



CONCURSO NACIONAL MEDIO AMBIENTE 2008 EL SALVADOR CENTRO AMERICA



Caracterización biológica del hongo *Aspergillus sp* encontrada en las semillas de *Caesalpinia coriaria* (Nacascal) y su impacto en la salud del Medio Ambiente. Año 2007.

Categoría: PROYECTO DE INVESTIGACION AMBIENTAL

ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

Docente Depto de Microbiología

Facultad de Medicina

Universidad de El Salvador

Dirección: final 25 av norte ciudad Universitaria. San Salvador

Tel 2273-0771 o 2225-1500 ext 4246

doctorvasquez@yahoo.com

antares2000a@yahoo.com

Coordinador: Dr. Enrique Barraza



Resumen

Objetivo. Caracterizar e identificar hongo encontrado en las semillas de Nacascal y su impacto en la salud del medio ambiente.

Metodología. Se procedió en tres fases: la **Primera fase** en la recolección de las semillas de nacascal en diferentes zonas del país, principalmente de la zona norte de Chalatenango y Morazán; **Segunda fase** extracción y preparación del tanino de la semilla y hongo; **Tercera fase** pruebas de laboratorio que consistieron en sembrar el inoculo del hongo presente en la semilla en tubos de agar sabouroud y examinar por microscopia la muestra y su relación con infecciones pulmonares y alérgicas en el ser humano.

Resultados. De las semillas de nacascal se encontró un hongo del genero *Aspergillus sp*, que incide en las infecciones respiratorias agudas de los habitantes que manipulan la semilla durante el teñido de pieles y vasijas, y por ende su impacto en la salud que lesiona los tejidos pulmonares. Se ha encontrado una relación entre el aspirado de las esporas del hongo y la consecuente enfermedad en el humano.

Conclusiones. Se encontró una nueva especie de hongo en El Salvador. El impacto ambiental producido por las esporas del hongo *Aspergillus* contribuye a la discapacidad laboral y gasto público en salud en tratar las infecciones Respiratorias Agudas.

Palabras clave. *Aspergillus sp*, Nacascal.



INTRODUCCION

En nuestro medio ambiente la Salud es un valor agregado al capital humano, no solo comprende en identificar el riesgo ambiental, sino también contribuir a resolver la problemática encontrada, que es tarea de todos en colaborar a minimizar el daño al medio ambiente.

En esta ocasión se investiga sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio a nivel Nacional conocida como la semilla de Nacascal o Nacascolo, utilizada ampliamente en la alfarería y curtido de pieles en la zona norte del país.

Esta semilla tiene una particularidad inerte que necesita la presencia de un hongo del genero *Aspergillus sp*, para que pueda teñir junto con las propiedades del barro teñirse de color negro, las vasijas y de curtir la piel del ganado vacuno. Además las vasijas le dan la característica especial de barro negro, que le dan un aspecto colonial y de belleza a las vasijas.

JUSTIFICACION. Sin embargo por desconocimiento científico, se ha encontrado que infiere un daño a la salud la presencia del hongo, y que por negligencia o falta educacional ignoran “el peligro” que encierra al aspirar las esporas durante la preparación del producto. La investigación pretende esencialmente a futuro en desarrollar niveles educacionales a la población que manipula durante la extracción del producto, para proteger el entorno ambiental y de salud de los habitantes que se dedican a su labor manufacturera. Que en muchas ocasiones se diagnostica como Bronquitis aguda o Asma bronquial siendo una micosis pulmonar, lo que el tratamiento debiera de ser un antimicótico y no un antibiótico.

Material y Métodos

Se procedió en tres fases: la **Primera fase** en la recolección de las semillas de nacascal en las diferentes zonas del país de la zona norte de Chalatenango y Morazán. **Segunda fase** extracción y preparación del tanino de la semilla y hongo; **Tercera fase** pruebas de laboratorio que consistieron en sembrar el inculo del hongo presente en al semilla en tubos de agar sabouroud y examinar por microscopia la muestra.

Resultados



Del árbol denominado **NACASCOL** cuyo nombre científico es *Caesalpinia coriaria*, de la familia *Caesalpinieaceae*, del genero *Caesalpinia*, planta leguminosa con tallo de de 3 a 11 metros de altura, con hojas en pares pinnas de 5 a 10 cm de largo, cada una con mas de 10 foliolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, ápice redondeado, semillas de color café de aspecto negro, del cual crece un hongo cuyo parecido es del *Aspergillus niger*, considerado como patógeno oportunista para el ser humano, cuya morfología no es igual, y cuyas esporas varían con el anterior, pero en este caso están dispuestas en forma de espículas separadas en toda la espora que son múltiples coalescentes pigmentadas y otras claras, de diámetro pequeño, que son de color negro a café según pigmentación y no son planas y rugosas como la de especie *niger*. Al cultivar en medio especial producen una coloración negra con producción de pigmento en el tubo en la región posterior en los tubos antes de las 24 hrs al agregar al medio Agar saboroud mas sustancias oxidantes. Del análisis fitoquímico preliminar del árbol de *Caesalpinia coriaria* contiene taninos, triterpenos, glicosidos y flavonoides. El hongo se reproduce exclusivamente en las semillas del árbol Nacascol, del cual se prepara para la extracción y preparación del colorante y luego cultivo in Vitro para la producción del colorante.



