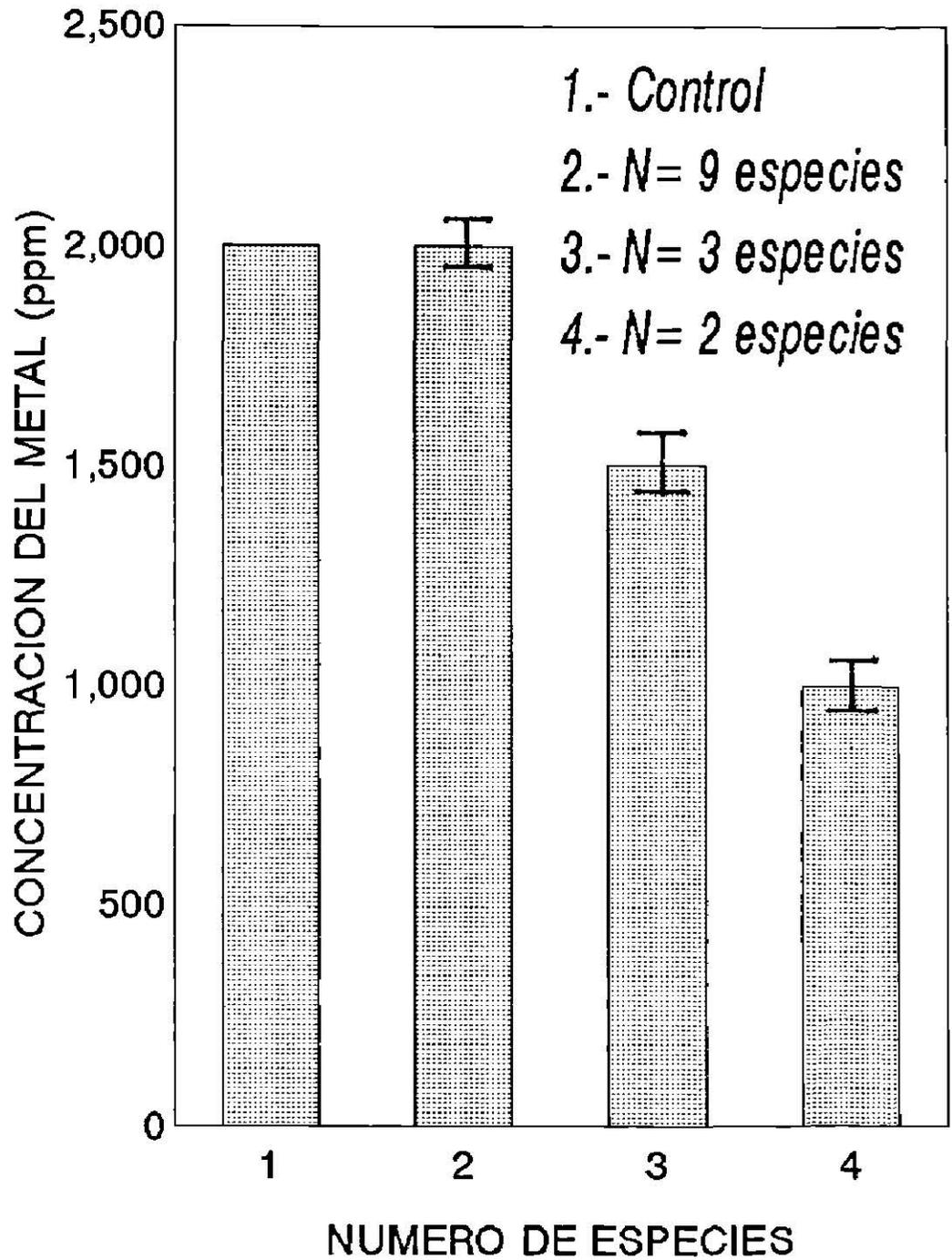


Figura No.7. RESISTENCIA DE DIFERENTES ESPECIES DE *Penicillium sp* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO, AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES(4-5 días de incubación, 28°C. Agar Extracto de Malta. CONTROL= *Penicillium sp* RESISTENTE A PLOMO).

