



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

REGISTRO DEL SERVICIO SOCIAL
POR INVESTIGACIÓN

**“Termotolerancia y producción de enzimas
de *Penicillium sp*, aislado de pacientes de la
Zona Metropolitana del Valle de Toluca”**

QUE PRESENTA EL ALUMNO

Daniel Sánchez Santiago

Matrícula
2142030155

ASESORES

Dra. Ma. Judith Castellanos Moguel, No. económico 28248
Laboratorio de Micología UAM-X

Dr. Raúl Venancio Díaz Godoy
Departamento de Aceleradores

México, CDMX.

Fecha: Enero 2020

INDICE

Introducción	1
Antecedentes	2
Marco Teórico	3
Cultivo en laboratorio:.....	3
Temperatura.....	4
Toxinas involucradas: riesgo a la salud	4
Mecanismos de infección: enzimas	5
Objetivo general	6
Objetivos particulares	6
Métodos	6
Área de estudio.....	6
Identificación	8
Pruebas enzimáticas.....	9
Proteasas	9
Análisis estadístico	9
Resultados y Discusión.....	9
Macroscópicas	9
Microscópicas.....	11
Termotolerancia	12
Proteasas.....	15
Análisis estadístico	18
Conclusiones	18
Referencias.....	19

Resumen

Las enzimas son biomoléculas proteicas, las cuales son responsables de la aceleración de reacciones químicas que mantienen y regulan a los organismos vivos. Uno de esos grupos de organismos son los hongos filamentosos tales como *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*, géneros de distribución mundial por lo que tienen un impacto económico y de salud en la vida humana.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad enzimática (proteasas) aislados del género *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* provenientes de lavados nasales a profesores de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT). Para calcular la actividad enzimática se utilizó el índice enzimático (IE) el cual establece la relación del diámetro medio del halo de degradación y el diámetro medio de la colonia, si este valor es >1 define una mayor producción de proteasas, las mediciones se registraron a las 24, 48 y 72 horas en el medio de cultivo "agar caseína", los hongos se incubaron a 15, 28 y 37 °C, para observar si la temperatura influye en la actividad enzimática. Los resultados mostraron a los 28°C una mayor actividad enzimática, obteniendo IE >1.5 en las ocho colonias sometidas al tratamiento, a diferencia de las que estuvieron en el tratamiento de los 15 °C obteniendo valores <1.5 en las primeras horas de exposición. Monzón 2001, menciona que el mecanismo químico de los hongos consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo. Los resultados determinados son similares a los obtenidos por DeviKhuraijam y Singh 2016, en el que presentaron la actividad enzimática extracelular de *Penicillium spp* en aislados ambientales y clínicos, para el aislado clínico obtuvieron un IE=1.6 en el que mencionan que valores >1 es de importancia clínica. En el estudio realizado por Blanco et al., 2002, determinaron la invasividad de los aislados clínicos de *Aspergillus fumigatus* precedentes de muestras de pacientes obteniendo un IE >1 en sus tratamientos, así mismo mencionan que las colonias fúngicas con índices enzimáticos altos tienen mayor probabilidad de causar una enfermedad invasiva. *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* mostraron una buena actividad enzimática para producir proteasas extracelulares a diferentes temperaturas, los resultados registrados para el (IE) expuestos en el presente trabajo muestran que poseen un aparato enzimático que produce gran cantidad de proteasas y esto puede ser un indicador de que estos aislados tengan una mayor capacidad de causar enfermedades en sujetos susceptibles.

Palabras clave: *Penicillium*, Hidrolasas peptídicas, *Aspergillus*.

Introducción

La Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) es considerada como una de las metrópolis importantes en la Región Centro México, ha presentado una transformación paulatina en sus actividades económicas, pasando de ser una economía rural a una industrial y de servicios, como consecuencia diversos estudios han determinado que la calidad del aire está en constante deterioro por diversos contaminantes, entre ellos de origen fúngico (Romero *et al.*, 2009).

Estudios anteriores reportan la presencia de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Epicoccum* en el Valle de Toluca (Cisteró-Bahima & Tomás 2003). *Penicillium* spp es un hongo que se encuentra constantemente en el aire, el contacto con la población es consecuente, es por ello que la contaminación por partículas en el aire y sus daños a la salud han sido ampliamente investigados, arrojando datos alarmantes, tales como el aumento en admisiones a hospitales y en la mortalidad y morbilidad por problemas respiratorios y cardiovasculares en la población en general (Romero & Reyes, 2009).

Penicillium spp ha sido reportado como un microorganismo anemófilo, los cuales constituyen un complejo grupo de microorganismos presentes en la naturaleza que pueden desarrollarse prácticamente en cualquier lugar, clima y época del año, por lo que resulta casi imposible evitar entrar en contacto con ellos, ingerirlos o inhalarlos, pueden hallarse en la tierra, aire, vegetación, la madera que se pudre, en interiores de desvanes, sótanos, baños, refrigeradores y otras áreas donde se guarden alimentos, cubos de basura, etc (Díaz *et al.*, 2010). Los hongos generan en grandes cantidades partículas microscópicas llamadas esporas o conidios, estructuras reproductivas o de dispersión que flotan en el aire, pueden ser inhaladas por las personas y provocarles reacciones alérgicas.

Principalmente la presencia de hongos en un ambiente, está dada por la tolerancia que hayan desarrollado ante las variables ambientales, incluyendo la temperatura. La temperatura es un factor ambiental relevante que afecta el crecimiento y desarrollo de los hongos en los ecosistemas. La mayor parte de los hongos son mesófilos, que se desarrollan a temperaturas entre 10 y 35 °C, sin embargo, sus valores óptimos están dentro de los 25 y 35 °C (Carlile *et al.*, 2001).

Estudios recientes elaborados en el Valle de Toluca principalmente de bioaerosoles demuestran la presencia de *Penicillium* sp en el ambiente de la zona, así como la ocurrencia

de estos microorganismos en pacientes de esta ciudad (López, B. 2012), es por ello que la presente investigación se enfoca en determinar las condiciones en que este hongo puede desarrollarse óptimamente y con ello evaluar si ésta puede ser un riesgo en la salud.

Antecedentes

Dix N.J. & Webster J. (1995) mencionan en su trabajo que la temperatura de incubación es un factor primordial para el crecimiento y metabolismo de las células fúngicas, a medida que la temperatura aumenta, las reacciones bioquímicas al interior de la célula, se aceleran. Sin embargo, por arriba de una cierta temperatura, proteínas y ácidos nucleicos principalmente pueden ser desnaturalizados y de la misma forma que si la temperatura disminuye, limita su desarrollo en el sustrato.

HacsKayolo *et al.*, (1965) mencionan que es importante analizar la termotolerancia de los hongos ya que las respuestas por parte de las cepas con relación a la temperatura pueden limitar su distribución, actividad y persistencia de los microorganismos fúngicos, si bien se ha observado que la temperatura menor a los 10 °C ralentiza el crecimiento de cepas fúngicas.

Hutchison (1990) utilizó temperaturas de 7 °C y 30 °C, considerando la temperatura de 18 °C como óptima para las cepas de *Penicillium sp* estudiadas. Por su parte, Carranza (2006) utilizó temperaturas de 4 °C, 24 °C y 30 °C para determinar cómo influye en el crecimiento fúngico de *Penicillium*, tomando en cuenta una temperatura de 25 °C como óptima para su estudio.