Fig. 1 -1 Semilla de Nacascol

El hongo encontrado en las semillas se describe así:

Esterigmas. La cabeza de la conidia es negra, conidioforo liso largo de 1 a 4 mm con conidias o esporas internas moderadas de 1 a 3 micras, coloreadas de color café a negro.

Características Macroscópicas: colonia en Agar saboraud es de color blanco luego cambia a verde de aspecto radiado y después se hace negro, el reverso es amarillo o pigmentado de color negro según agente oxidante, altura del micelio bajo, aspecto de la colonia es polvorienta de color negro.

Características Microscópicas: cabezas conidiales lisas de una pared redonda, dispuesta en forma radial, estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, coloreadas de color café a negro, no se observa vesícula o columella, hay conidias abundantes desprendiéndose de la cabeza, tiene una hilera de fialides. El esporangio es una estructura globosa peridial simple, del esterigma es de color negro. Las conidias maduras de color café son esféricas con proyecciones en forma de picos triangulares en toda la periferia, abundantes y las centrales son escasas formando espículas en numero mayor de 10, la conidia tiene un aspecto esférico estrellado con espículas, que de los extremos emergen filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias, toda la estructura forma una coraza sólida. Las esporas inmaduras asexuales son esféricas de pared delgada incolora de tamaño grande, que luego se llenan formando masas internas de color café. El conioforo es largo liso con esporas abundantes. Hay otras conidias que se diferencian de la anterior porque tienen una forma de núcleo al interior de tamaño regular a

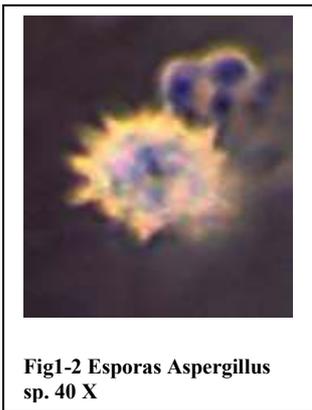


Fig1-2 Esporas *Aspergillus* sp. 40 X

grande de color celeste que adopta del colorante con borde hialino de pared simple que son mas pequeñas que las anteriores, sin protuberancias de aspecto rugoso plano en numero no mayor de 10, no forman espiculas.

En general la espora es de forma esférica, aseptada, ameropora, coloreada y oscura del tipo feospora, tamaño grande, cuyo diámetro es de 1 a 3 micras las hifas son septadas con micelio continuo. Crece a temperatura ambiente 37 ° C.

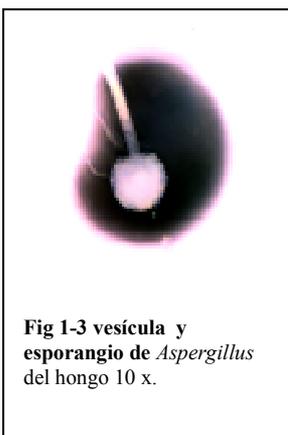


Fig 1-3 vesícula y esporangio de *Aspergillus* del hongo 10 x.

En cultivo de Agar saboraud de placa y tubo: se observan colonias abundantes de color blanco a verde radiado que cambia a color negro, dispuestos en forma radial del centro hacia fuera, el reverso de color amarillo a pigmentado negro según uso de oxidantes.

Esta variedad de *Aspergillus* encontrada, se sugiere que dada su caracterización morfológica es otra especie encontrada en El Salvador deducido por la clasificación taxonómica Internacional no corresponde a la especie *niger*.

Se hizo la observación del procedimiento de extracción del tanino que ocupan para teñir la alfarería de color negro, encontrando por entrevistas que el procedimiento de extracción dura una semana, luego a la siguiente semana los lugareños permanecen postrados en cama, con proceso febril, tos seca, lasitud y anorexia, por la manipulación y aspiración de los gases del quemado que realizan para fijar el colorante. Se observa que ha nivel del suelo cada objeto es colocado de nuevo en el suelo donde están tiradas las semillas donde se extrajo el colorante, lo que es evidente la contaminación de nuevo posterior quemado de vasijas por el fuego intenso construido de horno artesanal. También utilizan esta misma materia prima para la curtiembres de pieles, que también realizan similar el mismo proceso, presentando las mismas manifestaciones clínicas. No usan mascarillas ni guantes de protección, la mayoría son personas humildes y descalzos. El contacto de la vasija al horno ha de quemar la espora , pero se entra a discusión y debate que al contacto de la vasija posterior al quemado entra de nuevo al contacto con el suelo y vuelve a contaminarla, de donde ya no es tratada y vendida al mercado.

