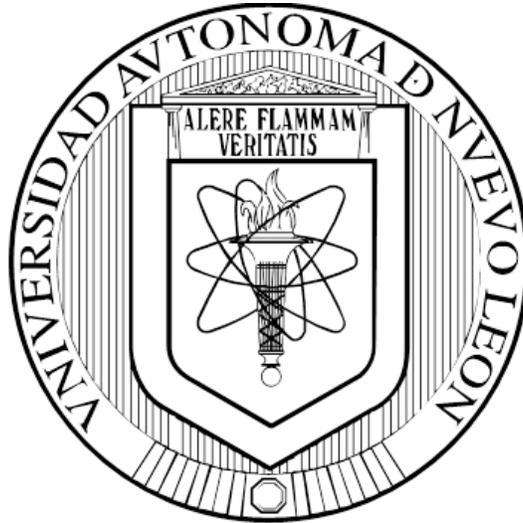


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS METALÓFILAS AUTÓCTONAS DE
MÉXICO PARA SU APLICACIÓN EN TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES**

POR

MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA HERNÁNDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

DICIEMBRE, 2017

OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS METALÓFILAS AUTÓCTONAS DE MÉXICO PARA SU APLICACIÓN EN TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES

Aprobación de la tesis

Dra. María Teresa Garza González
PRESIDENTE

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
SECRETARIA

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia
PRIMER VOCAL

Dr. Ulrico Javier López Chuken
SEGUNDO VOCAL

Dra. Katiushka Arévalo Niño
TERCER VOCAL

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
SUB-DIRECTORA DE POSGRADO

OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS METALÓFILAS AUTÓCTONAS DE MÉXICO PARA SU APLICACIÓN EN TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES

Revisión de la tesis:

Directora de Tesis
Dra. María Teresa Garza González

Co-Director de Tesis
Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

Revisor
Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Revisor
Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia

Revisor
Dr. Ulrico Javier López Chuken

Revisora
Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de Posgrado
Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

RESUMEN

María de los Ángeles García Hernández

Fecha de graduación: Diciembre 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS METALÓFILAS AUTÓCTONAS DE MÉXICO PARA SU APLICACIÓN EN TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES

Número de páginas: 126

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método del estudio:

La presencia o incremento de los contaminantes en el ambiente, ejerce una presión selectiva sobre la microbiota que coloniza a estos ecosistemas. La exposición prolongada a los contaminantes produce selección natural de los genotipos con capacidad de sobrevivir en dichas condiciones. Esta capacidad puede ser aprovechada por el hombre para el desarrollo de procesos biotecnológicos sustentables.

Contribuciones y Conclusiones:

Se obtuvieron ocho aislados fúngicos de efluentes y suelos contaminados de México, las cuales fueron identificados por secuenciación del gen rRNA 18S, como *A. ustus*, *P. janthinellum*, *T. longibrachiatum*, *P. boydii*, *P. chrysogenum*, *F. oxysporum*, y *A. sclerotigenum*. Las pruebas de tolerancia a Cr(VI) por las cepas fúngicas, indicaron ser altamente resistentes a concentraciones por arriba de 800 mg L⁻¹. La biomasa fúngica de los hongos fue utilizada en los estudios de biorreducción de Cr(VI) a pH 4 y 2, siendo el pH más bajo el que mostró los porcentajes de biorreducción más altos. La biomasa metabólicamente activa, demostró ser un agente reductor de Cr(VI) a pH 4 y pH 2, con una concentración inicial de Cr(VI) de 50 mg L⁻¹. Sin embargo, la biomasa inactiva a pH1 presenta capacidades de reducción de Cr(VI) de 261.7 a 345.82 mg g⁻¹. La capacidad de los hongos de excretar moléculas orgánicas reductoras, permitió el uso del filtrado extracelular para la reducción de iones Ag⁺ y Au³⁺, siendo una alternativa en la recuperación de estos metales o para la biosíntesis de nanopartículas metálicas. Además, la técnica de síntesis de nanopartículas vía microondas, fue evaluada en este proyecto, alcanzando tiempos de síntesis de 1 min. Principalmente, los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, han sido estudiados para la biorremediación de sitios contaminados y reducción de metales, por lo que es un campo fértil de investigación para los otros aislados.

FIRMA DEL ASESOR: _____

DEDICATORIA

Con todo mi amor dedico este trabajo a mi hija, María Sarahí; celebro tu vida que me ha impulsado a desear ser mejor cada día.

A mi esposo, por nunca querer cortar mis alas y acompañarme en este viaje con tu paciencia y amor.

A mi padre, por todo tu trabajo, esfuerzo y hacer de mí lo que soy.

A mi hermana, porque aún en la distancia siempre puedo contar contigo.

A mi tía, Julia García, por su cariño sincero de toda la vida.

A DIOS...

Porque todas las cosas proceden de él,

y existen por él y para él.

¡A él sea la gloria por siempre!

Romanos 11:36

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Teresa Garza González; sus enseñanzas van más allá de lo profesional. La admiro y respeto como persona, gracias por estos cinco años de trabajo, por su confianza y apoyo incondicional.

A cada uno de los doctores que formaron parte de este proyecto: Dr. Luis Álvarez, Dra. María Elena Cantú, Dr. Juan Francisco Villarreal, Dr. Ulrico López, y Dra. Katiushka Arévalo; gracias por su valiosa aportación, sus consejos y recomendaciones.

A los doctores Irene Castaño y Alejandro de las Peñas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), por abrirme las puertas de su laboratorio, por su amabilidad y todo el apoyo que me brindaron. Así mismo, al Dr. Israel López, por su disposición a ayudar, sus enseñanzas y pláticas amenas.

A la maestra Adriana Liñan y su equipo de trabajo, Gloria y Elías; por su actitud de servicio y buen trato en todo momento.

Por último, a esas personas que me brindaron su amistad, apoyo moral y que hicieron un poco más fácil el camino a la meta: Ismael Bernal; no sólo te agradezco tu apoyo, sabes que comparto contigo este trabajo. Jonathan Valentín, tu éxito es sólo cuestión de tiempo, gracias por todo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xv
Capítulo 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Contaminación por metales pesados.....	1
1.2 Interacción microbiana con metales pesados.....	2
Capítulo 2	3
ANTECEDENTES	3
2.1 Química y toxicidad del cromo hexavalente.....	3
2.1.1 Aplicaciones del Cr(VI) y su impacto ambiental	6
2.1.2 Marco legal para Cr(VI)	7
2.1.3 Técnicas de eliminación de Cr(VI).....	8
2.2 Procesos biológicos en la remoción de Cr(VI).....	9
2.3 Hongos metalófilos y su tolerancia a Cr(VI)	10
2.4 Mecanismos de interacción entre hongos metalófilos y Cr(VI)	13
2.4.1 Mecanismos intracelulares	15
2.4.2 Mecanismos extracelulares	16
2.4.3 Biosorción.....	17
2.4.4 Transporte y bioacumulación	27
2.4.5 Biorreducción de Cr(VI) por hongos.....	28
2.5 Aplicaciones tecnológicas de la biorreducción de metales por hongos.....	31
2.6 Justificación.....	38
2.7 Hipótesis	38
2.8 Objetivo general.....	39

2.8.1 Objetivos específicos.....	39
Capítulo 3	40
MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1 Metodología general del proyecto.....	40
3.2 Selección y recolección de muestras para el aislamiento de hongos metal tolerantes.....	41
3.2.1 Determinación de la concentración de metales en las muestras de aislamiento	41
3.3 Cultivo, aislamiento y purificación de cepas fúngicas metal tolerantes	41
3.3.1 Caracterización morfológica (macroscópica y microscópica) de las cepas fúngicas aisladas.....	42
3.3.2 Identificación de las cepas fúngicas metal tolerante basado en la secuenciación del gen 18S DNAr	42
3.4 Determinación del nivel de tolerancia a Cr(VI) de las cepas fúngicas.....	44
3.4.1 Método de difusión en placa.....	44
3.4.2 Índice de tolerancia.....	44
3.5 Evaluación de la capacidad de eliminación de Cr(VI) de los hongos metal tolerantes.....	45
3.5.1 Selección de las cepas fúngicas.....	45
3.5.2 Cinéticas de eliminación de Cr(VI)	45
3.5.3 Determinación de la capacidad de reducción de la biomasa fúngica	47
3.5.4 Caracterización de las biomásas fúngicas seleccionadas.....	47
3.6 Determinación de Cr(VI) y cromo total.....	50
3.6.1 Método colorimétrico (1,5-Difenilcarbazida).....	50
3.6.2 Curva de calibración	51
3.6.3 Análisis de cromo total	52
3.7 Estudios de biorreducción de sales metálicas (Ag y Au)	52
3.7.1 Biosíntesis de nanopartículas de oro y plata	53
Capítulo 4	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1 Determinación de las concentraciones de metales pesados en las muestras para el aislamiento de hongos metal tolerantes.....	54
4.2 Aislamiento y caracterización de las cepas fúngicas metal tolerantes	55

4.3 Identificación de las cepas fúngicas metal tolerante basado en la secuenciación del gen 18S DNAr	62
4.4 Determinación de la tolerancia a Cr(VI) por las cepas fúngicas aisladas	67
4.5 Estudios de eliminación de Cr(VI) por los aislados fúngicos metal tolerantes	69
4.5.1 Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa activa e inactiva.....	71
4.5.2 Efecto del pH en la eliminación del Cr(VI) por biomasa activa e inactiva	73
4.5.3 Efecto de la concentración inicial de Cr(VI) por biomasa activa e inactiva....	76
4.6 Mecanismos de eliminación de Cr(VI) por los aislados fúngicos.....	77
4.6.1 Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)	79
4.6.2 Potencial de carga cero de las cepas fúngicas metal tolerantes.....	83
4.6.3 Biorreducción de Cr(VI) por las cepas fúngicas metal tolerantes.....	84
4.6.4 Capacidad reductora de Cr(VI) de los aislados fúngicos.....	87
4.7 Biorreducción de metales valiosos (Au y Ag) por filtrado extracelular fúngico	88
4.7.1 Biosíntesis de nanopartículas metálicas de iones Au^{3+} y Ag^+ vía microondas.	97
Capítulo 5	104
CONCLUSIONES.....	104
Capítulo 6	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Enfermedades causadas por la exposición al Cr(VI)	5
Tabla II	Tolerancia a Cr(VI) por hongos metalófilos	12
Tabla III	Estudios de biorreducción de Cr(VI) por hongos	32
Tabla IV	Biosíntesis de nanopartículas de oro y plata por hongos	37
Tabla V	Composición química del medio mineral Lee modificado	46
Tabla VI	Condiciones experimentales para la determinación del punto de carga cero (pH_{pcc})	49
Tabla VII	Concentraciones de metales pesados en las muestras de aislamiento	55
Tabla VIII	Clasificación taxonómica de los aislados fúngicos metal tolerantes	64
Tabla IX	Determinación de cromo total en las cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa e inactiva	78
Tabla X	Parámetros cinéticos del modelo de pseudo primer orden	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de especiación de Cr(VI) a una concentración de 100 mg L ⁻¹	4
Figura 2	Mecanismos involucrados en la detoxificación de metales por hongos	14
Figura 3	Componentes principales de la pared celular de los hongos (a) β -1,3-glucano; (b) quitina	18
Figura 4	Mecanismos de biosorción de Cr(VI) por biomasa muerta de hongos	27
Figura 5	Síntesis biológica de nanopartículas utilizando extracto de hongos	35
Figura 6	Curva de calibración para la determinación de Cr(VI) por UV-Vis.	51
Figura 7	Cepa A1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).	56
Figura 8	Cepa B1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).	57
Figura 9	Cepa G1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).	58
Figura 10	Cepa D1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).	59
Figura 11	Cepa I1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).	59
Figura 12	Cepa J1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).	60
Figura 13	Cepa K1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).	61
Figura 14	Cepa L1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).	62

Figura 15	Árbol filogenético de las cepas fúngicas basado en la comparación de secuencias del gen 18S rRNA que muestran la relación entre ellos.	66
Figura 16	Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).	67
Figura 17	Índice de tolerancia a Cr(VI) por cada cepa fúngica aislada.	68
Figura 18	Cinéticas de eliminación de Cr(VI) de cada aislado fúngico	70
Figura 19	Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa e inactiva de <i>A. ustus</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>P. boydii</i> ; 50 mg L ⁻¹ ; pH 4.	71
Figura 20	Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa e inactiva de <i>P. chrysogenum</i> y <i>F. oxysporum</i> ; 50 mg L ⁻¹ ; pH 4.	72
Figura 21	Ensayo de eliminación de Cr(VI) por biomasa activa de <i>Fusarium oxysporum</i> .	73
Figura 22	Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa e inactiva de <i>A. ustus</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>P. boydii</i> ; 50 mg L ⁻¹ ; pH 2	74
Figura 23	Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa e inactiva de <i>P. chrysogenum</i> y <i>F. oxysporum</i> ; 50 mg L ⁻¹ ; pH 2	74
Figura 24	Ensayo de eliminación de Cr(VI) por biomasa activa de <i>F. oxysporum</i> y <i>P. boydii</i> .	75
Figura 25	Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa e inactiva <i>A. ustus</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>P. boydii</i> ; 100 mg L ⁻¹ ; pH 2	76
Figura 26	Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa e inactiva de <i>P. chrysogenum</i> y <i>F. oxysporum</i> ; 50 mg L ⁻¹ ; pH 2	77
Figura 27	Espectros FT-IR de las biomásas fúngicas	80
Figura 28	Espectro de FT-IR de la biomasa fúngica <i>T. longibrachiatum</i>	81