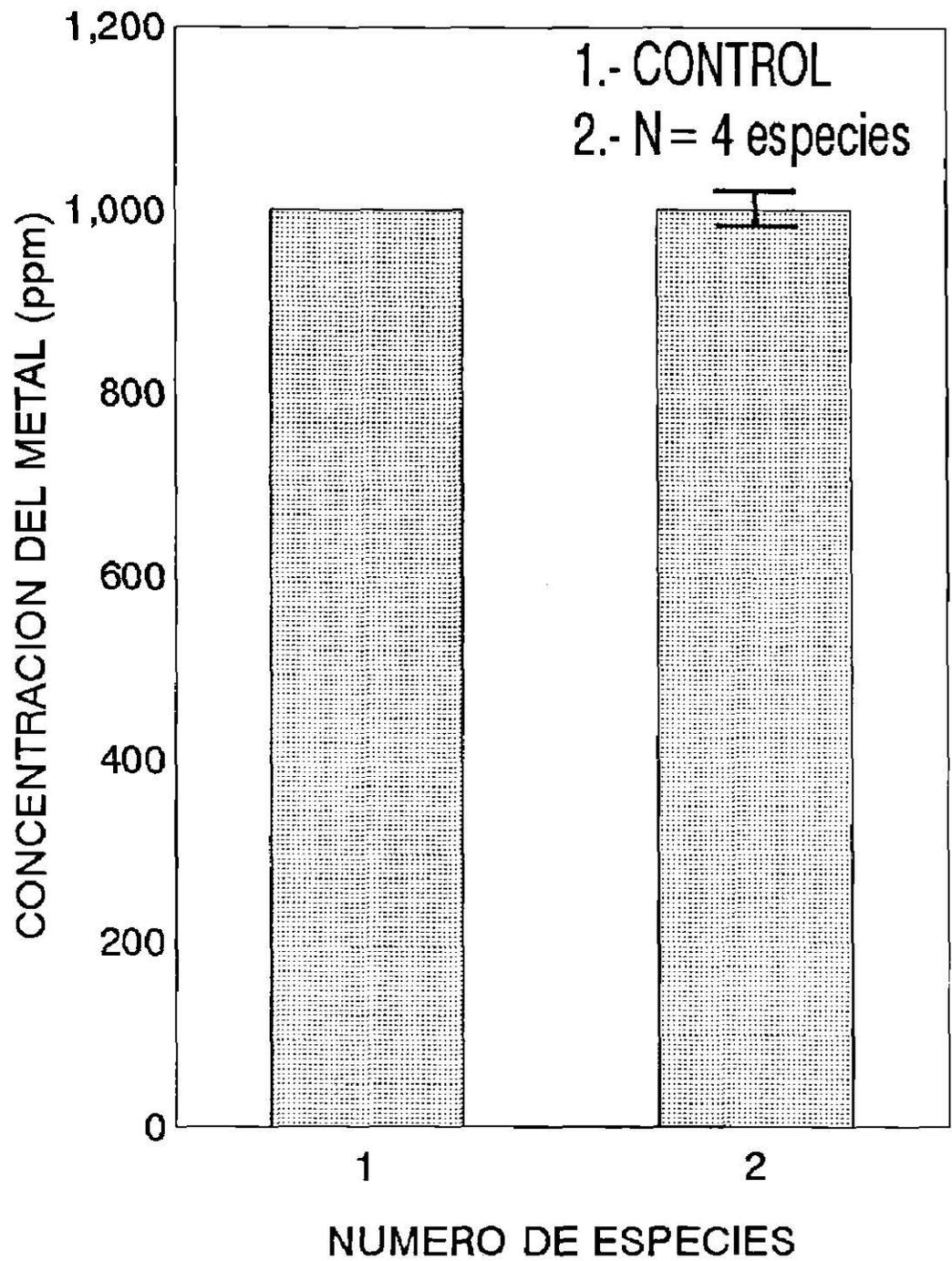


Figura No.8.- RESISTENCIA DE DIFERENTES ESPECIES DE *Trichoderma* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO, AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES (4-5 días de incubación, 26°C. Agar Extracto de Malta. CONTROL= *Penicillium* sp. RESISTENTE A PLOMO).