En un estudio realizado por, Díaz *et al.*, (2010)-, en niños de una primaria en La Habana, menciona que la mayor parte de los alumnos poseían un mayor contacto con *Penicillium sp*, obteniendo como resultado que el 50% se encontraban con mayor sensibilidad para *Penicillium sp*. En este mismo estudio se encontró que los alumnos presentaban un 27% asma, el 40% de rinitis alérgica y el 26% de dermatitis atópica, sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre reactividad cutánea a hongos ambientales y la presencia de enfermedades atópicas.

Marco Teórico

Penicillium es el género más grande, cosmopolita y que se encuentra más comúnmente en el suelo. Se lo clasifica como un género de hongos anamórficos (Booth C. 1971). El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2014) menciona a *Penicillium* como un hongo filamentoso hialino, saprófito perteneciente al filo Ascomycota así como algunas características generales que a continuación se describen.

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, por lo que el hombre se encuentra expuesto constantemente a su inhalación (Abarca, 2000).

Cultivo en laboratorio:

Macroscópicamente las colonias de *Penicillium* son normalmente de crecimiento rápido; al principio de color blanco y con el tiempo adquieren color azul, azul verdoso, verde, gris oliva o tonos rosados, con reverso amarillo cremoso.

La textura puede ser plana, filamentosa, aterciopelada o algodonosa dependiendo de la especie; además puede presentar gotas de exudado.

Microscópicamente presenta hifas hialinas septadas. Los conidióforos tienen ramas secundarias, denominadas métulas. Estas son de forma cilíndrica, con paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides en forma de matraz; de las cuales surgen largas cadenas sin ramificar de esporas o conidios formando el penacho o pincel característico del género.

Aspergillus es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides (Abarca, 2000).

Temperatura

La temperatura óptima de crecimiento de *Penicillium* es de 20–30 °C, aunque dependiendo de la especie puede crecer en el intervalo de 5-37 °C, produciendo la alteración de alimentos en refrigeración; también tolera grandes variaciones de pH entre 3,5-10, aunque crece mejor y más rápido a pH cercano a 4.

La temperatura óptima de *Aspergillus* tiene un intervalo más amplio pudiendo crecer desde los 15 a los 40 °C por lo que es un organismo muy tolerante a los cambios de clima (Alcalá, L-1998).

Toxinas involucradas: riesgo a la salud

Los efectos tóxicos están relacionados, principalmente, con intoxicaciones alimentarias, como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas. La relación entre la aparición de estos efectos y la exposición por vía respiratoria o dérmica no está bien estudiada en la actualidad; aunque la exposición por vía respiratoria a elevadas cantidades de polvo, ciertas toxinas son secretadas por algunas especies (tabla 1).

Tabla 1. Tabla general de toxinas y su efecto en el ser humano, Del Castillo (2007).

Agente biológico	Micotoxina	Efecto
<i>P. griseofulvum</i> <i>P. expansum</i>	Patulina	Neurotóxico
<i>P. citrinum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. verrucosum</i>	Citrinina	Nefrotóxico
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A	Nefrotóxico
<i>P. citreonigrum</i> <i>P. citreoviride</i>	Citreoviridina	Enfermedad del arroz amarillo (beriberi cardiaco agudo)
<i>P. frequentans</i>	Citromicetina	Hepatotóxico
<i>P. crustosum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. puberrelum</i> <i>P. chrysogenum</i>	Toxinas tremorgénicas	Neurotóxicas

Todas estas sustancias son originadas por los hongos para afianzarse en su ambiente natural inhibiendo a otros organismos que compiten por el sustrato. Cuando hay poca humedad y la temperatura no es adecuada, estos hongos esporulan, completando su ciclo de vida ante las condiciones adversas, siendo diseminados por insectos y ácaros (Booth, 1971).

Penicillium spp, es considerado como uno de los principales alérgenos ambientales, en una reacción alérgica que consiste en que nuestro organismo percibe como algo nocivo una sustancia, normalmente una proteína, (que denominamos alérgeno) que no lo es (CUN 2015). Este contacto pone en marcha una respuesta inmunológica exagerada que se manifiesta en diversos órganos del cuerpo. Causando síntomas como estornudos, lagrimeo, tos, picor de ojos, nariz y garganta, ojos enrojecidos, rinorrea, ruidos torácicos (pitos o silbidos), dificultad respiratoria (Zubeldia *et al.*, 2012).

Mecanismos de infección: enzimas

La virulencia micótica entendida como el grado de patogenicidad en los organismos, es la que determina en alto grado, la evolución o gravedad de las infecciones de hongo/huésped. Entre los factores de virulencia de los hongos se pueden señalar: el potencial de reproducción. Transición dimórfica. Calidad y naturaleza de las enzimas, exotoxinas, componentes de la pared celular, adhesión de la pared, receptores hormonales etc (Hernández *et al.*, 1995).

Con respecto a enzimas específicas de cada hongo, su mecanismo de patogenicidad estaría dado por su relación directa con el sustrato es decir que en sus etapas de desarrollo de la pared celular del hongo y dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica (Chaffin *et al.*, 1998). Algunos componentes de la pared son muy inmunogénicos y estimulan un gran número de respuestas celulares y humorales durante la infección, como lo es la producción de enzimas para protegerse de otros microorganismos o también el de extraer nutrientes del sustrato donde esta colonizando (Pontón 2008).

La virulencia fúngica puede atribuirse a muchos factores. Entre ellos, la capacidad de los hongos para crecer a 37 °C y adaptarse al medio ambiente dentro de los tejidos del huésped

les ayuda a establecer y causar infecciones. Los factores responsables de la patogenicidad fúngica son específicos del hongo. Las enzimas, toxinas y subproductos de diversos hongos juegan un papel importante en su virulencia y patogenicidad (Ramana *et al.*, 2013).

Objetivo general

Evaluar la termotolerancia y producción de proteasas de *Penicillium* sp, de muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca.

Objetivos particulares

- Identificar a *Penicillium* sp de cepas obtenidas de pacientes del Valle de Toluca.
- Describir la morfología de *Penicillium* sp.
- Inducir la producción de proteasas como indicador de virulencia.
- Evaluar la tasa de crecimiento a tres temperaturas de *Penicillium* sp.

Métodos

Área de estudio

El muestreo se llevó a cabo en La Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT), que se encuentra conformada por los municipios de Lerma, Metepec, San Mateo Atenco, Toluca y Zinacantepec (Fig. 1), y comprende una superficie de 2,669.6km², abarcando el 11.9% del territorio estatal. Se localiza a una altura de 2,650 msnm, entre los paralelos 19°05' y 19°27' latitud norte y los meridianos 99°23' y 99°53' longitud oeste (López 2012). La operación de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (RAMA-ZMVT), está a cargo de la Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Estado de México, a través de la Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación Atmosférica. La ZMVT cuenta con 7 estaciones de monitoreo atmosférico que miden los parámetros meteorológicos de temperatura ambiente, humedad relativa, velocidad y dirección del viento, presión atmosférica, radiación solar total, precipitación pluvial y contaminación (RAMAT, 2014); abarcan la zona sur (Metepec, Ceboruco, San Mateo Atenco), norte (Aeropuerto, San Cristóbal Huichochitlán) y centro (Toluca Centro y Oxtotitlán) del valle, las cuales operan los 365 días del año.

