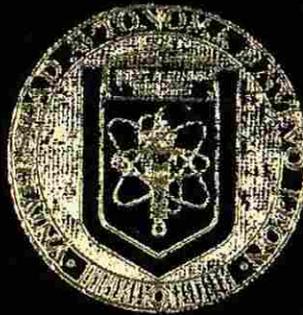


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS
FILAMENTOSOS TOLERANTES A METALES
PESADOS EN EL PROCESO DE LODOS ACTIVADOS
EN UNA PLANTA DE TRATAMIENTOS
DE AGUA RESIDUAL"

TESIS QUE PRESENTA LA
Q.F.B. MARISELA GARCIA HERNANDEZ

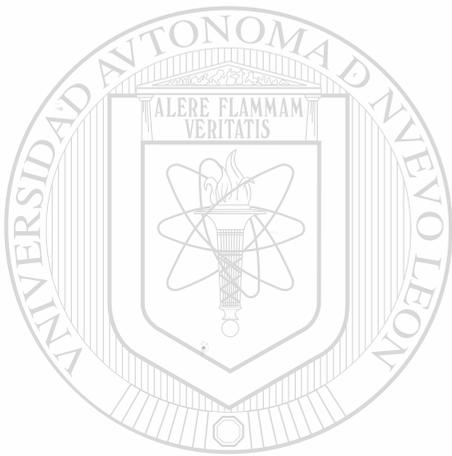
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. AGOSTO 2004

TM
Z5320
FCB
2004
.G372



1020149935



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



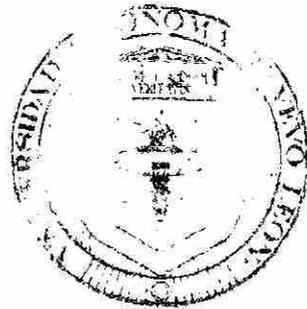
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS
FILAMENTOSOS TOLERANTES A METALES
PESADOS EN EL PROCESO DE LODOS ACTIVADOS
EN UNA PLANTA DE TRATAMIENTOS
DE AGUA RESIDUAL"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
TESIS QUE PRESENTA LA

Q.F.B. MARISELA GARCIA HERNANDEZ
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

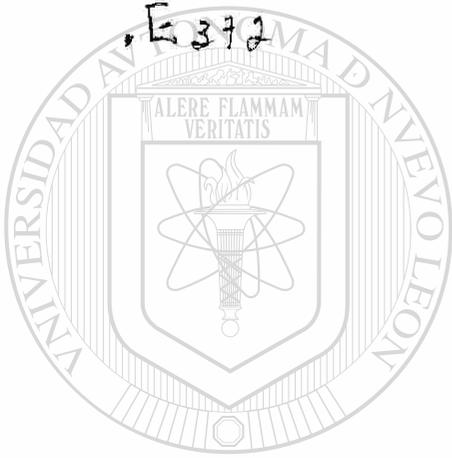
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. AGOSTO 2004

977 721

TH
25320
FOB
2012

E372



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO
TESIS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS
FILAMENTOSOS TOLERANTES A METALES PESADOS
EN EL PROCESO DE LODOS ACTIVADOS EN UNA
PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL”**

TESIS QUE PRESENTA LA

Q.F.B. MARISELA GARCÍA HERNÁNDEZ

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

AGOSTO 2004

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS
FILAMENTOSOS TOLERANTES A METALES PESADOS EN EL
PROCESO DE LODOS ACTIVADOS EN UNA PLANTA DE
TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL”**

TESIS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA POR**

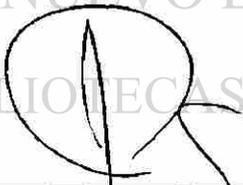
Q.F.B. MARISELA GARCÍA HERNÁNDEZ

APROBADA

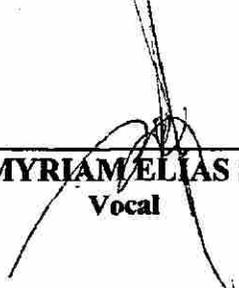
COMISIÓN DE TESIS



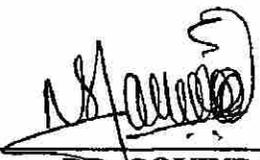
DR. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA
Director de Tesis



DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ
Secretario



DRA. MYRIAM ELÍAS SANTOS
Vocal

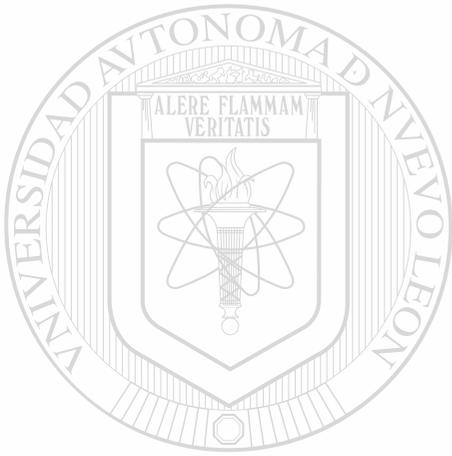


DR. GOVIND NADATHUR
Asesor Externo

San Nicolás de los Garza, N.L.

Agosto 2004

DEDICADO A:



DIOS

MI FAMILIA

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

MIS AMIGOS
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Por su amor y su confianza...

AGRADECIMIENTOS

A ti Señor, por guiarme, por tus promesas, por estar conmigo siempre, por ayudarme dándome la paciencia y fe de que lo lograría.

A mi padre por ser siempre un ejemplo de superación y enseñarme a aprender que las limitaciones solo existen en la mente.

A mi madre por tus palabras, por esa paciencia y tranquilidad que en los momentos difíciles han sido ejemplo para mí.

A Lila, por ser una excelente hermana mayor, por tus preocupaciones, cuidados y ánimos que me motivan a seguir avanzando en lo que me gusta hacer.

A Anita, por tu apoyo y nobleza, por escucharme y aconsejarme, por estar ahí cuando lo he necesitado.

A Rubén, por querer a Lila como la quieres, por ser un excelente hombre y ser humano, por ser mi hermano.

Al Dr. Hugo Luna Olvera, por la oportunidad de conocer el fascinante mundo de la investigación, por su confianza y asesoría en la elaboración de mi trabajo.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, por todas las enseñanzas brindadas durante mi formación como Maestro en Ciencias.

A la Dra. Miriam Elías, por su orientación y participación en la realización de esta investigación.

Al Dr. Govind Nadathur, por todo el apoyo y su valiosa orientación brindada en mi trabajo de tesis, por permitir finalizar mi investigación haciendo uso de su equipo de trabajo y la infraestructura de su laboratorio en Puerto Rico. Mil gracias.

A Santos por estar siempre conmigo a pesar de la distancia, por su ayuda en los momentos más importantes, más felices y difíciles. Gracias amiga. A ti Alex que siempre has creído en mí, por esa gran fe de que puedo lograr lo que sueño y pasa por mi mente.

Al club de Toby, mis amigas de siempre, Ame, Lucy y Diana, que aunque ha pasado el tiempo seguimos compartiendo de la misma manera como lo hacíamos hace 10 años. Gracias por permanecer ahí.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología que tuve y por los buenos amigos que hice en mi estancia en ese lugar, a Mabelle entrañable amiga que aunque no estés aquí

siempre confiaste en mi, a Sussy, Laura, Marco, Aurora, Caro y Juan. Hugo Leonid gracias por tu amistad, apoyo y asesoría.

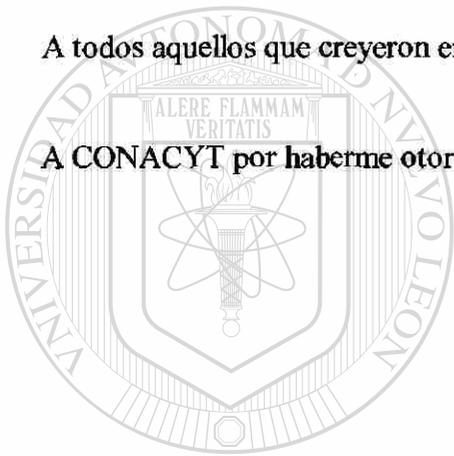
A aquellos que de alguna manera colaboraron en la elaboración de este trabajo, a Humberto no se me olvida que sin tu ayuda no hubiese podido finalizar, a Diana por tus contactos.

A ti Kathy por tus porras y curiosidad en mi trabajo, por tu amistad sincera que fue de mucho apoyo en los tiempos difíciles.

Y por los que aparecieron al final de este trabajo, al Dr. Medina por su amistad, confianza y ayuda, a Aleks por ser ese gran amigo y ángel que me ayuda, me cuida y apoya. A Mónica por tu sencillez y ánimo que siempre me demuestras a pesar de los problemas. A Adrián por tu ayuda siempre dispuesta, sobre todo por aquella que en aquel momento difícil la necesitaba...

A todos aquellos que creyeron en mi ...simplemente gracias.

A CONACYT por haberme otorgado el apoyo económico durante el postgrado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



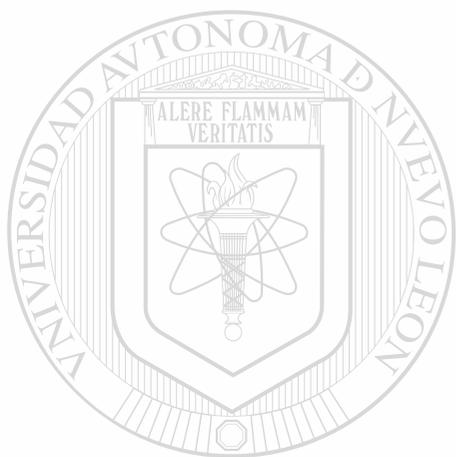
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE GRÁFICAS	vi
LISTA DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	x
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Antecedentes	3
2.1.1 Contaminación por metales pesados.....	3
2.1.1.1 Plomo	5
2.1.1.2 Cadmio	7
2.1.1.3 Mercurio	9
2.1.1.4 Cromo	10
2.1.2 Tolerancia a los metales pesados.....	10
2.1.2.1 Metalotioninas (MT).....	11
2.1.2.2 Fitoquelatinas (FQ).....	12
2.1.3 Resistencia a los metales pesados en hongos.....	13
2.1.4 Toxicidad de los metales pesados en los hongos.....	14
2.1.5 Factores ambientales que modifican la toxicidad de los metales.....	16
2.1.6 Interacciones de los hongos con los metales pesados.....	19
2.1.6.1 Precipitación y atrapamiento de metales extracelularmente	20
2.1.6.2 Unión de metales pesados a las paredes celulares.....	20
2.1.6.3 Captación de metales pesados.....	23
2.1.6.4 Atrapamiento intracelular de metales pesados.....	25
2.1.6.5 Transformación química de metales.....	26

III. IMPORTANCIA	1
IV. JUSTIFICACIÓN	2
V. HIPÓTESIS	3
VI. OBJETIVOS	3
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
7.1 Recolección de la muestra y Aislamiento de los hongos.....	7
7.2 Caracterización de las cepas.....	9
7.3 Selección de las cepas tolerantes a metales pesados.....	10
7.3.1 Preparación de los Stocks de metales.....	10
7.3.2 Preparación de los medios.....	11
7.3.3 Conteo de esporas e inoculación de las cepas.....	12
7.4 Extracción de DNA de los hongos.....	13
7.5 Amplificación con PCR 18S-rDNA.....	14
7.6 Clonación	16
7.6.1 Preparación de células calcio-competentes.....	19
7.6.2 Transformación	20
7.6.3 Miniprep	20
7.6.4 Caracterización de las clonas.....	23
7.7 Secuenciación	25
7.8 Análisis Estadísticos.....	26
VIII. RESULTADOS	44
8.1 Aislamiento de hongos de las muestras de agua residual.....	44
8.2 Caracterización de los aislamientos obtenidos.....	44
8.3 Selección de los hongos tolerantes a metales pesados.....	47
8.4 Análisis de Resistencia de la cepa #15.....	62
8.5 Extracción de DNA de las cepas de hongos.....	65
8.6 Amplificación de DNA genómico con PCR de 18S-rDNA.....	66

8.7 Clonación de la cepa #15.....	67
8.8 Secuenciación	69
IX. DISCUSIÓN	70
X. CONCLUSIONES	78
XI. APÉNDICE	79
XII. BIBLIOGRAFÍA	85



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE DE FIGURAS

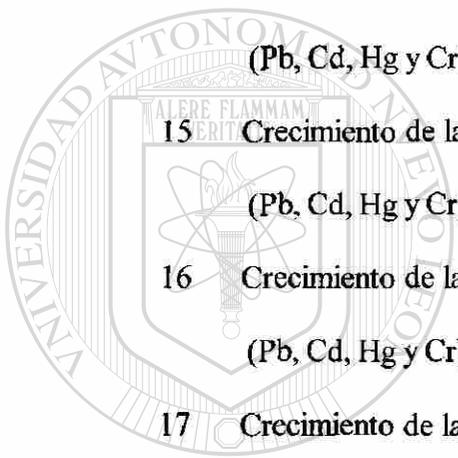
NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Diagrama de la subunidad menor eucariota rDNA con las regiones variables remarcadas en negro.....	36
2	Diseño Experimental de Clonación con el vector TOPO.....	39
3	Micro y macromorfología cepa #1 <i>Mucor sp.</i>	44
4	Micro y macromorfología cepa #2 <i>Geotrichum sp.</i>	45
5	Micro y macromorfología cepa #3 <i>Penicillium sp.</i>	45
6	Micro y macromorfología cepa #12 <i>Sporotrichum sp.</i>	46
7	Micro y macromorfología cepa #15 <i>Penicillium sp.</i>	46
8	Resistencia a Plomo de la cepa #1.....	49
9	Resistencia a Cadmio de la cepa #1.....	49
<hr style="border: 1px solid black;"/>		
10	Resistencia a Mercurio de la cepa #1.....	49
11	Resistencia a Cromo de la cepa #1.....	49
12	Resistencia a Plomo de la cepa #2.....	52
13	Resistencia a Cadmio de la cepa #2.....	52
14	Resistencia a Mercurio de la cepa #2.....	52
15	Resistencia a Cromo de la cepa #2.....	52
16	Resistencia a Plomo de la cepa #3.....	55
17	Resistencia a Cadmio de la cepa #3.....	55
18	Resistencia a Mercurio de la cepa #3.....	55

19	Resistencia a Cromo de la cepa #3.....	55
20	Resistencia a Plomo de la cepa #12.....	58
21	Resistencia a Cadmio de la cepa #12.....	58
22	Resistencia a Mercurio de la cepa #12.....	58
23	Resistencia a Cromo de la cepa #12.....	58
24	Resistencia a Plomo de la cepa #15.....	61
25	Resistencia a Cadmio de la cepa #15.....	61
26	Resistencia a Mercurio de la cepa #15.....	61
27	Resistencia a Cromo de la cepa #15.....	61
28	Cepa #15 en CS (izq. a der.) sin plomo, con plomo 400 ppm y caldo únicamente.....	63
29	Micelio seco cepa #15. (De izq.a der.) Sin metal; hongo en presencia de plomo 400 ppm.....	63
30	Cepa #15 en CS (izq. a der.) sin cromo, con cromo 250 ppm y caldo únicamente.....	64
31	Extracción de DNA de los aislamientos de hongos.....	65
32	Productos de PCR de DNA genómico de los aislamientos de hongos.....	66
33	Digestión de las clonas 2,3 y 5 con <i>EcoRI</i>	67
34	PCR de las clonas 2,3 y 5	68
35	Secuencia Nucleotídica obtenida de la secuenciación de la clona.....	69

INDICE DE GRÁFICAS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Crecimiento de la cepa #1 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	47
2	Crecimiento de la cepa #1 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	48
3	Crecimiento de la cepa #1 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	48
4	Crecimiento de la cepa #2 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	50
5	Crecimiento de la cepa #2 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	51
6	Crecimiento de la cepa #2 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	51
7	Crecimiento de la cepa #3 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	53
8	Crecimiento de la cepa #3 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	53
9	Crecimiento de la cepa #3 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	54
10	Crecimiento de la cepa #12 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	56

11	Crecimiento de la cepa #12 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	56
12	Crecimiento de la cepa #12 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	57
13	Crecimiento de la cepa #15 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	59
14	Crecimiento de la cepa #15 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	59
15	Crecimiento de la cepa #15 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	60
16	Crecimiento de la cepa #15 en 400 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	62
17	Crecimiento de la cepa #15 en 800 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).....	63



UANE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



INDICE DE TABLAS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Reacción de clonación con el vector TOPO.....	40
2	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	79
3	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	79
4	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	79
5	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	80
6	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	80
7	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	81
8	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #3 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	81
9	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #3 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	81
10	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #3 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	82

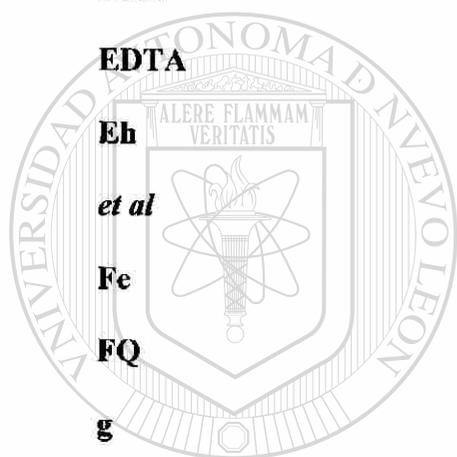
11	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	82
12	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	82
13	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	83
14	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	83
15	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	83
16	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	84
17	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 400 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	84
<hr/>		
18	Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 800 ppm. según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.....	84 [®]

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS

Ag⁺	Plata
Ag⁰	Plata metálico
Al³⁺	Aluminio
As	Arsénico
ASDC	Agar Sabouraud Dextrosa con Cloramfenicol
Au	Oro
Bi	Bismuto
°C	Grados Celsius
Ca²⁺	Calcio
CaCl₂	Cloruro de calcio
cDNA	DNA complementario
Cd	Cadmio
Cd-MT	Metalotionina de cadmio
Cd(NO₃)₂	Nitrato de cadmio
Cd(OH)₂	Hidróxido de cadmio
Cl	Cloro
cm	Centímetros
cm²	Centímetros cuadrados
Co	Cobalto
CO₃²⁻	Ion carbonato
Cr(III)	Cromo (III)
Cr(VI)	Cromo (IV)

CS	Calso Sabouraud
Cu²⁺	Cobre
Cu.MT	Metalotionina de cobre
dig.	Digerido
s/d	Sin digerir
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPS	Deoxinucleótidos trifosfatos
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Etilen diamin ácido tetracético
Eh	Potencial de óxido-reducción
<i>et al</i>	Colaboradores
Fe	Fierro
FQ	Fitoquelatinas
g	Gramos
H⁺	Ion hidrógeno
h/H	Horas
Hg	Mercurio
HgCl₂	Cloruro de mercurio
IPTG	Isopropyl-β-D thiogalactopyranosida
K	Potasio
Kda	Kilodaltos
Kb	Kilobases
K₂CRO₄	Cromato de potasio



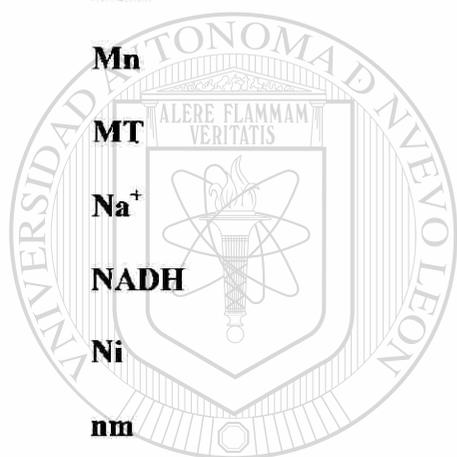
U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LB	Lennox Broth
M	Molar
Mg	Magnesio
MgCl₂	Cloruro de magnesio
mg/ml	Miligramos por mililitro
min.	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Mn	Manganeso
MT	Metalotioninas
Na⁺	Sodio
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido
Ni	Níquel
nm	Nanómetros
(NO₃)¹⁻	Ion nitrato
OH⁻	Grupo hidroxilo
%	Porcentaje
p	Página
p<0.05	Probabilidad menor que 0.05
pb	Pares de bases
Pb	Plomo
Pb(NO₃)⁻	Nitrato de plomo
PbS	Sulfuro de plomo



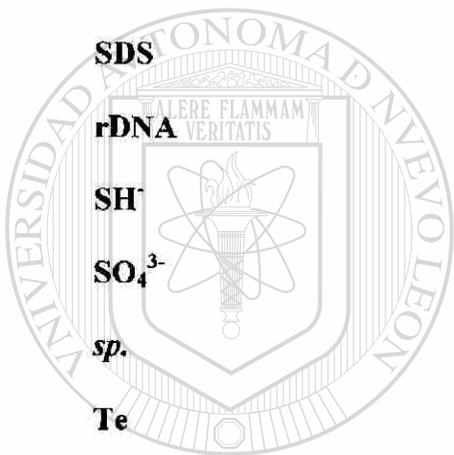
U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



PC	Pared celular
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
ppm/PPM	Partes por millón
Pt	Platino
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
S⁻²	Azufre
SDS	Dodecyl sulfato de sodio
rDNA	DNA ribosomal
SH⁻	Grupo sulfhidrilo
SO₄³⁻	Ion sulfato
sp.	Especie
Te	Telurio
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
µg/m³	Microgramos por metro cúbico
µg/µl	Microgramos por microlitro
µl	Microlitros
µm	Micras
X-gal	5-Br-4-Cl-3 Indolyl bd-galactopyranosida
Zn	Zinc



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



I. RESUMEN

En años recientes algunos estudios han demostrado el peligroso efecto de los metales en la diversidad microbiana y en la actividad del suelo. La acumulación de metales en el suelo a altas concentraciones puede ser debido a actividades antropogénicas tales como la aplicación de lodos residuales. Es bien conocido que los hongos adquieren resistencia en ambiente de metales pesados. Son dominantes bajo condiciones ácidas, donde los metales tóxicos pueden ser especiados en formas móviles. Debido a su hábitat de desarrollo filamentoso y su alta proporción de superficie de área, se asegura que las interacciones hongo-metal son un componente integral de los principales procesos cíclicos ambientales. Por tal motivo, una alternativa es la búsqueda de hongos filamentosos que puedan tolerar concentraciones de metales tóxicos. En el presente trabajo aislamos 5 cepas fúngicas: #1, #2, #3, #12 y #15 de la planta de tratamiento de agua residual, específicamente del proceso de lodos activados. Realizamos una selección con las mismas, en presencia de Pb, Cd, Hg y Cr a 50, 100 y 250 ppm. en base al síntoma de intoxicación más fácilmente observable que es la inhibición del crecimiento, siendo evaluado cada 24 h. La cepa #15 fue la óptima, ya que toleró el Pb, Hg y el Cr a la mayor concentración (250 ppm); además presentó tolerancia al Hg y al Pb a 400 ppm. Se realizó extracción y amplificación de DNA genómico de los aislados y únicamente se clonó la cepa #15. El análisis de la secuencia se realizó con el programa blastn y fue comparado por similitud; identificándose nuestra cepa como perteneciente al género *Penicillium*. Aunque no conocemos el o los mecanismos que participan, suponemos que pudiera ser la adsorción a grupos funcionales de la pared celular como reporta Tan & Cheng en donde describe la adsorción de iones metales a grupos amino en una especie de *P. chrysogenum*, al igual que Sarret en su estudio de los sitios de unión del Zn y Pb a grupos fosforil y carboxil a las paredes del mismo hongo. Por lo tanto los resultados aquí presentados sugieren que la investigación en el aislamiento, selección e identificación de cepas tolerantes a metales es de mucha utilidad y es previsible que la manipulación genética de los hongos utilizados, por técnica genética formal o ingeniería genética conducirá a incrementar en la eficiencia de la biosorción de las especies existentes hasta ahora o de otras nuevas.

II. INTRODUCCIÓN

El interés científico por la interacción de los hongos con los metales pesados se derivó inicialmente de la toxicidad de dichos elementos en preparaciones fungicidas utilizadas para el control de patógenos de plantas y para preservar productos naturales y sintéticos. (Horsfall, 1956; Ross, 1975). También ha sido de importancia el estudio del efecto de la redistribución artificial de metales tóxicos como consecuencia de actividades industriales en las poblaciones de los hongos (Gadd y Griffiths, 1978).

La creciente contaminación por metales tóxicos, metaloides, radionúcleos y compuestos organometálicos ha motivado el interés hacia los hongos debido a: (1) su ubicua y algunas veces dominante presencia en hábitats contaminados; (2) la captación y traslocación de metales tóxicos y radionúcleos hacia los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles, y (3) la protección que los hongos micorrízicos brindan a las plantas contra los metales tóxicos (Gadd, 1986b; Brown y Hall, 1990). La aplicación de desechos industriales municipales en terrenos agrícolas es una práctica muy extendida de disposición de desperdicios y de mejoramiento de las propiedades físicas y nutricionales del suelo; sin embargo, tales desechos pueden contener gran cantidad de metales que persisten en el suelo por períodos prolongados (Juste y Mench, 1992). La presencia de altas concentraciones de metales pesados en el suelo afecta la distribución de algunos grupos y especies de hongos y representa una presión selectiva para la aparición de variantes resistentes (GDA, 1986b). La capacidad de ciertos hongos para resistir y adaptarse a los metales estimuló las investigaciones acerca de las bases fisiológicas, bioquímicas y genéticas de este fenómeno (Cervantes y Gutiérrez-Corona, 1994).

2.1 ANTECEDENTES

Para llevar a cabo sus funciones los organismos vivos requieren de diversos iones inorgánicos como son: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{3-} , NO_3^- . Otros iones que también se hallan en el ambiente son ya sea tóxicos y sin alguna actividad biológica asociada (por ejemplo, los metales pesados Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+), o bien, son esenciales, pero son tóxicos cuando se encuentran en concentraciones relativamente elevadas (tal como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}). Existen varias definiciones del término “metales pesados”. Por lo general se acepta que son aquellos elementos cuya densidad es mayor a 5 g/ml. Para la mayoría de los organismos es extremadamente tóxica la exposición a un exceso de metales pesados como Cd, Hg, Cr, Ni y Pb. Los iones metálicos tóxicos suelen penetrar a la célula a través de los mismos sistemas de captación que utilizan los iones metálicos fisiológicamente importantes como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+1} . El incremento en los valores de los metales pesados en la biosfera es el resultado de perturbaciones originadas por el hombre en el medio ambiente o por fenómenos geológicos.