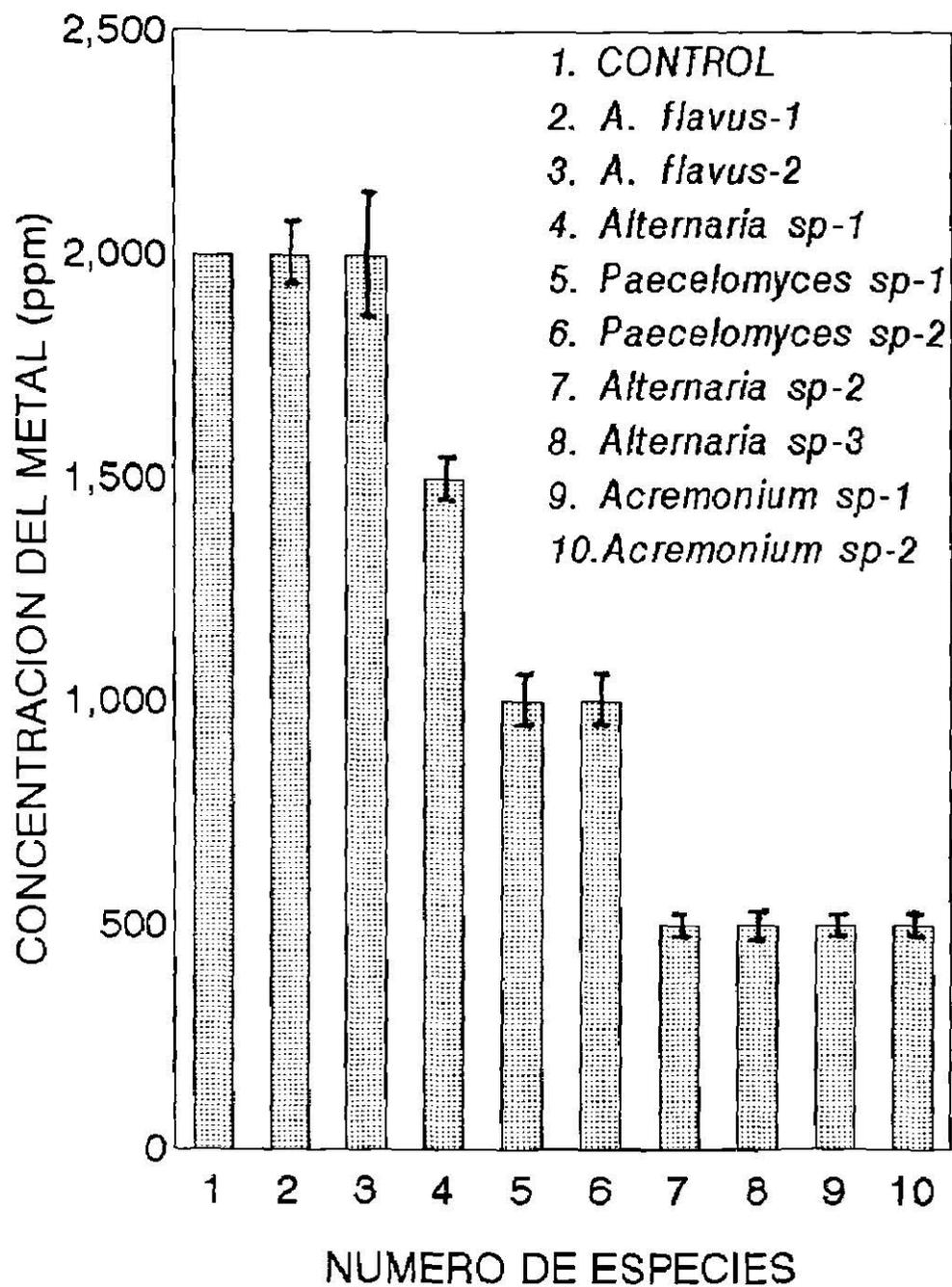


Figura No. 9 RESISTENCIA DE DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS FILAMENTOSOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO, AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES(4-5 días de incubación. 28°C. Agar Extracto de Malta CONTROL= *Penicillium* sp RESISTENTE A PLOMO).

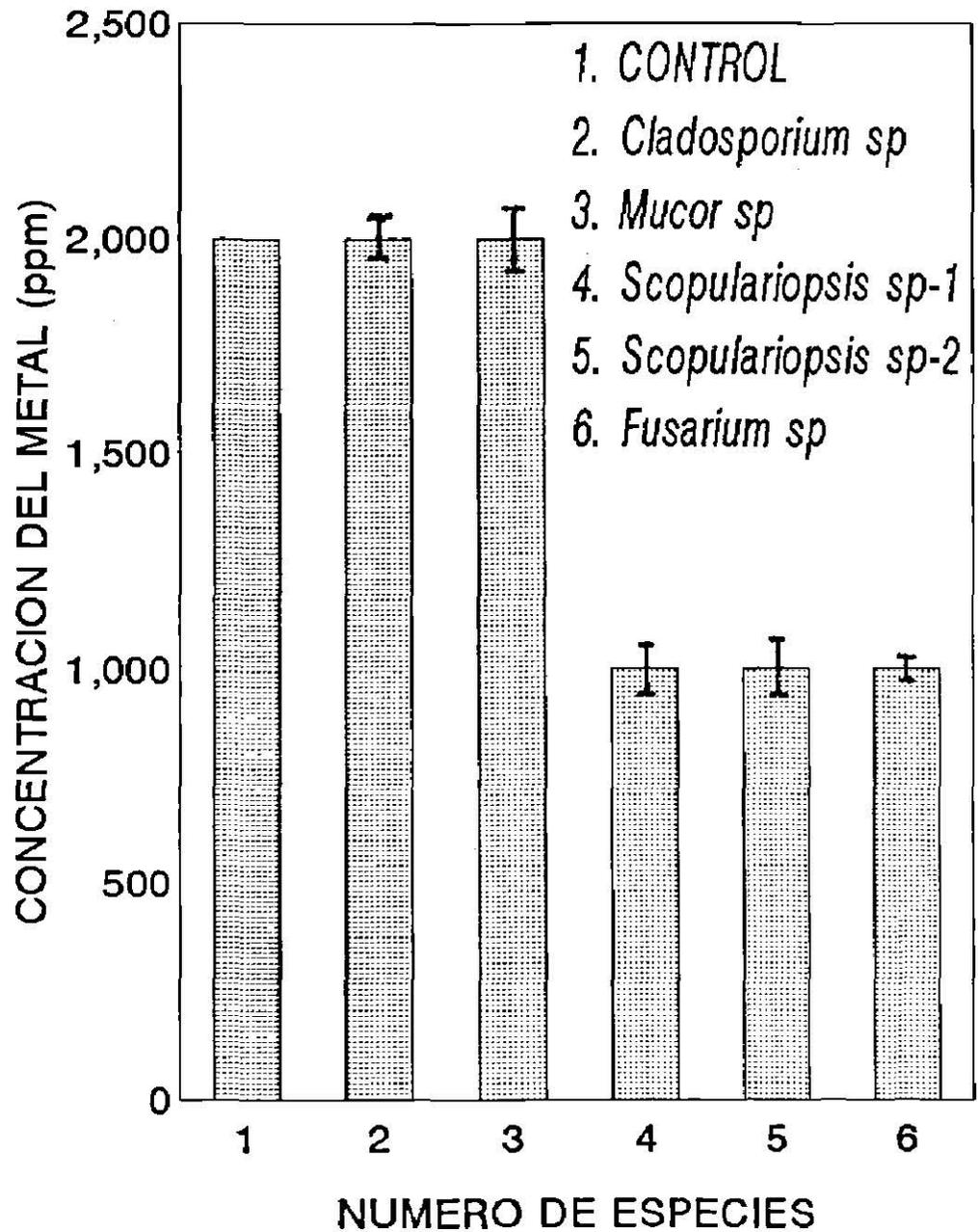


Figura No. 10- RESISTENCIA DE DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS FILAMENTOSOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO, AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES (4-5 días de incubación. 28°C. Agar Extracto de Malta. CONTROL= *Penicillium sp* RESISTENTE A PLOMO).