Por método de laboratorio se encontró que las 24 hrs del cultivo, por microscopia había crecimiento de esporulación rápida a los cinco minutos, a la hora habían millones de esporas en 10 campos. Tal como se observa en la tabla 1.



Como complemento se procedió a examinar y cultivar objetos de alfarería teñidos con los taninos de las semillas de *Caesalpinia coriaria* (nacascol), dando como resultado positivo a crecimiento del hongo a las dos semanas del caldo.

Por reporte epidemiológico del Ministerio de Salud se ha encontrado en estas zonas, existe la alta prevalencia de infecciones Respiratorias Agudas en niños y adultos, pero que dan como explicación a que “es viral el problema”, pero por desconocimiento no han descubierto que los fenómenos alérgicos y respiratorios tiene por origen otras causales, incluyendo esta que es por aspiración de esporas contaminantes, en particular debida a su actividad ocupacional.

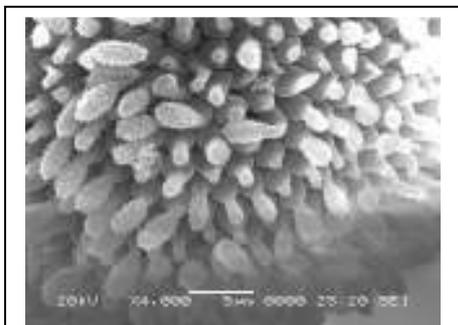


Fig. 1-4 Imagen obtenida con Microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 x). (Cortesía de Dra Vianey de Abrego. Tomada en CENSALUD. UES febrero 2008.)

En la Fig. 1- 4 se observa foto Imagen obtenida con Microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 x). Puede notarse según reporte de CENSALUD “hongo filamentoso, donde sobresalen del micelio las cabezas conidiales, redondeadas. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fialides en forma de botella, en cuyo extremo se fijan las esporas, en este caso solo se aprecia uno no una cadeneta “. **Fenotípicamente** corresponde a otra especie del genero *Aspergillus*.

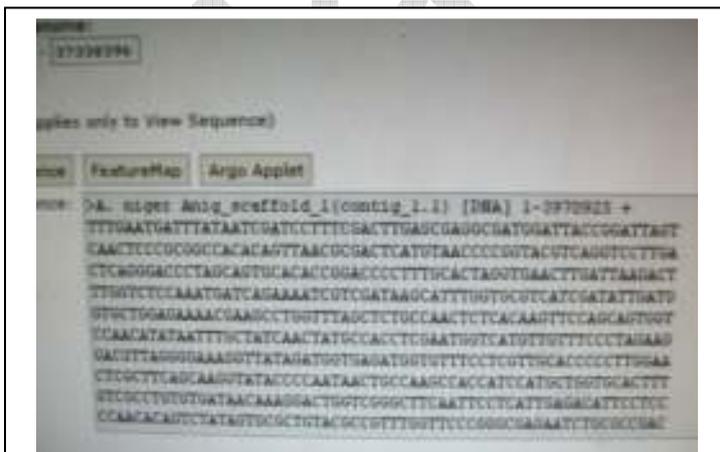


Fig. 2. Secuenciación del DNA del genero *Aspergillus sp*
Fuente: BROAD INSTITUTE. Aspergillus Comparative Database. 2007

Por estudios Genotípicos se encontró que es del genero *Aspergillus* presentando la siguiente secuenciación de DNA.

En la Fig. 3 Se observa la secuenciación del DNA del genero *Aspergillus sp*, en la que **Genotípicamente** la secuencias de bases puricas y piridimidicas se diferencian entre las diversas especies del genero, tal como se ve

el mapa cromosomico en la Fig. 3 y 4.

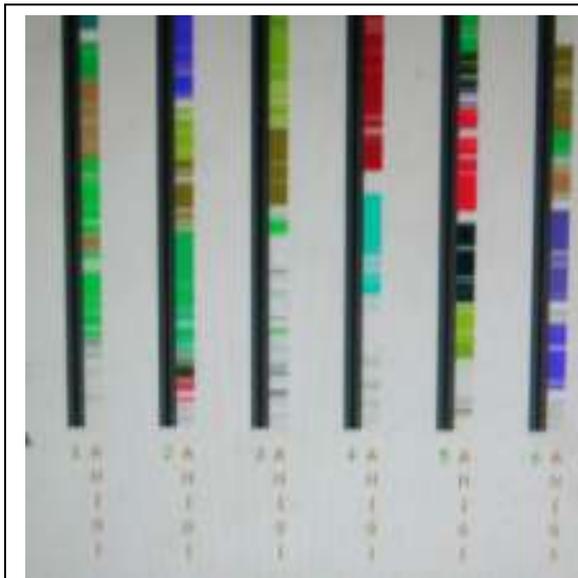


Fig.3. DNA cromosomal del genero *Aspergillus sp*.
Fuente: BROAD INSTITUTE. Aspergillus Comparative Database. 2007.