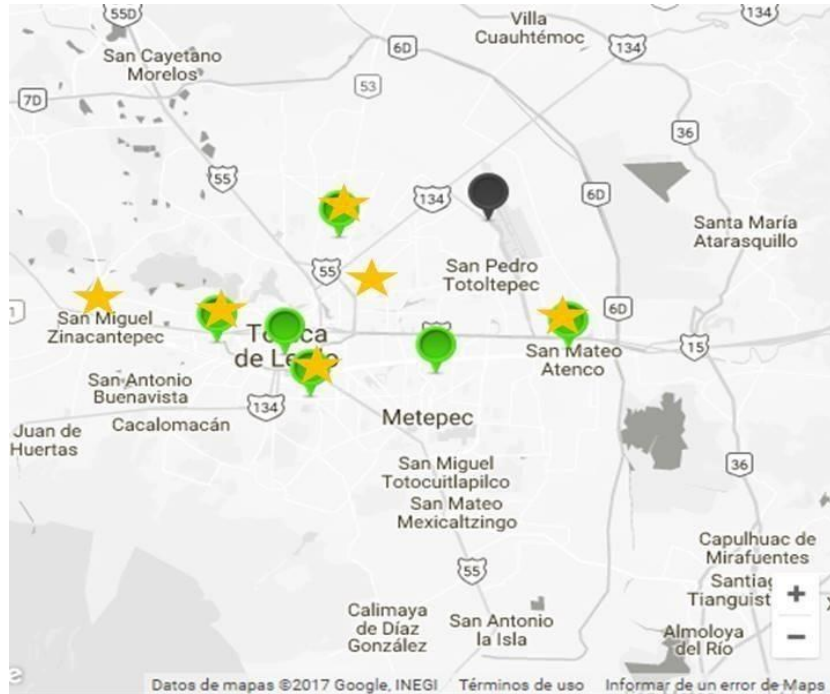


Figura 1. Ubicación de los puntos de muestreo en la ZMVT, (Datos de mapas 2017 Google, INEGI).

Obtención de muestras: Las muestras fueron obtenidas de profesores de educación pública de nivel primaria, secundaria y bachillerato. Principalmente se obtuvieron muestras de la preparatoria #5 de la UAEM (Universidad Autónoma del Estado de México) ubicada en Ceboruco, EDOMEX. Además, se les informó a los pacientes en que consistió el estudio, ya que se les hizo llegar un consentimiento informado el cual firmaron, en el mismo se mencionaba que tenían que despedir aire con fuerza por la boca en un tubo para condensar el aire expirado (RTube) con la finalidad que estos tubos sirvieran como una trampa para los propagulos fúngicos, el condensado fue utilizado para detectar proteínas de células CLUB, y el filtro se utilizó para la obtención de propágulos fúngicos.

Como primer punto se aislaron los organismos fúngicos de las muestras obtenidas de los pacientes del valle de Toluca, posteriormente se utilizó Agar Dextrosa Sabouraud, a este medio se le agrego un antibiótico para evitar el crecimiento bacteriano en seguida se cultivó en una incubadora a 28 - 30 °C hasta observar crecimiento.

Identificación

Para la identificación de los organismos fungicos se tomaron en cuenta las características morfológicas en la cual consistió en las características macroscópicas y microscópicas. se usaron las claves taxonómicas de *Penicillium* y *Aspergillus* (Abarca, 2000), para organismos fúngicos.

Técnica de cinta pegante: es una de las más utilizadas como método directo, Koneman, (1987) menciona que se conserva la yuxtaposición original de las esporas y segmentos de hifas. Se utiliza una cinta adhesiva transparente de aproximadamente 4 cm con el lado adhesivo hacia fuera, sosteniéndose con pinzas y presionando firmemente contra la superficie de la colonia del hongo que se desea identificar u observar.

Posteriormente para el diseño experimental se eligió a *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* por lo que se preparó nuevamente el medio de cultivo "Agar Dextrosa Sabouraud" en 72 cajas Petri, del cultivo de aislamiento anteriormente preparado y cultivado con *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* se tomó una muestra y se colocó en un tubo de ensaye estéril con 10 ml de agua destilada y se homogenizó por medio de un agitador Vortex durante 1 minuto para desprender los conidios de la superficie de la colonia, en seguida se obtuvo la concentración de conidios con ayuda de la cámara de Neubauer para evitar la diferencia de densidad en cantidad de conidios por tratamiento. En seguida se vertió en un vaso precipitado con círculos de papel filtro previamente esterilizados. Posteriormente los círculos impregnados con la misma concentración de conidios se inocularon en el centro del medio de cultivo "Agar Dextrosa Sabouraud" (SDA).

Las cajas Petri inoculadas se dividieron en 3 tratamientos a diferentes temperaturas (15, 28, 37 °C), con 9 réplicas cada uno, también se registró su crecimiento radial, para ello se medirá su diámetro en mm (D1 y D2) anotando los resultados en una tabla de crecimiento radial y con ello comparar su crecimiento y observar el efecto de la temperatura.

Pruebas enzimáticas

Proteasas

De las colonias puras anteriormente obtenidas en medio SDA se elaboró una suspensión de conidios con tween 80 al 0.05% por cada una, el tween tiene como finalidad favorecer la dispersión homogénea de los propágulos fúngicos, que son, habitualmente, ricos en sustancias lipídicas, especialmente en sus membranas celulares. La suspensión de conidios se utilizó para hacer la siembra en círculos impregnados con los mismos en cajas Petri con Agar caseína al 1% (proteína pura de la leche y contiene los aminoácidos esenciales). A continuación, las cajas se incubaron a 37, 28 y 15 °C. El diámetro de las colonias (DC) y el diámetro halo de hidrólisis (DHH) se registraron a las 24, 48 y 72 horas sobre la superficie de las cajas para determinar el Índice Enzimático (IE), el cual es el cociente entre DHH y DC de las colonias.

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza de Tukey con la finalidad de observar si existe diferencia significativa en el índice enzimático, se consideró un $p < 0,05$ como significativo.

Resultados y Discusión

Se aislaron un total de cinco cepas de *Penicillium sp* y tres cepas de *Aspergillus sp* por el método de filtración (filtros PM_{2.5}) provenientes de pacientes del Valle de Toluca de las cuales presentaron las siguientes características morfológicas.

Macroscópicas: De las colonias de *Penicillium sp* en óptimas condiciones presentaron un crecimiento rápido, con una textura semidura y algodonosa, con suficiente medio son de color verde azuladas o gris verdosas y con el halo de un color blanco, la superficie de la colonia tiene aspecto rugoso tal como se muestra en la figura 1, lo cual coincide con Loustau G, J. (1950) donde menciona que si la temperatura es favorable, *Penicillium sp* crece con rapidez, formando un velo blanquecino, bien perceptible a simple vista, en la superficie del sustrato. De las colonias de *Aspergillus sp* mostraron una gran diferencia, para las cepas 6 y 7 presentaron un color verde claro, con el halo y contorno blanco algodonoso con texturas suaves (figura 2) y para la cepa 8 presentó un color negro con el halo y contorno blanco algodonoso con textura dura (figura 3), Guzmán (1977) menciona que para este género en óptimas condiciones son de crecimiento rápido, la colonia es inicialmente plana, blanca que crece haciéndose

algodonosa. A medida que envejece y va apareciendo la esporulación, el centro de la colonia se va tornando de color distinto según la especie, así: amarillo *A. flavus*, verdoso *A. glaucus*, negro *A. niger*, gris *A. fumigatus*.

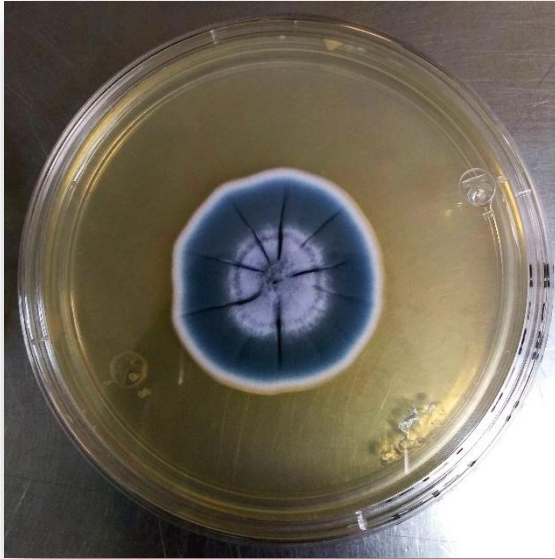


Figura 1. Macromorfología de *Penicillium sp*, aislado de muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca.