Figura 29	Potencial de carga cero (PCC) de <i>T. longibrachiatum</i> (G1).	83
Figura 30	Micrografías SEM de la biomasa de <i>P. boydi</i> ; antes y después de la reducción de Cr(VI).	86
Figura 31	Espectro Cr2p de la biomasa de <i>P. boydii</i> después de la reducción de Cr(VI).	87
Figura 32	Capacidad de reducción de Cr(VI) de la biomasa de <i>A. ustus</i> .	88
Figura 33	Reacciones de reducción de los iones AuCl_4^- .	89
Figura 34	Reacción de reducción de los iones Ag^+ .	89
Figura 35	Pruebas de biorreducción de iones Ag^+ y Au^{3+} por filtrados extracelulares fúngicos.	90
Figura 36	Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag; Au; Filtrado extracelular <i>A. ustus</i> .	91
Figura 37	Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag; Au; Filtrado extracelular <i>T. longibrachiatum</i> .	92
Figura 38	Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag; Au; Filtrado extracelular <i>P. boydii</i> .	93
Figura 39	Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag; Au; Filtrado extracelular <i>P. chrysogenum</i> .	93
Figura 40	Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag; Au; Filtrado extracelular <i>F. oxysporum</i>	94
Figura 41	(a) Espectro de extinción UV-Vis. (b) Color distintivo de diferentes tamaños de nanopartículas de plata.	95
Figura 42	Espectro UV-vis (normalizado) para AuNPs con diferentes tamaños de partículas en solución acuosa	96
Figura 43	Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas con un tiempo de reacción de 1 min.	97

- Figura 44** Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *A. ustus*. **98**
- Figura 45** Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *T. longibrachiatum*. **99**
- Figura 46** Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *P. boydii*. **99**
- Figura 47** Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *P. chrysogenum*. **100**
- Figura 48** Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *F. oxysporum*. **101**
- Figura 49** Espectros FT-IR de los filtrados extracelulares y (a) AuNPs sintetizadas por *P. chrysogenum* (J1) y *F. oxysporum* (K1); y AgNPs sintetizadas por *F. oxysporum* (K1) y *P. boydii* (I1). **102**

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Cr(VI)	Cromo hexavalente
Cr(III)	Cromo trivalente
L ⁻¹	Litros
mg	miligramos
g	gramos
mL	mililitros
mEq	miliequivalentes
pH _{pcc}	Potencial de carga cero
kg	Kilogramos
CMI	Concentración mínima inhibitoria
°C	Grados Celsius
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonias
mEq	miliequivalentes
N	Normalidad
q _r	Capacidad reductora, mg g ⁻¹
k ₁	Constante de velocidad de pseudo primer orden, min ⁻¹
q _c	Capacidad de reducción calculada, mg g ⁻¹
[Cr(VI)] ₀	Concentración inicial de cromo hexavalente, mg L ⁻¹
[Cr(VI)] _f	Concentración final de cromo hexavalente, mg L ⁻¹
V	Volumen, mL
[Cr]	Concentración de cromo total, mg L ⁻¹
AgNPs	Nanopartículas de plata
AuNPs	Nanopartículas de oro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH _f	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
LSPR	Plasmón Superficial de Resonancia Localizado

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación por metales pesados

Los metales pesados son el principal grupo de contaminantes inorgánicos; los cuáles surgen de las diversas operaciones industriales tales como minería, instalaciones de generación de energía, curtido de pieles, fabricación de pigmentos, fertilizantes fosfatados, industrias automotrices, de acero o metalmecánica. El tratamiento inefectivo de estos residuos, ha resultado en la acumulación de metales pesados en el suelo en concentraciones superiores a los límites establecidos por normas ambientales (Halim et al. 2003).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, a nivel mundial las concentraciones reportadas para metales pesados en aguas naturales, son: arsénico ($0.001-0.012 \text{ mg L}^{-1}$); cadmio ($<0.001 \text{ mg L}^{-1}$); cromo (<0.002 hasta 0.12 mg L^{-1}); cobre ($\leq 0.005-30 \text{ mg L}^{-1}$); mercurio ($<0.005 \text{ mg L}^{-1}$); níquel (0.02 mg L^{-1}); plomo ($<0.005-0.1 \text{ mg L}^{-1}$). Sin embargo, el límite máximo permisible para cada uno de estos metales indica que son el arsénico (0.01 mg L^{-1}), cromo (0.05 mg L^{-1}), cobre (2 mg L^{-1}) y plomo (0.01 mg L^{-1}), aquéllos que se encuentran en concentraciones superiores a las permitidas (WHO, 2011).

La presencia de estos contaminantes en el medio ambiente puede ser perjudicial para una variedad de especies vivas incluyendo seres humanos. Los metales se pueden distinguir de otros contaminantes tóxicos, ya que no son biodegradables y pueden ser acumulados en los tejidos vivos, causando diversas enfermedades y trastornos (Villaescusa et al. 2004).

1.2 Interacción microbiana con metales pesados

La introducción de metales pesados en el medio ambiente generalmente induce cambios morfológicos y fisiológicos en las comunidades microbianas (Vadkertiová y Sláviková 2006). Dichos contaminantes, ejercen una acción inhibitoria sobre los microorganismos bloqueando grupos funcionales (-SH, sitios oxigenados), desplazando iones metálicos esenciales, o por la modificación de conformaciones activas de moléculas biológicas (alteraciones en la estructura conformacional de ácidos nucleicos y proteínas) (Poole RK y Gadd GM 1989). Sin embargo, diversas bacterias, hongos y levaduras han mostrado la habilidad de sobrevivir y crecer en sitios contaminados con metales pesados (Anahid et al. 2011). La tolerancia adquirida por estos microorganismos está relacionada a los mecanismos que emplean como respuesta directa a la toxicidad del metal, los cuales incluyen precipitación extracelular, complejación, cristalización, biosorción, cristalización, eflujo, impermeabilidad, compartimentación intracelular y biotransformación (reducción) (Ross 1975; Gadd GM 1990; Mehra y Winge 1991; Gadd GM 1992, 1993, 2007). Este último, juega un rol importante en la transformación de metales de sus formas tóxica-soluble a no tóxica-insoluble (Srivastava y Kowshik 2013), lo cual dependerá de factores como el tipo de metal, la naturaleza del medio y las especies microbianas (Hassen et al 1998). Lo anterior, convierte a los microorganismos en una alternativa para ser utilizados en procesos biotecnológicos de biorremediación o recuperación de metales.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

2.1 Química y toxicidad del cromo hexavalente

El cromo puede existir en diferentes estados de oxidación que van desde -2 a +6, pero son los estados de oxidación +3 y +6 los más estables y comúnmente encontrados en el ambiente. En general, el cromo existe de manera natural en su forma trivalente ((Cr(III))), mientras que el cromo hexavalente (Cr(VI)) proviene principalmente de su aplicación industrial (Cervantes et al. 2001; Nath et al. 2009). El Cr(VI) y Cr(III) se caracterizan principalmente por sus diferentes propiedades fisicoquímicas, movilidad y toxicidad (Park et al. 2007). Los compuestos de Cr(VI) son habitualmente clasificados como altamente solubles en agua; el cromato de sodio (Na_2CrO_4), presenta una solubilidad reportada de 873 g L^{-1} a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y el cromato de potasio (K_2CrO_4) de 629 g L^{-1} a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (Rankin 2009). Mientras tanto, su forma reducida como Cr(III), al predominar como hidróxidos, óxidos o sulfatos, es menos soluble en agua, menos móvil, y ha sido reportado como 100 veces menos tóxico y hasta 1000 veces menos mutagénico que el Cr(VI) (Corona y Saldaña 2010).

La movilidad y biodisponibilidad del Cr(VI) dependen fundamentalmente de sus especies químicas, trióxido de cromo, cromatos y dicromatos (CrO_3 , CrO_4^{2-} , HCrO_4^- o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (Kotás y Stasicka 2000). La formación de diversas especies de Cr(VI) y sus proporciones relativas, dependen del pH y de la concentración de cromo total, tal como se muestra en la Figura 1. El ácido crómico (H_2CrO_4) pertenece a los ácidos fuertes a un pH menor o igual a 1 y el

cromato (CrO_4^{2-}) es la especie prevalente de Cr(VI) en ambientes acuáticos naturales a un pH neutro. Dependiendo de la concentración del soluto a un pH entre 1 y 6, son el ión hidrógeno cromato e ión dicromato aquéllos que prevalecen. El ion dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) es un dímero del ion hidrógeno cromato (HCrO_4^-), el cual se forma cuando la concentración de cromo excede aproximadamente 1 g L^{-1} (Aylett 1985; Arslan et al. 1987; De Flora et al. 1990; Cotton et al. 1999; Rankin 2009).

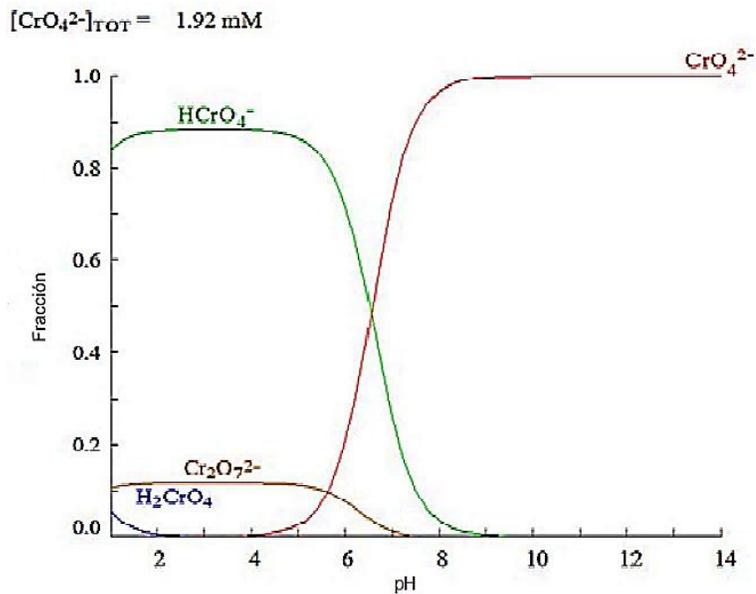
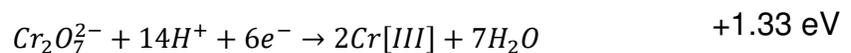


Figura 1. Diagrama de especiación de Cr(VI) a una concentración de 100 mg L^{-1} . (Kotás y Stasicka 2000)

La relación entre los estados hexavalente y trivalente del cromo se describe por la ecuación:



La diferencia de potencial eléctrico entre el Cr(VI) y Cr(III) refleja el fuerte potencial de oxidación del cromo hexavalente y la energía sustancial (1,33 eV) requerida para oxidar el cromo trivalente a la forma hexavalente (Dayan y Paine

2001). La oxidación de Cr(III) a Cr(VI) nunca ocurre en los sistemas biológicos, en contraste, la reducción de Cr(VI) a una forma insoluble como Cr(III) se produce espontáneamente en el organismo (Dayan y Paine 2001). La capacidad que posee el Cr(VI) para oxidar otras especies genera la formación de radicales libres durante su reducción a Cr(III). Esta reacción ejerce efectos nocivos en los sistemas biológicos cuando se produce dentro de la célula (Arslan y Tomasi 1987; Liu et al. 1995; Liu y Shi 2001).

Además, una exposición prolongada al Cr(VI) puede provocar diversas enfermedades en los seres humanos, cuando es inhalado, ocasiona un severo daño en los pulmones y tracto respiratorio, al contacto genera irritación o lesiones en la piel, e ingerido provoca problemas intestinales, incluso cáncer (Das y Singh 2011). En la Tabla I, se presentan las principales rutas de exposición e ingesta del Cr(VI) y los riesgos a la salud que presentan.

TABLA I
ENFERMEDADES CAUSADAS POR LA EXPOSICIÓN AL Cr(VI)

Ruta de exposición	Modo de ingesta	Riesgos de salud
Aire	Respiración	Irritación nasal, úlceras nasales, cáncer del tracto respiratorio y pulmón, tuberculosis, tos, etc.
Agua	Comida y bebidas	Cáncer de estómago, diarrea, broncoespasmos y neumonía
Contacto dérmico	Penetración de la piel	Irritación en la piel y dermatitis

(Das y Singh 2011)

En 1987, investigadores de la provincia de Liaoning, China, informaron que durante la producción de ferrocromo (1970-1978) el agua potable contenía Cr(VI) a una concentración de 20 mg L⁻¹, incrementando la mortalidad por cáncer de estómago y pulmón en la población durante ese periodo (Beaumont et al. 2008).

2.1.1 Aplicaciones del Cr(VI) y su impacto ambiental

La contaminación ambiental por Cr(VI) ha tenido un gran impacto en los niveles social, económico, y de salud pública. Muchos de los cuáles, han sido generados por su gran aplicación en procesos industriales y en la elaboración de diversos productos (Nriagu y Pacyna 1988). Las aplicaciones comerciales del Cr(VI) incluyen curtiduría, inhibición de corrosión, recubrimiento, soluciones de limpieza de cristalería, conservador de madera, acabado de metales, y pigmentos. Entre los principales usuarios de los compuestos de Cr(VI) son las industrias química, metalúrgica y refractaria. En la industria metalúrgica, se incluyen intermediarios de ferrocromo para acero inoxidable, hierro fundido y aleaciones no ferrosas. La inclusión de cromo en concentraciones entre 11 y 30% en aleaciones, aumenta la dureza, y resistencia a la corrosión. En la industria refractaria, las características ideales del Cr(VI) son su alto punto de fusión y su resistencia al ácido y álcali. Además, su aplicación principal en la industria química es como pigmento (verde, naranja, rojo, amarillo) (Barceloux 1999), para la elaboración de colorantes textiles (por ejemplo, dicromato de amonio, cromato de potasio y cromato de sodio), así como para pinturas, tintas y plásticos (trióxido crómico, cromato de zinc, cromato de bario, cromato de calcio, cromato de sodio, cromato de estroncio) (Rankin 2009).