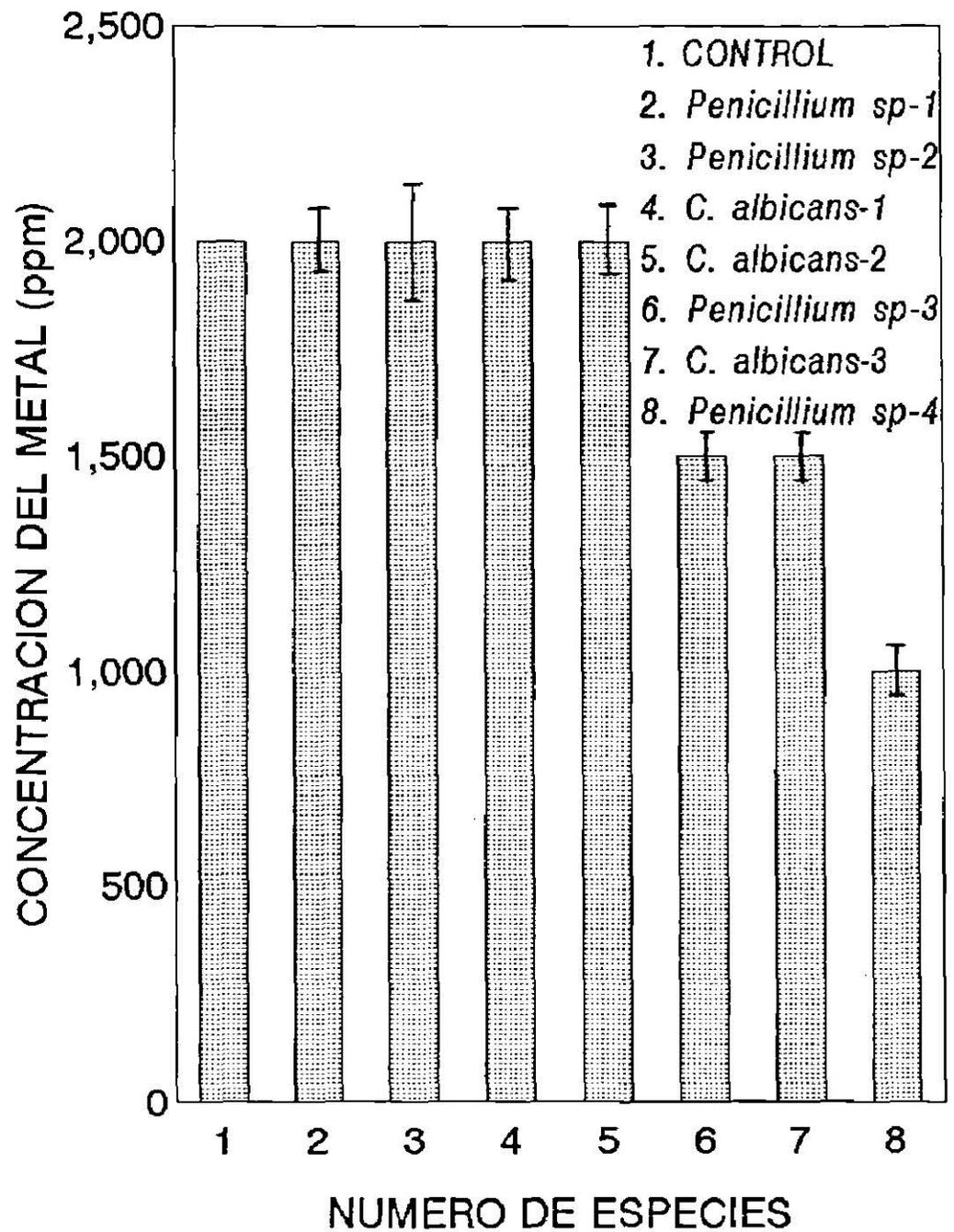


Figura No. 11- RESISTENCIA DE DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO, AISLADAS DE LODOS RESIDUALES (4-5 días de incubación. 28°C. Agar Extracto de Malta. CONTROL= *Penicillium sp* RESISTENTE A PLOMO).



Figura No. 12.- Características macroscópicas de *Penicillium sp*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

- 1.- Control sin metal
- 2.- Presencia de 500 ppm de plomo
- 3.- Presencia de 1000 ppm de plomo
- 4.- Presencia de 2000 ppm de plomo