Figura 2. Macromorfología de *Aspergillus sp*, aislado de muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca.

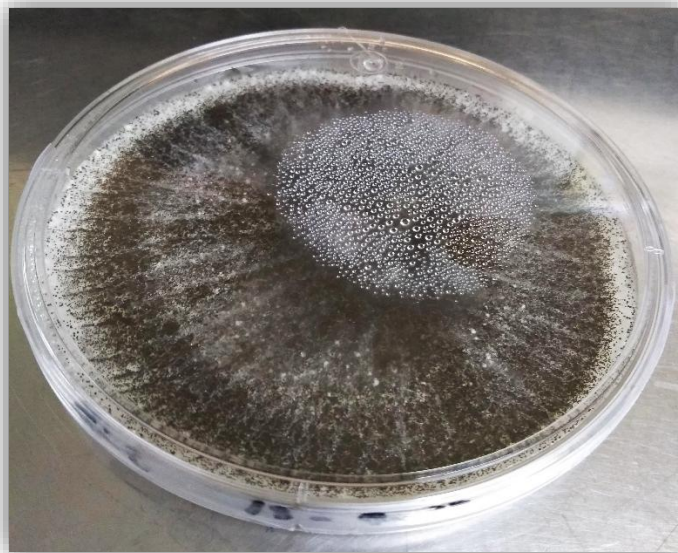
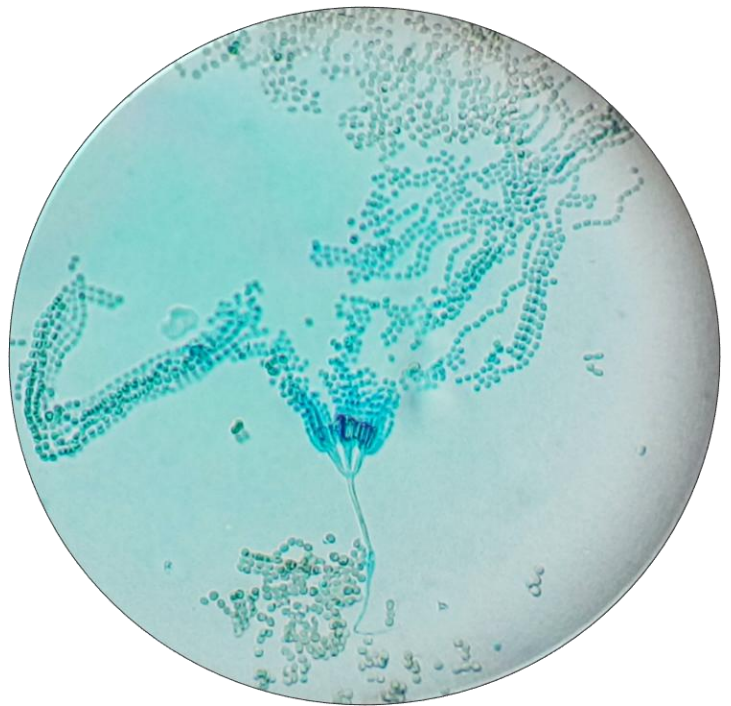


Figura 3. Macromorfología de *Aspergillus sp*, aislado de muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca.

Microscópicas: De las colonias de *Penicillium sp* presentaron hifas septadas hialinas con conidióforos múltiples, con filoides, la organización de las fialides en la punta de los conidióforos es típica (llamadas "penicilli" o pincel) y conidios de forma redonda en forma de cadena, las más alejadas tienen mayor madurez tal como se muestra en la figura 4. El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2016) menciona en la ficha de *Penicillium spp*, que microscópicamente presenta hifas hialinas septadas. Los conidióforos tienen ramas secundarias, denominadas métulas. Estas son de forma cilíndrica, con paredes lisas, de las cuales surgen largas cadenas sin ramificar de esporas o conidios formando el penacho o pincel característico del género.

Figura 4. Micromorfología de *Penicillium sp* aislado de muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca. Observadas a 40x en microscopio óptico.



En las colonias de *Aspergillus sp* mostraron algunas partes bien diferenciadas, la figura 5 muestra la vesícula (parte de arriba) en la cual se puede observar los conidios en formas globosas que se encuentran alrededor de esta, abajo las fialides que sostienen a los conidios junto con las metulas, el estipe que es la parte cilíndrica que está de bajo de la vesícula así como las hifas septadas, García y Verástegui (2001) menciona que los *Aspergillus* se caracterizan por tener micelio vegetativo compuesto de hifas septadas, ramificadas, estructura conidial desarrollada como pedicelos y cabezuelas de origen en células hifales especializadas (células del pie), de paredes gruesas, las cuales producen conidióforos como ramas aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la célula del pie.

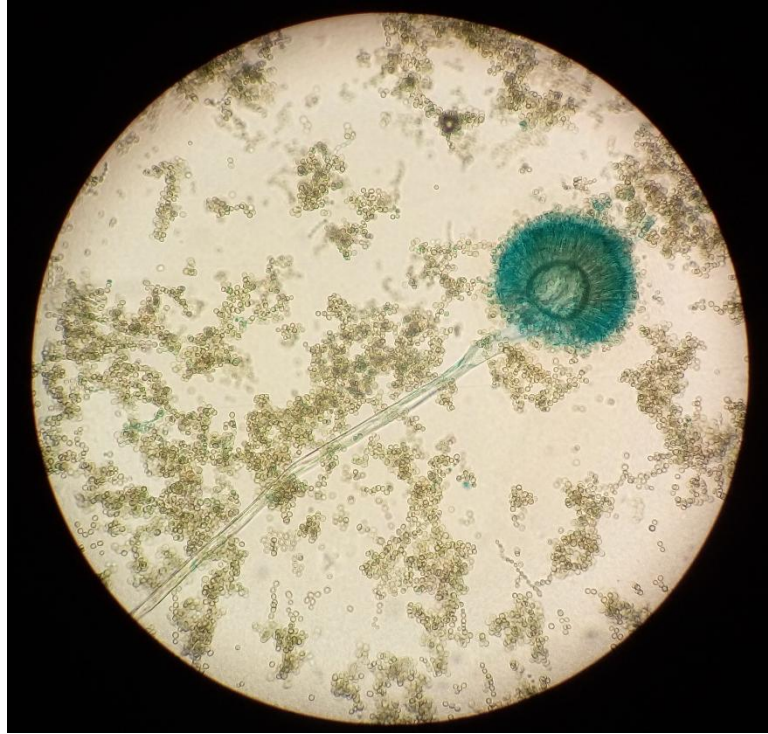


Figura 5. Micromorfología de *Aspergillus sp* aislado de muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca. Observadas a 40x en microscopio óptico.