Sin embargo, el uso incorrecto de estos compuestos ha provocado severos problemas de contaminación por Cr(VI). En 1987, en aguas subterráneas de pozos pertenecientes a la compañía Pacific Gas and Electric Company (PG&E), ubicada en el municipio de Hinckley, Minnesota, fueron detectados niveles de Cr(VI) de 0.58 mg L^{-1} ; más de 10 veces el límite máximo permisible (0.05 mg L^{-1}) para Cr(VI), el cual era utilizado como anticorrosivo en sus torres de enfriamiento (Pellerin y Booker 2000). En México existen zonas Industriales en donde se han encontrado altos niveles de Cr(VI), siendo las principales fuentes las curtidorías ubicadas en la ciudad de León, Guanajuato. Además, en el Estado de México existen aún grandes cantidades de Cr(VI), almacenadas de diversas fábricas que cerraron sus puertas décadas atrás sin recibir tratamiento alguno. Es por ello, que la importancia de contar con técnicas de tratamiento adecuadas ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas que sean económicas y principalmente que no representen un riesgo ambiental.

2.1.2 Marco legal para Cr(VI)

En consecuencia, las regulaciones ambientales han priorizado el riesgo de no eliminar de manera adecuada el Cr(VI) de aguas residuales y lodos industriales antes de su liberación al medio ambiente (Fu y Wang 2011). Para agua potable en los sistemas públicos, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) establece un nivel máximo de Cr(VI) de 0.05 mg L^{-1} y 2.0 mg L^{-1} para cromo total (U.S. EPA 2006). Mientras que los niveles permisibles de Cr(VI) en el agua potable, las aguas continentales superficiales y las aguas residuales industriales establecidos por la

Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) son 0.05, 0.1 y 0.25 mg L⁻¹, respectivamente (Gordon et al. 2008). En México, la norma NOM-002-ECOL-1996 establece un límite máximo permisible en promedio mensual de descargas de Cr(VI) en aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano y municipal de 0.5 mg L⁻¹. Además, para suelos agrícola, residencial y comercial, el límite máximo permisible para Cr(VI) establecido por la norma NOM-147-SEMARNAT/SSA1 es de 280 mg kg⁻¹ y de 510 mg kg⁻¹ para suelo industrial.

2.1.3 Técnicas de eliminación de Cr(VI)

Existen diversas tecnologías que se utilizan para reducir las concentraciones de Cr(VI) a niveles que cumplan con las normas ambientales establecidas (Cheung y Gu 2007b). Los métodos reportados para la remoción de Cr(VI) en efluentes residuales son principalmente, adsorción, filtración por membrana, intercambio iónico, electrólisis, reducción química y biosorción (adsorción a través de materiales biológicos, hongos, bacterias, levaduras, etc.) (Owlad et al. 2009). (a) *Adsorción*. Es un método eficaz para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con Cr(VI). El carbón activado, es el adsorbente más utilizado debido a su gran capacidad de adsorción. Sin embargo, los carbones activados comerciales son muy costosos y pueden remover unos pocos miligramos de iones metálicos por gramo de carbón (Fua y Wang 2011), aunado a los problemas de regeneración del material para su reutilización. (b) *Filtración por membrana*. Las técnicas de filtración con membrana son una gran promesa para la eliminación de iones metálicos por su alta eficiencia, fácil operación y ahorro de espacio. Los procesos con membrana más utilizados para eliminar

Cr(VI) de aguas residuales son; *ultrafiltración, ósmosis inversa, nanofiltración y electrodiálisis* (Barakat y Schmidt 2010). La eliminación de Cr (VI) por estas técnicas se realiza mediante interacciones electrostáticas entre el contaminante y la superficie de la membrana o por el tamaño molecular. Por lo tanto, el tamaño poroso de las membranas es un factor importante para evitar que los iones metálicos disueltos o los complejos de bajo peso molecular pasen a través de la membrana (Landaburu-Aguirre et al 2009). (c) *Intercambio iónico*. El proceso de intercambio iónico utiliza resinas naturales o sintéticas que tienen la capacidad específica de intercambiar sus iones con los metales pesados que están presentes en las aguas residuales (Kang et al. 2007). Normalmente, esta técnica podría verse afectada por el pH, temperatura, concentración inicial de Cr(VI) y tiempo de contacto. (d) *Tratamiento químico para la reducción de Cr(VI)*. Uno de los tratamientos más comunes es disminuir la toxicidad o movilidad del Cr(VI) transformándolo en especies menos reactivas (Cr(III)), a través de agentes químicos reductores (por ejemplo, cloruro de hierro (II), sulfato de hierro y sulfito de sodio) seguido por su precipitación en forma de hidróxidos (Huisman et al. 2006). La eficacia de esta técnica se ve opacada por la generación de residuos secundarios tóxicos que requieren un tratamiento posterior para su eliminación (Barrera-Díaz et al. 2012).

2.2 Procesos biológicos en la remoción de Cr(VI)

Una alternativa a los tratamientos anteriormente mencionados, es la biorremediación, la cual es una técnica emergente que utiliza organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, levaduras o algas) para la eliminación, degradación

o transformación de Cr(VI) (Gadd GM 2000). Algunos de los ejemplos *in-situ* y *ex-situ* para la biorremediación de iones metálicos son el cultivo del suelo, compost, el uso de biorreactores, bioventilación por oxígeno (biofiltros), bioaumentación de cultivos microbianos y la bioestimulación a partir de la adición nutrientes (Vangrosveld et al. 1994).

El interés en la aplicación de microorganismos para la biorremediación de sitios contaminados con Cr(VI), se basa principalmente en los mecanismos que emplean para la transformación de iones metálicos. Las bacterias, han sido ampliamente estudiadas debido a las enzimas cromato reductasas que poseen. La presencia de dichas proteínas, así como, de otros compuestos donadores de electrones, como son la glucosa, sucrosa, fructosa, etc., ofrecen una reducción más alta de Cr(VI) (Cheung y Gu 2007b).

Por otro lado, los hongos tienen una gran afinidad por los iones metálicos en comparación con otros microorganismos, pudiendo acumular metales por medio de diversos mecanismos biológicos. Estos mecanismos les proveen a los hongos la capacidad para producir enzimas extracelulares, o de adsorber los iones metálicos en su pared celular la cual presenta sitios de unión específicos (grupos hidroxilo, amino y carboxilo) (Preetha y Viruthagiri 2005; Faryal et al. 2007).

2.3 Hongos metalófilos y su tolerancia a Cr(VI)

El explorar microorganismos autóctonos de sitios contaminados con metales pesados para ser aplicados principalmente en biorremediación, ha sido un tema de estudio para diversos investigadores. Los sitios contaminados son las

fuentes principales para el aislamiento de hongos metal resistentes (Gadd y White 1993), ya que son microorganismos versátiles capaces de crecer en condiciones extremas de pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes y altas concentraciones de metales (Anand et al. 2006).

Diversos autores han reportado hongos filamentosos que presentan una tolerancia significativa a Cr(VI), y que, además, son microorganismos que habitan abundantemente en sitios contaminados. Los hongos aislados de sitios contaminados con cromo, han sido evaluados para determinar su nivel de tolerancia a dicho metal (Tabla II). En el 2016, Sharma y Malaviya aislaron 26 cepas fúngicas autóctonas de suelo y lodo contaminados con Cr(VI) provenientes de aguas residuales de la industria de curtiduría. Las cepas fúngicas fueron identificadas y asignadas a los géneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Paecilomyces* y *Fusarium*; el nivel máximo de tolerancia a Cr(VI) (> 300- 500 mg L⁻¹) de cada una de ellas fue reportado en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Por su parte, Arshad y Aishatul en el 2016 aislaron una cepa de *Aspergillus niger* proveniente de un campo de cultivo que era regado con aguas residuales en la India. La tolerancia para Cr(VI) reportada por *A. niger* en dicho estudio fue de 400 mg L⁻¹. En general, los hongos del género *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son los comúnmente aislados de sitios contaminados con Cr(VI) presentando una alta tolerancia a este metal. Se han reportado diversas tolerancias para Cr(VI) por *Aspergillus sp.*, de 600 mg L⁻¹ (Bennett et al. 2013), 650 mg L⁻¹ (Ezzouhri et al. 2009) y 200 mg L⁻¹ (Ahmad et al. 2006). Además, otras especies del mismo género como son *A. flavus*, *A. niger* (Bennett et al. 2013) y

A. versicolor (Das SK et al. 2008), han presentado concentraciones máximas de tolerancia para Cr(VI) de 600 hasta 1000 mg L⁻¹.

TABLA II
TOLERANCIA A Cr(VI) POR HONGOS METALÓFILOS

Hongo	Sitio de aislamiento	Tolerancia (mg L ⁻¹)	Medio	Ref.
<i>Cladosporium perangustum</i>	Suelo y lodos industriales de curtidurías (India)	>300	Sólido/ Líquido	(Sharma y Malaviya 2016)
<i>Penicillium commune</i>		>500		
<i>Paecilomyces lilacinus</i>		>300		
<i>Fusarium equiseti</i>				
<i>Aspergillus niger</i>	Campo de cultivo (India)	350-400	Sólido	(Arshad y Aishatul 2015)
<i>Fusarium clamydosporium</i>	Curtiduría de pieles (India)	500	Sólido	(Sharma y Malaviya 2014)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Curtiduría de pieles (India)	800	Sólido	(Jayanthi et al. 2014)
<i>Aspergillus niger</i>		512	Líquido	
<i>Aspergillus sp.</i>		600		
<i>Aspergillus niger</i>		600		
<i>Aspergillus flavus</i>		600		
<i>Helminthosporium sp.</i>		800		
<i>Aspergillus niger</i>		1000		
<i>Aspergillus versicolor</i>	Suelo y agua (Bulacan-Filipinas)	1000	Líquido	(Bennett et al. 2013)
<i>Scopulariopsis sp.</i>		1000		
<i>Curvularia sp.</i>		1000		
<i>Humicola grisea sp.</i>		400		
<i>Nannizzia sp.</i>		600		
<i>Fusarium sp.</i>	1000			
<i>Fusarium solani</i>	Curtiduría de pieles (India)	1000	Líquido	(Sen y Dastidar 2011)
<i>Penicillium sp.</i>	Agua y sedimento (Río Moghogha)	1040	Sólido	(Ezzouhri et al. 2009)
<i>Aspergillus sp.</i>		650		
<i>Fusarium sp.</i>		1300		
<i>Aspergillus versicolor</i>	Efluente de curtiduría (India)	1000	Sólido	(Das et al. 2008)

Para el caso del género *Fusarium*, se han reportado tolerancias para Cr(VI) de las especies, *F. sp.* (Ezzouhri et al.2009) y *F. solani* (Iram et al. 2012) de 1300 y 1000 mg L⁻¹, respectivamente. *Penicillium*, es uno de los géneros de hongos con mayor tolerancia reportada para Cr(VI), con una resistencia reportada a concentraciones de 500- 1000 mg L⁻¹ para *P. sp.*, *P. commune* y *P. chrysogenum* (Ezzouhri et al. 2009; Jayanthi et al. 2014; Sharma y Malaviya 2016).

La tolerancia a metales por estos microorganismos se traduce en su capacidad para sobrevivir a la toxicidad de los metales por medio de mecanismos producidos como respuesta directa a las especies metálicas (Ahmad et al. 2005). Lo anterior, como resultado de las interacciones entre el metal y el microorganismo en donde no sólo involucra a la pared celular, el periplasma, membrana plasmática, citoplasma, sino también, a los organelos celulares (Cervantes et al. 2006).

2.4 Mecanismos de interacción entre hongos metalófilos y Cr(VI)

De forma natural, los hongos se encuentran interactuando con metales como parte de su entorno, o para el caso del Cr(VI), por la introducción de éste debido a las actividades humanas. Los hongos poseen una variedad de propiedades que pueden influir en su interacción con los metales, ya que el crecimiento “normal” y el metabolismo de estos microorganismos, dependen de estas interacciones para satisfacer muchas veces, su necesidad de metales traza y nutrientes asociados (Gadd GM 2007). Sin embargo, los metales pesados esenciales tales como cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel; y otros cuyo papel biológico es desconocido como el cromo, el cadmio, el plomo, el

mercurio y la plata, podrían ser tóxicos si se encuentran en gran cantidad (Hughes y Poole 1991; Gadd GM 1993b).

En la Figura 2, se muestran los mecanismos involucrados en la detoxificación y transformación de metales por hongos, incluyendo mecanismos que restringen la entrada a la célula y la detoxificación intracelular o compartimentación organelar, esta última característica sólo de eucariotas.

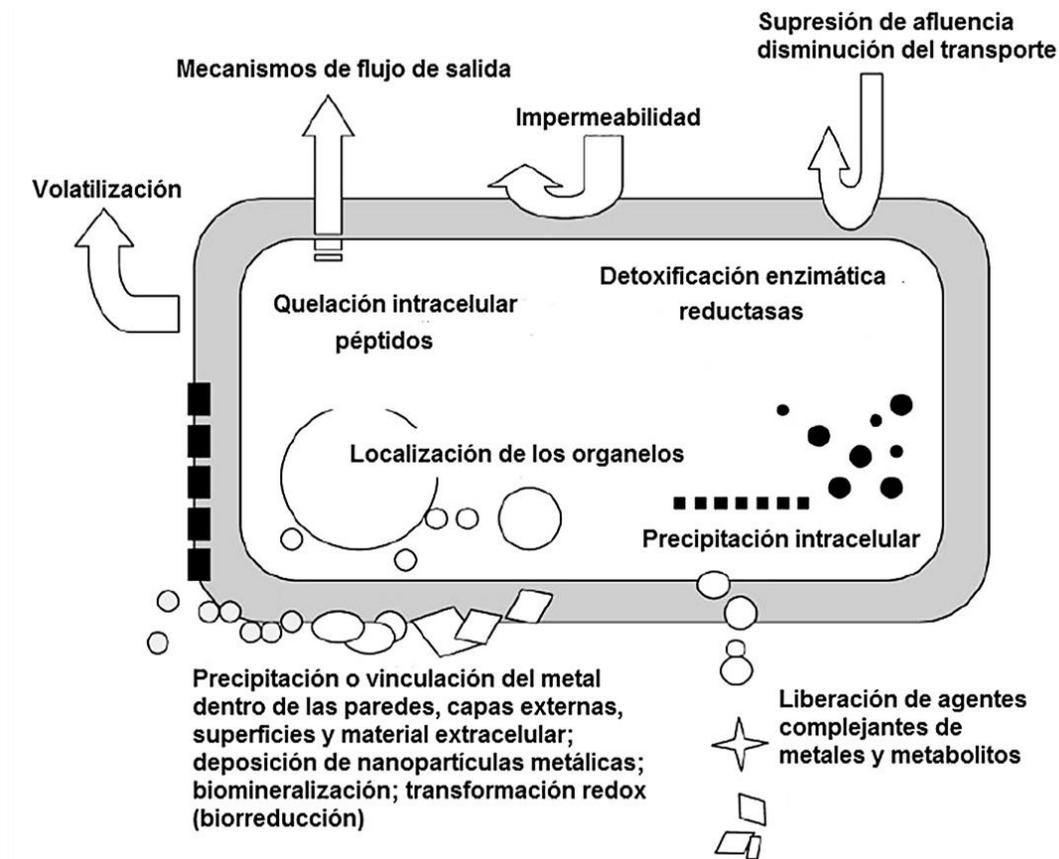


Figura 2. Mecanismos involucrados en la detoxificación de metales por hongos (Gadd GM 2010).