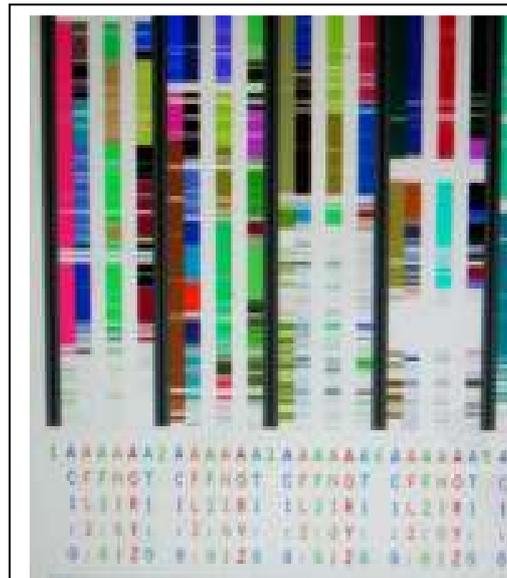


Fig. 4. Comparación de especies de *Aspergillus* por secuenciación cromosomal de DNA:

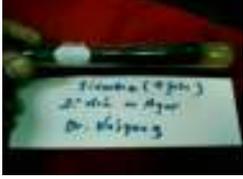
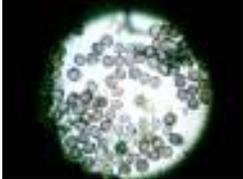
Discusión

Impacto en la Salud

El contacto directo de las semillas con la presencia del hongo con el humano, trae consecuencias daño a la salud y erogación del gasto publico en la atención de Infecciones Respiratorias Agudas, en los niveles de atención I, II y III de la red del Ministerio de Salud. De tal forma que clasifican en forma general el diagnostico de Infección Respiratoria Aguda sin explicar la causa de su origen.

Se ha determinado que los pacientes que presentan Aspergilosis broncopulmonar alérgica su agente causal incluyen del genero *Aspergillus* especies de *fumigatus*, *niger*, *terreus*, *flavus*, *nidulans*, *orizae* y *ochraceus*. En nuestro medio es mas frecuente el genero *Aspergillus* de la especie *niger*.⁽¹⁾



Tabla 1. Cultivo y Microcultivo del Hongo <i>Aspergillus sp</i> .	
Cultivo y Microcultivo del hongo <i>Aspergillus sp</i> .	Descripción
	<p>Foto 1. Semilla de Nacacol. Observe la pigmentación de color café a negro presente en la superficie de la semilla.</p>
	<p>Foto 2. Tubo en Agar saboraud con el hongo. Siembra de raspado de semilla Nacacol que presenta pigmentación de color negro. Se observa que al segundo día ya esta esporulando rápidamente hongo <i>Aspergillus sp</i>. Al cuarto día esta invadido todo el tubo en Agar saboroud.</p>
	<p>Foto 3. Crecimiento del hongo a las 24 hrs. 10 X Se observa al microscopio 10 x que la esporulación a los cinco, 15 y 30 minutos es alta, encontrando que en cincuenta campos esta completamente invadido.</p>
	<p>Foto 4. Microcultivo del hongo. Se hizo microcultivo del hongo, encontrando apareamiento de “mancha” en la placa a las 48 hrs.</p>
	<p>Foto 5. Observación del hongo a partir del microcultivo 10 X. Se observa el conioforo más la vesícula adherida al medio.</p>
	<p>Foto 6. Hongo <i>Aspergillus sp</i> 10 X. Se observa el hongo encontrado en las semillas de Nacacol con la vesícula y el conidioforo, presentando inicio de esporas en forma de cadena lineal.</p>
	<p>Foto 7. Espora del hongo <i>Aspergillus sp</i> 40 X. Ampliada 100 veces. Se observan esporas encontradas en el cultivo en todas las láminas que se desprenden de las vesículas..</p>
	<p>Foto 8. Espora del hongo <i>Aspergillus Niger</i> 40 X. Se observa que la variedad <i>niger</i> es la que esta asociada al genero <i>Aspergillus</i>, pero que en las semillas no se encontró esta variedad, sino la de la foto 7 es la mas frecuente, con esporulación alta.</p>