Termotolerancia

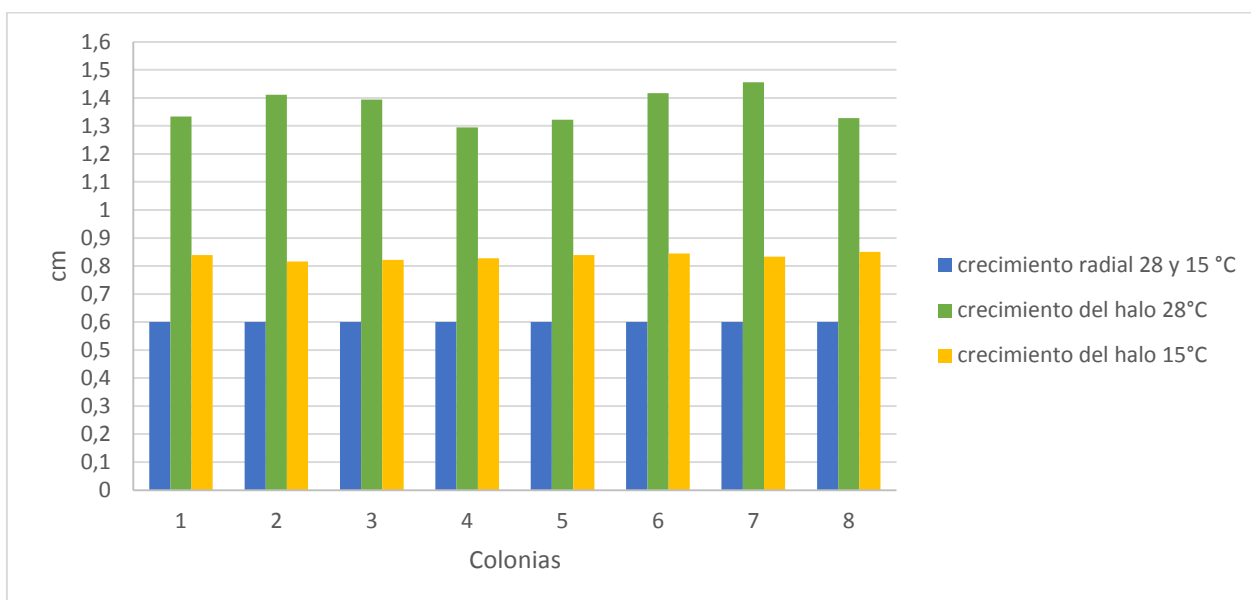
Se realizó una tabla (2) para identificar que cepas pertenecían a cuál de las dos especies, así como verificar cual es la que corresponde en las gráficas.

En las primeras 24 horas no se observó crecimiento radial, ya que los 0.6 cm que se maneja en la gráfica es el perímetro del confeti en el cual se inocularon los conidios sin embargo si presentaron crecimiento del halo en los tratamientos de 28 y 15 °C, para la temperatura de 37°C no mostro ninguna actividad (grafica 1), Loustau, (1950) menciona que las especies de *Penicillium sp* en general vegetan bien entre 15° y 25°C, por encima o por debajo de estos límites, el desarrollo comienza a tener afectaciones, la temperatura óptima es ordinariamente de 20°C a 23°C. Se puede observar que a los 28 °C muestra una mejor condición por el mayor crecimiento en el halo, esto coincide con lo descrito por Kavanagh, (2005), donde menciona que la mayoría de hongos filamentosos crecen a un rango de temperatura entre 25 a 30°C. En el tratamiento de 15°C se aprecia una menor actividad en las colonias por lo que se puede diferenciar como es que la temperatura está modificando

el metabolismo de estos hongos, de acuerdo con la literatura de Alexopoulos et al., (1996), la temperatura influye en el crecimiento, la germinación de esporas, reproducción y en general todas las actividades del organismo.

Tabla 1. Total, de aislados de las muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca

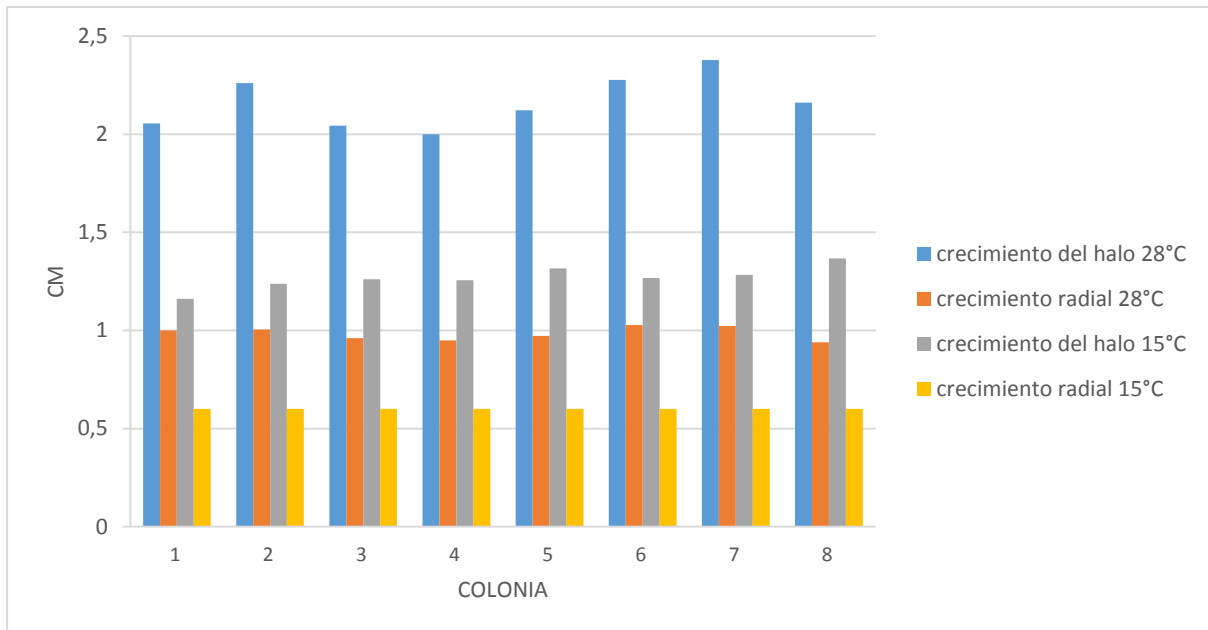
Registro en el cepario	N° en la grafica	Especie
14JQ	1	<i>Penicillium sp</i>
54J1C	2	<i>Penicillium sp</i>
57YAL	3	<i>Penicillium sp</i>
11CA	4	<i>Penicillium sp</i>
21MGG	5	<i>Penicillium sp</i>
4CB	6	<i>Aspergillus sp</i>
11CA	7	<i>Aspergillus sp</i>
53RRA	8	<i>Aspergillus sp</i>



Grafica 1. Termotolerancia de los aislados de las muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca durante las primeras 24 horas de exposición.