2.1.1 Contaminación por metales pesados.

Se calcula que la contaminación mundial anual por metales pesados excede a la contaminación combinada por desechos radiactivos y orgánicos (Nriagu y Pacyna, 1988). Se detectan valores tóxicos de metales pesados en las cercanías de sitios de desperdicio municipal e industrial y en diversos tipos de suelo, incluyendo los agrícolas. En éstos lugares pueden desarrollarse diversas plantas y microorganismos que tienen la capacidad de adaptarse y desarrollar tolerancia a las concentraciones tóxicas de los metales pesados. Las industrias que presentan mayores emisiones de metales pesados, según el elemento son: (a)

Pb: la combustión de gasolina con Pb, plantas de fundición de metales, pesticidas con arsenato de Pb, fertilizantes fosfatados y pinturas con plomo (Goldsmith *et al.*, 1976); también el empleo de barro vidriado para cocinar o guardar alimentos (Jiménez *et al.*, 1993). (b) Cd: procesadoras de baterías y acumuladores, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, cloruro de polivinilo, colorantes, equipos para ruedas, fusibles, joyería, laminados a vapor y soldadura (Galvao y Corey, 1987a). Otras fuentes atmosféricas de contaminación por Cd son el procesamiento de metales (aleaciones con Cd), la combustión de diesel y petróleo (Lagerwerff y Specht, 1970), los fertilizantes fosfatados y los pesticidas (Bazz y Govindjee, 1974). (c) Hg: minería (extracción de oro) fabricación electrolítica de Hg, fabricación de equipo eléctrico, industria del papel y celulosa, funguicidas mercuriales y fabricación de cloro-sosa (Galvao y Corey, 1987a). (d) Cr: industrias procesadoras de cemento, colorantes, curtiduría, material fotográfico, materiales refractarios, metalurgia y pinturas (Galvao y Corey 1987b).

Por la contaminación por metales pesados también se altera la composición de las poblaciones de un ecosistema, ya que cada especie responde de diferente manera a las concentraciones de contaminantes y por tanto acumula en mayor o menor medida determinados metales pesados. En general desaparecen muchas especies, conduciendo a que predominen aquellas que son resistentes a los agentes contaminantes (Cairns *et al.*, 1992; Munawar *et al.*, 1995).

La variabilidad de respuestas de los organismos por intervención de los factores fisicoquímicos ya descritos dificulta la explicación de los mecanismos para los efectos observados y dificulta también la determinación de concentraciones letales o subletales de los metales pesados. Los efectos subletales de los metales pesados, en una gran variedad de

organismos, conducen a cambios en su morfología o histología; fisiología (crecimiento, desarrollo, capacidad de nado, respiración y circulación); bioquímica (química sanguínea, actividades enzimáticas) y endocrinología, conducta y reproducción (Bryan, 1976).

Los efectos tóxicos de los metales pesados a nivel celular y molecular se relacionan principalmente con su interacción con los grupos sulfhidrilos de las proteínas (Kone *et al.*, 1990), su acción ionofórica (Gutknecht, 1981; Karniski, 1992), la cual impide el mantenimiento de los gradientes iónicos y con su capacidad para generar radicales libres.

A nivel subcelular los principales sitios de acción de los metales pesados son las mitocondrias, la membrana plasmática y el citoesqueleto (Díaz-Barriga *et al.*, 1989). Varios metales pesados, en particular Cr(VI), Ni, Co, Cd, As (III) y Pb, son carcinogénicos para el humano y otros mamíferos, pero no son mutagénicos en algunos microorganismos.

2.1.1.1 Plomo (Pb).

Los mecanismos clásicos de toxicidad del Pb son como análogo del Ca^{2+} (Chao *et al.*, 1984) y por interacción de grupos sulfhidrilo (ATSDR, 1992). A concentraciones micromolares, inhibe ciertas ATPasas, a la δ -aminolevulinato (δ -ALA) deshidratasa y a la lipoamida deshidrogenasa. El Pb también disminuye la fotosíntesis, el transporte mitocondrial de electrones (Bittel *et al.*, 1974) y la actividad de varias enzimas de la vía de las pentosas (Calderón-Salinas *et al.*, 1993).

Las principales fuentes de contaminación de Pb varían según la región; así, en las grandes ciudades las fuentes a combatir son las gasolineras y la cerámica vidriada (Calderón-Salinas 1996b). En las áreas rurales, la principal fuente es la contaminación de los alimentos por el uso de barro vidriado, en tanto que alrededor de las áreas industriales, el aire y el suelo son

los medios para el transporte de Pb (Díaz-Barriga *et al.*, 1993; Batres *et al.*, 1995). Si bien el uso de gasolina sin Pb ha comenzado a influir en el abatimiento de los niveles de Pb en sangre en los niños citadinos (Palazuelos, 1995) se debe continuar por medio del control de otras fuentes el esfuerzo para combatir a este contaminante. Al interactuar con el Fe, el Pb genera ferritina y un tipo anormal de Fe, produciendo micelas ferruginosas en las mitocondrias. También se forman complejos con el fosfato de ácidos nucleicos y nucleótidos y cataliza una hidrólisis no enzimática de los nucleósido-trifosfatos (especialmente ATP). Causa anemia en humanos y anomalías en el metabolismo de las porfirinas: mayor excreción urinaria de porfirinas y sus precursores, acumulación de protoporfirina libre en eritrocitos y de δ -ALA y coproporfirina en la sangre. Interactúa también con el fosfato de piridoxal impidiendo la activación de la síntesis del grupo hemo. Las altas concentraciones de Pb se ha relacionado con bajo peso al nacimiento y desarrollo neurológico anormal, entre otras alteraciones. El Pb es un metal de alta toxicidad para el ser humano (ATSDR, 1992). En México, el Pb representa un problema de salud pública

(Romieu *et al.*, 1994). La Ciudad de México tiene como norma de Pb en aire una cantidad de $1.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$; sin embargo en zonas como Xalostoc y Tlanepantla se rebasa ampliamente esta norma. En una población infantil expuesta al Pb en una zona fabril en Torreón, Coahuila, se observó un decremento de la coordinación neuromotora y un aumento en la incidencia de malestares generales como cólicos, dolores de cabeza y musculares y mareo (Calderón-Salinas *et al.*, 1996a). La toxicidad del Pb también se ha estudiado en la microalga *Chlorella vulgaris* y en el crustáceo *Daphnia magna* (del orden de los diplostracos, conocidos como pulgas de agua). En general los derivados tetraetilicos son menos tóxicos que los correspondientes derivados trifenilos del Pb. Los cambios en los

grupos alquil o aril o la introducción de un grupo OH reducen la toxicidad. El Pb (0.05 ppm) disminuye la movilidad de *Daphnia* a los 15 días y resulta letal a los 30 días. Los complejos de Pb con dl-cisteína son mucho menos tóxicos para el hongo *Aspergillus niger* que los de aspartato y citrato. El Pb estimula el crecimiento de *Sarcina flava* (levadura que crece en condiciones de pH básico); el PbS parece ser el metabolito final (Valle y Ulmer, 1972).

2.1.1.2 Cadmio (Cd).

El Cd interactúa con monómeros de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina con mayor afinidad que el Ca^{2+} y el Na^+ , y estas interacciones son una parte de la base bioquímica que explica los efectos tóxicos del Cd en las membranas biológicas (Valle y Ulmer, 1972). La otra parte importante del efecto tóxico del Cd sobre la función celular es su interacción con los grupos SH de proteínas y otras biomoléculas. Por ejemplo a una concentración de $5\mu\text{M}$

(0.562 ppm), el Cd puede inhibir por completo la fosforilación asociada con la oxidación *in vivo* e *in vitro* de succinato o citrato en mitocondrias de hígado de rata. El EDTA, los ditioles y otros metales como Mn, Co y Ni pueden revertir esta acción, lo cual indica una fuerte interacción del Cd con los grupos SH de las enzimas mitocondriales.

El Cd también inhibe la fotosíntesis y la fijación de CO_2 en las plantas. Este elemento puede afectar directamente al ciclo de Calvin, a la concentración y composición de pigmentos e inhibir la actividad de los fotosistemas, la fosforilación y el transporte de electrones (Atal *et al.*, 1991), aunque a bajas concentraciones de Cd, es más sensible el fotosistema II que el fotosistema I (De Filippis *et al.*, 1981b). El Cd puede inhibir o

estimular el crecimiento de ciertos microorganismos; por ejemplo, este metal puede inhibir el desarrollo del virus del mosaico del tabaco, mientras que bajas concentraciones de Cd pueden estimular el crecimiento de alga verde *Chlorella*, pero ocurre lo contrario cuando las concentraciones son altas (Valle y Ulmer, 1972). En estudios realizados con cepas de bacterias del género *Bacillus* resistentes y sensibles a Cd, se ha observado que las cepas sensibles acumulan casi 10 veces más Cd que las resistentes, luego de cuatro horas de exposición a 1 mg/ml (8.9 mM) del metal (Trevors *et al.*, 1986). Al parecer las algas y las cianobacterias son los organismos más sensibles al Cd, mientras que las bacterias y los hongos tal vez sean los más resistentes. En las bacterias se ha encontrado que la captación de Cd se relaciona con la presencia de plásmidos (Trevors *et al.*, 1986).

La toxicidad del Cd se relaciona con la generación de radicales libres y la activación de la calmodulina como análogo del Ca^{2+} (Días-Barriga, 1991). En humanos y animales experimentales la exposición crónica al Cd causa daño renal y proteinuria (Valle y Ulmer, 1972). La mayor acumulación corporal de Cd ocurre en el hígado y el riñón, pero también

en el cerebro fetal (Brus *et al.*, 1997).

En México las principales fuentes de exposición al Cd son la actividad industrial y el tabaco (Galicia-García *et al.*, 1997). A pesar de que dichas fuentes tienen el potencial de afectar a una gran cantidad de personas, aún son escasos los estudios epidemiológicos en poblaciones de alto riesgo. En San Luis Potosí se han efectuado dos estudios: en uno se demostró mayor exposición al Cd en niños vecinos de una zona industrial metalúrgica (Días-Barriga *et al.*, 1993) y en el otro, se demostró que las mujeres no fumadoras de la ciudad de San Luis Potosí, SLP, como ejemplo de ciudad industrial, tuvieron hasta 10 veces más Cd en la placenta que aquellas de una ciudad no industrial (Días-Barriga *et al.*, 1995). Ambos estudios dan una idea de la importancia que puede tener en México la exposición

humana al Cd y por lo tanto, esto debería ser un asunto prioritario en materia de salud pública en el país.

2.1.1.3 Mercurio (Hg).

Los compuestos mercuriales pueden dividirse en tres grupos: mercurio metálico, sales mercuriales inorgánicas y otros compuestos mercuriales orgánicos, los cuáles son extremadamente tóxicos para el ser humano (ATSDR, 1994). A causa de su hidrofobicidad y capacidad de interacción con los grupos sulfhidrido, los compuestos orgánicos cruzan fácilmente las barreras hematoencefálicas y placentaria y así resultan ser agentes neurotóxicos, sobre todo para el cerebro en formación (ATSDR, 1994); las sales inorgánicas también llegan al cerebro, aunque no en el grado de los mercuriales orgánicos. El efecto neurotóxico del Hg se debe a su capacidad de interactuar con los microtúbulos (Miurra e Imura, 1987). Así por un lado podría inhibir la proliferación celular y por el otro lado, la motilidad celular tan importante en los fenómenos de migración neuronal (ATSDR, 1994); la proliferación y la migración son críticas en las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso central. Muchos compuestos mercuriales producen anomalías cromosómicas e inducen defectos genéticos y teratogénicos; tanto el fenil- como el metilmercurio pueden inhibir la formación del huso acromático durante mitosis.

Otro mecanismo de toxicidad común a todos los compuestos mercuriales es la generación de radicales libre, porque se abaten los mecanismos antioxidantes de las células durante la exposición. La producción de radicales libres se ha relacionado tanto con daño renal (Girardi *et al.*, 1995) como en efectos neurotóxicos (ATSDR, 1994).

El compuesto más tóxico derivado del Hg es el metilmercurio; es sintetizado por las bacterias, se acumula en peces de agua dulce y se retiene fuertemente, con una vida media de muchos años.

2.1.1.4 Cromo (Cr).

Es un metal que puede encontrarse en estados de oxidación de -2 a $+6$, siendo las formas más comunes $+3$ y $+6$. El más estable es el estado trivalente del cromo, Cr (III). Los efectos biológicos del Cr dependen notablemente de su estado de oxidación. A los cromato, Cr (VI), se les reconoce ampliamente como sustancias tóxicas y se ha restablecido que son mutágenos y carcinogénicos; se ha informado de estos efectos en diversos sistemas biológicos, a partir de dicromato de K, trióxido de Cr o Cromato de Ca. La carcinogenicidad ocasionada por el Cr se ha explicado por la producción de epoxialdehídos en una reacción catalizada por lipasas lisosomales. Otro comunicado (Gómez-Arroyo *et al.*, 1981) lo explica por el intercambio de cromátides hermanas en cultivos de linfocitos

humanos. Se ha comprobado la existencia de dos tipos de mutaciones en *Salmonella* inducidas por Cr: sustitución de pares de bases y el corrimiento del marco de lectura. ®

También se ha demostrado la prevalencia de alteraciones cromosómicas inducidas por Cr (III) en células de mamíferos, en animales tratados y en plantas (Glass, 1956).

2.1.2 Tolerancia a los metales pesados.

Se ha observado que la tolerancia de los seres vivos a los metales pesados se debe a varios mecanismos como son: (1) la unión del metal a la pared celular y a la cara externa de la membrana plasmática, con la cuál se impide el paso de éste hacia el interior de la célula; (2) reducción del transporte a través de la membrana celular; (3) expulsión activa, por medio

de la cual sale mayor cantidad de metal que la entrante; (4) compartimentalización en que el metal queda secuestrado en un organelo en el interior celular; (5) por acción quelante, ya sea por proteínas o péptidos (metalotioninas o fitoquelatinas), compuestos orgánicos (citrato, malato, oxalacetato) o por compuestos inorgánicos (sulfuro, fosfato, polifosfatos); (6) biotransformación, ya sea por reducción ú oxidación del metal o por alquilación ; (7) precipitación o atrapamiento por secreción de compuestos en el medio extracelular (Verkleij y Schat, 1990; GDA, 1993; De Filippis y Pallaghy, 1994).

2.1.2.1 Metalotioninas (MT).

Las metalotioninas son proteínas de bajo peso molecular (menor a 40 Kda), que carecen de aminoácidos aromáticos, que poseen uniones Cis-X-Cis o Cis-Cis y que pueden sintetizarse por las bacterias, hongos, invertebrados y mamíferos. Estos compuestos se pueden dividir en tres clases (Kägi y Schäffer, 1988; Rauser, 1990):

Clase I: incluye aquellas MT de mamífero y polipéptidos de otros *pila* relacionados en su estructura primaria.

Clase II: se incluyen las MT que poseen poca correspondencia con las formas de los mamíferos, por ejemplo las de ciertas levaduras, procariontes, trigo, erizo de mar, etc.

Clase III: en la cual se encuentran polipéptidos atípicos que contienen unidades de γ -glutamilcisteinil, llamados fitoquelatinas o cadistinas.

Al compararse las secuencias de las MT de diferentes especies y órganos, se observa homología entre ellas. Las posiciones de las cisteínas, así como de las serinas y aminoácidos básicos, están altamente conservadas. Los aminoácidos reemplazados por lo general se localizan fuera de estas regiones y su presencia se explica por cambios de base

en el DNA a lo largo de la evolución. Así por ejemplo la diferencia de ocho posiciones de aminoácidos entre los dos tipos de MT renal de equino sugiere la existencia de más de un cistron para esta proteína. La selectividad de las MT por los cationes está determinada tanto por su localización y abundancia en los diferentes tejidos, como por su estructura polipeptídica.

La síntesis de MT se induce a nivel transcripcional y las células seleccionadas para tolerancia a metales pesados pueden presentar amplificación de los genes para MT. La expresión genética de las MT se induce rápidamente por exposición a metales pesados y en las células de mamífero son inducidas también por algunas hormonas o interferón. Entre las funciones fisiológicas de las MT se encuentra la activación de las apoenzimas que requieren de Zn o Cu para funcionar ; también pueden tener una función importante en la adaptación celular a varios tipos de estrés. Otras función que tienen estas proteínas es la de secuestrar metales no esenciales en el organismo como son Cd, Hg, Pb, Bi, Ag, Au y Pt. Todo lo anterior sugiere que las MT no son un simple sistema de detoxificación, si no que

es más probable que representen una función importante en la homeostasis de los metales pesados (Tomsett y Thurman, 1988).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.1.2.2 Fitoquelatinas (FQ).

Estos péptidos poseen la estructura $(\gamma\text{-lu-Cis})_n\text{-Gli}$, donde $n=2-11$ y tienen entre 5 y 23 aminoácidos (Grill *et al.*, 1986). Las fitoquelatinas se inducen cuando hay concentraciones elevadas de metales pesados. Entre sus características se encuentran: bajo peso molecular (menor a 10KDa), alto contenido de metales y cisteína, ausencia de aminoácidos aromáticos, secuencias de Cis-X-Cis (donde X es glutamato) y no conservan su estructura

secundaria. Las FQ derivan del glutatión y se polimerizan para formar péptidos atrapadores de metales pesados. En muchas especies de plantas y microorganismos, tales como algas rojas, verdes y cafés, otros protistas y hongos (Gekeler *et al.*, 1988; 1989; Kneer *et al.*, 1992) se ha encontrado capacidad para sintetizar FQ en respuesta a metales pesados.

La biosíntesis de las FQ se ha caracterizado en *Schizosaccharomyces pombe* (Rouser, 1990). El Cd actúa como el mejor activador de la FQ sintetasa, seguido en orden descendente por Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg y Au. La síntesis de FQ es citoplasmática, aunque ya se ha detectado la compartimentalización de las FQ (Salt y Rouser, 1995). De manera sorprendente la reacción catalizada por la fitoquelatina sintetasa no requiere de ATP, solo de la presencia de un metal pesado, el cuál actúa como un activador esencial de la enzima (Steffens, 1990). Aunque muchos metales inducen la síntesis de FQ, sólo se ha demostrado la unión de éstos péptidos de Cu, Zn, Pb y Cd. La afinidad del péptido varía dependiendo del metal.

2.1.3 Resistencia a los metales pesados en hongos.

El interés científico por la interacción de los hongos con los metales pesados se derivó inicialmente de la toxicidad de dichos elementos en preparaciones fungicidas utilizadas para el control de patógenos de plantas y para preservar productos naturales y sintéticos (Horsfall, 1956; Ross, 1975). También ha sido de importancia el estudio del efecto por metales tóxicos, metaloides, radionúcleos y compuestos organometálicos, ha motivado el interés hacia los hongos debido a: (1) su ubicua y algunas veces dominante presencia en hábitats contaminados; (2) la captación y traslocación de metales tóxicos y radionúcleos hacia los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles, y (3) la protección que los hongos micorrízicos brindan a las plantas contra los metales tóxicos (Brown y Hall, 1990).

La aplicación de desechos municipales en terrenos agrícolas es una práctica muy extendida de disposición de desperdicios y de mejoramiento de las propiedades físicas y nutricionales del suelo (Sauerbeck, 1987); sin embargo tales desechos pueden contener una gran cantidad de metales que persisten en el suelo por períodos prolongados. La presencia de altas concentraciones de metales pesados en el suelo afecta la distribución de algunos grupos y especies de hongos y representa una presión selectiva para la aparición de variantes resistentes (Ross, 1975; Gadd, 1986b).

2.1.4 Toxicidad de los metales pesados en los hongos.

Los metales pesados en concentraciones tóxicas pueden afectar a casi todos los aspectos del metabolismo, crecimiento y desarrollo de los hongos, dependiendo del grupo taxonómico, de la especiación y concentración del metal y de los diferentes factores fisicoquímicos del medio (GDA, 1989^a). Los síntomas de la intoxicación pueden variar ampliamente entre diferentes especies del metal, pero el principal factor de daño es el contacto directo entre la

especie activa de metal y los diferentes componentes celulares.

En hongos filamentosos y levaduras, el síntoma de intoxicación más fácilmente observable es la inhibición del crecimiento. En este sentido, se han evaluado las dosis mínimas inhibitorias de diferentes metales que afectan el crecimiento de los hongos.

Uno de los efectos más conspicuos de la toxicidad por metales pesados en los hongos es la alteración de la pared celular (PC), estructura que tiene a su cargo la forma de la célula y que está compuesta principalmente de polisacáridos, como la quitina, las glucanas y la quitosana. Y de otros componente como glicoproteínas y lípidos. Los polisacáridos mencionados interactúan fuertemente con los metales en ensayos realizados *in vitro*. El Cu, a una concentración de 9mM (571 ppm) produjo cambios morfológicos en el hongo

filamentoso *Cunninghamella blakesleena* caracterizados por un ensanchamiento y vacuolización de las hifas, así como por un engrosamiento irregular de la PC (Venkateswerlu *et al.*, 1989)

Para otros hongos filamentosos como *Mucor rouxii* (Ramírez-Salgado, 1989) y *Trichodema spp.* (Cortés-Penagos *et al.*, 1994) se obtienen observaciones similares; en estos hongos, 3.2 mM (203 ppm) de Cu provocan la formación de hifas con una morfología aberrante. Dichas células mostraron alteraciones en la PC, que era más gruesa y estructuralmente diferente que la de las células crecidas sin el metal. En el caso de *M. Rouxii* el Cu en altas concentraciones también causó la formación de células levaduriformes en cultivos incubados en aerobiosis. Se ha informado de cambios cuantitativos y cualitativos de los componentes de la pared celular (PC) de *C. blakesleena* con 2.5 ppm de Cu, en la cuál aumentan los contenidos de fósforo e hidroxiprolina, aminoácido normalmente ausente y disminuyen los valores de hexosaminas. En este mismo hongo, sus concentraciones de 4 ppm de Cu, se encontraron cambios en el contenido de citrulina de su PC (Venkateswerlu y Stotzky, 1986).

Rhizopus stolonifer, desarrollado en 50 ppm de Ni, mostró también aberraciones morfológicas como hifas muy gruesas que tuvieron una frecuencia muy alta de ramificación. (Babich y Stotzky, 1982^a). Por otro lado, 50 ppm de Zn inhibieron la formación de una estructura especializada para la adhesión del hongo *Monacrosporium endermatum* sobre su nemátodo hospedero (Rosenzweif y Pramer, 1980)

Muchas actividades bioquímicas de los hongos se afectan por su interacción con los metales. Entre los efectos más frecuentes se encuentran cambios en la permeabilidad celular, lo que conduce a la pérdida de solutos intracelulares, principalmente k.

El Ni impidió el metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae*, como resultado directo de la inhibición de la alcohol deshidrogenasa. *T. harzianum* y *T. viride*, aisladas como cepas resistentes a Cu, cuando crecen a las concentraciones mínimas inhibitorias de este metal (51 y 122 ppm, respectivamente) muestran un aumento muy grande en una actividad enzimática que reduce el Cu^{2+} en Cu^{1+} , la cual se localiza en la membrana citoplasmática de las células de estos hongos. El Cd, en una concentración de 10 ppm, altera la morfología de las mitocondrias de *S. cerevisiae*, con la consecuente deficiencia respiratoria en la levadura (Lindgren y Lindgren, 1973).

2.1.5 Factores ambientales que modifican la toxicidad de los metales.

Aunque se han encontrado hongos representativos de diferentes grupos taxonómicos en ambientes altamente contaminados con metales pesados, la diversidad de especies resulta muy disminuida; de éstas se selecciona sólo aquellas poblaciones tolerantes y/o resistentes capaces de sobrevivir y crecer en esas condiciones (Babich y Stotzky, 1985; GDA, 1986^a).

El efecto tóxico de los metales sobre la abundancia microbiana en ambientes naturales varía con la especiación y la concentración del metal, con los organismos presentes y con diversos factores ambientales (GDA y Griffiths, 1979). Muchos estudios han mostrado que los cationes metálicos como Cd, Cu, Zn, Pb y Ni, entre otros, se absorben y retienen en suelos y aguas, dependiendo de su composición y propiedades fisicoquímicas (Brunzl y Schimmack, 1991). Esta capacidad de adsorción es mediada por los componentes del medio incluyendo, por ejemplo, a las arcillas minerales de silicatos de Al y a la materia orgánica (humus, biomasa de plantas y microorganismos). Entre los factores fisicoquímicos del medio que pueden afectar la toxicidad de los metales hacia los microorganismos se encuentran: el pH, el potencial de óxido-reducción y los aniones y cationes inorgánicos.

El pH del medio puede influir en la toxicidad de los metales en dos sentidos: (1) modificando el estado fisiológico y las actividades bioquímicas de los microorganismos y por tanto, sus reacciones hacia las sustancias tóxicas y (2) en la especiación del metal, lo cual afecta su capacidad para unirse a la superficie celular. Cuando se incrementa el pH de una solución, dependiendo del tipo de metal, ésta puede formar diferentes especies hidroxiladas, siendo diferente a su vez la toxicidad de estas especies. A pH bajo aumenta la concentración de H^+ , el cual puede competir con los metales pesados por los sitios ionogénicos de los componentes celulares. La especiación de los ligandos orgánicos que pueden interactuar con los metales, y de este modo modificar su toxicidad, depende asimismo del pH del medio; por ejemplo cuando el Cd forma $Cd(OH)^+$ y complejos con compuestos orgánicos a pH alcalino, se vuelve más tóxico que en su forma libre para *A. niger*, *P. vermiculatum*, *P. asperum* y *C. echinulata* (Babich y Stotzky, 1978). Por el contrario, la toxicidad del Ni hacia los microorganismos decrece con el pH alcalino; los hongos crecen de manera más lenta en un suelo naturalmente ácido (pH 4.9) suplementado

con 1000 ppm de Ni, que a pH más alto. De manera general, se ha observado que el pH alto aumenta la toxicidad de los metales porque afecta los sistemas de captación y/o transporte en los microorganismos.

El potencial de óxido-reducción (E_h) del ambiente puede afectar la disponibilidad de los metales de manera directa, y de este modo sus valores de toxicidad. En un ambiente altamente reductor (E_h negativo), los metales pueden combinarse con S^{2-} y formar sales derivadas de sulfuros insolubles, que los microorganismo o captan. El E_h también afecta la valencia del metal; por ejemplo, es más tóxico el Cr (VI) que el Cr(III) para el crecimiento micelial y para la germinación de las esporas de diferentes hongos (Babich *et al.*, 1982).

Los aniones y cationes inorgánicos del ambiente también influyen en la especiación del metal y así de su toxicidad. Los metales pesados forman complejos de coordinación con aniones inorgánicos (OH⁻, Cl⁻). La diferente especiación de los metales pesados que ocurre en presencia de concentraciones variables de los ligandos aniónicos, puede ejercer diferentes efectos tóxicos en los organismos. Por ejemplo, altas concentraciones de Cl⁻ en el medio decrecen la toxicidad del Cd hacia *A. niger*, *A. stolonifer*, *Aspergillus conoides* y *Oospora spp.* (Babich y Stotzky, 1981). En el caso de los cationes inorgánicos, éstos pueden afectar la toxicidad de los metales como resultado de la competencia con las formas catiónicas de los metales pesados por los sitios aniónicos de los componentes de la superficie celular; por ejemplo el Mg puede disminuir los efectos tóxicos del Ni en varios hongos filamentosos (Babich y Stotzky, 1981).