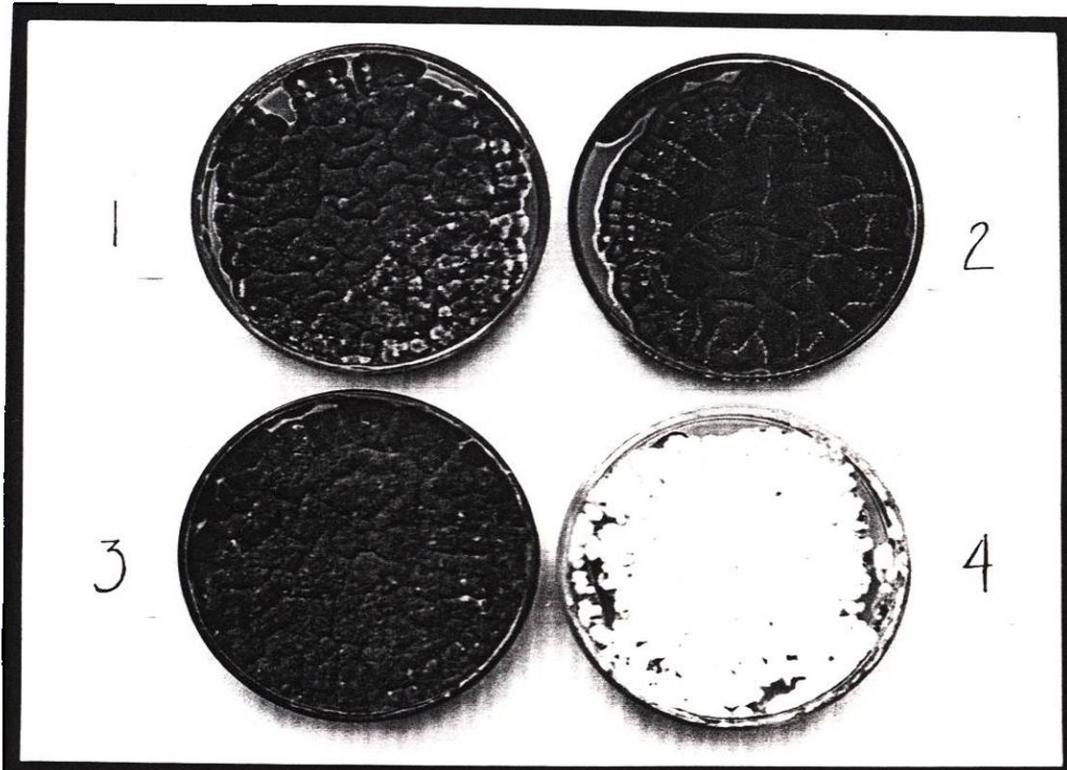


Figura No. 13.- Características macroscópicas de *Penicillium sp*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

- 1.- Control sin metal
- 2.- Presencia de 500 ppm de plomo
- 3.- Presencia de 1000 ppm de plomo
- 4.- Presencia de 2000 ppm de plomo

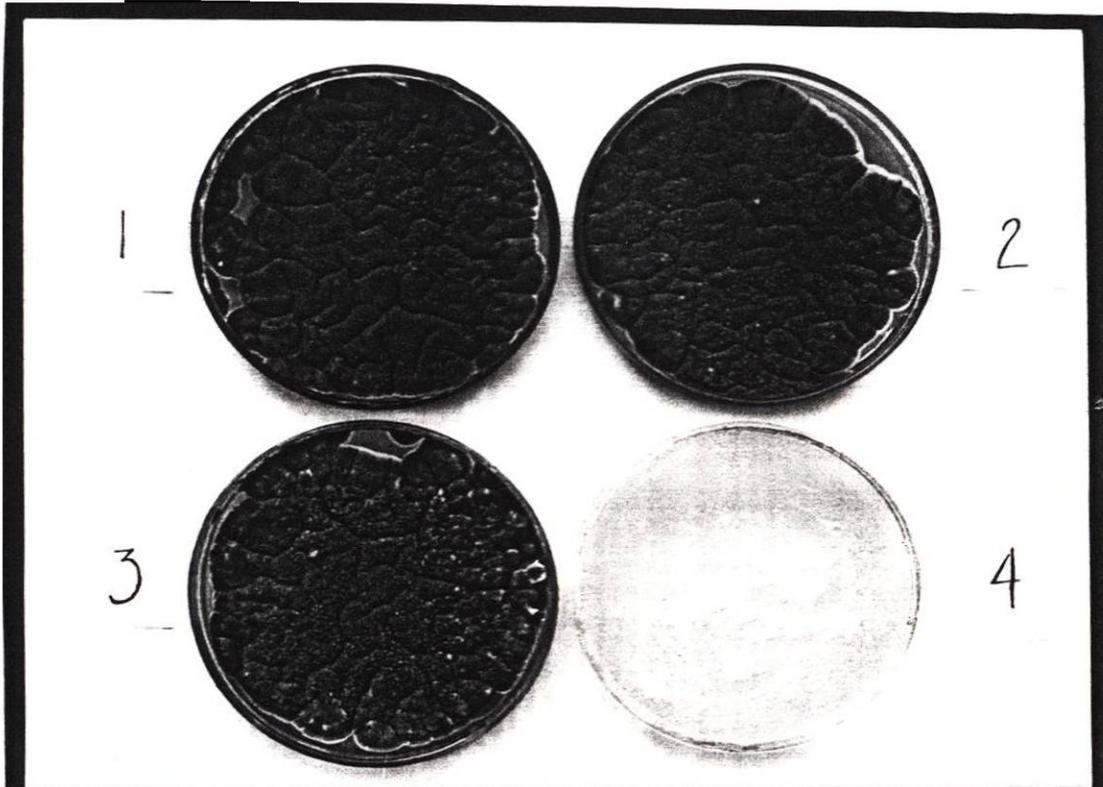


Figura No. 14.- Características macroscópicas de *Penicillium sp*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

- 1.- Control sin metal
- 2.- Presencia de 500 ppm de plomo
- 3.- Presencia de 1000 ppm de plomo
- 4.- Presencia de 2000 ppm de plomo