Los mecanismos empleados por los hongos pueden ser dependientes o independientes de su metabolismo. Algunos de ellos, pueden estar involucrados en fenómenos de transporte que contribuyen a disminuir la captación y/o el flujo de salida. Así mismo, pueden efectuar quelación, precipitación intracelular, y

transformaciones redox, este último pudiendo resultar en la deposición de partículas metálicas extracelulares (Gadd GM 2010).

2.4.1 Mecanismos intracelulares

Las cepas fúngicas requieren detectar y regular los niveles intracelulares de Cr(VI) a través de sistemas de homeostasis que mantienen un balance entre la incorporación, expulsión y captura del metal (Corona y Saldaña 2010). En el mecanismo intracelular, las proteínas de transporte del Cr(VI) pueden estar involucradas en la tolerancia o extrusión del Cr(VI) tóxico desde el citosol de la célula, o permitiendo el secuestro del Cr(VI) en el compartimiento vacuolar (Bellion et al. 2006). Los compuestos tiol incluyendo el glutatión (GSH), son a menudo considerados como agentes antioxidantes (Halliwell y Gutteridge 2007) y quelantes intracelulares, sin embargo, ellos mismos pueden generar radicales libres que pueden ser perjudiciales para las membranas biológicas (Pócsi et al. 2004). En el 2012, Pesti y colaboradores realizaron un estudio de la toxicidad del Cr(VI) a nivel molecular: la caracterización de radicales libres y el metabolismo del glutatión en una cepa de *Schizosaccharomyces pombe* mutante y sensible al Cr(VI). La bioacumulación y reducción de los aniones de Cr(VI) mostraron cierto acoplamiento dentro de la célula, como resultado del gradiente de concentración del Cr(VI) a través de la membrana plasmática y cuya eliminación del Cr(VI) por vías no específicas de transportadores de sulfato se mantuvo por la rápida reducción enzimática y no enzimática del ión CrO_4^{2-} . Entre los reductores no enzimáticos, es el glutatión el que desempeña un papel destacado en la reducción intracelular del Cr(VI) (Pesti et al. 2002).

Por otro lado, la metalotioneína, es otro de los quelantes intracelulares de primordial importancia en la amortiguación de las concentraciones de Cr(VI) en el interior de la célula (Clemens 2001). Estos péptidos son ricos en cisteína y tienen un bajo peso molecular, lo que les permite a los hongos mantener la homeostasis de los iones intracelulares y contribuir en la desintoxicación de Cr(VI) en la célula (Zhu et al. 2009). Se han evaluado la desintoxicación y homeostasis metálica del hongo ectomicorrícico *Pisolithus albus*, a partir de la inducción de la metalotioneína, cuyo funcionamiento aumentó con el incremento en la concentración de metales (Reddy et al. 2015).

2.4.2 Mecanismos extracelulares

Los hongos son capaces de restringir la entrada del Cr(VI) a la célula, a partir de mecanismos biológicos extracelulares, como son: (1) la captación del Cr(VI) reducido y/o por el aumento del flujo de salida del metal; (2) la inmovilización del Cr(VI), por ejemplo, por adsorción en la pared celular, la precipitación extracelular de minerales secundarios neoformados (por ejemplo oxalatos); y (3) el secuestro extracelular del Cr(VI) por exopolisacáridos y otros metabolitos extracelulares (Gadd GM 1993a; Macreadie et al. 1994; Blaudez et al. 2000; Perotto et al. 2002; Baldrian 2003).

Diferentes moléculas orgánicas y ácidos di- y tricarbónicos particulares pertenecientes a la pared celular, son excretadas por las células fúngicas para quelar Cr(VI) (Landeweert et al. 2001). La quelación de Cr(VI) por metabolitos de pequeña masa molecular, péptidos y proteínas es un elemento importante y crucial en casi todos los procesos de detoxificación de metales por hongos

(Tamás et al. 2006; González-Guerrero et al. 2009) y por eso no pueden sobreestimarse las reacciones de quelación tanto extracelulares y citosólicas (Banfálvi 2011). Por ejemplo, la secreción del glutatión es un elemento muy importante en la homeostasis de levaduras bajo diferentes condiciones ambientales (Perrone et al. 2005), así como, la presencia de pigmentos en su pared celular. La incorporación de melanina en la pared celular puede aumentar la capacidad de unir las especies de Cr(VI) (Fogarty y Tobin 1996); proceso que se llama biosorción, y no depende de la actividad metabólica del hongo.

2.4.3 Biosorción

La capacidad de los hongos para actuar como biosorbentes ha sido ampliamente evaluada, demostrando excelentes habilidades para secuestrar Cr(VI) (Kapoor y Viraraghavan 1995). Lo anterior, como resultado de la unión del Cr(VI) con componentes de la pared celular, principalmente, polisacáridos (galactosamina, quitina, glucano) y una cantidad menor de proteínas, lípidos y melaninas. Por ello, la pared celular fúngica es considerada como un mosaico de grupos funcionales y posee principalmente grupos carboxilo (-COOH), fosfato (PO_4^{3-}), amino (-NH₂), tiol (-SH), e hidróxido (-OH) (Bellion et al. 2006), los cuáles funcionan como sitios de interacción entre el hongo y el Cr(VI) y, en donde se pueden formar complejos de coordinación y/o intercambio iónico con las especies aniónicas del Cr(VI).

Además, tiene funciones protectoras y de acción ofensiva, es decir, actúa como una barrera inicial que está en contacto con ambientes hostiles en donde se encuentran los hongos y también, alberga en su pared celular muchas moléculas hidrolíticas y tóxicas que le permite defenderse de dichos ambientes

(Cañizares-Villanueva 2000). La pared celular de los hongos se compone de glucoproteínas y polisacáridos, principalmente, glucano y quitina. La quitina, es un homopolímero lineal de cadena larga compuesto de unidades de N-acetilglucosamina unidas entre sí con enlaces β -1,4 (Bowman y Free 2006), ver Figura 3.

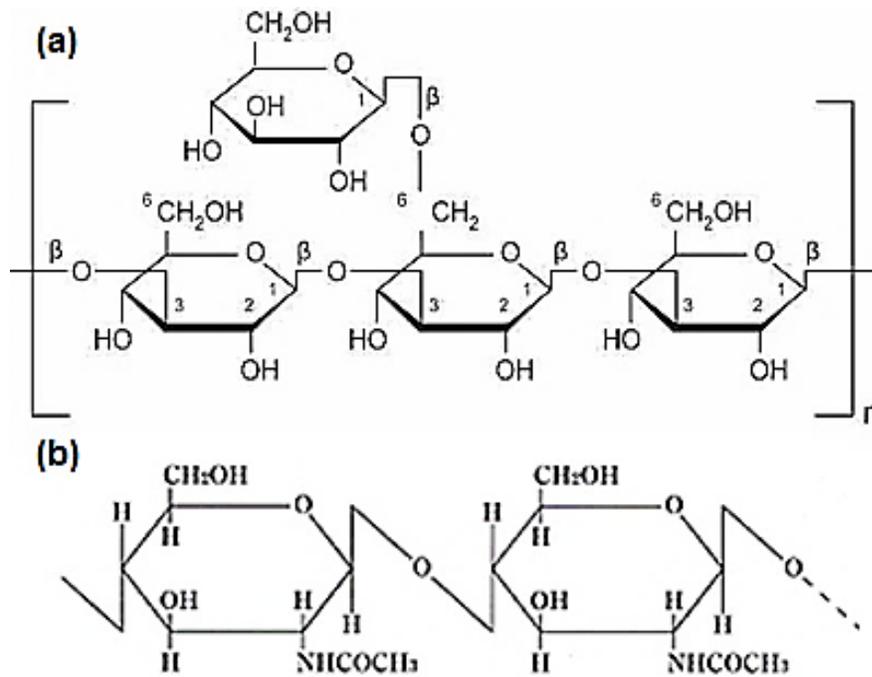


Figura 3. Componentes principales de la pared celular de los hongos.
(a) β -1,3-glucano; (b) quitina

El contenido de quitina presente en la pared celular de levaduras, se estima entre el 1-2% por peso seco, mientras que, en la pared celular de los hongos filamentosos, tales como *Neurospora* y *Aspergillus* se reporta entre el 10-20%. El glucano es el principal polisacárido estructural de la pared fúngica, constituye aproximadamente entre el 50-60% de la pared en peso seco. Los polímeros del glucano se componen de residuos de glucosa repetidos, que se ensamblan en cadena a través de una variedad de enlaces químicos. En general, entre el 65-

90% del glucano de la pared celular se encuentra como β -1,3-glucano (Bowman y Free 2006).

Las biomásas fúngicas se pueden utilizar tanto vivas como muertas, pero para la eliminación de metales la biomasa inactiva es preferible, sobre todo en el área de tratamiento de aguas residuales, ya que no se ven afectadas por los desechos tóxicos y productos químicos, evitando la contaminación del medio ambiente mediante la liberación de toxinas (Prigione et al. 2009).

Macaskie y Cañizares (1990), han recopilado las ventajas e inconvenientes que presentan el uso de una u otra biomasa.

a) Biomasa viva

Ventajas:

- A pesar de la saturación celular, el sistema se auto-restablece debido al crecimiento.
- Los metales son depositados en un estado químico alterado, y menos sensible a la desorción espontánea.
- La actividad metabólica puede ser la única forma económica de lograr cambios de valencia o de degradar compuestos organometálicos.
- Las cepas pueden ser mejoradas mediante manipulación genética.
- Se pueden emplear dos o más microorganismos de forma sinérgica.

Desventajas:

- Sólo pueden tratarse medios líquidos con baja concentración metálica, para evitar la toxicidad.

- Todos los medios líquidos o corrientes si se opera en continuo deben estar bajo condiciones fisiológicas.
- Los nutrientes no consumidos y productos metabólicos generados estarán en el medio líquido.
- Los productos metabólicos pueden formar complejos con los metales.
- La recuperación de los metales por desorción es limitada debido a que pueden formarse uniones intracelulares.

b) Biomasa muerta (Necromasa)

Ventajas:

- Su uso es independiente del crecimiento. No está sujeta a limitaciones de toxicidad. No necesita nutrientes, ni es preciso eliminar productos en su caso.
- El proceso de biosorción no está gobernado por limitaciones biológicas.
- Si se utiliza la biomasa inmovilizada, la técnica de inmovilización no viene impuesta por ilimitaciones de toxicidad o inactividad térmica
- La biomasa es rápida y eficiente en la recuperación de metales del medio líquido, comportándose como un intercambiador de iones.
- Los metales pueden ser fácilmente liberados y recuperados.

Desventajas:

- Rápida saturación, cuando los sitios de interacción con el metal están ocupados hay que eliminar el metal, antes de poder usar de nuevo la biomasa.
- La adsorción es muy sensible al pH.

- Las especies organometálicas no son susceptibles de degradación.
- La mejora de estos procesos es limitada, ya que las células no efectúan el metabolismo y la producción de la biomasa ocurre en una etapa anterior de crecimiento.

Durante la biosorción no dependiente del metabolismo celular, la adsorción del metal es por interacciones fisicoquímicas entre el metal y los grupos funcionales del biosorbente en la superficie celular microbiana. Dichas interacciones dependen de diversos factores, tales como:

(a) **pH.** La eliminación de Cr(VI) en solución acuosa utilizando biomasa viva y muerta de *Aspergillus niger*, fue evaluado por Holda, A., y colaboradores (2015). El pH fue factor más representativo en la eliminación de Cr(VI), la remoción completa de Cr(VI) utilizando biomasa muerta, se alcanzó únicamente a bajos valores de pH (1 y 2) con un menor tiempo de contacto. Por el contrario, el procesos de eliminación de Cr(VI) con biomasa viva, fue más intensivo en los primeros 5 días de formación del micelio, mostrando una mayor eficacia cuando el pH asciende a 4 (Holda y Mlynarczykowska 2016). Diversas especies del género *Aspergillus* han sido estudiadas como biosorbentes para la remoción de Cr(VI), Sivakumar en el 2016, evaluó el efecto del pH sobre la biosorción de Cr(VI) de diversas especies de *Aspergillus* (*niger*, *flavus*, *fumigatus*, *nidulans*, *heteromorphus*, *viridinutans*), encontrando a pH 3, el mayor porcentaje de biosorción para una concentración inicial de Cr(VI) de 290 mg L⁻¹. El orden de eliminación fue: *A. niger* > *A. flavus* > *A.fumigatus* > *A.*

nidulans > *A. heteromorphus* > *A. viridinutans*; con porcentajes de eliminación de 92.5, 86.7, 82.4, 81.6, 76.3 y 67.7, respectivamente (Sivakumar 2016). El proceso de biosorción depende ampliamente del pH de la solución acuosa, ya que la carga superficial de la pared celular de la biomasa se modifica con las variaciones del pH. A un pH ácido, la carga total superficial se encuentra predominantemente positiva y el ión cromato aniónico se une a los grupos cargados positivamente. A medida que el pH aumenta, la carga superficial total en la biomasa se convierte en negativo, lo que disminuye la adsorción por efectos de repulsión electrostática (Park et al. 2005).