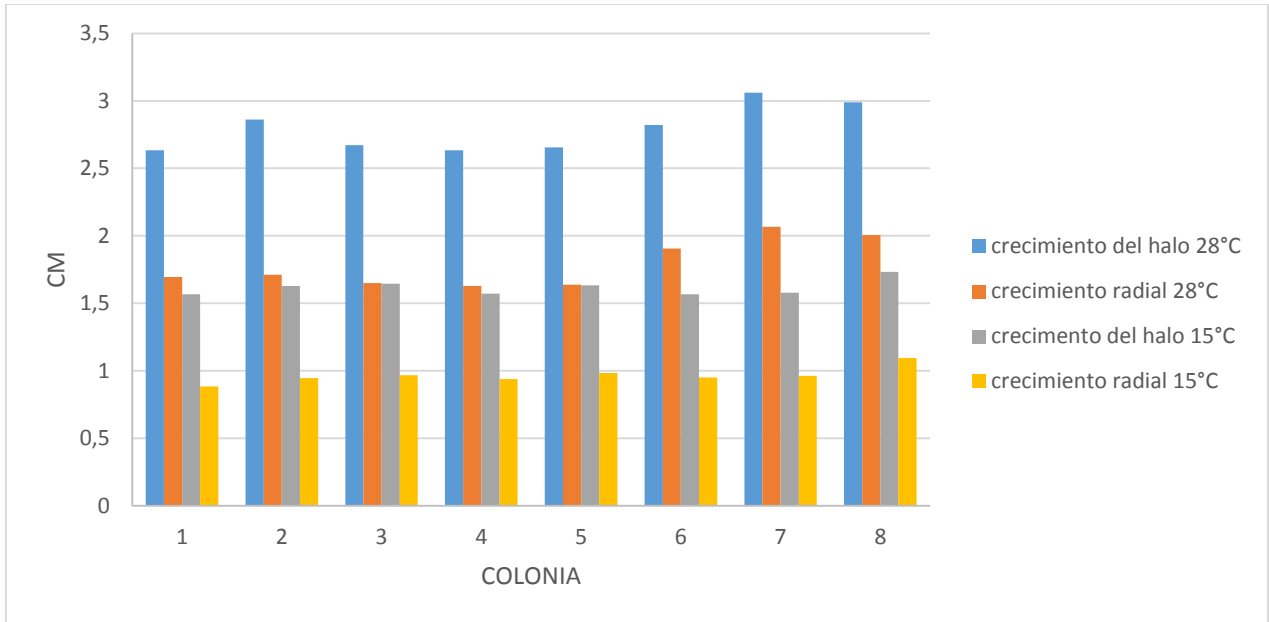
A las 48 horas de exposición en los tratamientos se observó crecimiento radial a los 28 °C (figura), en las cepas 6 y 7 de *Aspergillus sp* mostraron los crecimientos más altos (grafica 2), Carrillo (2003), menciona que la ubicuidad de los aspergilos es debida a su capacidad para crecer rápidamente a diferentes temperaturas sobre sustratos con diverso contenido de humedad. Sin embargo, en el tratamiento de 15 °C no mostro crecimiento radial, en esta parte de la prueba se pudo observar mejor la actividad metabólica de las colonias ya que se apreció una mejor condición de crecimiento a los 28 °C y en el tratamiento de los 37°C

no mostro ningún crecimiento. En el crecimiento del halo se observa una gran discrepancia entre los tres tratamientos, se puede apreciar que a los 28 °C las colonias tienen una mayor actividad en el sustrato.



Grafica 2. Termotolerancia de los aislados de las muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca durante las siguientes 48 horas de exposición.

Para finalizar a las 72 horas el tratamiento de los 37°C no mostro ningún crecimiento, a los 28 °C observamos una mayor actividad en las colonias (grafica 3) ya que se aprecia cómo tuvieron un mejor rendimiento en el DHH y DC a diferencia de los 15°C que la temperatura si interfirió en el crecimiento de las colonias (figura 6) Según Kavanagh, (2005), las curvas de crecimiento presentan tres fases: la primera es una fase de no crecimiento evidente, seguida de una fase de rápido crecimiento y finalmente una fase sin crecimiento neto o de autólisis por lo que en nuestros tratamientos podemos observar las primeras 2 fases en la temperatura de 28°C. En general para la mayoría de las especies del género *Penicillium* la temperatura a la cual se desarrollan óptimamente es de 25 a 28 °C. Sin embargo, al rebasar su rango de temperatura pueden comportarse como patógenos oportunistas y ser agentes de infecciones invasivas (Chen *et al.*, 2013).



Grafica 3. Termotolerancia de los aislados de las muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca durante 72 horas de exposición.

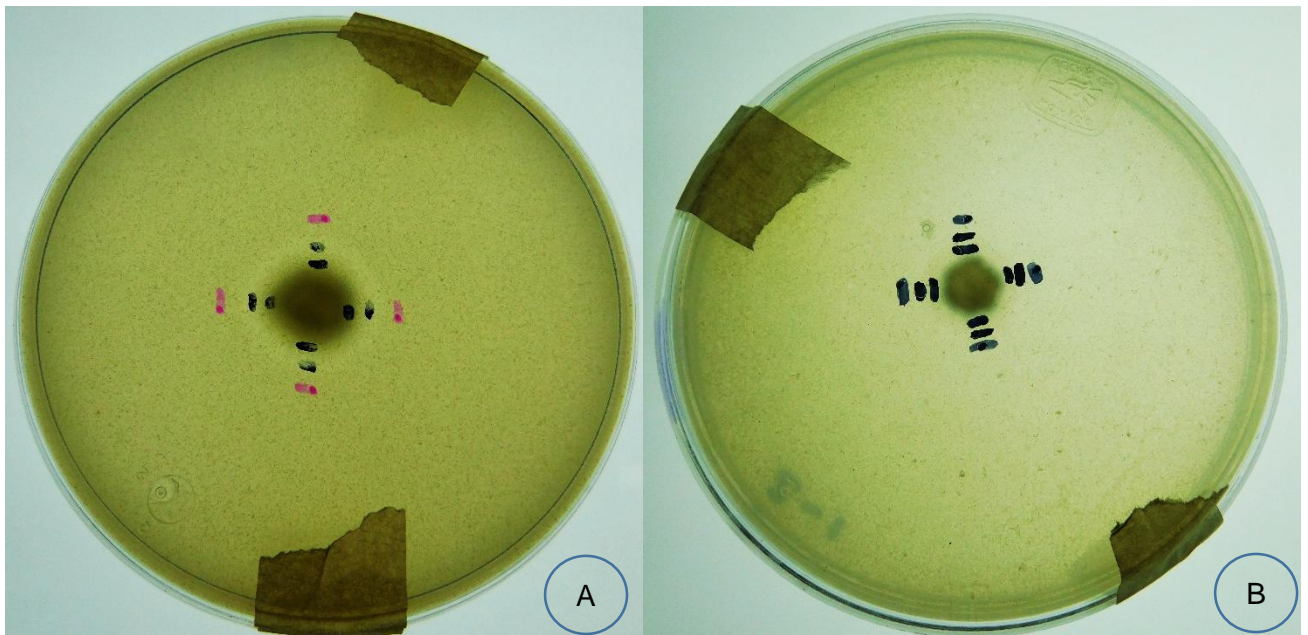


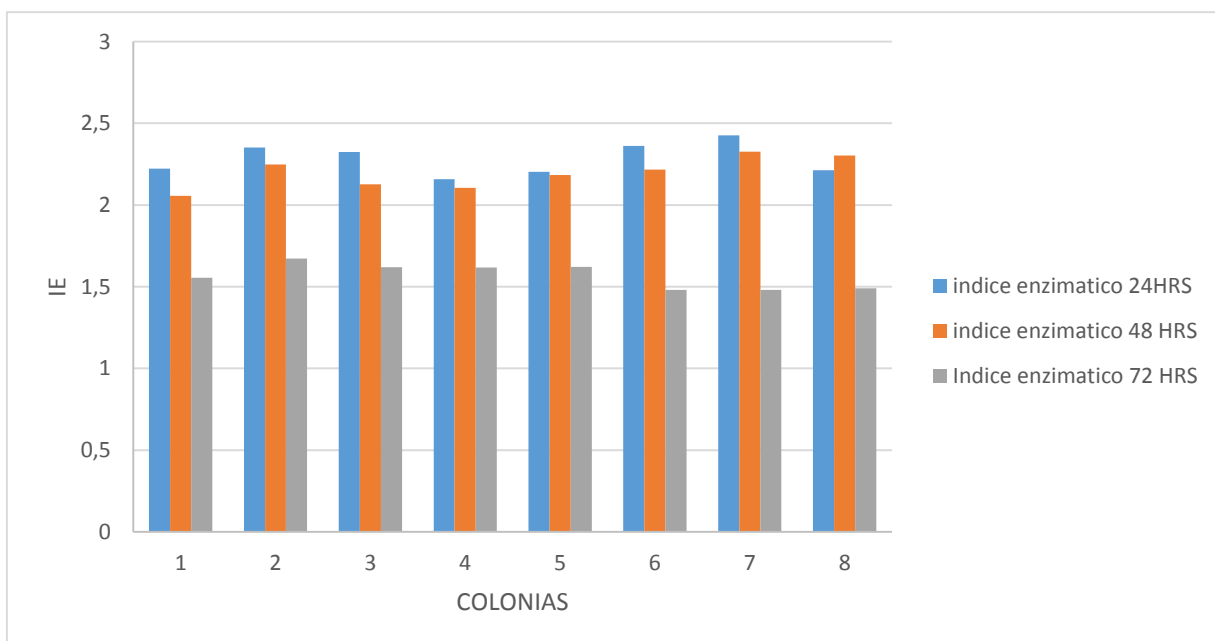
Figura 6. Crecimiento de *Penicillium sp* al finalizar los 2 tratamientos a diferentes temperaturas, A) 28°C y B) 15°C