Los compuestos orgánicos disueltos o en partículas en un ecosistema unen diferentes tipos de metales pesados y reducen así su toxicidad. El EDTA disminuye la toxicidad del Zn, Cu y Cd en un actinomiceto y en levaduras (Babich y Stotzky, 1983). El ácido aspártico

también baja la toxicidad del Ni y Pb hacia los hongos. En los medios de cultivo muy ricos, también aumentan las dosis mínimas inhibitorias, ya que los casaminoácidos, el extracto de levadura, la triptona y la peptona unen a muchos metales de manera diferente. El pH puede afectar la interacción de los metales pesados con la materia orgánica soluble (Farrah y Pickering, 1978). Por otra parte, la materia orgánica particulada (ácidos húmicos) en medios sintéticos, protege de los efectos del Pb y Ni a diferentes especies de hongos (Babich y Stotzky, 1979, 1982b). La temperatura modifica la toxicidad de los metales pesados como un resultado directo sobre el estado fisiológico de la célula más que sobre la especiación o disponibilidad.

2.1.6 Interacciones de los hongos con los metales pesados.

Los hongos poseen una variedad de mecanismos para la unión y remoción de metales que van desde interacciones fisicoquímicas al nivel de la superficie celular, tales como la adsorción, hasta procesos dependientes del metabolismo celular, como la acumulación intracelular o la precipitación extracelular del metal como consecuencia de la excreción de metabolitos. Dichas interacciones permiten que los hongos sobrevivan a la toxicidad de los metales; basándose en la capacidad de aquellos para crecer bajo ciertas concentraciones de metales se han utilizado de manera arbitraria, los términos “resistencia” y “tolerancia” (GDA, 1992b,c).

Así, se ha propuesto que el término resistencia debería referirse a la sobrevivencia del organismo a la toxicidad de los metales, con base en mecanismos producidos como en respuesta directa, según los tipos de especies de metal involucradas. Ejemplos de éstos mecanismos lo constituyen la síntesis de metalotioninas y fitoquelatinas en respuesta a una exposición al Cu o Cd (Mehra y Winge, 1991). Por otra parte se ha sugerido que el término

“tolerancia” se aplique a la sobrevivencia del organismo a la toxicidad por metales, mediante las propiedades intrínsecas de un organismo o por modificación ambiental de la toxicidad (GDA, 1992). Estas propiedades que determinan la sobrevivencia incluyen: la posesión de paredes celulares impermeables, la presencia de polisacáridos extracelulares y la excreción de metabolitos, en especial cuando estos componentes conducen a la destoxificación de especies de metales, por ejemplo por unión o precipitación de varios mecanismos fisicoquímicos y biológicos directos e indirectos tanto a nivel de campo como de laboratorio.

Los mecanismos biológicos implicados en la sobrevivencia de los hongos a la toxicidad de los metales incluyen: precipitación extracelular, formación de complejos y cristalización,

transformación de especies de metales (por ejemplo oxidación, reducción, metilación y desalquilación), biosorción a paredes celulares, pigmentos y polisacáridos extracelulares, transporte disminuidos o impermeabilidad, expulsión, compartimentalización, intracelular y precipitación y/o atrapamiento por ciertos moléculas.

2.1.6.1 Precipitación y atrapamiento de metales pesados en el medio extracelular.

Muchas sustancias producidas por las células fúngicas pueden formar complejos con o precipitar los metales pesados. El ácido cítrico es un eficiente quelante de metales; el ácido oxálico interactúa con los metales formando cristales de oxalato insolubles alrededor de las paredes celulares y en el medio externo. La producción de ácido sulfhídrico por algunas levaduras conduce a la precipitación de metales en la forma de sulfuros insolubles, localizados de manera principal en y alrededor de las paredes celulares (Minney y Quirk, 1985). Muchos hongos filamentosos y levaduras liberan moléculas con alta afinidad por Fe; a dichas moléculas se les conoce como sideróforos (Winkelmann, 1992). Los quelatos de

Fe formados externamente se introducen subsecuentemente a las células. En varios hongos se ha encontrado que la diferencia de Fe estimula la excreción de sideróforos (Adjimani y Emery, 1987). La levadura *Debaromyces hansenii* es capaz de producir roboflavina o un compuesto relacionado, cuando se cultiva en un medio deficiente en Fe o en presencia de Cu, Co o Zn (Gadd y Edwards, 1986).

2.1.6.2 Unión de metales pesados a las paredes celulares.

Las paredes celulares de los hongos son el primer sitio de interacción con muchas especies de metales y su remoción a partir de una solución puede ser rápida, aunque las velocidades dependen de factores como el tipo de metal y biomasa, la concentración del metal y de

factores ambientales. La asociación de los metales a las paredes celulares de los hongos es un proceso independiente del metabolismo que puede incluir intercambio iónico, adsorción, acomplejamiento, precipitación y cristalización.(Mullen *et al.*,1992). Así la pared celular tiene importantes funciones protectoras , actuando como una barrera que controla la entrada de solutos a las células, entre los que se encuentran los metales potencialmente tóxicos.

En los hongos la pared celular se compone principalmente de polisacáridos, algunos de ellos en asociación con proteínas y otros compuestos como lípidos y melaninas. Los componentes fibrilares que confieren rigidez a las paredes celulares incluyen la quitina (compuesta de unidades de N.acetil-d-glucosamina, con enlaces del tipo β -1,4), las glucanas (polímeros de glucosa, con enlaces del tipo β -1,3 y β -1,6) y la celulosa (que consta de unidades de glucosa unidas por enlace β -1,4). Entre los componentes de la matriz se encuentran: α -1,3/ α -1,3/ α -1,4glucana, glicoproteínas, quitosana (polímero de glucosamina con enlaces β -1,4), polímeros de galactosamina, poliuronidos, melaninas y lípidos (Peberdy, 1990) . Dichos componentes varían según el grupo taxonómico de los

hongos y en muchos casos dependiendo de la etapa de desarrollo (Bartnicki, 1968). Así, la unión de los metales a las paredes celulares de los hongos es compleja, implicando diferentes componentes y mecanismos, y variable, dependiendo de la estructura y composición de la pared celular, la cual puede afectarse por la presencia de metales tóxicos (Venkateswerlu *et al.*, 1989) En las paredes celulares existe una variedad de grupos químicos que podrían originar de manera potencial la unión de metales, los que incluyen grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo, y aunque es difícil de determinar su relativa contribución a dicho proceso (Strandberg *et al.*, 1981). No obstante, se ha propuesto que las interacciones primarias implican la unión de los metales a grupos

carboxilo y fosfato, las cuáles pueden ser estimuladas por la atracción electrostática a otros grupos funcionales cargados negativamente (Tobin *et al.*, 1990).

Se ha establecido que la unión de los metales a las células de los hongos consta de dos fases: la unión a la superficie celular, independientemente del metabolismo, y la entrada a las células, un proceso dependiente de energía. Se ha observado que después de fraccionar los extractos crudos de células de hongos filamentosos o de levaduras crecidas en presencia de metales, se encuentra asociada una cantidad apreciable de ellos con la pared celular. Así, las paredes celulares de los hongos *Penicillium italicum* (Somers, 1963), *Neurospora crassa* (Somers, 1963; Subramanyan *et al.*, 1983), *P. ochro-chloron* (Motohiro *et al.*, 1983), *Aureobasidium pululans* (Gadd, 1984) y *Mucor rouxii* (Ramírez-Salgado *et al.*, 1996) acumulan entre 5 y 40% del Cu agregado al medio de cultivo, el cuál, en algunos casos, origina un micelio con coloración azul.

En extractos de las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*, cultivadas en presencia de Cu, Cd o Ag, se localiza la mayor parte del metal unido en la

fracción insoluble, constituida de paredes celulares y membranas; una fracción minoritaria del metal se encuentra asociada con la fracción citosólica (Yazgan y Ozcengiz, 1994). En estos estudios se observó que, para la unión de todos los metales, fueron más eficientes las células de *K. marxianus* que las de *S. cerevisiae*; la diferencia más notable entre dichas levaduras se obtuvo respecto a la unión de Ag. En la cepa mucoide de *N. crassa*, la cuál carece de pared celular y se divide como protoplasto (Emerson, 1963) se ha observado una menor acumulación de Cu, en comparación con la cepa micelial silvestre que sí tiene pared celular (Germann y Lerch, 1987). Estos hallazgos indican la participación de la pared celular en las propiedades de los hongos para unir metales.

En la levadura *S. cerevisiae*, la pared celular participa de manera importante en la unión de Hg, ya que si se elimina la pared celular, desaparece casi 85% del metal unido por las células de la cepa silvestre (Ono *et al.*, 1988) Mutantes resistentes al metal, desprovistos de la pared celular, sólo retienen casi 5% del Hg unido por las células que poseen dicha estructura, lo sugiere que las mutaciones de resistencia al Hg aumentan la capacidad de unión del metal de la pared celular (Ono *et al.*, 1988).

2.1.6.3 Captación de metales pesados.

Muchos iones divalentes, tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , que son esenciales para el crecimiento y metabolismo, necesitan ser acumulados desde el medio extracelular. Sin embargo, como ya se mencionó, el exceso de dichos iones origina toxicidad, provocando alteraciones en el metabolismo y finalmente la muerte celular. Pueden ocasionarse efectos similares por la acumulación de iones no esenciales, como el Cd^{2+} y el Hg^{2+} . Se han demostrado tanto en hongos filamentosos como en levaduras, el transporte dependiente de

energía de varios cationes divalentes (Fuhrmann y Rothstein, 1968). Las diferencias en la acumulación entre distintos metales se han atribuido a un aumento en la salida de algunos iones o por alteraciones en la integridad estructural de la membrana, más que a diferencias en la afinidad el transporte (White y GDA, 1987 a). La captación de los cationes divalentes se altera por inhibidores metabólicos, bajas temperaturas y por la ausencia de sustratos que producen energía (Starling y Ross, 1990). Así, la captación de dichos iones depende del estado metabólico de la célula y puede variar con diferentes medios y condiciones de cultivo. Se ha sugerido que la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática participa en el transporte de iones divalentes (White y Gadd, 1987a) aunque no se le designa una función

directa en el proceso (Nieuwenhuis *et al.*, 1981). En la levadura *S. cerevisiae* y la resistencia a los metales pesados (Gadd, 1986).

En *S. cerevisiae* se ha logrado en los últimos años un avance notable en el conocimiento de las funciones bioquímicas involucradas en la incorporación y la movilización intracelular del Cu (Valentine y Gralla, 1997).

La incorporación del Cu inicia por su reducción por una o varias reductasas localizadas en la membrana plasmática. El Cu reducido es entonces transportado a través de la membrana celular por el transportador de alta afinidad *ctrl.*, el cuál también se requiere para el transporte del Fe^{2+} . Hasta la fecha, se han identificado tres proteínas que transportan el Cu de la proteína *ctrl.* Hacia tres diferentes localizaciones celulares: a) la proteína Cox17, que guía al Cu hacia la mitocondria para su inserción en la citocromo oxidasa; b) la proteína Lys7, que dirige al Cu hacia la Cu-Zn superóxido dismutasa; c) la proteína Atx1, que guía al Cu a un compartimiento posterior al Golgi, por medio de la proteína de Ccc2, para la incorporación final del Cu en la proteína Fet3, una multicobre oxidasa esencial para el transporte de alta afinidad del Fe.

Para estas tres proteínas se ha asumido que eventos de reconocimiento y unión molecular son partes esenciales de las vías individuales de movilización del Cu, debido a la aparente especificidad que cada proteína muestra para el sitio final de destino del Cu. Recientemente se ha obtenido evidencia de que éste es el caso para la transferencia in vivo del Cu de la proteína Atx1 a la proteína Ccc2, dado que se demostró Atx interactúa directamente con el dominio de unión a Cu de Cc2 (Pufahl *et al.*, 1997).

2.1.6.4 Atrapamiento intracelular de metales pesados.

La resistencia al Cu en *S. cerevisiae* se debe a la síntesis de la metalotionina de Cu (Cu.MT), también denominada cobretionina, la cuál conserva los valores de Cu intracelular y es codificada por el locus *CUP1* (Brenes-Pomales *et al.*, 1955; Fogel y Welch, 1982; Foulkes, 1982; Karin, 1985). Esto se debe a la amplificación del locus *CUP1*, de modo que las cepas resistentes (CUP) poseen dos o más copias del gen (Fogel y Welch, 1982). La clonación y caracterización molecular de *CUP1* indicó que la unidad que se repite es un fragmento de DNA de 2 kilobases (kb) (Fogel y Welch, 1982).

La transcripción de *CUP1* se induce por la presencia de Cu o Ag, aunque se ha observado que la Cu-MT es capaz de unir, además del Cu, al Cd, Zn, Ag, Co y Au (Gorman *et al.*, 1986). Aunque en *S. cerevisiae* el Cd no induce la expresión de *CUP1*, la sobreexpresión de este último conduce a resistencia al metal (Jeyaprakash *et al.*, 1991). La inducción del gen *CUP1* por el Cu requiere que participe una proteína reguladora codificada por el locus *ACE1* (también llamado *CUP2*) (Szczycka y Thiele, 1989; Welch *et al.*, 1989). El factor

de transcripción *CUP2* es una proteína nuclear, de modo que se requiere que el Cu llegue al núcleo para su activación (Szczycka y Thiele, 1989; Mehra y Winge, 1991).

Aunque *CUP2* se sintetiza de manera constitutiva, independientemente de la presencia o ausencia de Cu, sólo puede unirse a ciertos segmentos de DNA de la región promotora del gen *CUP1* cuando ha formado un complejo con el metal (Dameron *et al.*, 1991). En la levadura *Candida glabrata* se ha encontrado un factor de transcripción activado por metales, con homología parcial y función similar a la de la proteína *CUP2* de *S. cerevisiae* (Zhou y Thiele, 1991). Los genes heterólogos de los MT pueden ser completamente funcionales en levaduras; por ejemplo, el cDNA correspondiente a la Cd-MT de mono, fusionado a la secuencia promotora del gen *CUP1* de *S. cerevisiae* en un vector multicopia,

le confiere resistencia al Cu a una cepa de levadura con una delección en CUP1 (Thiele *et al.*, 1986).

Otros tipos de moléculas inducidas en los hongos por la presencia de Cu y otros metales son las fitoquelatinas (FQ) o cadistintas. Las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *C. glabrata* sintetizan dichos péptidos en respuesta a la presencia de Cd (Mehra y Winge, 1991); de igual manera responden al metal la levadura *S. cerevisiae* y el hongo filamentoso *N. crassa* (Kneer *et al.*, 1992), aunque la primera también sintetiza FQ en respuesta a Cu y Zn (Kneer *et al.*, 1992). La función protectora de los γ -péptidos en la toxicidad del cd se demostró por el aislamiento de mutantes incapaces de sintetizarlos, las cuáles se tornaron hipersensibles al Cd sin afectarse en su sensibilidad al Cu (Cablenz y Wolf, 1994). En las levaduras *C. glabrata* y *S. pombe*, cultivadas en presencia de Cd, se observó que la expresión constitutiva del gen *CUP1* de *S. cerevisiae* inhibe la acumulación de los complejos FQ-Cd; en ambas levaduras el atrapamiento intracelular del metal ocurre en forma de complejos MT-Cd (Yu *et al.*, 1994). Esta predominancia en la acumulación celular del metal cuando no existen genes de las MT o cuando éstos no se expresan.

2.1.6.5 Transformaciones químicas de metales.

Los hongos, al igual que otros microorganismos como las bacterias, son capaces de transformar metales químicamente por medio de reacciones de oxidación, reducción, metilación y desalquilación (GDA, 1992^a); sin embargo, se carece de información detallada en varios aspectos de dichas transformaciones. Tanto los hongos filamentosos como las levaduras poseen la capacidad de reducir Hg^{2+} a Hg^0 (Vonk y Sijpesteijn, 1973; Brunker y Bott, 1974; Yannai *et al.*, 1991). Otras transformaciones que efectúan los hongos incluyen:

la conversión de Ag^+ en Ag^0 metálico, la cuál se deposita en y alrededor de las células (Kieran et al., 1991), y la reducción de Cu (II) en Cu (I) por componentes asociados a la pared celular de la levadura *Debaromyces hansenii* (Wakatsuki et al., 1988; 1991a). En dicha levadura una enzima reductora de Cu, la Cu reductasa, cataliza la conversión de Cu (II) en Cu (I), con NADH como donador de electrones (Wakatsuki et al., 1991^a). La localización de la enzima parece ser en la pared celular de la levadura en donde podría participar en la regulación de la entrada del Cu a las células (Wakatsuki et al., 1991b).

La reducción de metaloides por los hongos incluye la conversión de telurito a Te elemental, que aparece como un depósito negro localizado sobre el retículo endoplásmico, así como la reducción de selenato o selenito para formar Se amorfo, que le confiere un color rojo a las colonias por su deposición en las paredes y membranas celulares (Konetzka, 1977).

Varios hongos pueden metilar al Hg, así como a otros metales y metaloides; dicho proceso puede visualizarse como un mecanismo de detoxificación debido a que por lo general las especies metiladas son más volátiles y pueden ser eliminadas del ambiente por los hongos

(Landner, 1971; Yannai et al., 1991; GDA, 1992^a). Parece que la biometilación del Se se realiza por un mecanismo análogo al de la metilación de As; varios hongos pueden producir derivados orgánicos del Se, por ejemplo dimetilselenuro, a partir de compuestos de dicho metaloide (Thompson-Eagle et al., 1989). Ciertos hongos son capaces de producir el compuesto volátil dimetiltelurio a partir de sales de Te (Chau y Wong, 1986). No obstante todavía no se ha examinado con detalle la participación de los hongos en la metilación de otros metales y metaloides.

III. IMPORTANCIA

Actualmente uno de los problemas que más preocupa a la humanidad es la gran cantidad de contaminantes que se desechan en el agua, por lo que el tratamiento de las aguas residuales es de gran importancia ya que ofrece una alternativa de solución a éstos; para que esto se logre se recurre a muchos métodos de los cuales los más utilizados son los que involucran microorganismos debido a que son económicos, eficientes y no generan subproductos contaminantes. La manera en que diversos microorganismos se comportan con la finalidad de eliminar cada una de las sustancias contaminantes, no está bien definida, si no que dependerá de la diversidad poblacional que se encuentre en el ambiente, de sus interacciones y del mecanismo que ejerzan sobre la sustancia a degradar. Por ejemplo, existen diversas formas de respuesta de los microorganismos a metales tóxicos, los pueden volatilizar, reducir, precipitarlos como sales metálicas, unirlos a las membranas o pared celular y adsorberlos a exopolímeros.

En su mayoría el tratamiento de las aguas residuales municipales e industriales en el país no considera el manejo y disposición de los lodos residuales que causan problemas de contaminación en los lugares donde se descargan. Aunque el manejo de los lodos residuales representa un costo adicional para los sistemas de tratamiento, actualmente existe tecnología sencilla y económica que permite aprovechar su contenido de materia orgánica y sus nutrientes para que estos lodos pueden utilizarse como fertilizante y restaurador de suelos.

En el área metropolitana de Monterrey, como urbe industrial, una característica común es el alto índice de contaminantes industriales y domésticos descargados en las redes de drenaje, potencialmente capaces de contaminar los ríos aledaños, consciente de esto la

Compañía de Agua y Drenaje de Monterrey ha construido tres plantas para el tratamiento de aguas residuales en las cuales el agua es tratada, limpiada y después liberada a los ríos, siendo uno de los productos que se obtienen una gran cantidad de lodos denominados biosólidos, los cuales puede ser utilizados como abonos en suelos agrícolas siempre y cuando se encuentren libres de **metales tóxicos** como: el cromo, el cadmio y el zinc entre otros, además de las cargas de: bacterias, hongos y parásitos que puedan contener y desarrollar algunas enfermedades, actualmente estos lodos son transportados a confinamientos especiales, lejos del área metropolitana. Una alternativa a esto es la búsqueda de microorganismos o consorcios microbianos que puedan actuar sobre concentraciones de metales tóxicos.

IV. JUSTIFICACIÓN

En el ambiente terrestre, los hongos son de fundamental importancia como organismos degradadores y simbioses de plantas (micorizas), juegan roles importantes en la mineralización del carbón y otros ciclos biogeoquímicos. Casi siempre son dominantes bajo condiciones ácidas, donde los metales tóxicos pueden ser especiados en formas móviles. Así combinado con su hábitat de desarrollo filamentosos y su alta proporción de superficie de área, se asegura que las interacciones hongos- metal son un componente integral de los principales procesos cíclicos ambientales.

Los metales y sus derivados pueden interactuar con los hongos de varias maneras dependiendo de las especies de metales, organismo y el ambiente, mientras que las actividades metabólicas fúngicas pueden también influenciar la especificación y movilidad.

V. HIPÓTESIS

Existe la posibilidad de aislar e identificar hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados de una planta de tratamiento de agua residual.

VI. OBJETIVOS

❖ Objetivo General:

Seleccionar hongos cultivables tolerantes a metales pesados e identificarlos mediante el análisis genético de rDNA 18S

❖ Objetivos Específicos:

- Aislar los hongos cultivables de las muestras del proceso de lodos activados que se

encuentran en mayor proporción

- Seleccionar los hongos tolerantes a metales pesados
- Seleccionar los oligonucleótidos que permitan amplificar la subunidad menor rDNA

18S de los hongos seleccionados para su identificación

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología del Suelo del área de Microbiología e Inmunología (Unidad "C") de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en colaboración con la Compañía de Agua y Drenaje de Monterrey.

7.1 Recolección de las muestras y Aislamiento de los Hongos.

Las muestras de agua residual fueron tomadas del Digestor de la planta de tratamiento de Agua Residual de la Compañía de Agua y Drenaje de Monterrey, ubicada en Escobedo N.L.; utilizándose frascos de plástico de 250 ml con tapón de rosca estériles. Estos fueron transportados en bolsas de plástico dentro de una hielera a una temperatura de 4°C hasta su llegada al laboratorio para su proceso. Una vez en el laboratorio se tomaron 10 ml de éstas

muestras y se colocaron en un frasco de vidrio de 250 ml con tapón de rosca que contenía 90 ml de agua destilada estéril, quedando diluida 10^1 , realizando diluciones hasta 10^6 de las cuales se tomó alícuotas de 0.1 ml de cada una de ellas y se inocularon por difusión en cajas de Petri estériles que contenían Agar Sabouraud Dextrosa con Cloramfenicol al 0.005% (ASDC). De las diluciones menores donde se podía apreciar el desarrollo de hongos filamentosos se tomaron las colonias y se sembraron para su purificación en nuevo ASDC.

7.2 Caracterización de las Cepas de Hongos.

De cada una de las cepas aisladas, se anotaron sus características macroscópicas y se procedió a preparar la técnica de Microcultivo para su caracterización microscópica.

Técnica de Microcultivo:

1. Se preparó cerca de 15 ml de agar ASDC estéril en una placa de petri (capa delgada), haciéndose cortes de 1 cm², utilizando un cuchillo estéril. Se esterilizó una varilla en forma de "V", del tamaño dentro de la caja de Petri, papel filtro circular, agua destilada, portaobjetos, cubreobjetos y pinzas.
2. Después de esterilizado el material, se colocó el papel filtro en el fondo de la caja, posteriormente la varilla en "V", en seguida el portaobjetos. Se situó un bloque de agar sobre el portaobjetos (asépticamente) e inoculó cada uno de los cuatro lados del bloque de agar con esporas y micelio. Se colocó el cubreobjeto estéril centradamente sobre el bloque y añadió agua estéril al papel filtro en el fondo para producir una cámara de humedad. Se incubaron las placas de Petri a 28-30 °C durante siete días.
3. Posterior a la incubación se levantó el cubreobjeto y se colocó sobre un portaobjeto limpio y observó al microscopio con una gota de azul de lactofenol para observar las estructuras del hongo para su identificación.

En cuanto a las características macroscópicas fueron anotadas las siguientes:

Anverso: Color, tipo de micelio, apariencia, tamaño y velocidad de crecimiento

Reverso: Color, presencia de pigmento

7.3 Selección de las cepas tolerantes a metales pesados.

7.3.1 Preparación de los Stock de metales

Las sales que se utilizaron fueron $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, HgCl_2 y K_2CrO_4 para Pb, Cd, Hg y Cr respectivamente. Los stocks fueron preparados a 3000 ppm y esterilizados con un equipo de filtración con membrana Micropore de 0.22 μm de diámetro y colocados en frascos de vidrio ámbar de 1 litro y almacenados a 4 °C.

7.3.2 Preparación de los medios

Se preparó ASDC y se le agregó la cantidad necesaria de cada stock de metales de 3000 ppm para preparar los medios a cinco diferentes concentraciones: 50, 100, 250, 400 y 800 ppm. Cada una de las cepas se desarrolló en placas de Petri que contenían los medios con los cuatro metales y las diferentes concentraciones al igual que en ASDC sin ninguno de los metales.

7.3.3 Conteo de esporas e inoculación de las cepas

Se realizó un conteo de esporas de cada una de las cepas para poder ajustar a la cantidad de volumen necesario para un inóculo de 1×10^1 esporas por placa. Se tomó una placa de cada cultivo (7 días de incubación aproximadamente), se le agregaron un poco más de 10 ml de agua estéril que contenía tween 80 al 0.1% para posteriormente raspar la superficie con un asa de nicromo y obtener las esporas. Se tomaron 10 ml del agua junto con la suspensión de esporas y se agregó a un frasco con 90 ml de agua estéril con tween 80 0.01%, siendo ésta la dilución 10^1 . Se siguieron diluciones hasta 10^3 dependiendo de la concentración de las

esporas. Se tomaron 10 μ l para llenar la Cámara de Neubauer y proceder al conteo al microscopio a objetivo 40X. Los cálculos fueron realizados multiplicando la media por 1×10^4 y el factor de dilución. Cada una de las placas fueron inoculadas con 1×10^1 esporas de cada una de las cepas e incubadas a 28-30 °C midiéndose su crecimiento radial de la colonia cada 24 h hasta llegar a 168 h.

7.4 Extracción de DNA de las cepas seleccionadas.

Para la extracción de DNA genómico de las cepas de hongos se utilizó el protocolo marcado en el UltraClean Soil DNA Kit de MO BIO Laboratories con No. de catálogo 12800-50.

Contenido del Kit

Tubos de 2 ml de Bead Solution, solución S1, solución IRS, Solución S2, solución S3, solución S4, solución S5, y unidades de filtro Spin en tubos de 1.9 ml . Cabe mencionar que

el protocolo original tiene algunas modificaciones ya que este es específicamente para muestras de suelo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Procedimiento:

1. A los tubos Bead solution de 2 ml agregue 0.3 g de micelio y mezcle en el vortex.
2. Agregue 60 μ l de la solución S1 e invierta varias veces o someta al vortex por un periodo breve.
3. Agregue 200 μ l de la solución IRS (Inhibitor Removal Solution). Solamente si el DNA es requerido para amplificación.