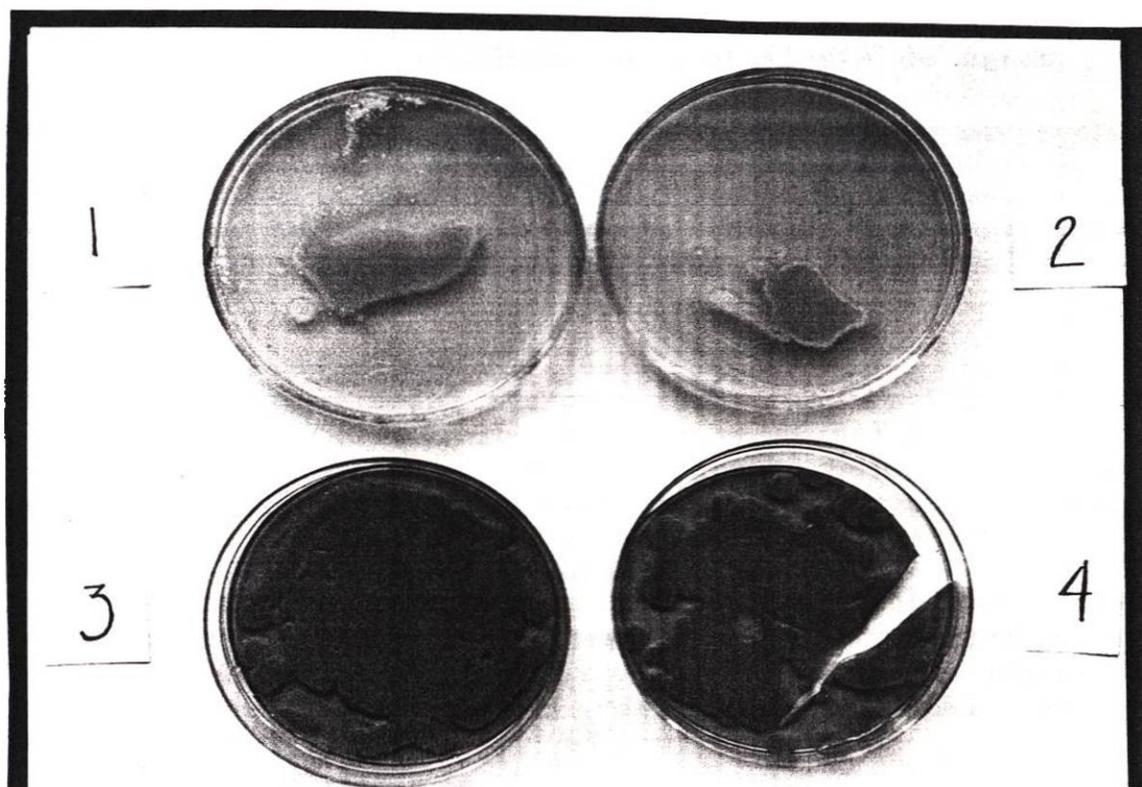


Figura No. 15.- Características macroscópicas de *C. albicans*
Crecido en AEM, 96-120 hrs, 28°C.

- 4.- Control sin metal
- 3.- Presencia de 500 ppm de plomo
- 2.- Presencia de 1000 ppm de plomo
- 1.- Presencia de 2000 ppm de plomo

D I S C U S I O N

El Tanque Tenorio es un área que se encuentra cubierta por las aguas de desecho industrial y aguas negras, por lo que es fuente de contaminación por metales pesados de los mantos acuíferos subterráneos de esta ciudad, pues éstos se acumulan en la cadena alimenticia y son poco degradados en la naturaleza. Los niveles de plomo que habían sido detectados en dicha laguna por Salas y Siller (1990) de 12.5 ppm han ido en aumento, ya que Montante y cols. (1995) detectaron que en las zonas muestreadas los niveles de plomo se encuentran dentro del rango de 15 a 199 ppm, esto puede deberse a las descargas industriales de diferentes fuentes (manufactura de baterías eléctricas, fundición, etc.), además, se sabe que la presencia de este metal induce problemas ecológicos, químicos, de tratamiento de aguas y de control de efluentes industriales.

El Tanque Tenorio se ha estudiado desde diferentes puntos de vista, pero no hay datos del contenido de la población fúngica en el mismo (Vargas Olvera, 1994; Alfaro y cols., 1990; Montante y cols., 1995), los hongos encontrados en este trabajo (siendo los primeros estudios al respecto) se consideran contaminantes ambientales.

Los hongos obtenidos de las muestras de agua analizadas que no presentaron resistencia al metal fueron *Cladosporium sp* (23.53%), *Penicillium sp* (20.6%) y *Absidia sp* (20.6%), lo cual está en relación con reportes previos de Arenas (1993), quien indica que estos hongos se pueden aislar de cualquier nicho ecológico. Los hongos más frecuentes que presentaron resistencia al metal fueron el *Penicillium sp* (44.5%) y el *Trichoderma sp* (16.66%). En las muestras de agua no se obtuvieron levaduras.

En los lodos analizados los hongos que se identificaron con mas frecuencia, que no tuvieron resistencia al metal fueron del género *Penicillium sp* (57.1 %) y los que si presentaron resistencia al metal fueron sólo de 2 géneros: *Penicillium sp* (57.1%) y *C. albicans* (42.8%).

Identificar *C. albicans* en lodos, no es frecuente, pues hay muy pocos reportes del aislamiento de este tipo de microorganismos (levaduras) a partir de zonas contaminadas con metales pesados, por ejemplo: Mendoza y cols., 1994, aislaron una cepa de *Cryptococcus albidus* resistente a plata a partir de jales de minas de Guanajuato.

En un estudio previo (Cervantes y Gutiérrez, 1994) se determinó que 200 ppm de cierto metal, es la dosis a la cual se considera que un organismo es resistente a dicho metal. En base a lo anterior la prueba de resistencia se realizó en el rango de 500 a 2000 ppm de plomo. De todas las especies de hongos aisladas en presencia de plomo, tanto en muestras de aguas como de lodos, el total de las mismas presentaron resistencia al metal entre 500 y 2000 ppm del mismo, lo cual indica que la laguna del Tanque Tenorio presenta una gran contaminación por plomo, además de que su presencia está alterando la microflora de la zona, pues al menos los hongos crecen bien en presencia del metal.