Proteasas

Los hongos tienen como característica común la ausencia de clorofila, por lo tanto, no pueden realizar fotosíntesis y deben nutrirse a partir de materia orgánica ya elaborada

(Arenas, 1993). Con el interés de observar la actividad enzimática de *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* de la ZMVT se realizaron tratamientos con medios de agar caseína con la finalidad de estudiar la degradación proteolítica de estos hongos en el sustrato.

Como se puede observar en la gráfica 4 de los 28°C las colonias de *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* presentan una mayor producción de proteasas a las 24 horas de incubación con un IE mayor a 2 en la mayoría de las colonias sometidas al tratamiento, Monzón (2001) menciona que el mecanismo químico de los hongos consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo, por lo que podemos evidenciar la capacidad de *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* para producir enzimas proteolíticas, posteriormente a las 48 horas se observa una escasa disminución en la actividad por lo que su IE se encuentra muy cercano al de las 24 horas sin embargo a las 72 horas se aprecia disminución significativa, siendo así menor a 2 en las 9 colonias. Si se observa en la figura 7 el crecimiento de la colonia era menor las primeras 48 horas a comparación de las 72 horas donde el crecimiento de la colonia fue mayor en relación a halo de degradación.



Gráfica 4. Promedio del índice enzimático de los aislados de las muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca durante el tratamiento de 28°C.

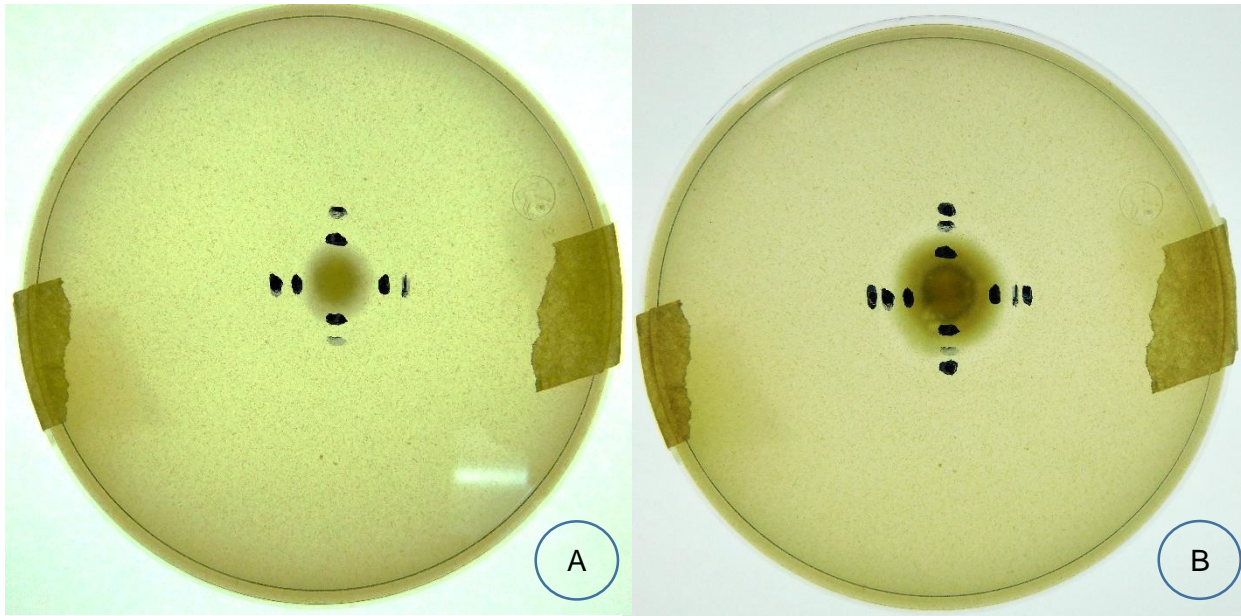
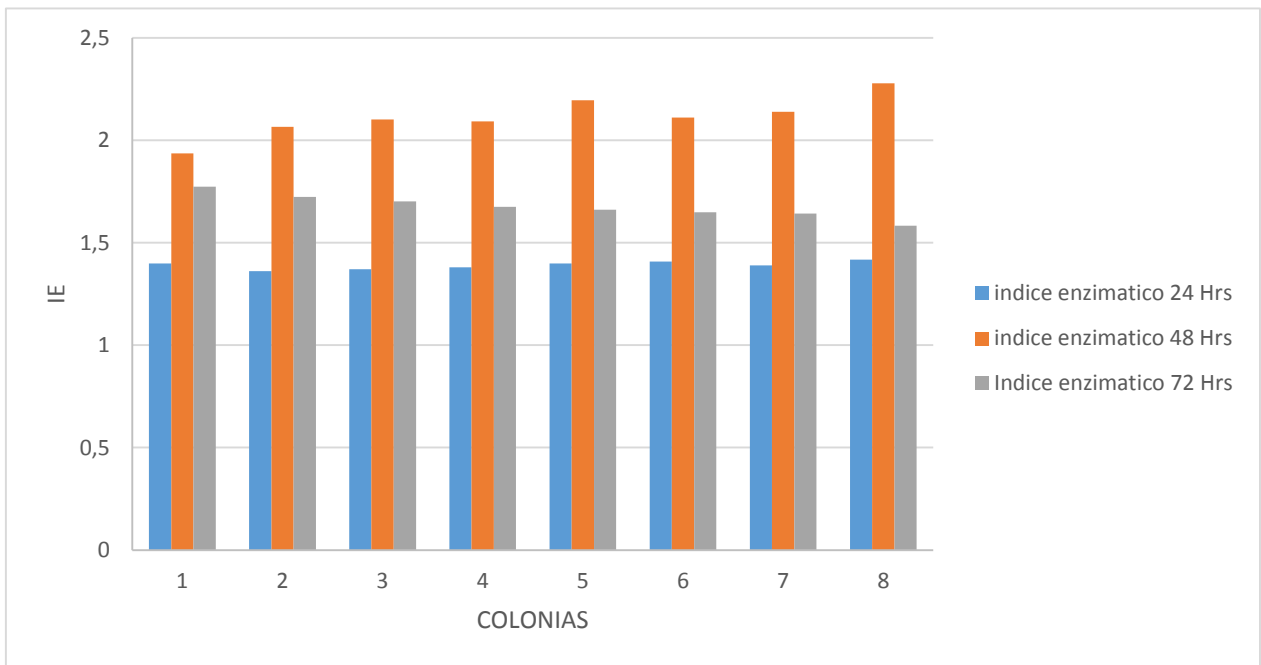


Figura 7. Crecimiento de *Penicillium sp.*, A) 48 horas y B) 72 horas

Para la gráfica 5 de los 15°C en relación al IE se observa una variación durante la producción de proteasas, siendo las 24 horas con menor actividad enzimática y a las 48 horas con mayor IE, a las 72 horas se aprecia una disminución a la cual no rebasa un IE mayor a 2.