4. Asegure los tubos de manera horizontal en el vortex con una cinta de pegar. Mezcle por un periodo no mayor de 10 min.
5. Asegure que los tubos roten libremente en la centrifuga sin tallarse. Centrifuge entonces a 10,000 x g durante 30 s.
6. Transfiera el sobrenadante a un microtubo limpio. Agregue 250µl de la solución S2 y mezcle de nuevo en el vortex por 5 s. Incube a 4°C durante 5 min.
7. Centrifuge los tubos a 10,000 x g por 1 min.
8. Transfiera 450µl del sobrenadante y mezcle en el vortex por 5 s. Descargue 700 µl en la unidad de filtro y centrifugue por 1 min. a 10,000x. Nota: Se requiere de dos o tres descargas totales de cada muestra .
9. Agregue 300µl de solución S4 y centrifugue por 30 s a 10,000 x g. Descargue y centrifugue de nuevo por 1 min.
10. Cuidadosamente sitúe la unidad de filtro en un nuevo tubo. Evite el escurrimiento de la solución S4 dentro de la unidad de filtro.

11. Agregue 50µl de la solución S5 al centro de la membrana blanca del filtro y centrifugue 30 s.

12. Elimine la unidad de filtro. El DNA en el tubo esta listo hora para cualquier aplicación.

Almacénelo a -20°C. La solución S5 no contiene EDTA.

13. Para la verificación de la extracción del DNA fueron revisados en geles de agarosa al 1.0% por electroforesis.

7.5 Amplificación con PCR de 18S-rDNA.

El 18S-rDNA fue amplificado selectivamente del DNA genómico purificado de las cepas resistentes por PCR utilizando un par de iniciadores reportados para amplificar la mayoría de los grupos taxonómicos de hongos (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridomycota* y *Zygomycota*)(Borneman, 2000):

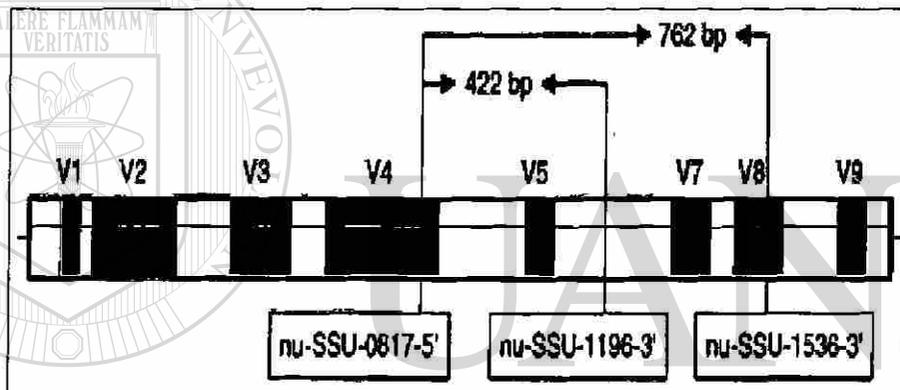


Fig 1. Diagrama de la subunidad menor eucariota rDNA con las regiones variables remarcadas en negro. Las posiciones numéricas de los iniciadores y los tamaños de los productos de la PCR fueron obtenidos utilizando *S. cerevisiae* (Genbank accesion no. J011353)

El par de iniciadores seleccionado fue el que amplifica para el fragmento de 762 pb cuyas secuencias son:

- ❖ nu-SSU-0817-5'(TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA)
- ❖ nu-SSU-1536-3' (ATTGCAATGCYCTATCCCCA)

Las condiciones de reacción fueron:

Premix (nu-SSU-0817-1536-3')

Vol. final 90µl, DNA 2µl (dil 1:10), nu-SSU-0817-5' 8µl, nu-SSU-1536-3' 8µl, MgCl₂ (25 mM) 8.8µl, dNTPS (10 mM) 2.5µl, Buffer 10X 8.8µl, Enhancer 30µl, Agua MiliQ 21.9µl.

Posterior a un previo calentamiento durante 5 min. a 94°C antes de iniciar el ciclo se le agrego a cada reacción una mezcla de 10µl que contenía MgCl₂ (25mM) 1.2µl, Buffer 10X 1.2µl, Agua MiliQ 5.6µl.

La amplificación fue llevada como sigue: un paso de desnaturalización fue llevado a cabo a 94 °C por 4 min., seguido por 35 ciclos de 30s a 94 °C, 44s a 54 °C y 60s a 72 °C y un último paso de 7 min. a 72 °C. Controles negativos fueron agregados sin la adición de DNA. Los productos de PCR fueron revisados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

7.6 Clonación.

Para la clonación se utilizó el protocolo marcado en el TOPO TA Clonig kit versión Q. De Invitrogen No. de catálogo K4620-01.

Contenido del kit.: pCRII-TOPO 20µl, 10X PCR Buffer 100µl, solución de sales 50µl, dNTP Mix 10µl, M13 Forward (-20) primer 20µl, M13 Reverse primer 20µl, templado control 10µl, primers PCR control 10µl, agua MiliQ estéril.

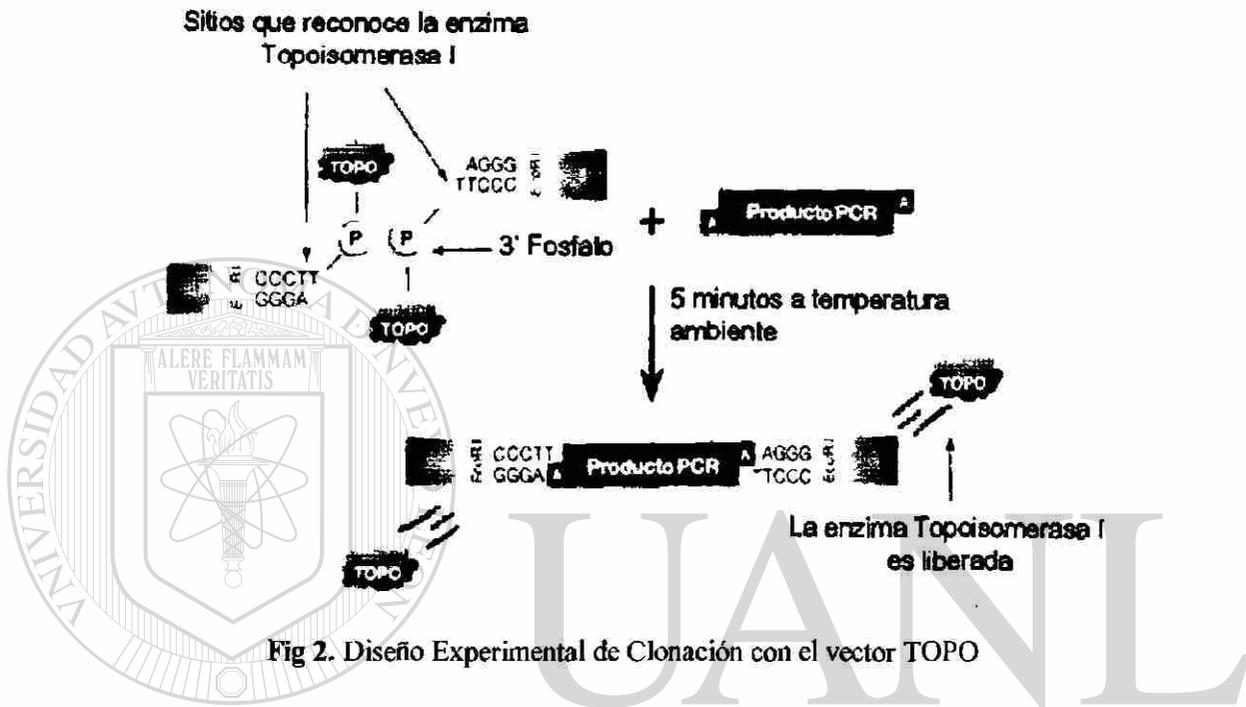
7.6.1 Preparación de células Calcio-competentes.

1. Inocule 5 ml de caldo LB con la cepa DH5 α toda la noche a 37°C a 200 rpm (pre-inóculo).
2. Inocule 200 ml de caldo LB líquido con 1 ml del pre-inóculo e incube a 37°C a 200 rpm durante 4 a 6 h (550 nm 0.4-1.0 D.O).
3. Separe en alíquotas de 100 ml, centrifugue a 6,000 rpm durante 5 min. a una temperatura de 4°C.
4. Resuspenda la pastilla en 10 ml de solución fría de CaCl₂ 80 mM, MgCl₂ 50 mM
5. Repita el paso 3 y 4, incube 10 min. en hielo y vuelva a centrifugar a 6,000 rpm durante 5 min. a 4°C.
6. Resuspenda la pastilla en 0.5 ml de CaCl₂ 0.1 M 0.5 ml de glicerol al 100%, estéril frías ambas soluciones.
7. Alicotar en suspensiones de 50 μ l en tubos eppendorf y congelar inmediatamente a -80°C.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El TOPO TA Cloning kit provee una alta eficiencia, y en un paso de 5 min., la estrategia para la inserción directa del producto de PCR en un vector.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

El diseño experimental en general fue el siguiente:

- ❖ Producir los productos de PCR
- ❖ Realizar la reacción TOPO Cloning (mezcle el producto de PCR y el vector TOPO)
- ❖ Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- ❖ Transformar la reacción de TOPO Cloning en células competentes
- ❖ Seleccionar y analizar 10 colonias blancas o azules para el inserto.

Después de haber obtenido el **producto de PCR** se procedió a realizar la **reacción de clonación** a un volumen final de 6 μ l de la siguiente manera:

Reactivos	Células calcio-competentes
Producto de PCR fresco	0.5 a 4 μ l
Solución de sales	1 μ l
Agua MiliQ estéril	Agregar a un vol. total de 5 μ l
TOPO vector	1 μ l
Volumen final	6μl

Tabla 1. Condiciones de reacción para la clonación de la cepa seleccionada de hongo.

Se mezcló la reacción gentilmente e incubó por 5 min. a temperatura ambiente (22-23°C).

Se situó la reacción en hielo y se procedió a realizar la **transformación**.

7.6.2 Transformación.

1. Se tomó 1 tubo eppendorf que contenía 50 μ l de células competentes y se colocó en hielo.

Se esperaron aproximadamente 5 min. para adicionar 2 μ l de la reacción de clonación y se incubó en hielo por un periodo de 20 min.

2. Se sometió a shock térmico a una temperatura de 42°C por 2min. en un thermomixer marca Eppendorff. Inmediatamente se colocó de nuevo en el hielo por un espacio de 5 min.
3. Se le adicionó al tubo 450 μ l de caldo LB. Se incubó a 37°C durante 1 h a 225 rpm.
4. Durante la incubación, se tomó una placa de agar LB con ampicilina y se plaqueó sobre la superficie mediante la técnica de difusión, 40 μ l de IPTG (50 mg/ml) y de X-gal (40 mg/ml).

Se dejó hasta absorberse.

5. Finalizado la hora de incubación se plaquearon 200µl del caldo, sobre la placa de agar LB con ampicilina y se incubó 16 h a 37°C.
6. Se tomaron las colonias blancas desarrolladas sobre la placa e inocularon con una puntilla en tubos con caldo LB con ampicilina. Se inoculó también algunas colonias azules para control negativo. Estos se incubaron 18 h a 225 rpm a una temperatura de 37°C. para realizarles miniprep.

7.6.3 Miniprep.

1. Se colocaron 1.5 ml de caldo en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron durante un min. a 14,000 rpm.
2. Se decantó el exceso de medio, se añadió 100µl de la sol I y se resuspendió por vortex para incubarlos posteriormente 5 min. en hielo
3. Se agregaron 200µl de la sol II y se mezcló completamente por inversión. La células deben lisarse y el medio volverse claro y viscoso.
4. Después de esperar 3 min. y haber agregado entonces 150µl de la solución III se mezcló de nuevo por inversión, formándose un precipitado de DNA/proteína/SDS. Se incubó en hielo de 10 a 30 min. y se centrifugo a 14,000 rpm por 9 min.
5. Se colocó el sobrenadante (~400µl) en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y se añadió 650µl de isopropanol. Se incubó a temperatura ambiente por 20 min. y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min.

6. Después de descartar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol 70% se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 3 min. Se descargó el sobrenadante y se repitió este mismo paso.
7. Se adicionaron 1000µl de etanol 100%, y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. descartándose posteriormente el sobrenadante para secar las pastillas a 37°C.
8. Finalmente se resuspendió en 30µl de TE pH 8.0 con RNAsa (1µg/100µl).

7.6.4 Caracterización de las clonas.

Para caracterizar las probables clonas se procedió a:

- Digerir con enzima EcoRI
 - La clona para liberar el plásmido
 - El PCR del DNA genómico de la cepa

- Correr PCR
 - DNA genómico de la cepa (control +)
 - DNA plasmidico (control -)
 - DNA de la clona probable
 - Sin DNA

7.7 Secuenciación.

Para la secuenciación de la clona de la cepa #15 se envió el DNA plasmídico al laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Ciencias Marinas, de la Universidad de Puerto Rico, el cual tiene a su cargo el Dr. Govind Nadathur, quien es profesor de dicha universidad y asesor externo del presente trabajo. El plásmido fue secuenciado por el M.C. Hugo Gallardo Blanco y William Rosado utilizando el método de Dideoxinucleótido Terminador de Cadena (Dideoxi Chain Terminator Method) empleando el secuenciador ABI 310 DNA sequencer con el "Big dye chain terminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación fueron Universal M13 forward y reverse.

7.8 Análisis Estadísticos.

Para la validación de los resultados obtenidos en las determinaciones de la medición del crecimiento de las cepas de hongos en presencia de cada uno de los metales con las diferentes concentraciones se aplicó la prueba estadística Análisis de Varianza Multifactorial y la Prueba de Dunnett para determinar si existe diferencia significativa entre las cepas estudiadas. Los datos fueron alimentados en una computadora COMPAQ Presario MV525 con el uso de los paquetes estadísticos SPSS (versión 9.0 para Windows 98) y Excel (Office 2000).

En el caso del análisis de la secuencia se utilizó el programa Blastn 2.2.9 (May-01-2004) de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para la comparación de ésta por similaridad.

VIII. RESULTADOS

8.1 Aislamiento de hongos de las muestras de agua residual.

A partir de las muestras de agua residual que fueron tomadas del Digestor de la planta de tratamiento de Agua Residual de la Compañía de Agua y Drenaje de Monterrey, ubicada en Escobedo N.L.; se realizó conteo en placa para posteriormente aislar las colonias de interés, el número de UFC obtenidas en Agar Sabouraud fue de 41×10^4 UFC/ml de muestra. Se hicieron 14 aislamientos para diferenciar los desarrollos levaduriformes, filamentos y bacterianos de cada uno de los aislados. De ésta identificación se determinaron 5 aislamientos fúngicos: Cepas #1, #2, #3, #12 y #15.

8.2 Caracterización de los aislamientos obtenidos.

Las características macroscópicas como microscópicas de las 5 cepas de interés son presentadas en las siguientes figuras.

Cepa #1 *Mucor sp.*

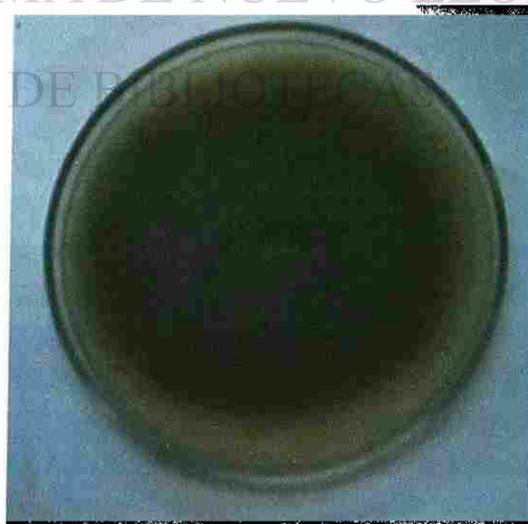


Fig 3. Micro y macromorfología. Conidias redondas, hifas gruesas no septadas, esporangios. Anverso: apariencia algodonosa grisáceo; reverso: amarillo pálido, borde regular, crecimiento rápido.



Fig 4. Micro y macromorfología. Arthroconidias, hifas septadas simples. Anverso: apariencia aterciopelada blanca; reverso: amarillo; borde irregular; crecimiento rápido.

Cepa # 3 *Penicillium* sp.



Fig 5. Micro y macromorfología. Phialoconidias y microconidias, hifas septadas, hialinas, conidióforos ramificados, fiálides agrupadas al final del conidióforo. Anverso. Apariencia aterciopelada verde; reverso: color crema con hendiduras; borde irregular, crecimiento moderado.

Cepa # 12 *Sporotrichum sp.*

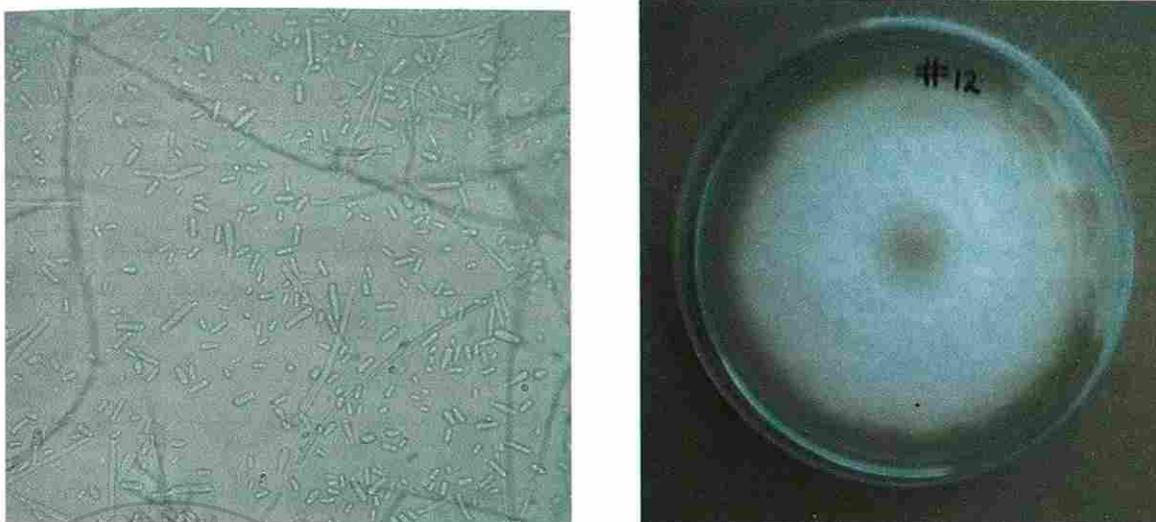


Fig 6. Micro y macromorfología. Arthroconidias, escasas aleurias, hifas septadas, muy escasas clamidosporas. Anverso: apariencia polvorienta blanca; reverso: amarillo claro, borde regular, crecimiento rápido.

Cepa # 15 *Penicillium sp.*

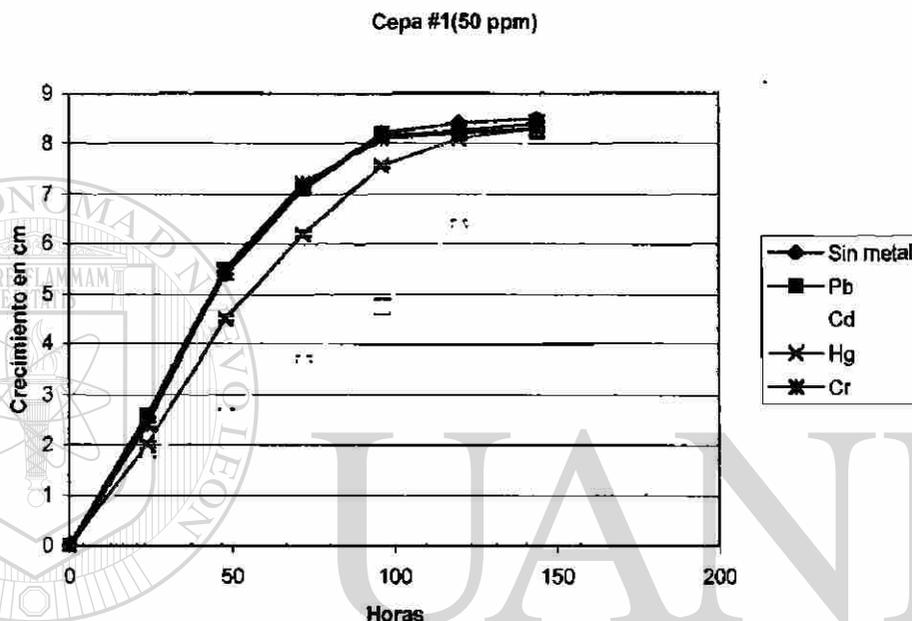


Fig 7. Micro y macromorfología. Microconidias, hifas septadas, conidióforos con fiálides agrupadas al final. Anverso: apariencia aterciopelada blanco con verde reverso: color beige con hendiduras.

8.3 Selección de los hongos tolerantes a metales pesados.

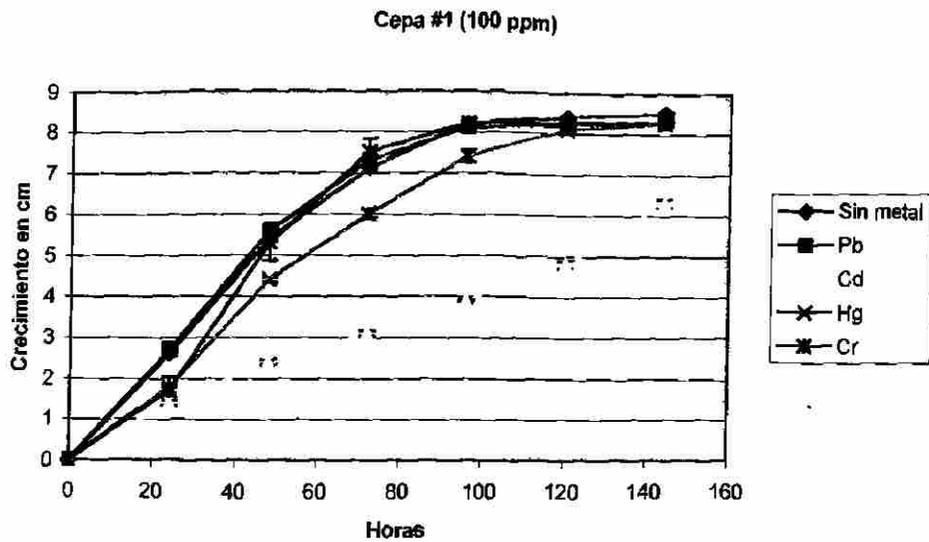
La selección de las cepas tolerantes se realizó en base al síntoma de intoxicación más fácilmente observable que es la inhibición del crecimiento.

Se realizaron ensayos con los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr) en las tres concentraciones diferentes (50, 100 y 250 ppm) con cada uno de los aislados.

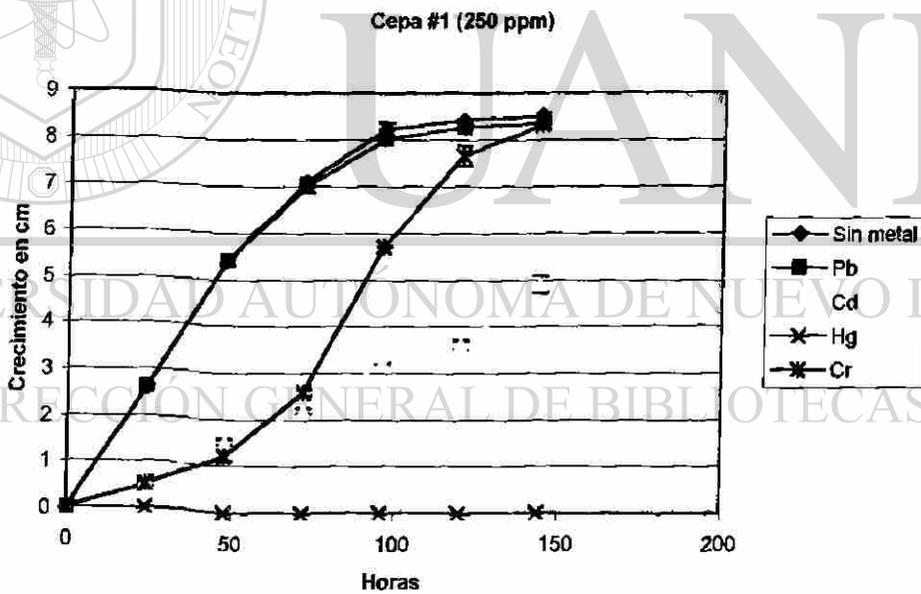


Gráfica 1. Crecimiento de la cepa #1 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).

En la gráfica 1 podemos observar que en el crecimiento en presencia del cadmio existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) lo que significa que el crecimiento promedio con este metal a 50 ppm es menor que el crecimiento promedio control. Comparado el crecimiento el crecimiento promedio de la cepa #1 en presencia del plomo, el mercurio, el cromo y el crecimiento promedio control (crecimiento sin metal) donde no hay una diferencia significativa.



Gráfica 2. Crecimiento de la cepa #1 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).



Gráfica 3. Crecimiento de la cepa #1 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

Los cuatro metales (Pb, Cd, Hg y Cr) a una concentración de 100 ppm empezaron a inhibir el crecimiento de la cepa #1 por lo que hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento promedio de cada uno de ellos con respecto al crecimiento promedio control; en cambio con una concentración de 250 ppm no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento con respecto al crecimiento control en presencia de los metales plomo y cromo, es decir su crecimiento fue igual y no se veía inhibido su crecimiento con dichos metales a ésta concentración.