Los hongos aislados podrían ser utilizados como filtros biológicos para tratar de eliminar metales pesados y flúor en solución, pues ya hay reportes previos del uso de la biomasa celular de algunos microorganismos para eliminar metales pesados en solución con resultados altamente satisfactorios (Volesky y Holan, 1995), también como referencia para posteriores estudios de la flora fúngica de esta laguna.

Actualmente, se tiene un reporte de su aplicación: el agua de desecho de la industria minera de Guanajuato, se somete a tratamiento consistente en conducirla a grandes reservorios o lagunas artificiales donde circula lentamente promoviendo el crecimiento de algas y otros microorganismos, junto con el de plantas y animales acuáticos (García y cols., 1995), pues los organismos acumulan metales como partículas iónicas, o bien excretan sustancias que los neutralizan, o los hacen insolubles (Gadd, 1992) y muchos microorganismos concentran los metales a través de la unión a componentes estructurales específicos (por ejemplo: polisacáridos, polifosfatos y proteínas). Finalmente, realizando investigaciones sobre la selección de microorganismos capaces de acumular metales, así como diseñar sistemas de Ingeniería Industrial necesarios para aprovechar las características biológicas de remoción de todos o de ciertos iones en solución por los mismos microorganismos en los grandes volúmenes de agua; en el Tanque Tenorio puede ser de considerable aplicación, en las lagunas de desechos industriales, en la minería e industria metalúrgica.

Finalmente podríamos decir que las implicaciones de la contaminación del Tanque Tenorio pueden ser variadas: económicas, porque los cultivos que se desarrollan cerca de la laguna (maíz, alfalfa) no pueden aprovecharse al 100%; de salud, porque el peligro de enfermedades está latente debido al alto índice de contaminación orgánica; toxicológicas, por la presencia de metales pesados, fenoles, derivados clorados; sociales y geoquímicas, por la potencial contaminación de los mantos acuíferos subterráneos que abastecen de agua la ciudad de San Luis Potosí, así como ecológicas, por la presencia de bacterias y hongos resistentes a metales pesados.

CONCLUSIONES

De este trabajo realizado en aguas y lodos de zonas aledañas a tierras de cultivo del Tanque Tenorio se concluye que:

- 1.- La zona de riego del Tanque Tenorio, presenta una gran contaminación por hongos, que están considerados como oportunistas (que bajo ciertas condiciones pueden inducir enfermedades en los humanos), por lo que presentan un riesgo potencial para la salud de los habitantes de la zona.
- 2.- A partir de las aguas analizadas, se aislaron 36 especies de hongos resistentes a plomo, de las cuales las más frecuentes fueron: *Penicillium sp* (44.44%) y *Trichoderma sp* (16.66%).
- 3.- Se aislaron 34 especies de hongos, que no son resistentes a plomo, a partir de las aguas analizadas siendo las más frecuentes: *Cladosporium sp* (23.53%), *Penicillium sp* (20.58%) y *Absidia sp* (20.58%).
- 4.- En los lodos analizados se encontró el hongo filamentoso *Penicillium sp* (57.1%) y la única levadura presente fué *Candida albicans* (42.85%).
- 5.- Todas las especies aisladas en presencia del metal, presentaron resistencia al mismo en un rango de 500 a 2000 ppm.
- 6.- Los resultados de la microflora fúngica encontrada que presentan resistencia a plomo, indican contaminación por el mismo, así como alteraciones al ecosistema, pues el desarrollo de microorganismos en esas condiciones lo confirman.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Acosta, I., García, G., Torre, M.E. y Moctezuma, M.G. 1993. Aislamiento de hongos contaminantes ambientales resistentes a metales pesados y su potencial uso como bioadsorbentes naturales. *Biotecnología*. Vol. 3 y 4. pp 1-7.
- 2.- Acosta, I., Gutiérrez, C., Nava, V., Díaz, P., Navarro, R., Alvarez, N., Méndez, G., Robles, A., Adame, G., Mendoza, J., Fuentes, L. y Moctezuma, M.G. 1995. Eliminación de metales pesados y flúor en solución por la biomasa celular de algunos hongos filamentosos. *Revista de la Asociación de Ingenieros de Minas, Metalurgistas y Geólogos de México, A.C.* pp 1-15.
- 3.- Alfaro de la Torre, C., Díaz-Barriga, F., Galván Almendárez, G., Medellín Milán, P., Rea López, M.A., Ruíz Flores, E., Salas Cabrera, M.C. y Siller López, F.R. 1990. Toxicidad de aguas residuales en San Luis Potosí. *Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Vol. 13. pp 27-30.
- 4.- Arenas, R. 1993. *Micología Médica Ilustrada*. 1a. ed. Ed. Interamericana
- 5.- Armienta, M.A., Ceniceros, N., Rodríguez, R., Cruz, O., Juárez, F. y Aguayo, A. 1995. Movilidad del cromo en suelos contaminados de León, Gto. *Actas Inageq Vol. 1.* pp 19-22.
- 6.- Brauckman, B.M. 1990. Industrial solutions amenable to biosorption. In: *Biosorption of heavy metals*. Volesky, B. Ed. CRC Press. pp 51-64.
- 7.- Cervantes, C. y Gutiérrez, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Reviews*. Vol. 14. pp 121-128.
- 8.- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. and Rhodes, R. 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th. Academic Press.
- 9.- Díaz Barriga, F., Cuellar, J.A., Gómez, H., Mejía, J.J., Batres, L., Yañez, L. y Carrizales, L. 1990. Estudio sobre la exposición ambiental al arsénico y el cadmio en la población infantil de una zona de alto riesgo de la ciudad de San Luis Potosí. Informe entregado a SEDUE Federal.
- 10.- Díaz Pérez, M.P. 1994. Aislamiento de hongos tolerantes a metales pesados a partir de desechos mineros. Tesis Licenciatura. Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas. UASLP.
- 11.- Durazo, J., La transformación del sistema acuífero de la cuenca de México. *Ciencia y Desarrollo*. Conacyt. Vol. XVIII. No. 106. pp 40-47.
- 12.- Espejo, R. and Romero, P. 1987. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *App. Environ. Microbiol.* Vol. 53. No. 8. pp 1907-1912.
- 13.- Gadd, G.M. 1992. Microbial control of heavy metal pollution. In: Fry, J.C., Gadd, G.M., Herberet, R.A., Jones, C.E. Eds. *Watson-Crick. Microbial control of environmental, pollution*. pp 59-88.