Grafica 5. Promedio del índice enzimático de los aislados de las muestras obtenidas de pacientes del Valle de Toluca durante el tratamiento de 15°C.

Los resultados recabados son similares a los obtenidos por DeviKhuraijam y Singh 2016, en el que determinaron la actividad enzimática extracelular de *Penicillium spp* en aislados ambientales y clínicos, para el aislado clínico obtuvieron un IE=1.6 en el que mencionan que valores >1 es de importancia clínica. En el estudio realizado por Blanco et al., 2002, determinaron la invasividad de los aislados clínicos de *Aspergillus fumigatus* precedentes de muestras de pacientes obteniendo un IE >1 en sus tratamientos, así mismo mencionan que las colonias fúngicas con índices enzimáticos altos tienen mayor probabilidad de causar una enfermedad invasiva. *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* mostraron una buena actividad enzimática para producir proteasas extracelulares a diferentes temperaturas, los resultados registrados para el (IE) expuestos en el presente trabajo muestran que poseen un aparato enzimático que produce gran cantidad de proteasas y esto puede ser un indicador de que estos aislados tengan una mayor capacidad de causar enfermedades en sujetos susceptibles.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Tukey para observar si en los tratamientos que se sometieron las diferentes cepas presentaban diferencias significativas. Los resultados obtenidos si presentaron diferencia significativa ($P= 0,0035$), debido que la comparación se realizó en el tratamiento de termotolerancia con relación a la producción de enzimas, observamos como la temperatura afecta directamente la actividad enzimática de nuestros organismos, Sanchis et al. (2007), menciona que los diferentes géneros de hongos filamentosos poseen necesidades nutricionales y de temperatura para desarrollarse óptimamente, por lo que alguna afectación en estas necesidades influye en el crecimiento y actividad metabólica de los organismos.

Conclusiones

- Se identificaron cinco cepas de *Penicillium sp* y tres de *Aspergillus sp* por el método de filtros, de profesores de educación pública principalmente de la preparatoria #5 de la UAEM (Universidad Autónoma del Estado de México) ubicada en Ceboruco, EDOMEX
- *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* mostraron la morfología común para estos tipos de género por lo que su descripción fue satisfactoria.
- *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* mostraron una buena actividad enzimática para producir proteasas extracelulares a diferentes temperaturas.

- Los tratamientos a diferentes temperaturas si mostraron diferencia significativa por lo que observamos cómo es que esto afecta directamente el desarrollo y la actividad enzimática de estos aislados.

Referencias

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17(3), S79-84.
- Alcalá, L., Muñoz, P., Peláez, T., & Bouza, E. (1998). *Aspergillus y aspergilosis*. *Revista año [fecha de acceso] Volumen: pag Madrid-España*. URL disponible en <http://www.seimic.org/control/reviMico/asperguillus.htm>.
- ALEXOPOULOS, C., MIMS, C., BLACKWELL, M. 1996. *Introductory mycology*. Cuarta Edición. John Wiley & Sons. Nueva York. 869 pg.
- ARENAS, R. 1993. *Micología Médica Ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica*. Primera Edición. McGraw Hill. México D.F. 397 pg.
- Blanco, J. L., Hontecillas, R., Bouza, E., Blanco, I., Pelaez, T., Muñoz, P., & Garcia, M. E. (2002). Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1811-1813.
- Booth C. (1971). *The Genus Fusarium*. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England. 237 p
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The fungi*. Gulf Professional Publishing.
- Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta, Argentina, 118.
- Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*; 62: 130-180.
- Chen, M., Houbraken, J., Pan, W., Zhang, C., Peng, H., Wu, L., ... & Liao, W. (2013). Pulmonary fungus ball caused by *Penicillium capsulatum* in a patient with type 2 diabetes: a case report. *BMC infectious diseases*, 13, 496.

- Cisteró-Bahima A. y J. B. Tomàs. (2003). Mapa fúngico y estudio multicéntrico de sensibilización a hongos en Cataluña. *Alergol inmunol clin.* 18 (3): 106-121.
- Clínica Universidad de Navarra (2015). Diagnósticos de los microarrays, consultado en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/pruebas-diagnosticas/diagnostic-o-microarrays>
- Del Castillo, J. M. S. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- DeviKhurajam, R. y Singh, Y. R. B. (2016). In-vitro extracellular enzyme activity of clinical and environmental *Penicillium* spp. *Indian Journal of Applied Microbiology.* 19 (1): 1-8.
- Díaz Rodríguez, A., Fabré Ortiz, D. E., Coutin Marie, G., & González Méndez, T. (2010). La sensibilización a hongos ambientales y su relación con enfermedades atópicas en escolares. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 26(4), 647-655.
- Dix N.J. & Webster J. (1995). Fungi of Extreme Environments. En *Fungal Ecology*. Chapman & Hall. London. 322-332.
- El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2017). Fichas de agentes biológicos: *Penicillium* spp. DataBio.pp: 1-5.
- GARCIA, L., VERÁSTEGUI, L. 2001. Determinación de Metabolitos Secundarios a partir de una cepa Nativa de *Aspergillus* sp. aislada del Páramo del Tablazo, Departamento de Cundinamarca. *Microbiólogo Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. 72 pg.
- Google mapas 2007, consultado en: <https://www.google.com.mx/maps>
- GUZMÁN, M. 1977. *Micología médica*. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 386 pg.
- Hernández H. F., De Bievre C, Camacho Arroyo, Cerbón MA, Dupont B, López Martínez R. (1995). Sex hormone effects on *Phialophora Verrucosa* in vitro and characterization of progesterone receptors. *J Med Vet Mycol*, 33:235-239.
- KAVANAGH, K., Ed. 2005. *Fungi Biology and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra. 297 pg.
- KONEMAN, E., ROBERTS, G. 1997. *Micología: práctica de laboratorio*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 221 pg.

- López, B. (2012). Distribución temporal de esporas fúngicas aerotransportadas en la zona metropolitana del valle de México. Informe final de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. México, D. F.
- Loustau G, J. (1950). Clave determinativa de las especies del género *Penicillium*. In *Anales de la Universidad de Murcia*. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones.
- Monzón, A., 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integral de Plagas*. (CATIE, Costa Rica) 63:95–103.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol*, 25, 78-82.
- Ramana, K V., Kandi, S., Bharatkumar, P. V., Sharada, CH. V, Rao, R., Mani, R., Rao, S. D. (2013). Invasive Fungal Infections: A Comprehensive Review. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*. 1(4): 64-69.
- Romero, T., & Reyes, L. (2009). Influencia de emisiones naturales y antropogénicas en el material aerotransportado del Valle de Toluca. *Contacto nuclear*, 54, 12-17.
- Sanchis, V; Marin, S; Ramos, A. 2007. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. In Soriano del Castillo, JM. *Micotoxinas en alimentos*. ES, Díaz de Santos. p. 63-89
- Zubeldia, J. M., Senent, C. J., & Baeza, I. J. T. M. L. (2012). Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA. Fundación BBVA.