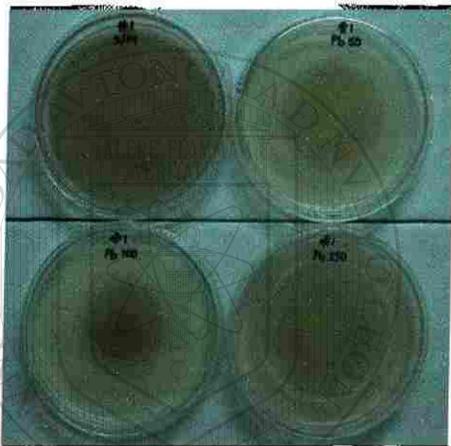


Fig 8. Resistencia a Plomo de la Cepa #1



Fig 9. Resistencia a Cadmio de la Cepa #1

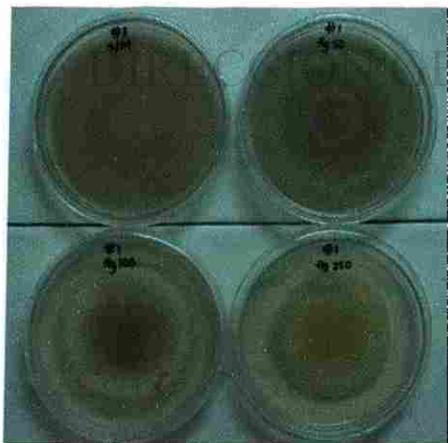


Fig 10. Resistencia a Mercurio de la Cepa #1

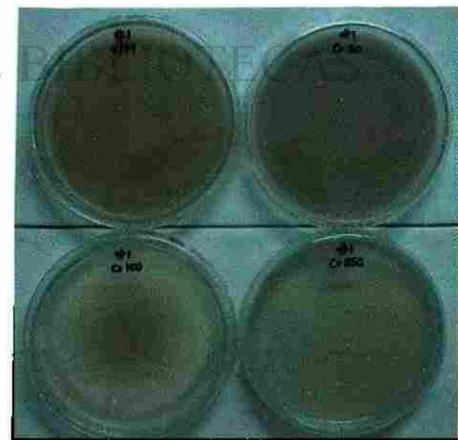
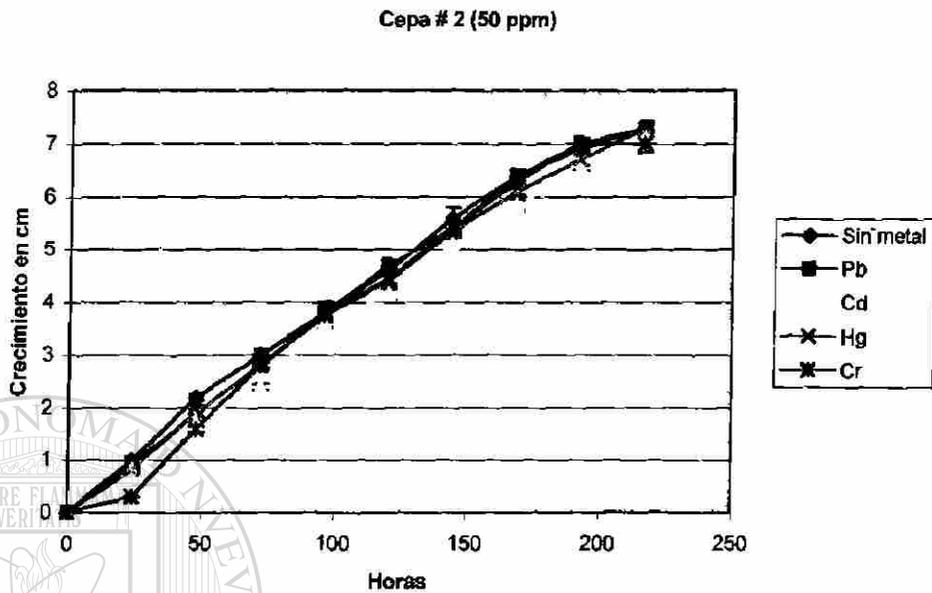
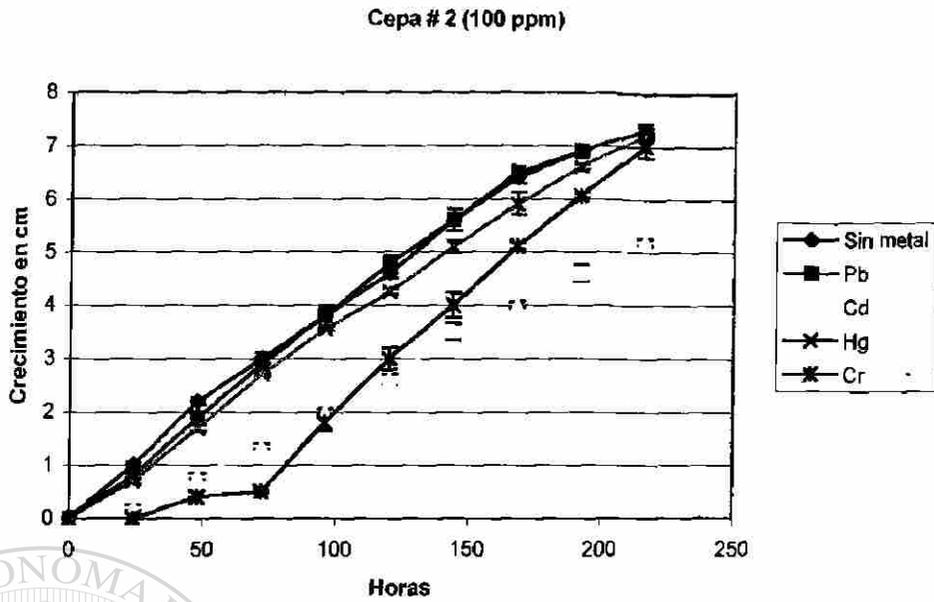


Fig 11. Resistencia a Cromo de la Cepa #1

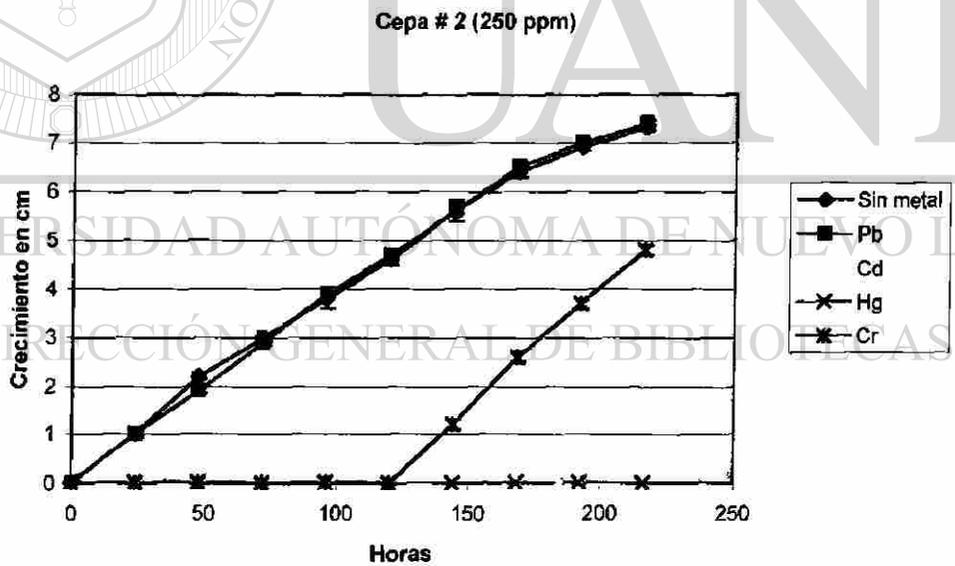


Gráfica 4. Crecimiento de la cepa #2 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

La gráfica 4 muestra que con el único metal a 50 ppm, en el cuál hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al crecimiento control fue con el cromo a diferencia del crecimiento en presencia de plomo, cadmio y mercurio en las cuáles no hubo diferencia significativa en el crecimiento ($p < 0.05$), es decir el crecimiento en estos metales es igual al crecimiento de la cepa #2 sin la presencia del metal.



Gráfica 5. Crecimiento de la cepa #2 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).



Gráfica 6. Crecimiento de la cepa #2 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

149935

A una concentración de 100 ppm ningún crecimiento presentó diferencia significativa con respecto al crecimiento control ($p < 0.05$), por lo que de alguna manera a esta concentración no se ve inhibido el crecimiento de la cepa. A 250 ppm se vio inhibido el crecimiento de la cepa #2 haciéndose notoria la diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el crecimiento en presencia de cadmio, mercurio y cromo con referencia al crecimiento control, a excepción del plomo cuyo crecimiento no mostró diferencia significativa, es decir no se veía inhibido su crecimiento.

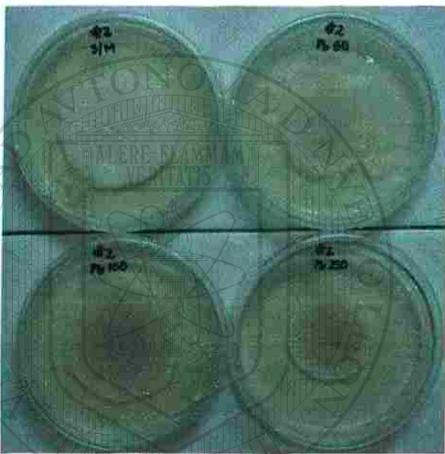


Fig 12. Resistencia a Plomo de la Cepa #2



Fig 13. Resistencia a Cadmio de la Cepa #2

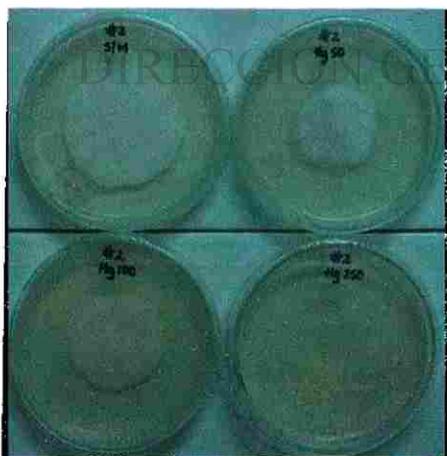


Fig 14. Resistencia a Mercurio de la Cepa #2

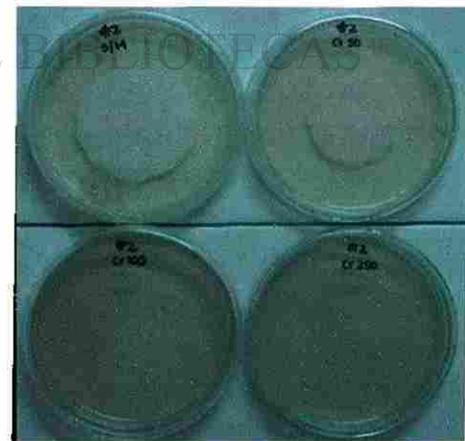
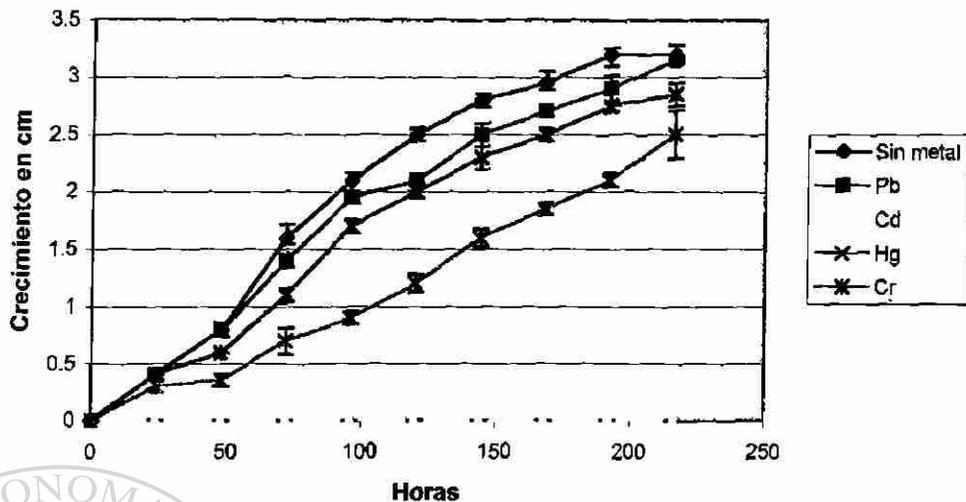


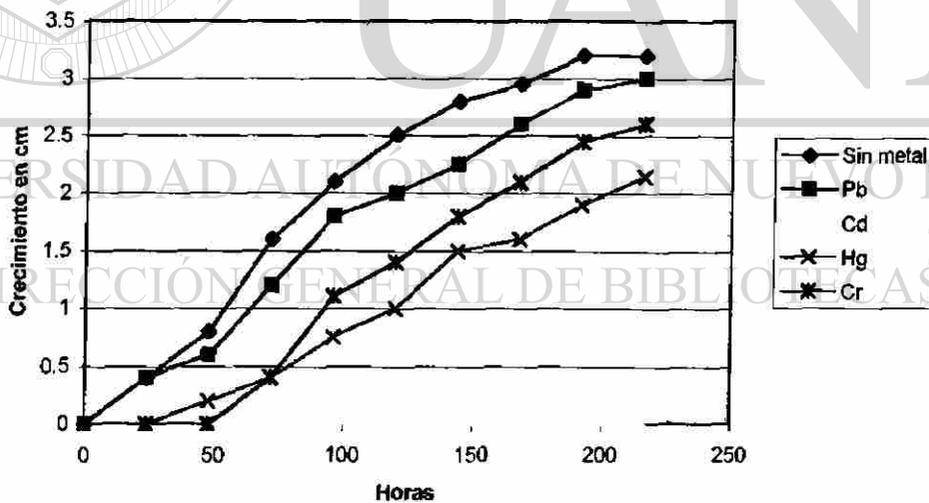
Fig 15. Resistencia a Cromo de la Cepa #2

Cepa # 3 (50 ppm)



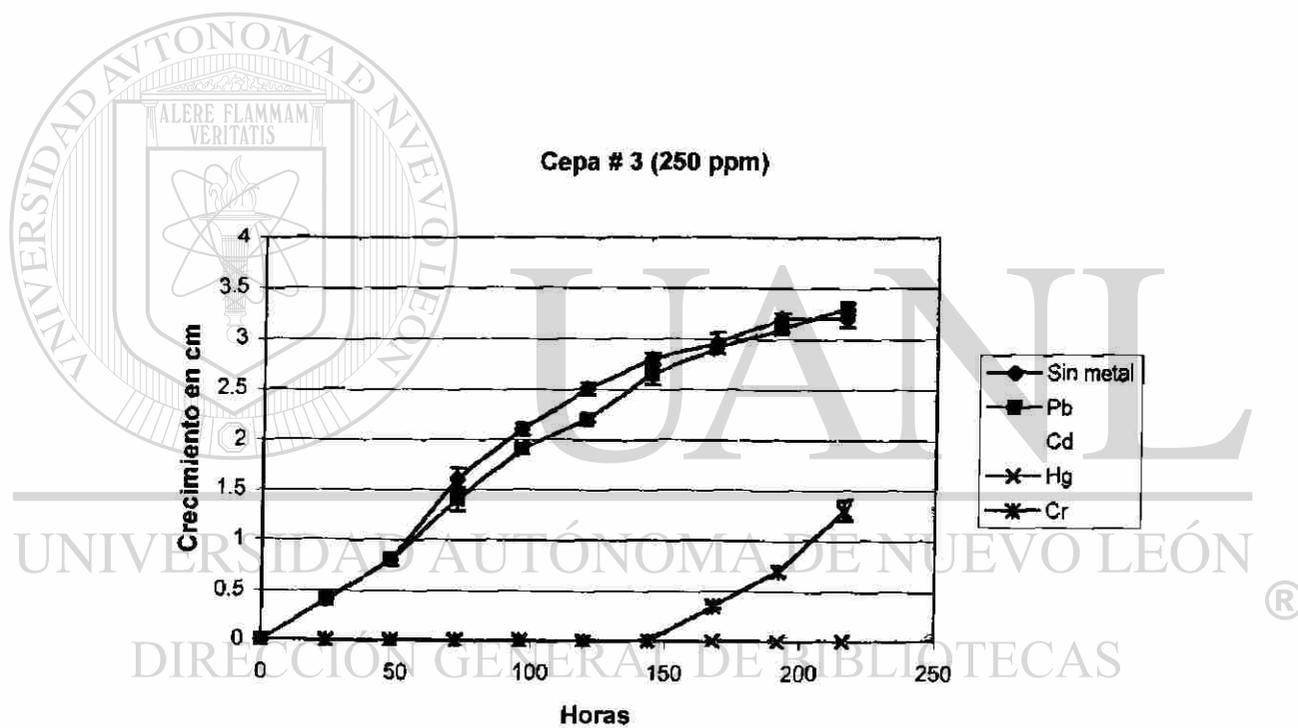
Gráfica 7. Crecimiento de la cepa #3 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

Cepa # 3 (100 ppm)



Gráfica 8. Crecimiento de la cepa #3 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

En la gráfica 7 observamos cómo el crecimiento en presencia del metal plomo es el único que no muestra una diferencia significativa con respecto al crecimiento control, es decir que el crecimiento de esta cepa no se ve inhibido por el plomo a 50 ppm, en cambio existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en presencia de los otros metales como cadmio, mercurio y cromo.



Gráfica 9. Crecimiento de la cepa #3 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

Este mismo comportamiento es observado a una concentración de 250 ppm, es decir hay una diferencia significativa en presencia de cadmio, mercurio y cromo, a excepción del plomo.

Con una concentración de 100 ppm los crecimientos con todos lo metales se ve inhibido y presentan una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al crecimiento control.



Fig 16. Resistencia a Plomo de la Cepa #3



Fig 17. Resistencia a Cadmio de la Cepa #3

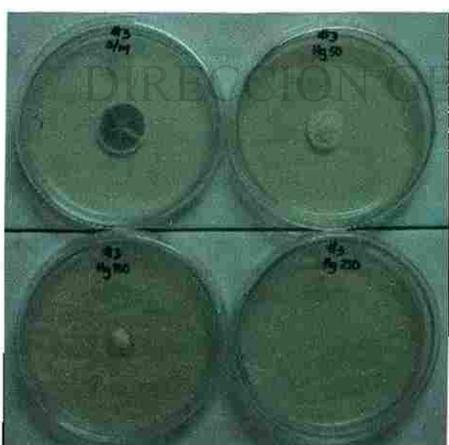


Fig 18. Resistencia a Mercurio de la Cepa #2

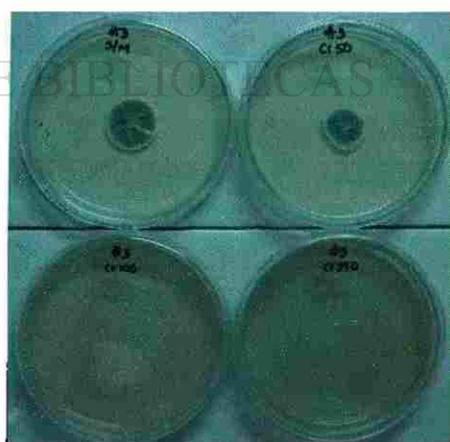
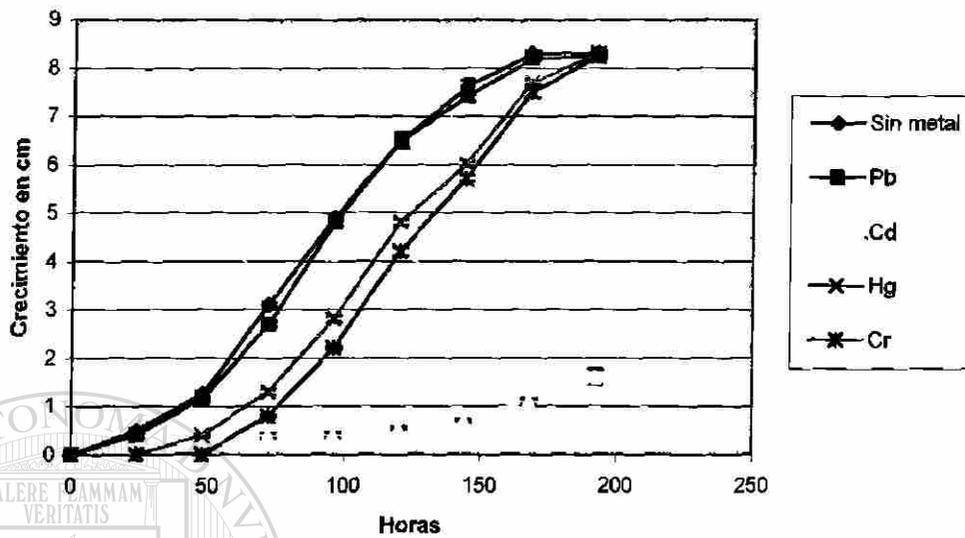


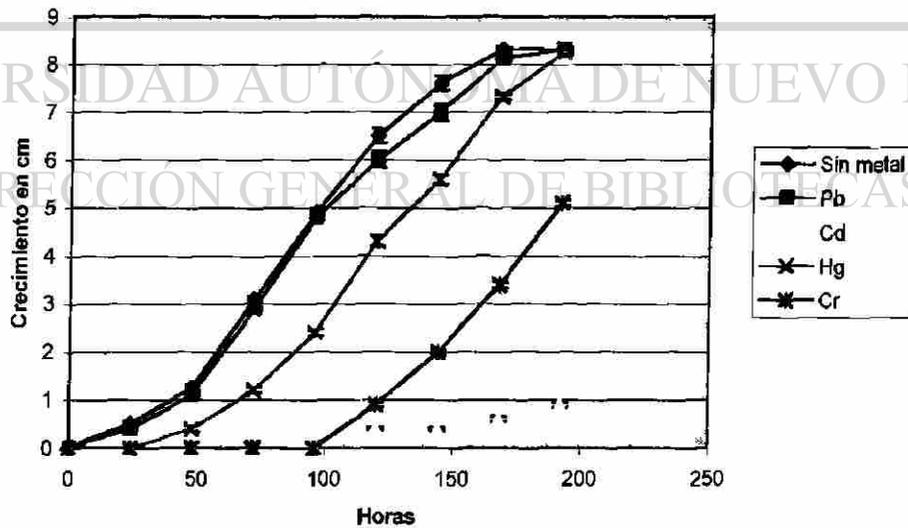
Fig 19. Resistencia a Cromo de la Cepa #2

Cepa #12 (50 ppm)



Gráfica 10. Crecimiento de la cepa #12 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

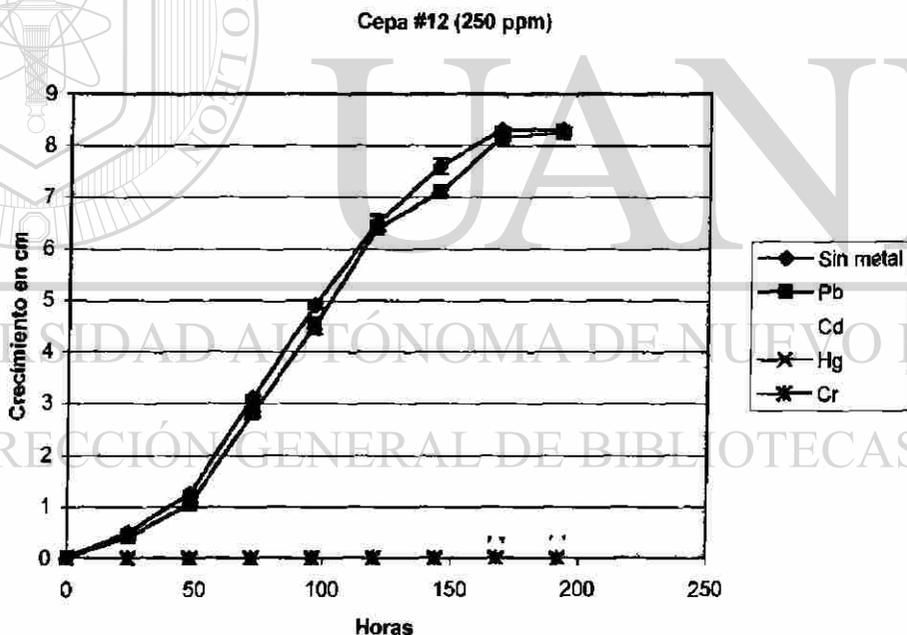
Cepa #12 (100 ppm)



Gráfica 11. Crecimiento de la cepa #12 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

Con la cepa #12 a una concentración de 50 ppm se presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) del crecimiento en presencia del metal cadmio, y con los metales plomo, mercurio y cromo no hubo diferencia significativa entre sus crecimientos y el crecimiento control.

En el caso de la concentración de 100 ppm la diferencia significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento con relación al crecimiento control se presentó con los metales cadmio y cromo, y donde no hubo ninguna diferencia significativa con relación al crecimiento control fue en presencia de los metales plomo y mercurio.



Gráfica 12. Crecimiento de la cepa #12 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).

En la concentración de 250 ppm de cada uno de los metales con la cepa #12 hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento de todos con relación al crecimiento control a excepción del plomo en el cuál no hubo diferencia significativa, por lo que en esta concentración en casi todos los metales se inhibe el crecimiento.