(b) **Dosis de biomasa.** La influencia de la relación biosorbente/soluto expresada como dosis de biomasa, es un factor importante en la biosorción de Cr(VI), y así lo presentan en su estudio Kshama A. y colaboradores en el 2013. Ellos evaluaron la biomasa muerta de *Rhizopus arrhizus.*, encontrando que la eliminación de Cr(VI) fue dependiente de la concentración del biosorbente. Una dosis de biomasa de 0.5 g L⁻¹ logró un porcentaje de eliminación del 35.91% para una concentración inicial de Cr(VI) de 50 mg L⁻¹. Sin embargo, una dosis más alta de biosorbente (3 g L⁻¹), resultó en el incremento del porcentaje de eliminación de Cr(VI) del 79.22% (Shroff y Vaidya 2013). Diversos estudios han reportado a la dosis de biomasa como un factor primordial en el proceso de biosorción de Cr(VI); microorganismos como *A. niger* (Ren et al. 2015), *A. flavus* (Abubacker y Kirthiga 2013), *A. sojae* y *A. oryzae*

(Reya et al. 2012), *M. racemosus* (Liu T et al. 2007), *Pythium sp.* (Kavita et al. 2011), han mostrado el mismo comportamiento anteriormente mencionado. La disponibilidad de más sitios de unión, que representa una mayor área de adsorción, puede ser una de las razones por la que la eficiencia en la remoción de Cr(VI) aumenta al incrementarse la dosis de biomasa (Kadirvelu y Cloirec 2000). Siendo tal, que el proceso de biosorción se acelera y el equilibrio se alcanza más rápido.

(c) **Concentración inicial de Cr(VI).** La disponibilidad de los iones de Cr(VI) en solución, aumenta la capacidad de la biomasa para remover los iones metálicos, de tal forma, que la concentración inicial de Cr(VI) influye directamente en la tasa de biosorción. Khambhaty, Y., y colaboradores en el 2009, observaron que al incrementar la concentración inicial de Cr(VI) de 10 hasta 400 mg L⁻¹ de Cr(VI), la capacidad de biosorción de *Aspergillus niger* aumentó de 2.5 hasta 54.16 mg g⁻¹. En este caso, ellos establecen que una mayor concentración de iones metálicos proporciona una mayor fuerza de propulsión para superar la resistencia de transferencia de masa, entre las fases sólida y acuosa, resultando en una mayor probabilidad de colisión entre los iones de Cr(VI) y el biosorbente (Khambhaty et al. 2009).

(d) **Tiempo de contacto.** Liu, T., y colaboradores en el 2007, observaron tres fases de eliminación de Cr(VI) en el proceso de biosorción, utilizando biomasa de *Mucor racemosus*. La primera fase, fue la etapa más rápida de eliminación de Cr(VI), representando la eliminación de casi la mitad de la concentración total del metal en la primera hora de

contacto. Posteriormente, la segunda etapa se ve fuertemente representada por la reducción del Cr(VI), debido al aumento de Cr(III) en solución (1 h y 8 h), alcanzando un equilibrio a las 8 horas, aproximadamente. Finalmente, entre 8 h y 24 h de contacto, el aumento de eliminación y reducción fue sólo 6.7% y 0.1%, respectivamente. Logrando que casi todos los iones de Cr(VI) se eliminaran en 24 horas, cuando la concentración inicial de Cr(VI) era por debajo de 100 mg L⁻¹ (Liu T et al. 2007). La primera fase, en donde se obtiene el mayor porcentaje de eliminación a un menor tiempo de contacto, se atribuye a la disponibilidad de sitios de unión, los cuales con el paso del tiempo comienzan a ocuparse por los iones metálicos incrementándose el tiempo para la eliminación de estos en solución.

(e) **Temperatura.** El proceso de biosorción de Cr(VI) por micelio vivo de *Trichoderma harzianum* estudiado por Sarkar, S., y colaboradores en el 2013, mostró el papel significativo que juega la temperatura durante el proceso de eliminación del ión metálico. Un aumento en la temperatura (20-30) °C mostró el incremento de eliminación del Cr(VI), observándose a 30 °C, la temperatura óptima para la máxima remoción. A dicha temperatura, el porcentaje de biosorción de Cr(VI) fue del 90%, sin embargo, el porcentaje de eliminación se redujo un 20% al incrementarse la temperatura a 40 °C. Lo anterior sugiere, que al utilizarse biomasa viva, temperaturas por encima de la óptima para el crecimiento de los hongos, actividad enzimática, vehículos de transporte e integridad de la membrana celular, pueden verse afectados obstaculizando el proceso (Soumik 2013).

La temperatura influye en la biosorción al afectar la configuración y estabilidad de la pared celular de los hongos. Además, la naturaleza exotérmica de algunos procesos de biosorción ocasiona la disminución de la capacidad de biosorción de algunos biosorbentes al aumentar la temperatura de operación (Tahir et al. 2014).

En el 2005, Park y colaboradores definieron cuatro modelos de biosorción de Cr(VI); (1) *biosorción aniónica*, (2) *biosorción acoplada a la reducción*, (3) *biosorción catiónica y aniónica* y, (4) *biosorción aniónica y reducción*.

(1) *Biosorción aniónica*. Las especies aniónicas de Cr(VI), cromato (CrO_4^{2-}) y/o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), se unen a la superficie de la biomasa fúngica a través de la atracción electrostática existente entre los grupos funcionales cargados positivamente, como son: aminas protonadas, presentes en la quitina y quitosano, y las especies aniónicas del Cr(VI). Por lo anterior, este mecanismo está influenciado principalmente en el pH del medio, ya que la protonación de los grupos funcionales participantes se logra a valores bajos del mismo.

(2) *Biosorción acoplada a la reducción*. La adsorción de Cr(VI) por la biomasa fúngica sucede mediante dos mecanismos basados en la reducción del Cr(VI) a Cr(III). El mecanismo I (directo), sucede al contacto del Cr(VI) con los grupos funcionales donadores de electrones de la superficie de la biomasa, en un medio ácido. Posteriormente, parte del Cr(III) resultante de la reducción, es adsorbido en la superficie de la biomasa, la cual dependerá de su naturaleza. Por otro lado, el mecanismo II (Indirecto),

sucede en tres etapas: (i) las especies aniónicas del Cr(VI) se unen a los grupos funcionales protonados de la pared celular fúngica; (ii) una vez adsorbidas las especies aniónicas del Cr(VI) en la pared celular de la biomasa, estas interaccionan con grupos funcionales adyacentes con potenciales de reducción inferior al del Cr(VI), reduciéndose a Cr(III); (iii) el Cr(VI) reducido se libera de la superficie de la biomasa como Cr(III) por repulsión electrostática entre este y los grupos cargados positivamente. En la Figura 4, se muestra el esquema que representa los mecanismos propuestos por Park y colaboradores, explicando gráficamente lo que sucede en la biomasa muerta de los hongos al interactuar con el Cr(VI).

(3) *Biosorción catiónica y aniónica.* En relación a lo mencionado anteriormente, una parte del Cr(VI) puede ser reducido a Cr(III) y de acuerdo con la naturaleza funcional de la pared celular de la biomasa, tanto el cromo hexavalente (aniónico) como el cromo trivalente (catiónico), pueden ser adsorbidos por la biomasa en reacciones simultáneas.

(4) *Biosorción aniónica y reducción.* De acuerdo con este mecanismo y tal como lo explica Park y colaboradores (2005), una parte del Cr(VI) se reduce a Cr(III) por interacción con la biomasa, y principalmente, el Cr(VI) es adsorbido mientras que el Cr(III) permanece en solución.

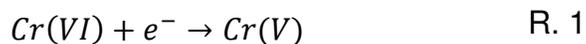
eliminación de Cr(VI) en presencia de iones sulfato, como competidor directo del cromato, además, de inhibidores metabólicos con el fin de impedir la acumulación del Cr(VI), provocaron una disminución en la eliminación de Cr(VI), demostrando la participación del transportador activo del sulfato. Además, los estudios por TEM-EDXA (Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X acoplada a TEM), revelaron presencia de cromo en la pared celular y en el citoplasma (Das SK y Guha 2009).

2.4.5 Biorreducción de Cr(VI) por hongos

La reducción del Cr(VI) por hongos, se ha considerado como un mecanismo adicional de estos microorganismos para dar respuesta a la toxicidad del Cr(VI), ya que dentro de las células microbianas fúngicas el Cr(VI) puede ser reducido a Cr(III) por sistemas reductores (Corona y Saldaña 2010). El Cr(VI) se transporta activamente a través de la membrana biológica tanto en microorganismos procariotas como eucariotas. Una vez dentro de las células microbianas, el Cr(VI) se reduce a Cr(III), probablemente a través de la formación de dos estados intermediarios inestables el Cr(V) y Cr(IV). Después de que el Cr(VI) entra en la célula como un poderoso agente oxidante, este puede ser reducido por vías enzimáticas (directa) y / o no enzimáticas (indirecta) (Ksheminska et al. 2006), pero para las células microbianas eucariotas, especialmente levaduras y hongos, el conocimiento de los sistemas de reducción de cromato es aún incierto (Gadd GM 2010).

Los estudios que se han realizado con microorganismos bioacumuladores de Cr(VI) (Dönmez y Aksu 2002; Baldrian 2003; Dursun et al. 2003; Zouboulis et

al. 2004; Dönmez y Kocberber 2005) han demostrado que la eliminación de Cr(VI) incluye las siguientes etapas: (1) la unión del Cr(VI) a la superficie celular, (2) la translocación del Cr(VI) a la célula, y (3) la reducción del Cr(VI) a Cr(III). En esta última etapa, se han sugerido dos etapas de reacción de reducción (Suzuki et al. 1992): en la primera, el Cr(VI) acepta una molécula de NADH, generando Cr(V) como un producto intermediario (R. 1), para después, el Cr(V) formado acepta dos moléculas de electrones y forma el Cr(III) (R. 2). De esta forma, se ha establecido que el NADH, NADPH y electrones de la reserva endógena, participan como donadores de electrones en el proceso de reducción del Cr(VI) (Appenroth et al. 2000).



(a) Biorreducción enzimática (directa)

Para las células microbianas eucariotas los sistemas de reducción de cromato por enzimas es aún incierto (Ksheminska et al. 2006). En bacterias, se ha indicado la existencia de proteínas ChrA que forman parte de una superfamilia de transportadores de cromato (CHR), y que probablemente están implicadas en el transporte de sulfato y cromato (Nies et al. 1998). Actualmente, se incluyen 135 secuencias de homólogos de las proteínas CHR incluyendo proteínas de origen eucariótico, entre ellas algunos hongos filamentosos (Cervantes et al. 2001).

Yanling Gu y colaboradores en el 2015, sugieren un mecanismo sobre la reducción enzimática de Cr(VI) a partir de *Aspergillus niger*. Analizaron la capacidad de reducción de los componentes intracelulares y confirmaron que el

Cr(VI) reducido en *A. niger* depende principalmente del extracto libre de células, como en la mayoría de los casos de bacterias, en donde la actividad de la cromato reductasa está relacionada con la fracción intracelular (Myers y Myers 1993; Ravindranath et al. 2011). Sometieron el extracto libre de células a altas temperaturas (95 °C) en la que la proteína puede desnaturalizarse, afectando así la capacidad de reducción y comprobando la actividad enzimática en el proceso (Gu et al. 2014). Otros estudios, *Candida maltosa* (Calvo-Méndez et al. 2004), *Penicillium sp.* (Acosta-Rodríguez et al. 2015), *Pichia jadinii* (Ksheminska et al. 2003), *Aspergillus tubingensis* Ed8 (Coreño-Alonso et al. 2009), han demostrado una alta actividad específica de la cromato reductasa en el extracto crudo (sobrenadante), no así, en la fracción de membrana. Lo que indica, que la cromato reductasa es una enzima citosólica, semejante a las enzimas que se encuentran en las bacterias cromato resistentes.

(b) Biorreducción no enzimática (indirecta)

Una vez que el Cr(VI) entra a la célula este puede ser reducido a Cr(V), a través de ciertas moléculas reductoras no enzimáticas como el ácido ascórbico, glutatión, cisteína, peróxido de hidrógeno o riboflavina (Villegas et al. 2008). Pesti y colaboradores en el 2002, reportaron al glutatión en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* como un posible agente protector contra la toxicidad del Cr(VI) (Pesti et al. 2002). Además, Acevedo-Aguilar y colaboradores en el 2006, estudiaron la reducción del Cr(VI) a Cr(III) por dos cepas de hongos filamentosos resistentes (*Aspergillus sp.* Ed8 y *Penicillium sp.* H13), autóctonas de residuos industriales contaminados con Cr(VI). Los resultados determinaron la capacidad de estas cepas para reducir Cr(VI) presente en el medio de

crecimiento sin acumular Cr(VI) en la biomasa al final del proceso. Dicho comportamiento no se observó cuando utilizaron un extracto libre de células, lo que indicó que la reducción de Cr(VI) por las cepas Ed8 y H13 no implicó la participación directa de alguna proteína (cromato reductasa), sino que estuvo basado principalmente en el poder reductor de la fuente de carbono y que fue llevado a cabo extracelularmente. Por otro lado, se ha descrito la captura de cromo en la superficie de hongos filamentosos y de levaduras, como resultado de su unión con componentes de la pared celular, principalmente polisacáridos (Volesky y Holan 2003).

2.5 Aplicaciones tecnológicas de la biorreducción de metales por hongos

- ***Biorremediación de sitios contaminados con Cr(VI)***

Los compuestos de Cr(VI) son oxidantes fuertes y pueden reducirse fácilmente a Cr(III) en presencia de donantes de electrones como materia orgánica e inorgánica. Se han realizado extensas investigaciones para obtener productos biológicos que ayuden en la remediación a gran escala de la tierra, el agua y las aguas residuales contaminadas con metales pesados. Existen estudios que muestran la notable capacidad de los hongos para reducir completamente altas concentraciones de Cr(VI) bajo condiciones aerobias, ver Tabla III, lo que permite que los metales sean transformados in situ en formas insolubles. Los procesos de inmovilización son particularmente aplicables a la eliminación de metales de fases móviles tales como aguas subterráneas y lixiviados.