- 14.- García Aguirre, G. 1989. Manual de métodos para el análisis de micotoxinas en granos. UNAM.
- 15.- García, V., Sosa, L., Cano, C., Ponce, P., Obregón, A., Vázquez, G., Ramos, R., Gutiérrez, M. y Montoya, A. 1995. Biotecnología Ecológica para el tratamiento de residuos mineros. Actas Inageq. Vol. 1. pp 175-180.
- 16.- González, L. y Alfaro, C. 1995. Efecto de los desechos urbanos sobre la calidad de aguas de ríos. Actas Inageq. Vol. 1. pp 11-12.
- 17.- Gutiérrez, S. y Domínguez, E. 1995. Estudio hidrogeoquímico del agua subterránea en los alrededores de una industria papelera en el Valle de Villa de Reyes, S.L.P. Actas Inageq. Vol. 1. pp 71-76.
- 18.- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos. Micología Básica y Aplicada. FCE-UNAM.
- 19.- Higuchi, K. 1976. PCB poisoning and pollution. Academic Press, New York.
- 20.- Holan, Z.R. and Volesky, B. 1994. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 43. pp 1001-1009.
- 21.- Koneman, E.W. y Roberts, G.D. 1987. Micología Práctica de Laboratorio. 3a. ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina.
- 22.- Lieber, G., Mago Vern, G.J. and Sadigni, F. 1977. *Penicillium*. Granuloma of the lung presenting as a solitary pulmonay nodule. JAMA. vol. 273. pp. 671.
- 23.- Martínez Ruíz, V.J. 1983. Presente y futuro de las cuencas geohidrológicas de Villa de Reyes, San Luis Potosí y Villa de Arista, S.L.P. Folleto Técnico No. 91. Instituto de Geología y Metalurgia. UASLP.
- 24.- Mendoza, E., Sosa, L., Gutiérrez, F., Obregón, A., Mendoza, D., Lappe, P. y Ulloa, M. 1994. *Cryptococcus albidus* aislada de zonas mineras de Guanajuato como resistente a plata es capaz de acumular este metal. Memorias de V Congreso Nacional de Micología. pp. 156.
- 25.- Montante Montelongo, A.D., Alfaro de la Torre, M.C. y Medellín Milan, P. 1995. Estudio geoquímico de elementos traza en una laguna artificial de aguas residuales. Actas Inageq. Vol. 1. pp 33-38.
- 26.- Niv, H., Shu Xu, X. and Wang, J. 1993. Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 42. pp 785-787.
- 27.- Orrantia, E., Arévalo, S. y Pereyra, B. 1995. Aislamiento de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* resistentes a altas concentraciones de arsénico. Memorias del XXVI Congreso Nacional de Microbiología. pp M-68.
- 28.- Peña, S.D. y Duran de Bazúa, M.C. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. Ciencia y Desarrollo. vol XVI, No. 94. pp. 61-69. Conacyt.

- 29.- Ramos, R. y Gutiérrez, M. 1995. Estudios de movilización de metales pesados en el municipio de Guanajuato. Actas Inageq. Vol. 1. pp 41-43.
- 30.- Sag, Y., Ozer, D. and Kutsal. 1995. A comparative study of the biosorption of lead (II) ions to *Z. ramigera* and *R. arrhizus*. Process Biochemistry. Vol. 30. No. 2. pp 169-174.
- 31.- Sakaguchi, T., Nakajima, A. and Tsuruta, T. 1993. Recovery of gold by using microbial biomass. Chemical Metalurgy. Vol. III. pp 41-53.
- 32.- Salas Cabrera, M.C. y Siller López, F.R. 1990. Detección de tóxicos en aguas residuales. Tesis Licenciatura. Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas. UASLP.
- 33.- Soto, M.E. y Brizuela, O.L. 1996. Remoción de metales pesados y flúor en solución por cinco especies de *Aspergillus* y un lodo obtenido de la laguna del tanque Tenorio. Tesis Licenciatura. Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas. UASLP.
- 34.- Vargas Olvera, M.C. 1994. La contaminación de acuíferos en la cuenca geohidrológica de San Luis Potosí. Curso: Mecanismos de interacción entre sólidos-metales tóxicos de interés ambiental en ecosistemas acuáticos. 12-15 abril. Facultad de Ciencias Químicas. UASLP.
- 35.- Volesky, B. and Holan, Z.R. 1995. Biosorption of heavy metals. Biotechnol. Prog. Vol. 11. pp 235-250.