Fig 20. Resistencia a Plomo de la Cepa #12

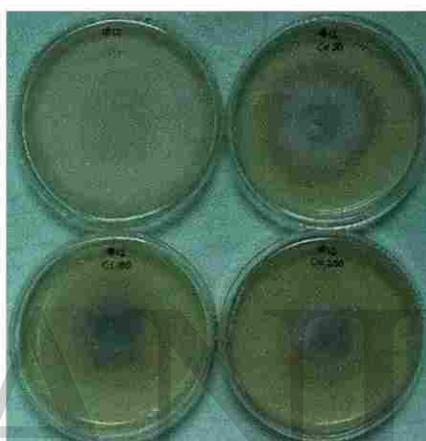


Fig 21. Resistencia a Cadmio de la Cepa #12

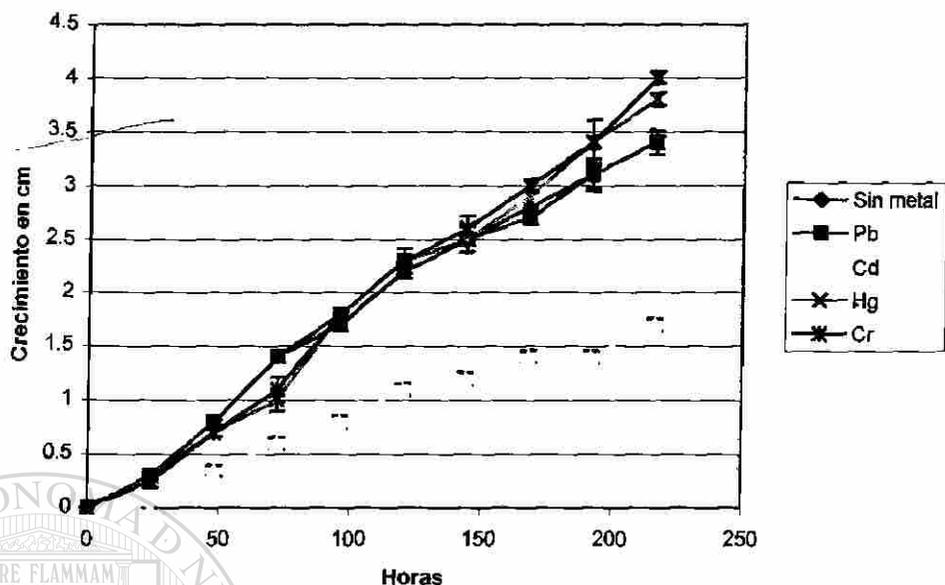


Fig 22. Resistencia a Mercurio de la Cepa #12



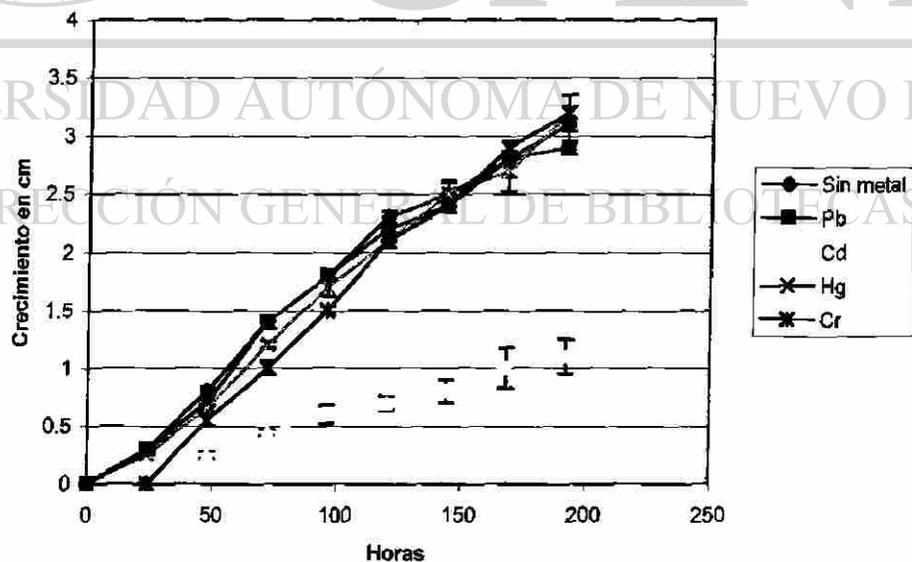
Fig 23. Resistencia a Cromo de la Cepa #12

Cepa #15 (50 ppm)



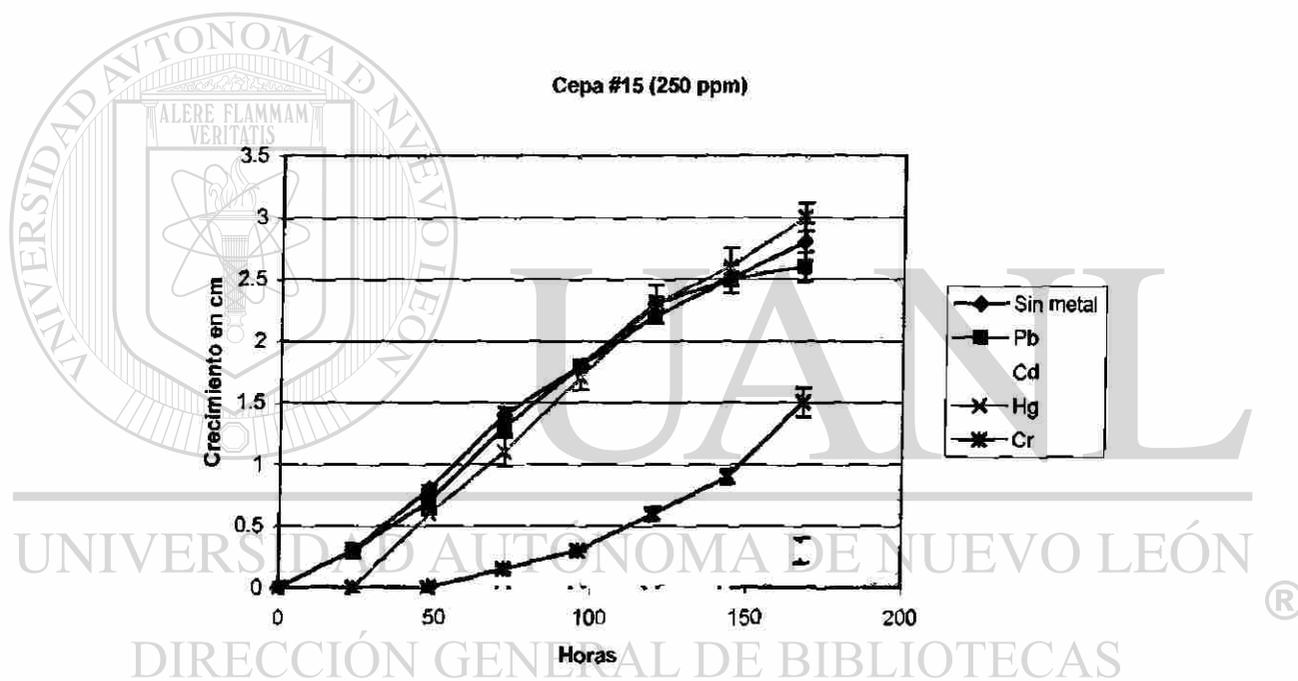
Gráfica 13. Crecimiento de la cepa #15 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

Cepa # 15 (100 ppm)



Gráfica 14. Crecimiento de la cepa #15 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

La gráfica 13 y 14 nos muestra el crecimiento de la cepa #15 en presencia de los metales, el cuál presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con el metal cadmio y no hubo diferencia significativa con los metales plomo, mercurio y cromo tanto en la concentración de 50 ppm y 100 ppm.



Gráfica 15. Crecimiento de la cepa #15 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

En el caso de la concentración de 250 ppm para la cepa #15 observamos que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) del crecimiento promedio en relación con el crecimiento control en los metales cadmio y cromo, es decir éstos metales a 250 ppm inhiben el crecimiento de la cepa a diferencia de los metales plomo y mercurio en los cuáles no se encontró una diferencia significativa en relación al crecimiento control.



Fig 24. Resistencia a Plomo de la Cepa #15

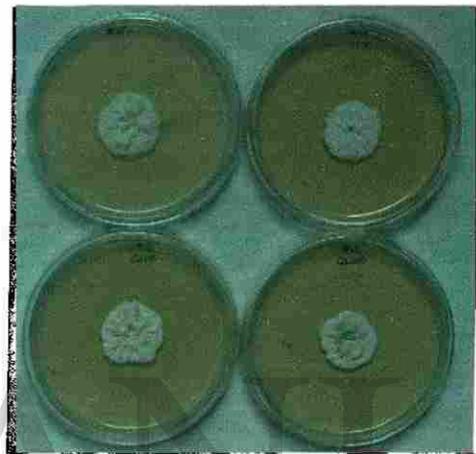


Fig 25. Resistencia a Cadmio de la Cepa #15



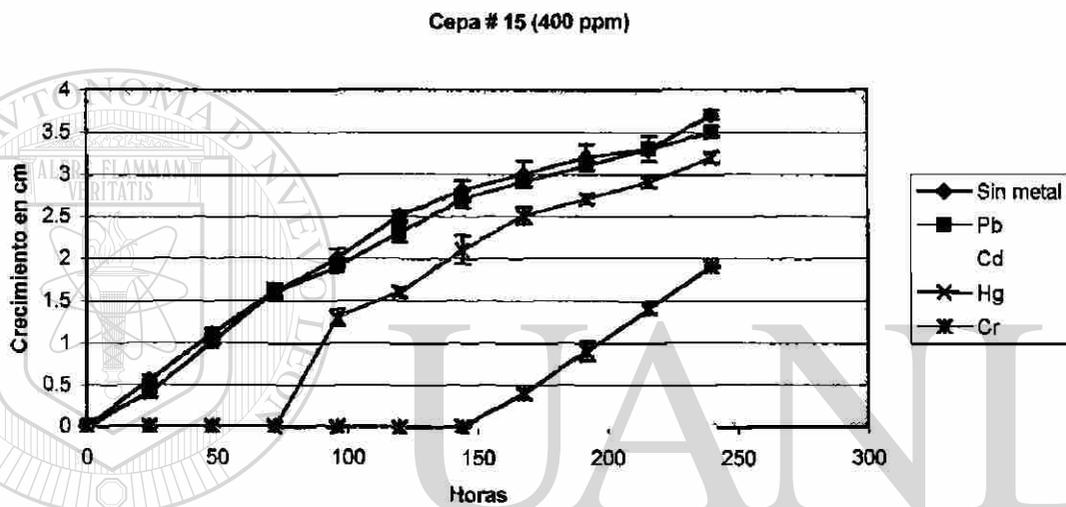
Fig 26. Resistencia a Mercurio de la Cepa #15



Fig 27. Resistencia a Cromo de la Cepa #15

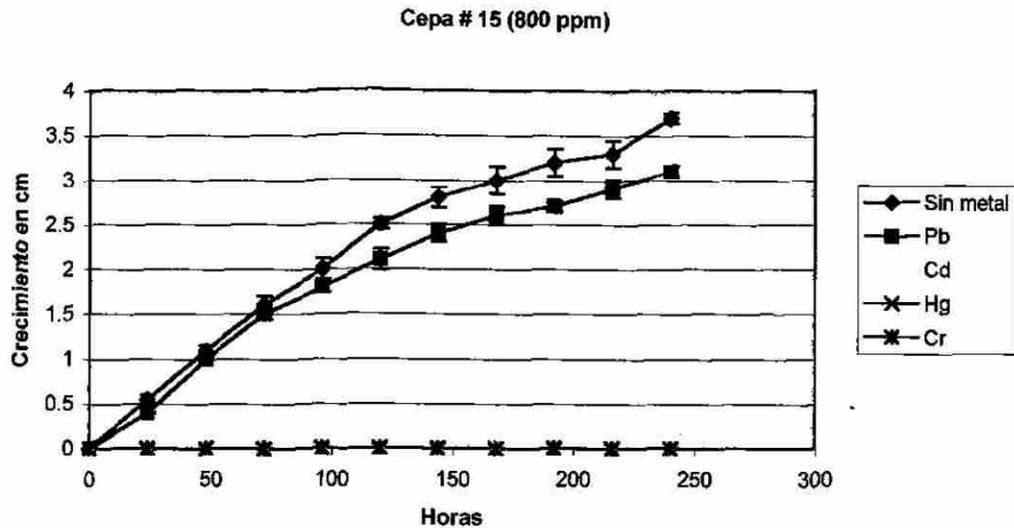
8.4 Análisis de Resistencia de la Cepa #15.

Debido a que la cepa #15 fue la que presentó menor inhibición en su crecimiento en presencia de metales como plomo, mercurio y cromo (a excepción del cadmio) en la mayor concentración (250 ppm) en comparación con las otras cepas restantes, se realizó un análisis de mayor resistencia con dicha cepa a dos concentraciones mayores como 400 y 800 ppm para cada uno de los metales.



Gráfica 16. Crecimiento de la cepa #15 en 400 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).

En la gráfica 16 observamos que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el crecimiento de la cepa #15 en presencia del cadmio y el cromo, comparado con el crecimiento de la cepa en presencia del plomo y el mercurio en los cuáles no hay diferencia significativa entre éstos últimos y el crecimiento promedio del crecimiento control (sin presencia de metal).



Gráfica 17. Crecimiento de la cepa #15 en 800 ppm en presencia de los 4 metales (Pb, Cd, Hg y Cr).

Con la concentración de 800 ppm (gráfica 17) con todos los metales hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el crecimiento de la cepa en presencia de casi todos los metales y el crecimiento control a excepción del plomo.

Cultivamos la cepa #15 en medio de cultivo líquido para observar si también era capaz de desarrollar en medio líquido y cómo sería su crecimiento en presencia y ausencia del metal

(plomo 400 ppm y cromo 250 ppm).



Fig 28. Cepa #15 en CS (izq. a der.) sin plomo, con plomo 400 ppm y caldo únicamente.



Fig 29. Micelio seco cepa #15. Izq. sin metal; der. hongo en presencia de Pb 400 ppm

Al momento de cultivar la cepa #15 en presencia del mercurio a 400 ppm no se obtuvo crecimiento alguno, de hecho se observó la presencia de un precipitado negro en el fondo del matraz, por lo que pensamos que estábamos teniendo un problema con la solubilización del plomo en medio líquido, por lo que no podríamos llevar a cabo bien el experimento, tras realizar varias modificaciones al medio líquido para tratar de eliminar el precipitado pero sin éxito alguno, optamos por modificar el experimento realizándolo el crecimiento con el cromo a 250 ppm.

La cepa #15 también desarrolló en caldo Sabouraud más cloranfenicol 0.005% (CS) en presencia de 400 ppm de plomo (fig. 26), procedimos a filtrarlo, secarlo y pesarlo para ver la reducción del crecimiento. La diferencia de micelio sin metal y el micelio en presencia de plomo fue de 0.06 g, es decir se redujo en un 4.84 %.



Fig 30. Cepa #15 en CS (izq. a der.) sin cromo, con cromo 250 ppm y caldo únicamente.

En el caso del cromo a 250 ppm el crecimiento micelial en el medio líquido fue mínimo por lo que no se pudo llevar a filtración y ver el porcentaje de reducción del mismo entre el micelio sin el cromo y en presencia de éste.

8.5 Extracción de DNA de las cepas de hongos.

Se realizó Extracción de DNA de las cepas de hongos utilizando un Kit de Extracción comercial para muestras de suelo.

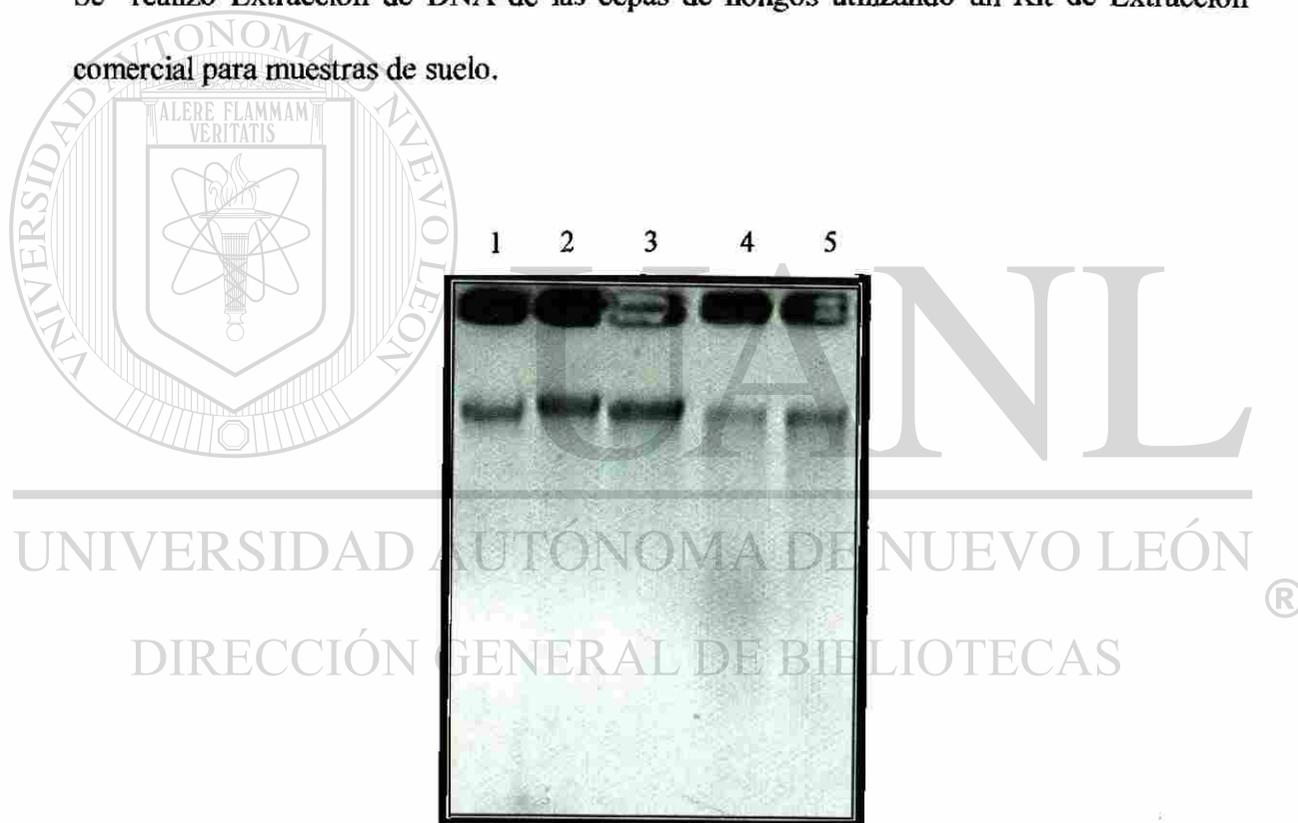


Fig 31. Extracción de DNA de los aislamientos de hongos. Carriles del 1 al 5: Cepas #1, #2, #3, #12 y #15 respectivamente.

8.6 Amplificación de DNA genómico con PCR de 18S-rDNA.

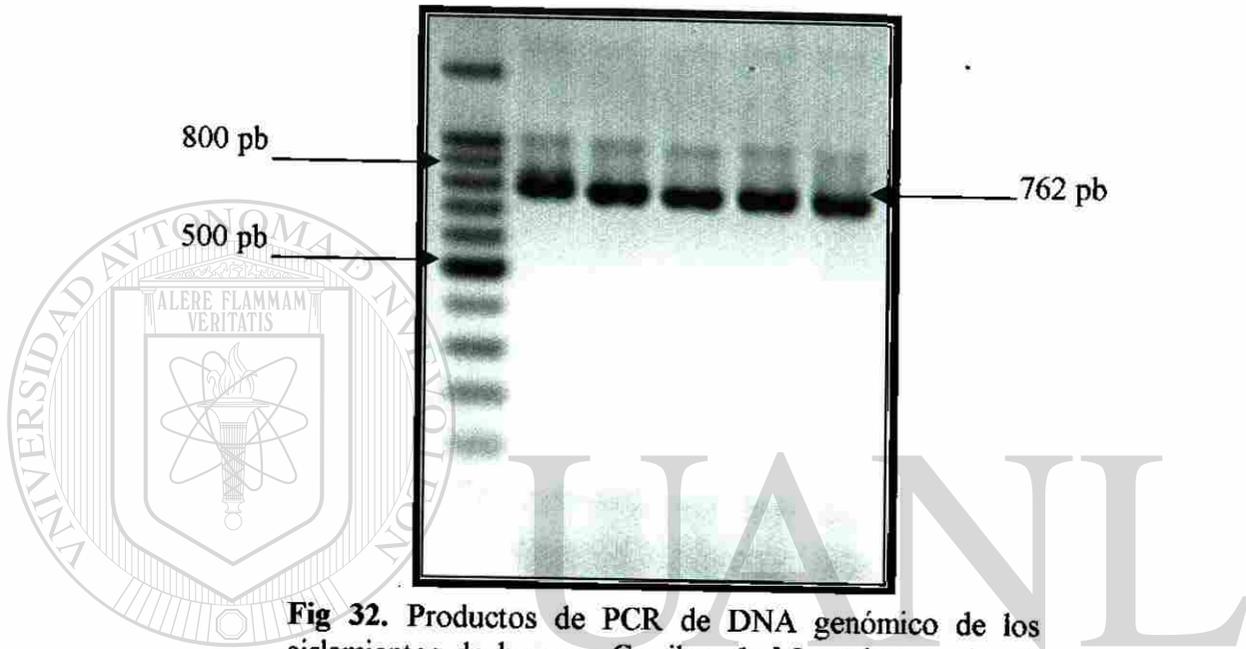


Fig 32. Productos de PCR de DNA genómico de los aislamientos de hongos. Carriles 1: Marcador, carriles 2 al 6: Cepas #1, #2, #3, #12 y #15 respectivamente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

8.7 Clonación de la cepa #15.

Caracterización de las clonas

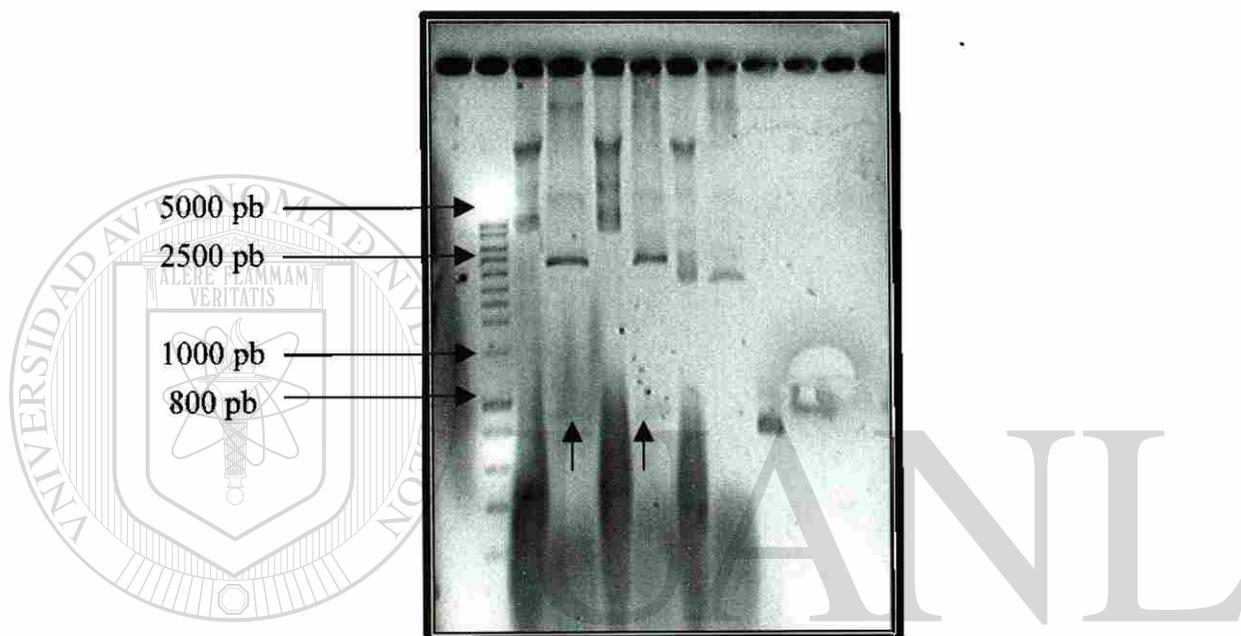


Fig 33. Digestión de las clonas 2, 3 y 5 con *EcoRI*. Carril 2: marcador; carril 3: clona 2 s/d; carril 4: clona 2 dig; carril 5: clona 3 s/d; carril 6: clona 3 dig; carril 7: clona 5 (negativo) s/d; carril 8: clona 5 (neg) dig; carril 9: PCR (inserto) de cepa #15.

PCR de las clonas

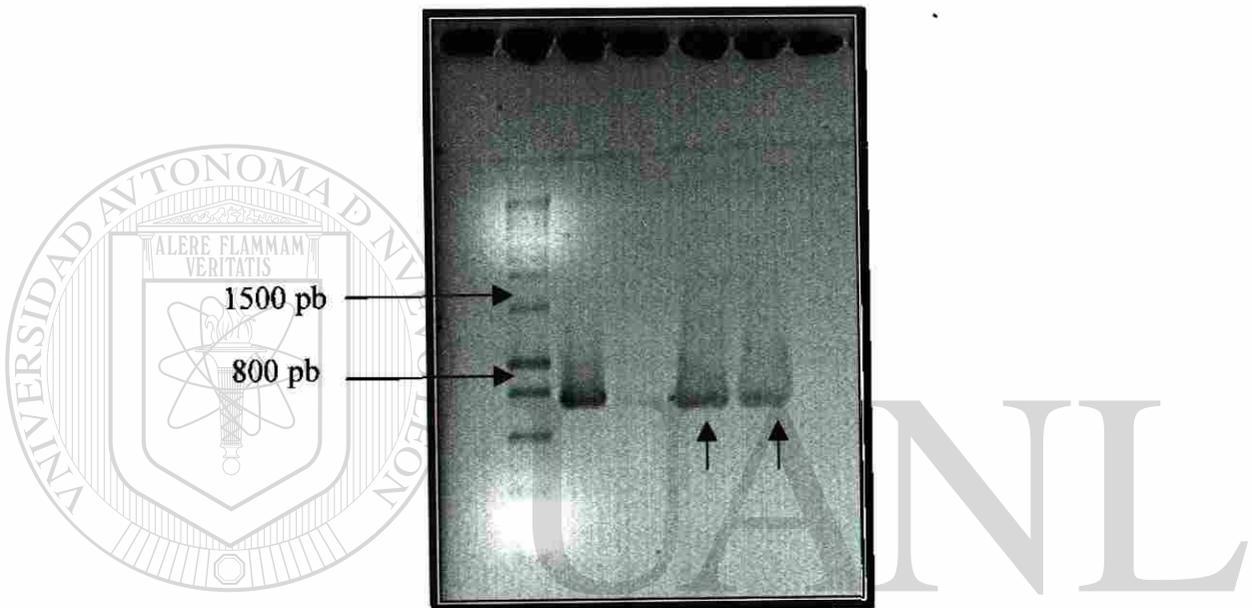


Fig 34. PCR de las clonas 2, 3 y 5. Carril 2: marcador; Carril 3: PCR de DNA genómico de la cepa #15 (control +); Carril 4: PCR de DNA plasmídico (control -); carril 5: PCR de la clona 2; carril 6: PCR de la clona 3.

8.8 Secuenciación de la cepa #15.

A continuación se presenta la secuencia que se obtuvo con un tamaño de 775 pb.

```

1   ttagcattggaataatggaataggacgtccggttctatcttcttgggtttctaggaccgccgtaatgattaataggatagtcggggcgtcagatttcagc 100
101  tctcagaggtgaaattcttggatttctctgagactaactactcgaagaacattcgcacaaggatgttttcattaatcaggaacgaaagttagggatcgaa 200
201  gacgatcagataccgtctgtagctttaacataaactatgccgactagggatcggacgggattctatgatgacccttcggcacccttacgagaatcaaa 300
301  tttttgggttctggggggagtatggctcgaaggctgaaacttaagaaatgacggaaggcaccacaaggcgtggagcctcggccttaattgactcaa 400
401  caccggggaaactcccaggctctagaccāaaataaggatgacagattggagagctctcttcttgatctttggatgggtgggtgcatggccgtctcttag 500
501  ttggtgggagtggatttctctgctttaattggcgataacgaaacggaccctggcccttaaaagecggctccgcatctcggggccgctggctctcttag 600
601  ggggactatcgctcaagccgatggaagtgcgcggcaataacaggtctgtgtagtcccttagatgtcttggccgcacgcgcctacacatgacaggccag 700
701  ceagtacatcaccttggccgagaggtctgggtaactctgttaaacctgtctctgctggggatagagcattgcaat 775
  
```

Fig 35. Secuencia Nucleotídica obtenida de la secuenciación de la clona .

Datos Obtenidos con el programa Blast al comparar la secuencia nucleotídica obtenida de la cepa #15

Se enlistan las primeras 20 secuencias nucleotídicas en score descendente.

GENBANK ACCESION NO.	STRAIN	IDENTITIES	GAPS	SCORE (BITS)
AB074658.1	Uncultured ascomycete	759/777 (97%)	15/777 (1%)	1289
AB086834.1	Penicillium herquei	759/777 (97%)	15/777 (1%)	1289
AF548090.1	Penicillium glabrum	758/777 (97%)	15/777 (1%)	1281
AB069704.1	Thysanophora sp. WC 0944	758/777 (97%)	15/777 (1%)	1281
EJU21298	Eupenicillium javanicum	758/777 (97%)	16/777 (2%)	1273
D88321.2	Talaromyces emersonii	758/778 (97%)	16/778 (2%)	1267
AB032120.1	Penicillium argillaceum	758/778 (97%)	16/778 (2%)	1267
PVY13996	Paecilomyces variotii	757/778 (97%)	15/778 (1%)	1267
AB033534.1	Penicillium argillaceum	758/778 (97%)	16/778 (2%)	1267
D88323.1	Chromocleista malachitea	756/777 (97%)	15/777 (1%)	1265
AB075440.1	Thysanophora longispora	756/777 (97%)	15/777 (1%)	1265
AB069700.1	Thysanophora longispora	756/777 (97%)	15/777 (1%)	1265
AB032070.1	Penicillium lagena	756/777 (97%)	15/777 (1%)	1265
D88322.1	Talaromyces eburneus	757/778 (97%)	16/778 (2%)	1259
D88320.2	Geosmithia cylindrospora	757/778 (97%)	16/778 (2%)	1259
AB008396.1	Aspergillus candidus	757/778 (97%)	16/778 (2%)	1259
D88319.1	Penicillium namyslowskii	755/777 (97%)	15/777 (1%)	1257
AB028190.1	Penicillium namyslowskii	755/777 (97%)	15/777 (1%)	1257
AB031391.1	Eladia saccula	755/777 (97%)	15/777 (1%)	1257
AB027410.1	Penicillium sacculum	755/777 (97%)	15/777 (1%)	1257

IX. DISCUSIÓN

La liberación de metales pesados al medio ambiente ha ido incrementando continuamente como resultado de las actividades industriales y desarrollo tecnológico, siendo una amenaza significativa para el ecosistema y la salud pública debido a su toxicidad, acumulación en la cadena alimenticia y su persistencia en la naturaleza. Por eso es importante desarrollar nuevos métodos para la remoción de metales y la recuperación de soluciones diluidas o de iones metales pesados a bajas concentraciones.