TABLA III
ESTUDIOS DE BIORREDUCCIÓN DE Cr(VI) POR HONGOS

Hongo	pH	Tiempo (h)	[Cr(VI)] ₀ mg L ⁻¹	Inóculo	% Reducción	Referencias
<i>A. niger</i>	4.5 ±0.5	96	50	Micelio activo	48.7	(Shugaba y Buba 2012)
<i>A. parasiticus</i>					43.6	
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	5.5	120	200	Biomasa muerta	100	(Sharma y Adholeya 2011)
<i>Paecilomyces sp.</i>	4.0	168	50	Micelio activo	100	(Acosta y Cárdenas 2010)
<i>A. niger var tubingensis Ed8</i>	5.0	24	50	Micelio activo	95	(Coreño-Alonso et al. 2009)
<i>T. inhamatum</i>	6.0	192	470	Micelio activo	100	(Morales y Urbina 2008)
<i>A. awamori</i>	1.5	48	25	Biomasa muerta	29	(Gochev et al. 2010)
<i>A. spp.</i>	1.0	-	360	Micelio activo	68	(De Sotto et al. 2015)
<i>A. flavus</i>	4.5	120	50	Micelio activo	99.2	(Sathvika et al. 2015)
<i>A. flavus</i>					99	
<i>A. niger</i>	2.0	168	150	Micelio activo	98	(Bennett et al. 2013)
<i>A. sp.</i>					98	
<i>Auricularia polytricha</i>	1.0	54	10	Biomasa muerta	97	(Zheng et al. 2014)
<i>Mucor racemosus</i>	1.0	24	100	Biomasa muerta	50	(Liu et al. 2007)
<i>Rhizopus oryzae</i>	7.0	72	400	Micelio activo	91.15	(Sukumar M 2010)
<i>A. niger</i>	6.2	168	50	Micelio activo	99.6	(Rivera -Martínez et al. 2015)
<i>P. chrysogenum</i>	5.0	48	50	Micelio activo	100	(Pazouki et al. 2007)

- **Recuperación de metales con valor industrial**

Generalmente, el enfoque de los tratamientos comúnmente utilizados para la eliminación de residuos de metales permite únicamente su eliminación, desechándolos como lodos y evitando su reutilización. Es por ello, que la reutilización de estos metales como materias primas puede resultar económico para diversos procesos en los que las fuentes naturales de metales están disminuyendo (Chen y Lim 2002). La reducción de metales nobles no sólo permite la recuperación de metales valiosos, también es una vía para la síntesis de nanopartículas y nanomateriales (Makarov et al. 2014). Las nanopartículas han sido sintetizadas por mucho tiempo a partir de vías químicas y físicas las cuales se asocian a ciertas limitaciones como son el uso de químicos tóxicos, alto costo operacional y consumo de energía. Los métodos químicos necesitan agentes reductores como borohidruro de sodio, ácido ascórbico, citrato trisódico o alcoholes, los cuales pueden aumentar la reactividad y toxicidad de las partículas reduciendo su aplicación principalmente en áreas biomédicas. Por otro lado, los métodos físicos requieren un enorme consumo de energía para mantener una alta temperatura y presión en el proceso de síntesis (Li et al. 2011).

La síntesis biogénica de nanopartículas metálicas implica la biorreducción de sales metálicas a metal elemental que puede ser estabilizado por moléculas orgánicas presentes en los microorganismos tales como hongos. La función de estos microorganismos como agentes reductores, encapsuladores y productores de estabilizantes naturales, ha atraído la atención de investigadores, debido a que ofrecen un método limpio, no tóxico y respetuoso con el medio ambiente (Siddiqi y Husen 2016). Se ha demostrado que los hongos tienen la capacidad

de producir nanopartículas con una amplia gama de tamaños, formas, composiciones y propiedades fisicoquímicas (Mohanpuria et al. 2008). El proceso biosintético por hongos puede llevarse a cabo de manera intracelular o extracelular, de forma enzimática o por moléculas propias de las células fúngicas que incluyen proteínas, pigmentos y azúcares (Moghaddam et al. 2015). El método intracelular consiste en el transporte de iones al interior de la célula microbiana para formar las nanopartículas en presencia de enzimas. La síntesis extracelular de nanopartículas implica atrapar los iones metálicos sobre la superficie de las células (biomasa fúngica) y reducir los iones en presencia de enzimas (Zhan et al. 2011). Además, la biosíntesis extracelular también puede llevarse a cabo a partir de la biomasa fúngica crecida en condiciones óptimas (pH, temperatura, agitación, nutrientes, etc.) y puesta en contacto con agua desionizada para su posterior filtración. El sobrenadante (extracto fúngico) se utiliza para sintetizar nanopartículas mediante la adición de una sal metálica (Malik et al. 2014). Tres posibles mecanismos han sido propuestos para explicar la micosíntesis de nanopartículas metálicas; mediante la enzima nitrato reductasa; por quinonas transportadoras de electrones (Sarkar et al. 2012); reductasas dependientes de la α -NADPH (Anil Kumar et al. 2007).

Al principio del proceso de biosíntesis (ver Figura 5), la reducción bioquímica de las sales metálicas comienza casi inmediatamente. Existe un periodo de activación inicial cuando los iones metálicos del proceso se convierten de sus estados de oxidación mono, di, o tri- valente a estados de valencia cero y tiene lugar la nucleación de los átomos metálicos reducidos. Posteriormente, surge un período de crecimiento cuando las partículas vecinas más pequeñas

coalescen para formar nanopartículas más grandes que son termodinámicamente más estables. A medida que el crecimiento progresa, las nanopartículas se agrupan para formar una variedad de morfologías tales como cubos, esferas, triángulos, hexágonos, etc. (Akhtar et al. 2013). En la etapa final de síntesis, la capacidad del extracto fúngico para estabilizar la nanopartícula influye en el comportamiento de agregación de los “clusters” y proporciona mediante fuerzas repulsivas una estabilización electrostática (iones citrato) o una estabilización estérica (polímeros).

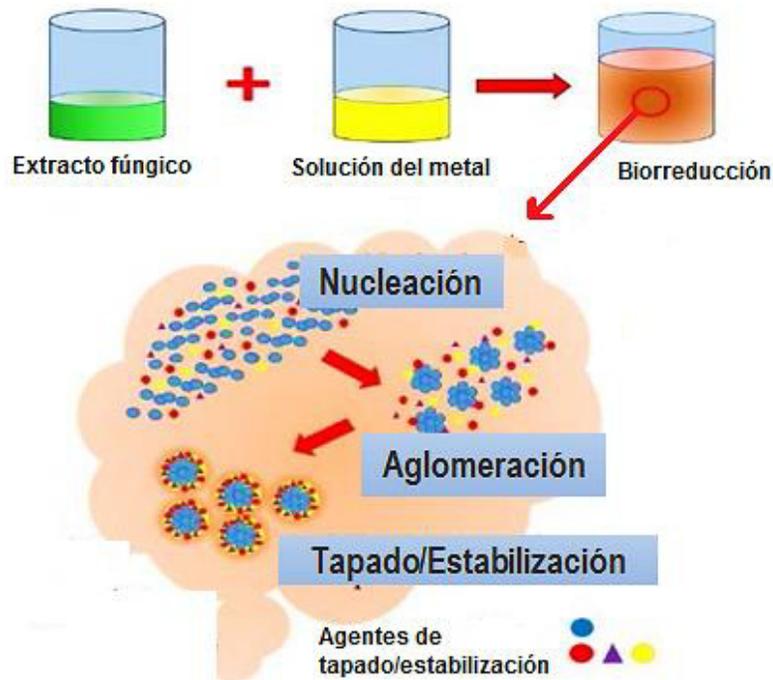


Figura 5. Síntesis biológica de nanopartículas utilizando extracto de hongos. (Shah et al. 2015).

Además, los ligando orgánicos como tioles (-SH) (polímeros con grupos mercapto) con una fuerte afinidad a las superficies metálicas pueden suprimir la agregación de las nanopartículas (Polte 2015). Las propiedades del extracto de hongos tales como su concentración, concentración de sales metálicas, tiempo

de reacción, pH de la solución de reacción y temperatura influyen significativamente en la calidad, el tamaño y la morfología de las nanopartículas sintetizadas (Mittal et al. 2013).

Las nanopartículas de oro son de interés, principalmente debido a su estabilidad en condiciones atmosféricas, la resistencia a la oxidación y la biocompatibilidad (Sarkar et al. 2012). Estas propiedades únicas pueden potencialmente ser explotadas en una amplia gama de aplicaciones industriales utilizando sus propiedades ópticas y electrónicas en óptica, electrónica, diagnóstico y diversas aplicaciones biomédicas. Por otro lado, resultados recientes han demostrado que los AgNPs, debido a sus características especiales, tienen un inmenso potencial para aplicaciones como agentes antimicrobianos, antiparasitarios y antiincrustantes (agentes terapéuticos y en sistemas de purificación de agua, etc.).

Diversas cepas de hongos se han utilizado como recursos prometedores para la fabricación de nanopartículas de Au y Ag de forma intra y extracelular, resaltando los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*. En la Tabla IV, se observan los estudios realizados en los últimos 5 años, cuya localización principal de las nanopartículas de Ag y Au a partir de hongos se da de manera extracelular utilizando filtrado libre de células, con formas principalmente esféricas y de tamaños variables (1-172 nm).

TABLA IV
BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y PLATA POR HONGOS

Hongo	Metal-NPs	Localización	Forma	Tamaño (nm)	Referencia
<i>Penicillium expansum</i>	Ag	Extracelular/biomasa	Esférica/ cúbica	30-150	(Mohammadi y Solouti 2015)
<i>Penicillium chrysogenum</i>					
<i>Trichoderma sp.</i>				8-60	(Devi et al. 2013)
<i>Aspergillus terreus</i>				1-20	(Li et al. 2012)
<i>Aspergillus tamarii</i>		Filtrado extracelular	Esférica	25-50	(Kumar 2015)
<i>Aspergillus flavus</i>					(Moharrer et al. 2012)
<i>Trichoderma viride</i>				59	(Mishra et al. 2014)
<i>Fusarium solani</i>				20-50	(Gopinath y Arumugam 2013)
<i>Trichoderma koningii</i>				10-14	(Maliszewska 2013)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		Au	Filtrado extracelular	Esférica	153.3
<i>Penicillium citrinum</i>				172	(Honary et al. 2013)
<i>Penicillium waksmanii</i>				160.1	
<i>Alternaria alternata</i>			Esférica/ triangular	12±5	(Sarkar et al. 2012)

2.6 Justificación

Diversos procesos industriales generan diariamente residuos contaminados con metales tóxicos, convirtiéndose en una de las problemáticas ambientales más importantes en la actualidad. Las tecnologías comúnmente utilizadas para tratar estos desechos presentan ciertas desventajas, como son altos costos operacionales, la generación de lodos secundarios tóxicos y la imposibilidad de recuperar metales valiosos. Los mecanismos empleados por hongos metalófilos para tolerar altas concentraciones de metales, crean una alternativa ecológicamente viable para mitigar esta problemática. Principalmente, la capacidad de estos microorganismos para biorreducir metales puede permitir la biorremediación de sitios contaminados con Cr(VI) por su transformación a Cr(III) así como, la biosíntesis de nanopartículas de oro y plata para la recuperación de estos metales ampliamente utilizados en diversas ramas de la industria.

2.7 Hipótesis

Las cepas fúngicas metal tolerantes poseen mecanismos de transformación de metales que pueden ser aplicados en ambientes contaminados con Cr(VI) para disminuir su toxicidad mediante su reducción a Cr(III), y en la recuperación de metales con alto valor industrial.

2.8 Objetivo general

Obtener cepas fúngicas metal tolerantes que presenten mecanismos de eliminación o transformación de metales, para ser aplicadas en la detoxificación de ambientes contaminados con Cr(VI) y en la recuperación de metales con alto valor industrial.