El uso de tecnologías convencionales, tales como intercambio iónico, precipitación química, ósmosis inversa y recuperación evaporativa, es casi siempre ineficiente y/o muy caro (Yu and Kaewsarn, 1999; Zhao *et al.*, 1999). A diferencia de los herbicidas, pesticidas y otros compuestos tóxicos que pueden degradarse biológicamente, los metales pesados no pueden ser eliminados y permanecen en los suelos o sedimentos, de donde se liberan lentamente al agua (Ehrlich, 1990). La remoción de los metales pesados de los cuerpos de agua mediante métodos tradicionales, tales como el intercambio iónico o la precipitación con limo, resulta muchas veces costosa e ineficiente, en particular a bajas concentraciones del metal. Además, el tratamiento de los lodos representa uno de los mayores costos en el tratamiento de las aguas residuales. Sin embargo, a pesar de que los lodos suelen ser excelentes fertilizantes, su uso en la agricultura se ve limitado por la presencia de metales pesados. La lixiviación química también es costosa por requerir grandes cantidades de ácido; en cambio es más sencilla y económica la lixiviación efectuada por microorganismos como *Thiobacillus ferrooxidans* (Couillard y Zhu, 1992).

Por estas razones, se requiere desarrollar nuevas tecnologías capaces de reducir la concentración de metales pesados en cuerpos de agua a concentraciones biológicas

- aceptables, y cuyos costos sean accesibles. Desde hace más de un siglo se ha reconocido el potencial de los microorganismos para utilizarse en la degradación o remoción de contaminantes ambientales (Schönborn, 1986) y se han aplicado desde hace mucho tiempo, por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales (Brock y Madigan, 1988).

Con mayor conocimiento de la fisiología y la genética molecular de los microorganismos se han podido establecer las bases para aplicar la biotecnología ambiental y los procesos denominados de biorremediación o biorremoción.

Con esto en mente el objetivo de nuestro trabajo fue seleccionar e identificar microorganismos, específicamente hongos filamentosos, capaces de tolerar concentraciones de metales pesados, con el objetivo de identificar alguna especie que pueda servir de estudio para su utilización como agente biorremediador de efluentes contaminadas con metales pesados o la utilización de algún gen de resistencia que pueda ser utilizado en otra cepa con características más óptimas de crecimiento o producción.

En nuestro trabajo escogimos cuatro de los principales metales que consideramos son foco de contaminación por las diferentes industrias que se encuentran en nuestra ciudad, como son el plomo, el cadmio, el mercurio y el cromo. De los 5 aislados de hongos filamentosos que obtuvimos de las muestras de agua del proceso de lodos activados de la planta de tratamiento de agua residual, pudimos observar que las capacidades de cada una de las cepas para desarrollar en presencia de plomo, cadmio, mercurio o cromo, varían tanto del tiempo de incubación, el metal así como la concentración del mismo. En estudios extensivos acerca de la utilización de biomasa microbiana como bioabsorbentes para la remoción de metales pesados, se han investigado las capacidades de remoción de varias especies de bacterias, algas, hongos y levaduras (Yetis *et al*; 2000) y se ha visto que los mecanismos como intercambio de ion, quelación, adsorción y difusión que son los que

participan en este tipo de procesos, difieren de las especies utilizadas, el origen y el procesamiento de la biomasa y solución química (Churchill *et al.*, 1995).

Observamos que existían diferencias significativas con todas las variables (tiempo de incubación, metal y concentración) por lo que nos enfocamos específicamente en la variable metal, fijando la concentración y tomando en cuenta el último tiempo de incubación. Dándonos como resultado que para la cepa #1 a 50 ppm los metales para los cuales ésta presentó mayor tolerancia fueron el plomo, el mercurio y el cromo. A 100 ppm se inhibió el crecimiento y a 250 ppm únicamente toleró la presencia del plomo y el cromo.

La cepa # 2 a 50 ppm toleró la presencia del plomo, cadmio y mercurio; a 100 ppm toleró los 4 metales: plomo, cadmio, mercurio y cromo; y para la concentración de 250 ppm únicamente fue con el metal plomo. Con la cepa #3, el metal con el que no se inhibió el crecimiento a 50 y 250 ppm fue el plomo. A 100 ppm se inhibió el crecimiento de la cepa #3 con todos los metales.

La cepa #12 a 50 ppm toleró la presencia de plomo, mercurio y cromo, a 100 ppm la presencia de plomo y mercurio, y únicamente del plomo a 250 ppm. Y con la cepa #15 tanto a 50 como 100 ppm el crecimiento no se inhibió en presencia del plomo, mercurio y cromo y en una concentración de 250 ppm toleró al plomo y mercurio. Uno de los efectos de la toxicidad por metales pesados en los hongos es la alteración de su pared celular (PC), estructura que tiene a su cargo la forma de la célula y está compuesta de polisacáridos, quitina, las glucanas y la quitosana; y de otros componentes como glicoproteínas y lípidos.

En la Fig. 9 se muestra el cambio drástico en la morfología de la cepa #1 en presencia del cadmio, donde se aprecia una modificación en el color café del crecimiento filamentoso a un color amarillo intenso, al igual que la apariencia polvorienta del hongo a una más rugosa y engrosada. Muchos de los componentes de las células interactúan fuertemente con los

metales en ensayos realizados *in vitro*. El Cu, a una concentración de 571 ppm produjo cambios morfológicos en el hongo filamentoso *Cunninghamella blakesleena* caracterizados por un ensanchamiento y vacuolización de las hifas, así como un engrosamiento irregular de la pared celular (Venkateswerlu *et al.*, 1989). En la cepa #2 en presencia del plomo y en la cepa #12 en presencia del plomo y cadmio podemos observar la formación de un pigmento radial café oscuro en el centro del crecimiento tanto en el anverso como el reverso (Fig. 12, Fig. 20 y Fig. 21). Para otros hongos como *Mucor rouxii* (Ramírez-Salgado, 1989) y *Trichoderma spp.* (Cortés-Penagos *et al.*, 1994) se obtuvieron observaciones similares; en estos hongos 203 ppm de Cu provocan la formación de hifas con una morfología aberrante. Dichas células mostraron alteraciones en la pared celular, que era más gruesa y estructuralmente diferente que la de las células crecidas sin el metal. *Rhizopus stolonifer*, desarrollado en 50 ppm de Ni, mostró también aberraciones morfológicas como hifas muy gruesas que tuvieron una frecuencia muy alta de ramificación (Babich y Stotzky, 1982^a).

Después de seleccionar la cepa #15 siendo la que toleró el mayor número de metales (plomo, mercurio y cromo) en las tres concentraciones, sobre todo a 250 ppm y teniendo en cuenta como característica importante que fue la única cepa que presentó tolerancia al mercurio a ésta última; aumentamos las concentraciones de los metales a 400 y 800 ppm en crecimiento sobre medio sólido, para observar si el comportamiento de la cepa #15 seguía siendo el mismo. A 400 ppm toleró la presencia del plomo y mercurio, pero con 800 ppm se inhibió el crecimiento en presencia de todos los metales.

Teníamos interés de saber si este tipo de comportamiento también podíamos obtenerlo en medio líquido, por lo que inoculamos los cultivos con los metales Pb y Hg a 400 ppm. En el caso del plomo, observamos que de la misma manera la cepa #15 desarrollaba en

presencia del plomo a 400 ppm, y únicamente se redujo el crecimiento en un 4.84%. Otro de los objetivos de realizarlo en medio líquido fue para analizar el micelio seco obtenido, es decir si el metal se encontraba dentro del micelio, precipitado extracelularmente o si estaba en el caldo de cultivo modificado químicamente y así darnos una idea del mecanismo o mecanismos que pudieran estar interviniendo en esa resistencia de la cepa #15 al metal. Por problemas con el equipo de espectroscopía de absorción atómica que utilizaríamos, no se logró este objetivo, el cuál se piensa que en estudios posteriores sea un objetivo a cumplir. En el caso del mercurio, no se obtuvo crecimiento micelial en medio líquido a 400 ppm, debido a la formación de un precipitado negro que se formó al inicio de la incubación de la cepa #15 con el metal Hg. Por lo que después de varios intentos de eliminar ésta limitante, se optó por sustituirlo por el cromo, a la mayor concentración a la cuál no se inhibió (250 ppm). En presencia del cromo a 250 ppm, el crecimiento en medio líquido, fue mucho menor, por lo que la recuperación del micelio para su secado fue más difícil y observar la reducción del micelio en presencia del cromo a 250 ppm. Desde hace tiempo se ha observado que la biomasa fúngica posee la capacidad de absorber metales a partir de soluciones acuosas, incluso cuando ya están muertas las células. Algunos estudios indican que la pared celular es el sitio primario donde se acumula el metal (Tobin *et al.*, 1984). Se señala a los polisacáridos quitina y quitosana como componentes de la pared celular útiles en la remoción de metales valiosos. La unión de los metales a la biomasa es un fenómeno complejo que depende de la naturaleza del adsorbente y de las especies de los metales presentes (éstas últimas en función del pH, su concentración, los aniones presentes y otros factores). A la biosorción se le considera como una alternativa biotecnológica de gran potencial para la remoción o recuperación de metales de diferentes fuentes que incluyen: efluentes industriales, aguas residuales de origen municipal, desechos de la industria, etc.

(Burgstaller, 1989). La biomasa utilizada generalmente proviene como desecho de procesos de fermentación basados en el uso de hongos filamentosos (Stoll y Duncan, 1996)

Deducimos una tolerancia a los metales aquí ensayados con las cepas aisladas, por que en varios de ellos no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre su crecimiento con el metal y el crecimiento control (sin el metal).

En muchas de las ocasiones no es sólo uno de los mecanismos es el que participa, ya sea precipitación celular, formación de complejos, transformación de metales (oxidación, reducción, metilación, etc), biosorción a paredes celulares, pigmentos; expulsión, compartimentalización y/o atrapamiento por ciertas moléculas. Muchos microorganismos como levaduras y hongos acumulan cantidades considerables de ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, oxálico, málico, tartárico, fumárico y pirúvico (Rehm y Reed., 1991).

Algunos hongos como *Trichoderma harzianum* pueden solubilizar MnO_2 , Fe_2O_3 y Zn mediante la liberación de agentes quelantes (Clarke, S.E., Stuart, J., 1987). Otro caso interesante resulta la utilización de una combinación de la solubilización microbiana del Pb de la piromorfita, $Pb_3(PO_4)_3Cl$, mediada por el hongo *Aspergillus niger* con la acumulación del metal disuelto por parte de plantas que crecen en suelos contaminados con dicho metal (Gadd, G.M., 2000). La bioacumulación es otro proceso en el cuál una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioninas o compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos.

Después de la identificación por microbiología tradicional y la selección de la cepa #15, realizamos extracción de DNA para el análisis de su secuencia (Fig. 31), con el cuál se provee un mayor entendimiento de los microorganismos de hábitat naturales, y pueden ser estudiados y caracterizados sin ser cultivados. De las varias técnicas de ácidos nucleicos

utilizados para estimar la composición y la diversidad de una comunidad microbiana en hábitat complejo, la que utilizamos fue la determinación de las secuencias 18S rRNA (Ward *et al.*, 1992). Tanto la extracción como la amplificación del DNA se llevó a cabo de los 5 aislados (Fig. 31 y Fig. 32), pero únicamente la cepa #15 fue clonada para su secuenciación (Fig. 33 y Fig. 34); la cuál fue realizada en Puerto Rico, por el M.C. Hugo Leonid Gallardo García Blanco y William Rosado bajo la dirección del Dr. Govind Nadathur. El análisis de la secuencia obtenida (Fig. 35), fue realizado por el programa Blastn y comparado por similitud con otras secuencias conocidas en la base de datos NCBI GeneBank Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). En suma, el hongo seleccionado como una cepa tolerante a metales pesados fue identificado como perteneciente al género *Penicillium*.

Los resultados aquí presentados así sugieren que existe la posibilidad de aislar hongos filamentosos capaces de tolerar a metales pesados para su identificación y utilización por interacción metal-microbiota dentro de la biotecnología ambiental, con el objeto de

implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados. Los hongos como ya vimos poseen diversos mecanismos para unir y remover metales pesados en solución. Un proceso de bioremediación fue desarrollado utilizando el hongo *Aspergillus niger* para producir ácidos orgánicos débiles para la lixiviación de metales pesados de suelos contaminados (Wasay, S., 1998). En algunas circunstancias, los hongos pueden adsorber derivados insolubles de metales, por ejemplo sulfuros, lo que puede representar otra área potencial de aplicación biotecnológica. *Aspergillus niger* es capaz de oxidar sulfuros de Cu, Fe y Zn a sus correspondientes sulfatos; las partículas de sulfuros son adsorbidas del medio a la superficie micelial (Wainwright y Grayston, 1986). *Mucor flavus* puede adsorber sulfuro de Fe, polvo de Zn e hidróxido férrico “ocre” a partir del drenaje

acidificado de un amina (Singleton *et al.*, 1990). *A. níger*, *Fusarium solani* y *Penicillium notatum* son capaces de remover ocre a partir de una solución, pero con menos eficiencia que *M. flavus* (Wainwright *et al.*, 1986).

Aunque en nuestro trabajo desconocemos específicamente el o los mecanismos que están presentes, suponemos que uno de los mecanismos de nuestra cepa de *Penicillium*, pudiera ser algún proceso de inmovilización fisicoquímico como la adsorción, es decir, la unión a grupos funcionales de la pared celular ($-\text{PO}_3$, $-\text{COO}$, $-\text{NH}_2$), etc; mecanismo que ha sido reportado como un nuevo modelo que describe la relación de adsorción de iones metales a grupos amino en una especie de *Penicillium chrysogenum* (Tan & Chen, 2003); cuyo trabajo sugiere que el micelio podría ser utilizado para la remoción a gran escala de Cr de aguas de desecho de curtidurías. También Sarret en su estudio de la determinación estructural del Zn y el Pb a los sitios de unión en las paredes de *Penicillium chrysogenum*, nos muestra la unión predominante a grupos fosforil y carboxil (Sarret *et al.*, 1998). La tolerancia existe, por las características anteriormente mencionadas, y para nuestro propósito la cepa óptima de nuestros aislados, fué la cepa #15 perteneciente al género *Penicillium*.

Por lo tanto más investigación en el campo de la ecología de hábitats contaminados con metales es mucha utilidad y es previsible que la manipulación genética de los hongos utilizados, bien sea por técnicas de genética formal o ingeniería genética, conducirá a incrementos en la eficiencia de la biosorción de las especies utilizadas hasta ahora o de otras nuevas.

X. CONCLUSIONES

1. Se realizaron 5 aislamientos de hongos filamentos de las muestras del proceso de agua residuales.
2. La selección de las cepas tolerantes a metales pesados se llevó a cabo en base al síntoma de intoxicación más fácilmente observable que es la inhibición del crecimiento y a la diferencia significativa en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo entre el crecimiento en presencia de cada uno de los metales y su crecimiento control.
3. La cepa #15 fue la óptima de nuestros aislados, ya que toleró el mayor número de metales (plomo, mercurio y cromo) en la tres concentraciones, sobre todo a 250 ppm. Una característica importante es que fué la única cepa que presentó tolerancia al mercurio a 400 ppm.
4. La cepa #15 tolerante a metales pesados fue identificada por métodos moleculares utilizando una base de datos de secuencias (NCBI Genebank Database) como perteneciente al género *Penicillium*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

XI. APÉNDICE

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #1 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	2.6±0.06*	2.6±0.06*	1.8±0.06*	2.0±0.06*	2.4±0.06*	
48	5.4±0.10*	5.5±0.00*	2.7±0.00*	4.5±0.06*	5.5±0.10*	
72	7.1±0.10*	7.1±0.06*	3.7±0.06*	6.2±0.06*	7.2±0.00*	
96	8.2±0.12*	8.15±0.07*	4.75±0.14*	7.55±0.05*	8.1±0.06*	
120	8.4±0.03*	8.25±0.03*	6.4±0.06*	8.1±0.03*	8.2±0.03*	
144	8.5±0.06*	8.4±0.06*	8.3±0.17*	8.3±0.06*	8.3±0.03*	

Tabla 2. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #1 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	2.6±0.06*	2.7±0.06*	1.4±0.06*	1.8±0.00*	1.7±0.35*	
48	5.4±0.10*	5.6±0.06*	2.4±0.06*	4.4±0.06*	5.3±0.44*	
72	7.1±0.10*	7.3±0.12*	3.1±0.06*	6.0±0.10*	7.5±0.32*	
96	8.2±0.12*	8.1±0.8*	3.9±0.03*	7.4±0.15*	8.2±0.03*	
120	8.4±0.03*	8.2±0.03*	4.8±0.10*	8.1±0.08*	8.25±0.03*	
144	8.5±0.06*	8.3±0.03*	6.3±0.12*	8.25±0.03*	8.3±0.03*	

Tabla 3. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #1 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	2.6±0.06*	2.6±0.06*	0.6±0.06*	0.0±0.00*	0.5±0.06*	
48	5.4±0.10*	5.4±0.10*	1.5±0.06*	0.0±0.00*	1.2±0.12*	
72	7.1±0.10*	7.0±0.12*	2.2±0.06*	0.0±0.00*	2.6±0.06*	
96	8.2±0.14*	8.0±0.00*	3.2±0.00*	0.0±0.00*	5.7±0.00*	
120	8.4±0.03*	8.25±0.05*	3.6±0.10*	0.0±0.00*	7.65±0.22*	
144	8.5±0.06*	8.35±0.03*	4.9±0.17*	0.0±0.00*	8.3±0.08*	

Tabla 4. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #2 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	1.0±0.06*	0.9±0.10*	0.8±0.06*	0.8±0.06*	0.3±0.10*
48	2.2±0.06*	1.9±0.06*	1.7±0.06*	1.9±0.15*	1.6±0.06*
72	3.0±0.10*	2.8±0.06*	2.4±0.06*	2.8±0.10*	2.8±0.05*
96	3.8±0.20*	3.8±0.10*	3.6±0.10*	3.75±0.08*	3.75±0.10*
120	4.6±0.10*	4.7±0.06*	4.15±0.10*	4.4±0.12*	4.45±0.10*
144	5.6±0.21*	5.4±0.06*	5.1±0.12*	5.35±0.05*	5.4±0.15*
168	6.4±0.12*	6.3±0.06*	5.85±0.10*	6.1±0.06*	6.4±0.10*
192	6.9±0.06*	7.0±0.06*	6.55±0.05*	6.7±0.10*	7.0±0.12*
216	7.3±0.06*	7.3±0.06*	7.2±0.06*	7.3±0.11*	7.0±0.15*

Tabla 5. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #2 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.0*
24	1.0±0.06*	0.8±0.06*	0.2±0.06*	0.7±0.06*	0.0±0.00*
48	2.2±0.06*	1.9±0.06*	0.8±0.06*	1.7±0.06*	0.4±0.00*
72	3.0±0.10*	2.9±0.06*	1.35±0.05*	2.7±0.03*	0.5±0.03*
96	3.8±0.20*	3.8±0.06*	2.0±0.06*	3.55±0.03*	1.8±0.15*
120	4.6±0.10*	4.8±0.12*	2.6±0.10*	4.25±0.05*	3.0±0.20*
144	5.6±0.21*	5.6±0.03*	3.5±0.15*	5.1±0.12*	4.0±0.23*
168	6.4±0.12*	6.5±0.12*	4.0±0.06*	5.9±0.21*	5.1±0.06*
192	6.9±0.06*	6.9±0.06*	4.6±0.15*	6.6±0.06*	6.05±0.05*
216	7.3±0.06*	7.3±0.10*	5.2±0.06*	7.2±0.06*	7.0±0.21*

Tabla 6. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #2 250 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	1.0±0.06*	1.0±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	2.2±0.06*	1.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
72	3.0±0.10*	2.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
96	3.8±0.20*	3.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
120	4.6±0.10*	4.7±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
144	5.6±0.20*	5.6±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	1.2±0.10*
168	6.4±0.12*	6.5±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	2.6±0.10*
192	6.9±0.06*	7.0±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	3.7±0.10*
216	7.3±0.06*	7.4±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	4.8±0.10*

Tabla 7. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #3 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	0.4±0.06*	0.4±0.06*	0.0±0.00*	0.3±0.06*	0.4±0.06*	
48	0.8±0.06*	0.8±0.06*	0.0±0.00*	0.35±0.05*	0.6±1.05*	
72	1.6±0.11*	1.4±0.06*	0.0±0.00*	0.7±0.11*	1.1±0.06*	
96	2.1±0.06*	1.95±0.05*	0.0±0.00*	0.9±0.06*	1.7±0.06*	
120	2.5±0.06*	2.1±0.03*	0.0±0.00*	1.2±0.08*	2.0±0.06*	
144	2.8±0.06*	2.5±0.10*	0.0±0.00*	1.6±0.08*	2.3±0.10*	
168	2.95±0.10*	2.7±0.03*	0.0±0.00*	1.85±0.05*	2.5±0.06*	
192	3.2±0.06*	2.9±0.012*	0.0±0.00*	2.1±0.06*	2.75±0.05*	
216	3.2±0.09*	3.15±0.03*	0.0±0.00*	2.5±0.21*	2.85±0.10*	

Tabla 8. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #3 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #3 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	0.4±0.06*	0.4±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
48	0.8±0.06*	0.6±0.10*	0.0±0.00*	0.2±0.00*	0.0±0.00*	
72	1.6±0.12*	1.2±0.06*	0.0±0.00*	0.4±0.03*	0.4±0.06*	
96	2.1±0.06*	1.8±0.10*	0.0±0.00*	0.75±0.05*	1.1±0.06*	
120	2.5±0.06*	2.0±0.08*	0.0±0.00*	1.0±0.03*	1.4±0.03*	
144	2.8±0.06*	2.25±0.05*	0.0±0.00*	1.5±0.03*	1.8±0.08*	
168	2.95±0.14*	2.6±0.08*	0.0±0.00*	1.6±0.03*	2.1±0.06*	
192	3.2±0.06*	2.9±0.12*	0.0±0.00*	1.9±0.12*	2.45±0.05*	
216	3.2±0.09*	3.0±0.08*	0.0±0.00*	2.15±0.10*	2.6±0.10*	

Tabla 9. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #3 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #3 250 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	0.4±0.00*	0.4±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
48	0.8±0.06*	0.8±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
72	1.6±0.11*	1.4±0.12*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
96	2.1±0.06*	1.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
120	2.5±0.06*	2.2±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
144	2.8±0.06*	2.65±0.10*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	1.2±0.10*	
168	2.95±0.10*	2.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.35±0.03*	
192	3.2±0.06*	3.1±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.7±0.05*	
216	3.2±0.09*	3.3±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	1.3±0.10*	

Tabla 10. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #12 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.5±0.06*	0.4±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	1.25±0.05*	1.15±0.05*	0.0±0.00*	0.4±0.03*	0.0±0.00*
72	3.1±0.06*	2.7±0.06*	0.4±0.06*	1.3±0.06*	0.8±0.03*
96	4.9±0.06*	4.8±0.06*	0.4±0.06*	2.8±0.06*	2.2±0.03*
120	6.5±0.15*	6.5±0.15*	0.55±0.03*	4.8±0.06*	4.2±0.08*
144	7.6±0.15*	7.4±0.10*	0.7±0.03*	6.0±0.06*	5.7±0.06*
168	8.3±0.06*	8.2±0.03*	1.1±0.06*	7.7±0.06*	7.5±0.12*
192	8.3±0.06*	8.25±0.03*	1.6±0.15*	8.3±0.03*	8.25±0.05*

Tabla 11. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #12 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.5±0.06*	0.4±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	1.25±0.05*	1.1±0.03*	0.0±0.00*	0.4±0.06*	0.0±0.00*
72	3.1±0.06*	2.9±0.03*	0.0±0.00*	1.2±0.06*	0.0±0.00*
96	4.9±0.06*	4.8±0.06*	0.0±0.00*	2.4±0.06*	0.0±0.00*
120	6.5±0.15*	6.0±0.17*	0.4±0.03*	4.3±0.12*	0.9±0.06*
144	7.6±0.15*	7.0±0.17*	0.4±0.03*	5.6±0.10*	2.0±0.06*
168	8.3±0.06*	8.1±0.06*	0.6±0.06*	7.3±0.06*	3.4±0.06*
192	8.3±0.06*	8.3±0.03*	0.9±0.06*	8.25±0.05*	5.1±0.06*

Tabla 12. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #12 250 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.5±0.06*	0.4±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	1.25±0.05*	1.05±0.04*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
72	3.1±0.06*	2.8±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
96	4.9±0.06*	4.5±0.15*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
120	6.5±0.15*	6.4±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
144	7.6±0.15*	7.1±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
168	8.3±0.06*	8.15±0.05*	0.35±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
192	8.3±0.06*	8.25±0.03*	0.4±0.01*	0.0±0.00*	0.0±0.00*

Tabla 13. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #15 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	0.3±0.01*	0.3±0.06*	0.0±0.00*	0.3±0.03*	0.25±0.06*	
48	0.8±0.03*	0.8±0.03*	0.35±0.05*	0.7±0.03*	0.7±0.03*	
72	1.4±0.06*	1.4±0.06*	0.6±0.06*	1.0±0.10*	1.1±0.12*	
96	1.8±0.03*	1.7±0.06*	0.8±0.06*	1.8±0.03*	1.8±0.06*	
120	2.3±0.06*	2.2±0.06*	1.1±0.06*	2.3±0.03*	2.3±0.12*	
144	2.5±0.12*	2.5±0.06*	1.2±0.06*	2.5±0.06*	2.6±0.12*	
168	2.8±0.15*	2.7±0.06*	1.4±0.06*	2.9±0.06*	3.0±0.06*	
192	3.1±0.15*	3.1±0.12*	1.4±0.06*	3.4±0.21*	3.4±0.06*	
216	3.4±0.12*	3.4±0.06*	1.7±0.06*	3.8±0.06*	4.0±0.06*	