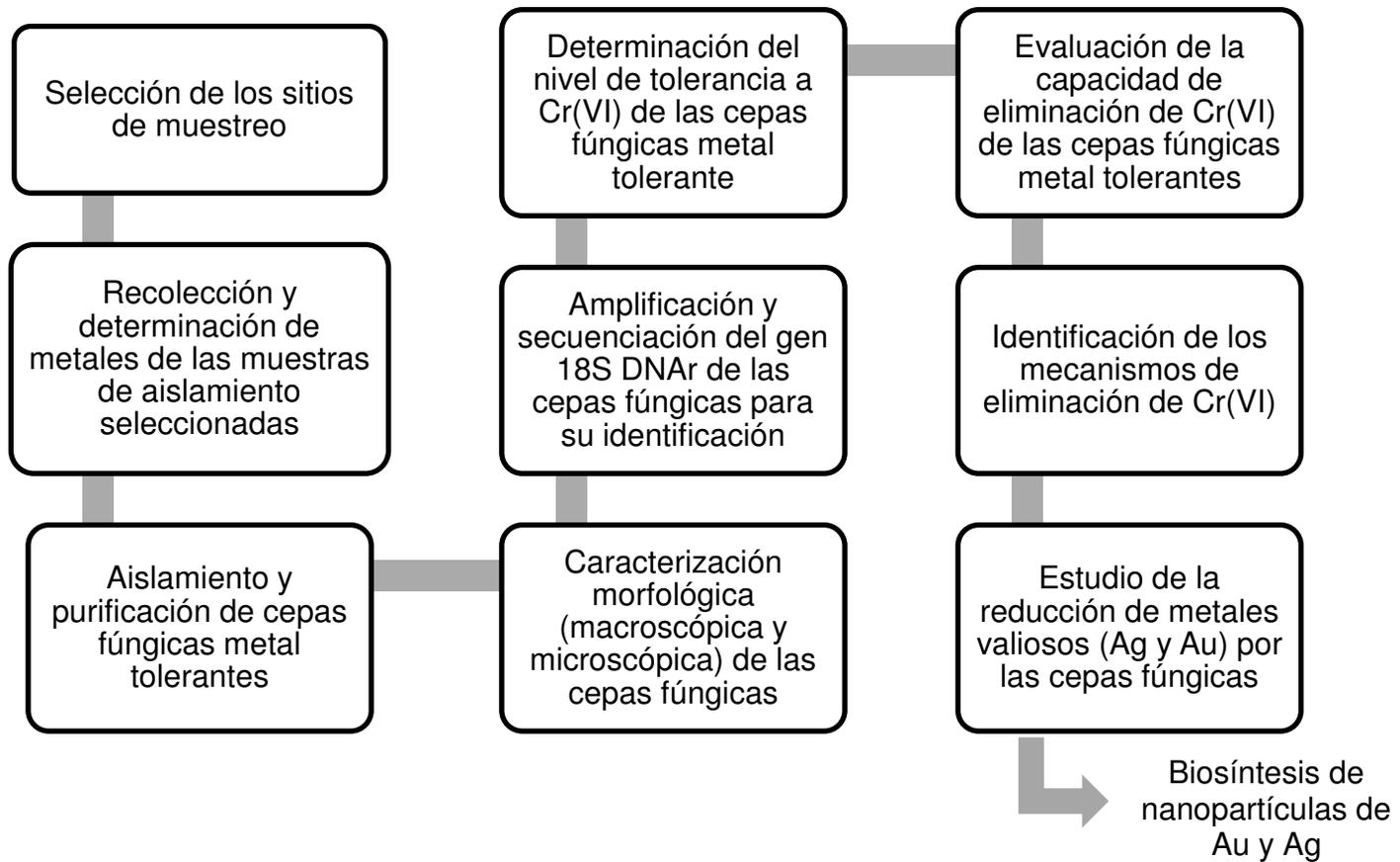
2.8.1 Objetivos específicos

- Aislar e identificar hongos metal tolerantes provenientes de sitios industriales
- Determinar el nivel de tolerancia a Cr(VI) de los aislados fúngicos metal tolerantes
- Evaluar la capacidad de reducción de Cr(VI) de las cepas fúngicas metal tolerante
- Identificar los posibles mecanismos de transformación del Cr(VI) por las cepas de hongos aisladas
- Estudiar la reducción de sales metálicas (Au y Ag) por las cepas fúngicas cromato tolerantes para su recuperación
- Determinar si la reducción de sales metálicas es una vía directa a la biosíntesis de nanopartículas metálicas

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Metodología general del proyecto



3.2 Selección y recolección de muestras para el aislamiento de hongos metal tolerantes

La recolección de tres tipos de muestras se realizó en áreas industriales específicas de México; sedimento de la industria metalúrgica proveniente de Apodaca, Nuevo León; efluente de curtiduría de Guanajuato, Guanajuato; suelo contaminado con Cr(VI) proporcionado por el Laboratorio de Química Ambiental de la FCQ-UANL proveniente de Villa de García, Nuevo León. Las muestras recolectadas se mantuvieron en refrigeración a 4 °C, hasta su utilización.

3.2.1 Determinación de la concentración de metales en las muestras de aislamiento

Las concentraciones de metales pesados en cada muestra recolectada se determinaron de acuerdo a lo establecido en el método EPA 6020A-2007: Espectrometría de Masas Acoplado inductivamente (Agilent 75000 ICP-MS). El análisis de Cr(VI) en cada una de las muestras se realizó en base a la Norma Mexicana NMX-AA-044-SCFI-2014, por el Departamento de Servicios Profesionales de la Facultad de Ciencias Químicas.

3.3 Cultivo, aislamiento y purificación de cepas fúngicas metal tolerantes

El aislamiento de hongos metalófilos se llevó a cabo por dilución de 2 mg o 2 mL de muestra (según el caso) y se colocaron en frascos de 40 mL de capacidad que contenían 20 mL de agua bidestilada estéril. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se tomó una alícuota de 0.2 mL de la suspensión y se inoculó sobre cajas Petri que contenían Agar Papa Dextrosa (PDA) por el método de extensión en placa. Las cajas se

incubaron a una temperatura de 28 ± 2 °C, durante un tiempo de 120 horas, después de ese tiempo de incubación, las colonias de hongos filamentosos fueron identificadas y resembradas por picadura sobre PDA fresco para purificación.

3.3.1 Caracterización morfológica (macroscópica y microscópica) de las cepas fúngicas aisladas

Los hongos aislados fueron caracterizados fenotípicamente a escala macroscópica (color, textura, forma, diámetro) y microscópica (forma de las conidias, septación micelial, tamaño). Para la caracterización macroscópica se realizaron en cultivos en cajas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud (SDA). La caracterización microscópica se realizó por microcultivos, observando diariamente la evolución del crecimiento durante 7 días de incubación en un microscopio Zeiss Standard 25 ICS (40x).

3.3.2 Identificación de las cepas fúngicas metal tolerante basado en la secuenciación del gen 18S DNAr

3.3.2.1 Protocolo de extracción de DNA fúngico

Las cepas fúngicas fueron crecidas en caldo papa dextrosa a 28 °C por un tiempo de 48 horas y 150 rpm de agitación. El micelio de los diferentes cultivos se obtuvo por filtración al vacío, y luego se congeló con nitrógeno líquido. La extracción de ADN genómico de los hongos en estudio, se realizó siguiendo el protocolo de extracción descrito por Reader y Broda (1985). El ADN obtenido se cuantificó ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) en un espectrofotómetro (Nanodrop-EPOCH) y se verificó su integridad en un gel de electroforesis utilizando gel de agarosa al 0.8%.

3.3.2.2 Amplificación del DNA genómico de los hongos aislados

El ADN extraído para cada hongo fue utilizado como molde para la amplificación del 18S ADNr a partir de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las reacciones de amplificación se realizaron durante 30 ciclos utilizando una polimerasa de alta fidelidad (Iproof BIO-RAD) y los cebadores universales SR6R (Fw) 5'-AAGTATAAGTCGTAACAAGG-3' y LR1 (Rv) 5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3' (Vilgalys y Hester 1990). Las amplificaciones se realizaron en un Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler, utilizando los siguientes parámetros: (1) desnaturalización, 94 °C (1 min); alineación, 50 °C (45 s); rampa de calentamiento, 50-72 °C (1 min); extensión, 72 °C (1 min) y finalmente etapa de incubación a 72 °C (7 min). Posteriormente, los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando un kit de purificación (QIAquick, PCR Purification Kit 250 Qiagen).

3.3.2.3 Secuenciación del gen 18S RNAr

La secuenciación de los fragmentos de PCR se realizó en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), San Luis Potosí, México. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas usando la herramienta NCBI BLAST (Basic Local Alingment Search Too). La construcción del árbol filogenético se realizó posterior a la alineación de las secuencias usando el software MEGA V 6.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al. 2013), por el método neighbor-joining con análisis bootstrap de 1000 repeticiones y el modelo Maximum Composite Likelihood de análisis de distancia.

3.4 Determinación del nivel de tolerancia a Cr(VI) de las cepas fúngicas

3.4.1 Método de difusión en placa

La tolerancia a Cr(VI) de cada una de las cepas fúngicas aisladas se determinó a partir de la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando la técnica de difusión en agar. Se prepararon cajas Petri con SDA las cuales fueron inoculadas con 100 μL de una suspensión de esporas estandarizada en 1×10^6 UFC mL^{-1} . Posteriormente, se impregnaron discos de papel filtro (Whatman 41-0.5 mm de diámetro) previamente esterilizados con 8 μL de diferentes concentraciones de Cr(VI) ($100\text{-}1000$ mg L^{-1}) y se colocaron en zonas equivalentes en la placa. Las cajas fueron incubadas a una temperatura de 28 ± 2 °C por 7 días, los ensayos para cada cepa fúngica se realizaron por triplicado. El control se realizó siguiendo la misma metodología previamente descrita pero impregnando los discos con agua bidestilada estéril. Posterior a los 7 días de incubación, los controles y las cajas con tratamiento se compararon visualmente para ver la disminución del crecimiento de cada hongo en presencia de Cr(VI).

3.4.2 Índice de tolerancia

La determinación del índice de tolerancia se realizó utilizando un medio mineral Lee modificado (Lee et al. 1975), el cual fue inoculado con una suspensión de esporas estandarizada (1×10^6 UFC mL^{-1}). Los ensayos se realizaron en tubos de ensayo con un volumen de medio de 8 mL, 1 mL de inóculo y 1 mL de diferentes soluciones stock de Cr(VI) para obtener concentraciones finales de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg L^{-1} de Cr(VI) en un volumen final de 10 mL. Los experimentos se incubaron a una temperatura de 28 °C por 7 días y 150 rpm.

Posteriormente, el micelio obtenido se filtró al vacío (papel filtro Whatman 41), se lavó dos veces con agua bidestilada estéril y se secó a 70 °C hasta alcanzar un peso constante. El índice de tolerancia se calculó con la siguiente fórmula, ver ecuación 1:

$$IT = \frac{\text{Biomasa tratada con Cr(VI)}(g)}{\text{Biomasa en el medio control}(g)} \quad (1)$$

La biomasa en el medio control es aquella crecida sin presencia de Cr(VI).

3.5 Evaluación de la capacidad de eliminación de Cr(VI) de los hongos metal tolerantes

3.5.1 Selección de las cepas fúngicas

Las cepas fúngicas fueron seleccionadas de acuerdo a su capacidad de eliminación de Cr(VI) utilizando micelio fresco. Las cepas fueron crecidas en caldo PD y posteriormente el micelio fresco se filtró al vacío y se enjuagó dos veces con agua bidestilada estéril. Se utilizó una dosis de biomasa de 2 g L⁻¹ (peso húmedo) para cada hongo y se añadió a 20 mL de medio mineral (Lee modificado) adicionado con Cr(VI) a una concentración final de 50 mg L⁻¹ y pH 4. Los experimentos se realizaron por duplicado y fueron incubados a 28 ± 2 °C por 7 días y 150 rpm.

3.5.2 Cinéticas de eliminación de Cr(VI)

Las cinéticas de eliminación de Cr(VI) para cada hongo seleccionado se llevaron a cabo utilizando biomasa activa, biomasa inactiva y filtrado extracelular. Las condiciones de crecimiento y la obtención de biomasa fúngica se realizaron en las mismas condiciones anteriormente mencionadas en el apartado 3.5.1. Las condiciones experimentales para cada tipo de ensayo fueron las siguientes;

concentración inicial de Cr(VI) de 50- 100 mg L⁻¹, volumen final de 20 mL, pH 2-4. Los ensayos se incubaron a una temperatura de 28 °C, por 7 días y 150 rpm de agitación. Las cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa activa se realizaron utilizando una dosis de biomasa de 2 g L⁻¹ en peso húmedo, la cual se puso en contacto con un medio mineral Lee modificado (ver Tabla V) adicionado con Cr(VI).

TABLA V
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MEDIO MINERAL LEE MODIFICADO

Componente	Concentración (g L ⁻¹)
Nitrato de Potasio	1.0
Sulfato de Magnesio	1.0
Fosfato de Potasio	0.5
Dextrosa	5.0
Cloruro de Sodio	0.1

Los ensayos con biomasa inactiva se llevaron a cabo con biomasa (2 g L⁻¹) la cual se puso en contacto con una solución agua/Cr(VI). El control para cada ensayo utilizando biomasa activa e inactiva se realizó en las mismas condiciones ya descritas para cada caso pero sin adición de biomasa.

El filtrado extracelular, se obtuvo poniendo en contacto 10 g de micelio fresco en 100 mL de agua bidestilada estéril con un tiempo de incubación de 72 h a 28 °C y 150 rpm. Posteriormente, la biomasa fue filtrada y el sobrenadante se utilizó agregando 2 mL L⁻¹ en una solución agua/Cr(VI).

3.5.3 Determinación de la capacidad de reducción de la biomasa fúngica

El método para evaluar la capacidad de reducción de las biomásas fúngicas es el propuesto por Park y colaboradores en el 2004 (Park et al. 2004) (2) método consiste en utilizar una cantidad de biomasa limitante, es decir, que la relación de la concentración de biomasa sea muy pequeña en comparación a la concentración de Cr(VI) utilizada. El tiempo de contacto biomasa/Cr(VI), debe ser extenso, de tal forma que se agote la capacidad reductora de la biomasa. Para ello, las condiciones experimentales fueron las siguientes; 0.5 g L⁻¹ dosis de biomasa inactiva, una concentración 500 mg L⁻¹ de Cr(VI), 28 °C, 150 rpm. Posterior a 20 días, la capacidad de reducción se evaluó en base a la ecuación 2.

$$q_r = \frac{[Cr(VI)]_0 - [Cr(VI)]_f}{[B]}$$

Dónde:

q_r = Capacidad de reducción de la biomasa fúngica (mg g⁻¹)

$[Cr(VI)]_0$ = Concentración inicial de Cr(VI), mg L⁻¹

$[Cr(VI)]_f$ = Concentración final de Cr(VI), mg L⁻¹

$[B]$ = Concentración de la biomasa, g L⁻¹

3.5.4 Caracterización de las biomásas fúngicas seleccionadas

3.5.4.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Se realizaron los espectros de infrarrojo de la biomasa de cada uno de los hongos seleccionados, antes y después de las cinéticas de eliminación de Cr(VI) a una concentración de 100 mg L⁻¹. Para este análisis se utilizó un

espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (Spectrum One, Perkin Elmer) con un intervalo de medición de 650 – 4000 cm^{-1} .