Tabla 14. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #15 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	0.3±0.01*	0.3±0.03*	0.0±0.00*	0.25±0.03*	0.0±0.00*	
48	0.8±0.03*	0.7±0.03*	0.25±0.03*	0.65±0.03*	0.55±0.05*	
72	1.4±0.06*	1.4±0.06*	0.45±0.03*	1.2±0.06*	1.0±0.06*	
96	1.8±0.03*	1.8±0.06*	0.6±0.08*	1.7±0.06*	1.5±0.03*	
120	2.3±0.06*	2.2±0.06*	0.7±0.06*	2.1±0.17*	2.1±0.01*	
144	2.5±0.12*	2.4±0.06*	0.8±0.10*	2.5±0.17*	2.4±0.06*	
168	2.8±0.15*	2.8±0.06*	1.0±0.17*	2.7±0.17*	2.9±0.06*	
192	3.1±0.15*	2.9±0.06*	1.1±0.15*	3.2±0.06*	3.2±0.15*	
216	3.4±0.12*	3.4±0.06*	1.1±0.15*	3.6±0.06*	3.4±0.12*	

Tabla 15. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #3 250 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	0.3±0.01*	0.3±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
48	0.8±0.03*	0.7±0.08*	0.0±0.00*	0.6±0.01*	0.0±0.00*	
72	1.4±0.06*	1.3±0.06*	0.0±0.00*	1.1±0.12*	0.15±0.03*	
96	1.8±0.03*	1.8±0.03*	0.0±0.00*	1.7±0.10*	0.3±0.01*	
120	2.3±0.06*	2.2±0.06*	0.0±0.00*	2.3±0.15*	0.6±0.06*	
144	2.5±0.12*	2.5±0.06*	0.0±0.00*	2.6±0.15*	0.9±0.06*	
168	2.8±0.15*	2.6±0.12*	0.3±0.10*	3.0±0.12*	1.5±0.12*	
192	3.1±0.15*	3.3±0.17*	0.4±0.08*	3.2±0.15*	2.0±0.10*	
216	3.4±0.12*	3.4±0.15*	0.5±0.01*	3.4±0.15*	2.5±0.08*	

Tabla 16. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #15 400 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	0.55±0.05*	0.4±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
48	1.1±0.06*	1.0±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
72	1.6±0.10*	1.6±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
96	2.0±0.12*	1.9±0.01*	0.0±0.00*	1.3±0.10*	0.0±0.00*	
120	2.5±0.06*	2.3±0.12*	0.0±0.00*	1.6±0.06*	0.0±0.00*	
144	2.8±0.12*	2.7±0.10*	0.0±0.00*	2.1±0.17*	0.0±0.00*	
168	3.0±0.15*	2.9±0.06*	0.0±0.00*	2.5±0.10*	0.4±0.06*	
192	3.2±0.15*	3.1±0.06*	0.0±0.00*	2.7±0.06*	0.9±0.12*	
216	3.3±0.15*	3.3±0.01*	0.0±0.00*	2.9±0.06*	1.4±0.06*	
240	3.7±0.06*	3.5±0.06*	0.0±0.00*	3.2±0.06*	1.9±0.01*	

Tabla 17. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 400 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #15 800 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	0.55±0.05*	0.4±0.01*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
48	1.1±0.06*	1.0±0.01*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
72	1.6±0.10*	1.5±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
96	2.0±0.12*	1.8±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
120	2.5±0.06*	2.1±0.12*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
144	2.8±0.12*	2.4±0.10*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
168	3.0±0.15*	2.6±0.10*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
192	3.2±0.15*	2.7±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
216	3.3±0.15*	2.9±0.10*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
240	3.7±0.06*	3.1±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	

Tabla 18. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 800 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Tan T y Chen P** (2003). Biosorption of metals ions with *Penicillium chrysogenum*. Appl Bioche Biotechnol, 104(2):119-28.
2. **Baldrian P y Gabriel J** (2002). Intraespecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. Mycologia, 94(3):428-36.
3. **Canstein HV, Kelly S, Li Y and Wagner-Döbler I** (2002). Species Diversity Improves the Efficiency of Mercury-Reducing Biofilms under Changing Enviromental Conditons. Applied and Environmental Microbiology, 68(6):2829-37.
4. **Ceribasi H and Yetis U**, (2001). Biosorption of Ni (ii) and Pb (ii) *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system-Kinetics. Water SA ,Vol. 27, No. 1:15-20.
5. **Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R** (2001). Interactions of Chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiology Reviews, 25:335-47.
6. **Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougél C, Thioulouse J & Nazaret S** (2001). Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. Applied and Environmental Microbiology, 67(10):4479-87.
7. **Williams RH, Ward E and Alastair MacCartney H** (2001). Methods for Integrated Air Sampling and DNA Analysis for Detection for Airborne Fungal Spores. Applied and Environmental Microbiology, 67(6):2453-59.
8. **Boon N, Goris J** (2000). Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gpf. Applied and Enviromental Microbiology, 66:2906-13.

9. **Borneman J, Hartin RJ (2000).** PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes From Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10): 4356-60.
10. **Cervantes C, Alvarez H, Ramírez MI, Vargas E (2000).** Expulsión de Arsenito y Cromato en bacterias. *Boletín de Educación Bioquímica*, 19(2):103-9.
11. **Dirk Jan van Elsas, Frois Duarte Gabriela, (2000).** Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 43:2:133-51
12. **Gadd GM (2000).** Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11:271-79.
13. **González J, Moreno AM, Pérez L, Larrea MT, Prieto P, De la Rosa C, Masso A (2000).** Nivel de Contaminación en suelos por elementos tóxicos traza. Impacto sobre las comunidades microbianas. *Edafología*, 7(3):47-54.
14. **Gross S & Robins EI (2000).** Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hidrobiología* 433:91-109.
15. **Hill GT, Mitkowski AN, Aldrich-Wolfe L, Ernele LR, Jurkonie DD, Ficke A, Maldonado-Ramírez S, Lynch ST, Nelson EB (2000).** Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15:25-36.
16. **Hobman JL, Wilson JR, Brown NL (2000).** Microbial Mercury Reduction. *Environmental Microbe.Metal Interactions*. 8:177-197.
17. **Hobman JL, Wilson JR, Brown NL (2000).** Microbial Mercury Reduction. *Environmental Microbe.Metal Interactions*. 10:235-55.
18. **Hobman JL, Wilson JR, Brown NL (2000).** Microbial Mercury Reduction. *Environmental Microbe.Metal Interactions*. 11:237-56.

19. **Yetis U, Dolek A, Dilek FB and Ozcengiz G (2000).** The removal of Pb (II) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water. Res.* 34 (16) 4090-100.
20. **Del Val. C, Barea JM (1999).** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2):718-23.
21. **Konopka A, Zakharova T, Bischoff M, Oliver L, Nakatsu C and Turco RF (1999).** Microbial Biomass and Activity in Lead-Contaminated Soil. *Applies and Environmental Microbiology*, 65(5):2256-59.
22. **Smit Eric, Leeflang Paula, Glandorf Boet, (1999).** Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA y Temperature Gradient Gel Electrophoresis, 65(6):2614-21.
23. **Yu Q and Kaewsarn P (1999).** Binary adsorption of copper (II) and cadmium (II) from aqueous solutions by biomass of marine alga *Durvillacea potatorum*. *Sep. Sci. Technol.* 34(8):1595-1605.
24. **Zhao M, Duncan JR and Van Hille RP (1999).** Removal and recovery of zinc from solution and electroplating effluent using *Azolla filiculoides*. *Water Res.* 33(6):1516-22.
25. **Sarret G, Manceau A, Sapdini L, Claude Roux J, Lous Hazemann J, Soldo Y, Eybert-Berard L, Jacques Menthonnex J (1998).** Structural Determination of Zn and Pb Binding Sites in *Penicillium chrysogenum* Cell Walls by EXAFS Spectroscopy. *Environ Sci Technol* 32:1648-55.
26. **Wasay SA, Barrington SF, Tokunaga S (1998).** Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents. *Environ. Technol.* 19:369-80.
27. **Yeates C., Gillings M.R., Davison A.D., (1998).** Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1:140-46

28. **Brus R**, Kostrzewa RM, Felinska W, Plech A, Szkilnik R, Frydrych JC (1997). Ethanol inhibits cadmium accumulation in brains of offspring of pregnant rats that consume cadmium. *Toxicol. Lett.* 76:57-62.
29. **D.K. van Elsas**, Trevors J.T., (1997). Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *Modern Soil Microbiology.* 13:375-439.
30. **Galicia-García V**, Rojas-López M, Rojas R, Olaiz G, Ríos C (1997). Cadmium levels in maternal cord and newborn blood in México City. *Toxicol. Lett.* 91:57-61.
31. **Pufahl RA**, singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta CV, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu (I) receptor Abcl. *Science* 278:853-56.
32. **Valentine JS**, Gralla Be (1997). Delivering copper inside yeast and human cells. *Science* 278:817-18.
33. **Calderón-Salinas V**, Valdez-Anaya B, Zúñiga-Charles MA, Albores-Medina A (1996a). Lead exposure in a population of mexican children. *Human Exp. Toxicol.* 15:305-311.
34. **Calderón-Salinas V**, Hernández Luna C, Valdez Anaya B, Maldonado-Vega M, López Miranda A (1996b). Evolution of lead toxicity in a population of children. *Human Exp. Toxicol.* 15:376-382.
35. **Cervantes C & Silver S** (1996). Sistemas de Resistencia a Metales en *Pseudomonas*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 38:45-64.
36. **Krauter P**, Martinelli R, Williamns K and Martins S (1996). Removal of Cr(VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodegradation*, 7:277-86.

37. **Ramírez-Salgado P**, Caracheo-Aguilar S, Obregón Herrera A, Sosa-Luna L, Amézquita-López F, Mendoza-Díaz G, Gutiérrez-Corona F (1996). Copper resistance and accumulation in the zygomycete *Mucor rouxii*. *Curr. Microbiol.* 33:163-6.
38. **Stoll A**, Duncan JK (1996). Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* 18:1209-12.
39. **Batres L**, Carrizales L, Calderón J, Díaz-Barriga F (1995). Participación del barro vidriado en la exposición infantil al plomo en una comunidad industrial expuesta ambientalmente a este metal. En: Intoxicación por plomo en México: Prevención y Control (Hernández M y E Palazuelos, Eds) Instituto Nacional de Salud Pública y Departamento del Distrito Federal. p:175-85.
40. **Díaz-Barriga F**, Carrizales L, Calderón J, Batres L, Yáñez L, Tabor MUU, Castelo J (1995). Measurement of placental levels of arsenic, lead and cadmium as a biomarker of exposure to mixtures. E: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: A book* (Butterworth FM, Corkum LD y Guzmán-Rincón J, Eds.) Plenum Pub. Co. p:139-48.
41. **Girardi G**, Elias M (1995). Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Rad. Biol. Med.* 18:61-6.
42. **Jiménez C**, Ramírez I, Palazuelos E, Muñoz I, C Munawar M, Munawar IF, Weisse T, Leppard GG, Legner M (1995). The significance and future potencial of using microbes for assesing ecosystems health; The Great Lakes example. *J. Aquatic Ecosys. Health* 3:295-310.
43. **Munawar M**, Munawar IF, Weisse T, Leppard GG, Legner M (1995). The significance and future potencial of using microbes for assessing ecosystems health; The Great Lakes example. *Aquatic Ecosys. Health* 3:295-310 .

44. **Palazuelos E**, (1995). En: Intoxicación por plomo en México: Prevención y Control (Avila MH y Palazuelos, eds) México, D.F. p:257-88.
45. **Salt DE, Rauser WE** (1995). Mg ATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant physiol* 107:1293-1301.
46. **Cervantes C, Gutiérrez-Corona F** (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 14:121-38.
47. **Coblentz A, Wolf K** (1994). The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *FEMS Microbiol. Rev.* 14:303-8.
48. **Cortés-Penagos C, Gradueñas-Piña C, Caracheo-Aguilar S, Obregón-Herrera A, Ramírez-Salgado P, Amézquita-López F, Hernández-Hernández M, Cano-Canchola C, Sosa-Luna L, Gutiérrez-Corona F** (1994). Tolerancia a metales en hongos: mecanismos y aplicaciones. En: la Importancia Biológica de los Iones Inorgánicos. Cervantes C, Saavedra-Molina A y Fariás Rodríguez R. (Eds). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p:118-32.
49. **De Filippis LF, Pallaghy CK** (1994). Heavy metals: Sources and biological effects. En: Rai LC, Gaur JP, Soeder CJ, (Eds.). *Advances in Limnology Series Algae and Water Pollution*, Cap. 2, p. 31-77. Schweizerbarts'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
50. **Romieu I, Palazuelos E, Hernández-Avila M, Ríos C, Muñoz I, Jiménez C, Cahero G**, (1994). Sources of lead exposure in México City. *Environ.Health Perspect.* 102:384-89.
51. **Yazgan A, Ozcengiz G** (1994). Subcellular distribution of accumulated heavy metals in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett* 16:871-74.

52. **Yu W, Santhanagopalan V, Sewell AK, Jensen LT, Winge DR (1994).** Dominance of metallothionein in metal ion buffering in yeast capable of synthesis of (EC)_nG isopeptides. *J. Biol. Chem* 269:21010-15.
53. **Calderón-Salinas V, Hernández-Luna C, Maldonado M, Saénz D (1993).** Mechanisms of the toxic effect of lead. I. Free lead in erythrocyte. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 3: 153-64.
54. **Cortes M, Rivero A, Catalán J (1993).** Factores de exposición ambiental y concentraciones de plomo en sangre en niños de la ciudad de México. *Salud Pública de México* 35:599-606.
55. **Díaz-Barriga F, Santos MA, Mejía JJ, Batres L, Yáñez L, Carrizales L, Vera E, Del Razo LM, Cebrián ME, (1993),** Arsenic and cadmium absorption in children living near a smelter complex in San Luis Potosí, México. *Environ. Res.* 62:242-50.
56. **Burgastaller W, Strasser H, Wobking H, Schinner F (1992).** Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*. Bioreactor leaching and stoichiometry. *Environ. Sci. Tech.* 26:340-46.
57. **Cairs J, Niederlehner R, Orvos DR (1992).** Predicting risk in the ecosystems. Princeton Scientific Pub. Co. Princeton, N.J. p. 347.
58. **Couillard D, Zhu S (1992).** Bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge for agricultural application. *Water Air Soil Pollut.* 63:67-80.
59. **Juste C, Mench M (1992).** Long-term application of sewage sludge and its effects on metal uptake by crops. En: *Biogeochemistry of trace metals: Advances in trace substances Research*, Lewis, Boca Ratón, FL. P. 159-193
- Karniski LP (1992).** Hg²⁺ and Cu⁺ are ionophores, mediating Cl⁻/OH⁻ exchange in liposomes and rabbit renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 26:19218-25.

60. **Karniski LP** (1992). Hg^{+2} and Cu^{+} are ionophores, mediating Cl/OH^{-} exchange in liposomes and rabbit renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 26:19218-25.
61. **Kneer R, Kutcheon TM, Hochberger A, Zenk MH** (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* 157:305-10.
62. **Kneer R, Kutchan TM, Hochberger A, Zenk MH** (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* 157:305-10.
63. **Mullen MD, Wolf DC, Beveridge TJ, Bailey, GW** (1992). Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. *Soil Biol. Biochem.* 24:129-35.
64. **Winkelmann G** (1992). Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands. *Mycol. Res.* 96:529-34.
65. **Atal N, Sradhi PP, Monhanty L** (1991). Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium. Analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. *Plant Physiol.* 32:943-51.
66. **Brunzl K, Schimmack W** (1991). Kinetics of the sorption of ^{137}Cs , ^{85}Sr , ^{37}Co , ^{65}Zn and ^{109}Cd by the organic horizons of a forest soil. *Radiochimica Acta* 54:97-102.
67. **Dameron CT, Winge DR, George GN, Sansone M, Hu S, Hamer D** (1991). A copper-thiolate polynuclear cluster in the ACE1 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:6127-131.
68. **Díaz-Barriga F** (1991). Principios de la toxicidad del cadmio. *Ciencia y Desarrollo.* 17:61-8.
69. **Jeyaprakash A, Welch JW, Fogel S** (1991). Multicopy CUP1 plasmids enhance cadmium and copper resistance levels in yeast. *Mol. Gen Genet.* 225:368-8.

70. **Menhra RK, Winge DR (1991).** Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their related expression. *J. Cell. Biochem.* 45:30-40.
71. **Wakatsuki T, Hayakawa S, Hatayama T, Kitamura T, Imahara H (1991a).** Solubilization and properties of copper reducing enzyme systems from the yeast cell surface in *Debaryomyces hansenii*. *J. Ferment. Bioeng.* 72:79-86.
72. **Wakatsuki T, Kayakawa S, Hatayama T, Kitamura T, Imahara H (1991b).** Purification and some properties of copper reductase from cell surface of *Debaryomyces hansenii*. *J. Ferment. Bioeng.* 72:158:61.
73. **Yannai S, Berdicevski Y, Duek LL (1991).** Transformations of inorganic mercury by *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Environ. Microbiol.* 57:245-47.
74. **Zhou P, Thiele DJ (1991).** Isolation of a metal-activated transcription factor gene from *Candida glabrata* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6112-16.
75. **Ehrlich HL (1990).** Geomicrobiology. 2a. Edición. Marcel Dekker, Nueva York.
76. **Kone BC, Brenner RM, Gullans SR (1990).** Sulfhydryl/reactive heavy metals increase cell membrane K^+ and Ca^{2+} transport in renal proximal tubule. *J. Membrane Biol.* 113:1-12.
77. **Peberdy JF (1990).** Fungal cell walls a review. En: *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* (Kuhn Pj, Trici APJ, Jung MJ, coosey MUU, Copping LE, Eds.) Springer-Verlag, Berlin, p:5-30.
78. **Rausser EW (1990).** Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.* 59:61-86.
79. **Steffens JC (1990).** The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 41:553-75.
80. **Singlenton Y, Wainwright M, Edyvean RGT (1990).** Some factors influencing the adsorption of particulates by fungal mycelium. *Biorecovery* 1:271-89.

81. **Tobin JM, Cooper DG, Neufeld RJ (1990).** Investigation of the mechanism of metal uptake by denatured *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 12:591-95.
82. **Verkleij JAC, Schat H (1990).** Mechanisms of metal tolerance in higher plants. En: Shaw AT, Ed. *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects.* CRC Press, Boca Raton, Florida. 8:105-18.
83. **Diaz-Barriga F, Carrizales L, Yáñez L, Hernández JM, Domínguez MC, Palmer E, Saborío JL, (1989).** Interaction of cadmium with actin microfilaments in vitro. *Toxicol, Vitro* 3:277-84.
84. **Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1989).** Survey of the plant kingdom for the ability.
85. **Sczypka M, Thiele DJ (1989).** A cysteine-rich nuclear protein activates yeast metallothionein gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 9:421-9.
86. **Venkateswerly G, Yoder MJ, Stotzky G (1989).** Morphological, ultrastructural and chemical changes induced in *Cunninghamella blakesleeana* by copper and cobalt. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:204-10.
87. **Welch J, Fogels S, Buchman C, Karin M (1989).** The *CUP2* gene, coding for yeast metallothionein. *EMBOJ.*8:255-60.
88. **Brock TD, Madigan MT (1988).** *Biology of microorganisms: 59 Edición* p: 641-44. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
89. **Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1988).** Algae sequester heavy-metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150:197-202.
90. **Kögi JHR, Schäffer A (1988).** Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27:8509-15.

91. **Nriagu JOO, Pacyna JM (1988).** Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333:134-39.
92. **Ono B-I, Ohue H, Ishihara F (1988).** Role of cell wall in *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Hg²⁺. *J. Bacteriol.* 170:5877-82.
93. **Tomsett AB, Thurman DA (1988).** Molecular biology of metal tolerance of plants. *Plan Cell Environ.* 11:383-94.
94. **Wakatsuki T, Iba A, Imahara H (1998).** Copper reduction by yeast cell wall materials and its role o copper uptake in *Debaryomyces hansenii*. *J. Ferment. Technol.* 66:257-65.
95. **Adjimani JP, Emery T (1987).** Iron uptake in *Mycelia sterilia* EP-76. *J. Bacteriol.* 169:3664-8.
96. **Galvao LAC, Corey G (1987a).** Cadmio. Serie Vigilancia No.4 Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, Metepec, Estado de México.
97. **Galvao LAC, Corey G (1987b).** Cromo Serie Vigilancia No. 5.
98. **Galvao LAC, Corey G (1987c).** Mercurio. Serie Vigilancia No. 7.
99. **Germann UA, Lerch K (1987).** Copper accumulation in the cell-wall-deficient slime-variant of *Neurospora crassa*. Comparison with a wild-type strain. *Biochem. J.* 245:479-84.
100. **Miura K, Imura N. (1987).** Mechanisms of methyl mercury cytotoxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 18:161-89.
101. **Sauerbeck DR (1987).** Effects of agricultural practices on the physical, chemical and biological properties of soils: Part II. Use of sewage sludge and agricultural wastes. En: *Scientific Basis for Soil protection in the European Community.* Elsevier Applied Science, Londres. p:181-210.
102. **White C, Gadd GM (1987a).** The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133:727-37.

103. **Gaad GM** and Edwards SW (1986). Heavy-metal-induced flavin production by *Debaromyces hansenii* and possible connections with iron metabolism. Trans. Br. Mycol. Soc. 87:533-42.
104. **Gaad GM** (1986a). The responses of fungi towards heavy metals. En: Microbes in Extreme Enviromentns. Academica Press, Londres. p:83-110.
105. **Gaad GM** (1986b). The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physiology of the process and applications for biotechnology. En: Immobilization of Ions by Biosorption. Chichester: Ellis Howrwood Ltd, p:135-147.
106. **Gorman JA**, Clarck PE, Lee MC, Debouck C, rosenberg M (1986). Regulation of the yeast metallothionein gene. Gene 48:13-22.
107. **Grill E**, Gekeler W, Winnacker EL, ZenK MH (1986). Homophytochelatin are heavy metal-binding peptides of homoglutathione. FEBS Lett. 205:47-50.
108. **Schönborn W** (1986)., Historical development and ecological fundamentals. P. 23. En: W. Schönborn (Ed). Microbial Degradations. Biotechnology. Vol. 8. VCH. Wein heim, Alemania.
-
109. **Thiele DJ**, Walling MJ, Hamer DH (1986). Mammalian metallothionein is functional in yeast. Science 231:854-6.
110. **Trevors JT**, Stratton GW, Gadd GM (1986). Cadmium transport, resitance and toxicity in bacteria, algae, and fungi. Can. J. Microbiol. 32:447-64.
111. **Ventakeswerly G**, Stotzky G (1986). Copper and cobalt alter the cell wall-composition of *Cunninghamella blakesleeana*. Can. J. Microbiol. 32:654-62.
112. **Wainwright Y**, Grayston SJ, De Jong PM (1986). Adsorption of insoluble compounds by mycelium of the fungus *Mucor flavus*. Enzyme Microb. Techol. 8:597-600.
113. **Karin M** (1985). Metallothioneins: proteins in search of function. Cell 41:9-10.

114. **Minney SF, Quirk AV (1985).** Growth and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* at different cadmium concentrations. *Microbios* 42:37-44.
115. **Chao SH, Suzuki Y, Zysk JR, Cheung WY (1984).** Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. *Mol. Pharmacol.* 26:75-82.
116. **Gadd GM (1984).** Effect of copper on *Aureobasidium pullulans* in solid medium: adaptation not necessary for tolerant behaviour. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82:546-9.
117. **Motohiro F, Sunao Y, Soso T (1983).** Distribution of copper in the cells of heavy metal tolerant fungus, *Penicillium ochro-chlorom*, cultured in concentrated copper medium. *Agric. Biol. Chem.* 47:1367-69.
118. **Subramanyam C, Venkateswerlu G, Rao SLN (1983).** Cell wall composition of *Neurospora crassa* under conditions of copper toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:585-90.
119. **Babich H, Schiftenbauer M, Stotzky G (1982).** Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 28:452-57.
120. **Fogel S, Welch JW (1982).** Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:5342-6.
121. **Foulkes EC (1982).** Biological Roles of Metallothionein. Elsevier, Nueva York, N.Y.
122. **De Filippis LF, Hamp R, Zeigler H (1981b).** The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. *Arch. Microbiol.* 128:407-11.
123. **Gómez-Arroyo S, Altamirano M, Villalobos-Pietrini R (1981).** Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes in vitro. *Mutation Res.* 90:425-31.

124. **Gutknecht J** (1981). Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. *J. Memb. Biol.* 61:61-6.
125. **Stradberg GW, Shumate SE, Parrot JR** (1981). Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:237-45.
126. **Farrah H, Pickering WF** (1978). The effect of pH and ligands on the sorption of heavy metals ions by cellulose. *Aust. J. Chem.* 31:1501-9.
127. **Gaad GM, Griffiths AJ** (1978). Microorganism and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* 4:303-17.
128. **Bryan GW** (1976). Heavy metal contamination in the sea. En: Johnston, R (ed.) *Marine Pollution*. Academic Press, Londres. p:185-302.
129. **Goldsmith CD, Jr Scalon PF, Pirie WR** (1976). Lead concentrations in soil and vegetation associated highways of different traffic densities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16:66-70.
130. **Ross IS** (1975). Some effects of heavy metals on fungal cells. *Tras. Brit. Mycol.Soc.* 64:175-193.
131. **Bazzas MB, Govindjee** (1974). Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts. *Environ. Lett.* 6:1-12.
132. **Bittel JE, Koeppe DE, Miller JR** (1974). Sorption of heavy metal cations by corn mitochondria and the effects on electron and energy transfer reactions. *Physiol. Plant.* 30:226-30.
133. **Lindgren CC, Lindgren G** (1973). Mitochondrial modification and respiratory deficiency in the yeast cell caused by cadmium poisoning. *Mutation Res.* 21:315-21.

134. **Vonk JW, Sijpesteijn AK (1973).** Studies on the methylation of mercuric chloride by pure cultures of bacteria and fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 39:505-13.
135. **Valle BL, Ulmer DD (1972).** Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41:91-128.
136. **Lagerwerff JV, Specht AW (1970).** Contamination of roadside soil and vegetation with cadmium, nickel, lead and zinc. *Environ. Sci. Technol.* 4:583-6.
137. **Bartnicki-Garcías S (1968).** Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:64-108.
138. **Fuhrmann R, Tothstein H (1968).** The transplant of Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} , into yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 163:325-30.
139. **Emerson S (1963).** 'Slime' a plasmodioid variant of *Neurospora crassa*. *Genética* 34:162-82.
140. **Somers E (1963).** The uptake of copper by fungal cells. *Ann. Appl. Biol.* 51:425-37.
141. **Gläss E (1956).** Untersuchungen über die Einwirkung von, shwermetallsalzen auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. *Bot.* 44:1-58.
142. **Horsfall JG (1956).** Principles of Fungicidal Action. Waltham, Massachusetts: Crónica Botánica.
143. **Brenes-Pomales A, Lindengren G, Lindengren CC (1955).** Gene control of copper sensitivity in *Saccharomyces*. *Nature* 136:841-2.