3.5.4.2 Determinación del potencial de carga cero (pH_{PCC})

El potencial de carga cero (pH_{PCC}) corresponde al pH en el que la superficie de la biomasa se encuentra iónicamente neutra. El análisis se realizó mediante titulaciones potenciométricas, agregando diferentes volúmenes de HCl y NaOH 0.1 N en diferentes tubos para centrífuga (BD Falcon) de 50 mL., aforados a 25 mL con una solución de NaCl 0.1 N preparada previamente con agua desionizada. Posteriormente, se agregó 0.1 g de biomasa fúngica y después de 24 horas de agitación a 150 rpm y 28 °C, la suspensión resultante fue centrifugada a 3000 rpm (centrífuga, DSC-1512 SD-1) y se cuantificó el pH de cada solución (potenciómetro, HANNA Instruments 211). El experimento se realizó por triplicado, y se realizó un blanco para cada experimento en condiciones similares, pero sin adición de biomasa. Los diferentes volúmenes agregados de HCl y NaOH 0.1 N, se presentan en la Tabla VI, así como el número de experimentos realizados para el análisis.

Las concentraciones de H^+ y OH^- adsorbidos sobre la superficie son iguales en el PCC, y por lo tanto la carga de la superficie es neutra. El valor del pH_{PCC} puede ser determinado en la intersección con el eje de las abscisas en la gráfica de distribución de carga superficial, la cual presenta el número de iones liberados en función del pH del medio.

TABLA VI
CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DEL
POTENCIAL DE CARGA CERO (pH_{PCC})

EXPERIMENTO	HCl 0.1 N (mL)	EXPERIMENTO	HCl 0.1 N (mL)
CONTROL	0	CONTROL	0
1	0.2	10	8
2	0.4	11	6
3	0.8	12	4
4	1.2	13	2
5	1.6	14	1.6
6	2	15	1.2
7	4	16	0.8
8	6	17	0.4
9	8	18	0.2

Para realizar el cálculo de los iones liberados, se utilizó la ecuación 3.

$$IL = \frac{(V_b - V_a)(N)}{m} \quad (3)$$

Donde:

IL = Número de iones liberados, mEq g⁻¹

V_a, V_b = Volumen de NaOH 0.1 N empleado en el experimento y blanco

N = Normalidad de la solución de NaOH y HCl, mEq L⁻¹

m = Cantidad de biomasa, g

Cabe mencionar que los cambios de pH se representan en función del volumen de NaOH 0.1 N empleado, en donde los volúmenes utilizados de HCl

0.1 N son interpretados como valores negativos de NaOH 0.1 N. Se realiza la comparación de la muestra y el blanco, de tal forma que cuando se añade una misma cantidad de NaOH 0.1 N, estos presentaran un diferente valor de pH, hasta obtener un pH común para ambos en el que se requiere una misma cantidad de NaOH 0.1 N agregada, representando así el pH_{PCC} para la biomasa de cada hongo en estudio.

3.5.4.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopia fotoelectrónica de barrido (XPS)

El análisis superficial de la biomasa de hongo previamente liofilizada antes y después de la eliminación de Cr(VI), se realizó por microscopia electrónica de barrido (microscopio de barrido electrónico SEM, modelo Nescope 6000, JEOL) y espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) bajo las siguientes condiciones; Thermo Scientific Escalab 250Xi: manteniendo una presión base de análisis de ~10-10 mbar; la excitación de los fotoelectrones analizados fue realizada con una fuente de rayos X monocromática de Al K α (1486.68 eV), radio de análisis de 650 μ m; realizando un barrido de baja resolución *survey*.

3.6 Determinación de Cr(VI) y cromo total

3.6.1 Método colorimétrico (1,5-Difenilcarbazida)

La determinación de la concentración de las soluciones de Cr(VI), se realizó por espectrofotometría UV-visible (Espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS) a 540 nm utilizando el método colorimétrico de la 1,5- Difenilcarbazida. De acuerdo con la Norma Mexicana (NMX-AA-044-SCFI-2001) la reacción de óxido reducción se lleva a cabo por 10 min a pH 1 ajustado con una solución de H₂SO₄

0.2 N. Debido al pH ácido de la solución, se forma un complejo rojo-violeta como resultado de la oxidación simultánea de la difenilcarbazida a difenilcarbazona, la reducción de Cr(VI) a Cr(III), y la quelación del Cr(III)/difenilcarbazona (ver R 3).



3.6.2 Curva de calibración

Para llevar a cabo el análisis de Cr(VI), se realizó una curva de calibración de acuerdo al procedimiento descrito en la Norma Mexicana (NMX-AA-044-SCFI-2001) para la determinación de cromo hexavalente en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. A partir de una solución estándar de Cr(VI) de 1000 mg L⁻¹ se realizaron diferentes diluciones a un volumen final de 10 mL para concentraciones de Cr(VI) en un intervalo de 0.1- 1.0 mg L⁻¹ (Figura 6).

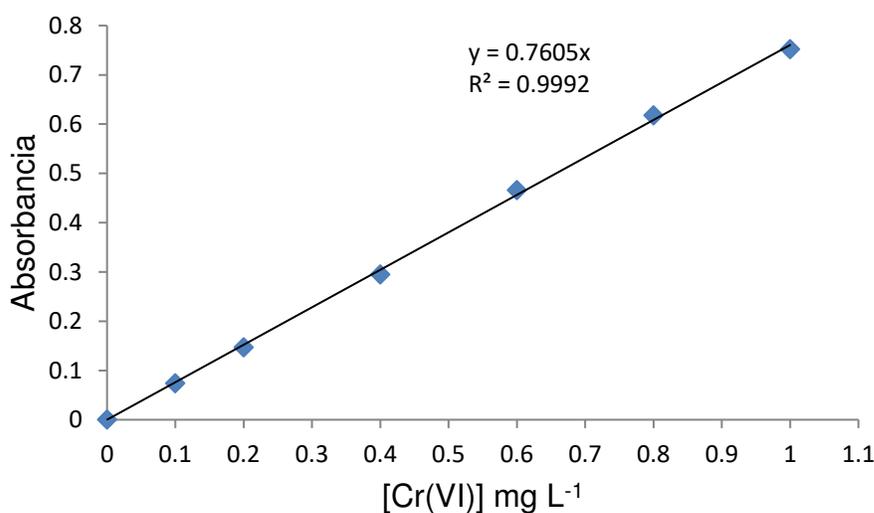


Figura 6. Curva de calibración para la determinación de Cr(VI) por UV-Vis.

3.6.3 Análisis de cromo total

El análisis de cromo total es importante para determinar el mecanismo de eliminación de Cr(VI) por las cepas fúngicas, ya que mediante este método se puede identificar si el Cr(VI) es reducido a Cr(III) y/o acumulado en la biomasa.

Para este estudio, se utilizó la técnica de espectroscopia de absorción atómica (AA) y se utilizó un espectrofotómetro GBC-932 AA. Se realizaron soluciones estándar de Cr(VI) en un rango de concentración de 1 a 20 mg L⁻¹ para la calibración del equipo de medición y las soluciones de Cr(VI) resultantes de la remoción fueron diluidas hasta un rango de concentración dentro de la curva realizada. La concentración de Cr(III) presente en las soluciones, se calcula de la diferencia entre la concentración de Cr total obtenida por esta técnica y la de Cr(VI) obtenida por espectroscopia de UV-Vis.

3.7 Estudios de biorreducción de sales metálicas (Ag y Au)

Para los estudios de biorreducción extracelular de los iones Ag(I) y Au(III), se prepararon soluciones stock de 1000 mg L⁻¹ de Ag(I) y Au(III) utilizando una sal de nitrato de plata (AgNO₃) y ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) previamente esterilizada por filtración. Además, se obtuvieron los filtrados extracelulares de cada hongo en estudio (ver 3.5.2). La mezcla de reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 10 y 5 % de filtrado extracelular fúngico para plata y oro, respectivamente; 50 mg L⁻¹ de Ag(I) y Au(III); 28 °C y 150 rpm. La biorreducción fue evaluada a pH 9 y 8 para oro y plata, respectivamente, de acuerdo al cambio de coloración en las mezclas de reacción. El control se realizó

sustituyendo el filtrado extracelular fúngico por agua bidestilada estéril y bajo las mismas condiciones experimentales.

3.7.1 Biosíntesis de nanopartículas de oro y plata

Se realizaron cinéticas de biorreducción de Ag(I) y Au(III) bajo las condiciones previamente mencionadas, la cuales fueron monitoreadas al contacto y diariamente por 7 días. La biosíntesis de nanopartículas de oro y plata se comprobó por espectrofotometría UV-Vis (Shimadzu UV-1800) en un intervalo de longitud de onda de 300-700 nm (Au) y 200 -700 nm (Ag). Se evaluó la longitud máxima de LSPR (Resonancia Superficial de Plasmón Localizado) presentada por cada metal, la cual se ha reportado para nanopartículas de plata en 420 nm y 530 nm para oro.

Además, se evaluó la síntesis de nanopartículas de Ag(I) y Au(III) vía microondas con un tiempo de reacción de 1 min.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de las concentraciones de metales pesados en las muestras para el aislamiento de hongos metal tolerantes

Se recolectaron tres tipos de muestras para el aislamiento de hongos metal tolerantes provenientes de diferentes sitios industriales en áreas específicas de México. En la Tabla VII, se muestran las concentraciones de metales pesados obtenidas por tipo de muestra; sedimento de la industria metalúrgica (Apodaca, N. L.), efluente de curtiduría (Guanajuato, Gto.), y suelo contaminado con Cr(VI) (García, N. L.).

En el suelo contaminado con Cr(VI), los niveles de Cr y Cr(VI) fueron 2428 y 1718 mg kg⁻¹, respectivamente. Estos valores son superiores a la concentración máxima permisible para Cr(VI) en suelos industriales (510 mg kg⁻¹) establecida en la NOM-147-SEMARNAT / SSA1-2004. El sedimento de la industria metalúrgica presentó una concentración de Cr(VI) menor a la del límite de detección del equipo y una concentración de Cr de 201 mg kg⁻¹ la cual es menor que la obtenida para otros metales como zinc (1331 mg kg⁻¹), níquel (906 mg kg⁻¹) y estaño (106 mg kg⁻¹). Por otro lado, las concentraciones de metales pesados en el efluente de curtiduría fueron en su mayoría menores al límite de detección del método utilizado.

TABLA VII
CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS EN LAS MUESTRAS
DE AISLAMIENTO

Metal pesado	Sedimento (mg kg⁻¹)	Efluente (mg L⁻¹)	Suelo (mg kg⁻¹)
Cromo	201	<1.0 (*)	2428
Cromo hexavalente	<1.0 (*)	<1.0 (*)	1718
Cobalto	7.61	5.40	5.94
Níquel	906	<2.0 (*)	14.3
Cobre	73.6	<2.0 (*)	5.87
Zinc	1331	0.92	64.4
Arsenico	<2.0 (*)	<2.0 (*)	<2.0 (*)
Cadmio	<2.0 (*)	<2.0 (*)	<2.0 (*)
Estaño	106	<2.0 (*)	<2.0 (*)
Plomo	40.3	<2.0 (*)	38.6

(*) Nivel inferior de la curva de calibración determinado con estándares acuosos según las condiciones operacionales del laboratorio y teniendo en cuenta el límite de detección del instrumento de medición.

4.2 Aislamiento y caracterización de las cepas fúngicas metal tolerantes

Se aislaron 8 cepas fúngicas las cuales fueron etiquetadas como A1, B1, D1, I1, J1, K1, y L1. Las cepas A1, B1, D1 y K1 se obtuvieron del efluente de curtiduría; las cepas G1, I1 y L1 se aislaron a partir del sedimento de la industria metalúrgica y únicamente J1, se obtuvo del suelo contaminado con Cr(VI).

Las características microscópicas y macroscópicas de cada cepa aislada se describen a continuación.

A1. Las características macroscópicas de esta cepa se muestran en la Figura 7, incluyen micelio aéreo de textura aterciopelada con tono marrón / grisáceo que forman círculos concéntricos y pigmentación amarilla del agar. A escala microscópica, presenta hifas hialinas septadas con ramificaciones y cabezas conidiales. Además, se pudo observar conidióforos rectos, vesícula radial y filial corto con conidios esféricos terminales.

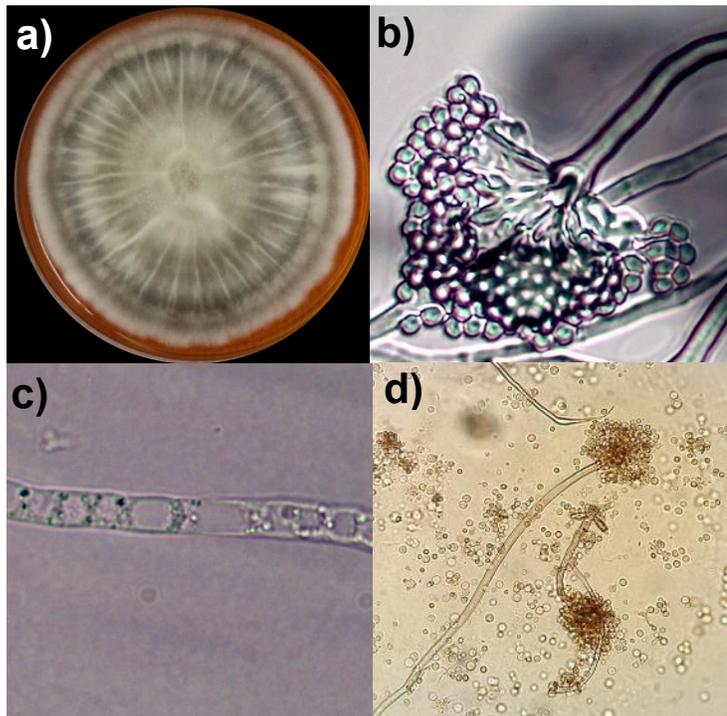


Figura 7. Cepa A1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).

B1. Presenta una apariencia macroscópica de textura aterciopelada color blanco, después de tres días adquiere un color verde/grisáceo con apariencia arenosa la cual queda rodeada de micelio blanco. Al reverso, la colonia se observa de color coral claro sin rugosidad. Microscópicamente, se caracteriza por presentar hifas septadas, conidióforos ramificados con fiálides solitarias y

ampuliformes. Además, posee conidios esféricos que se agrupan formando cadenas, tal y como se muestra en la Figura 8.

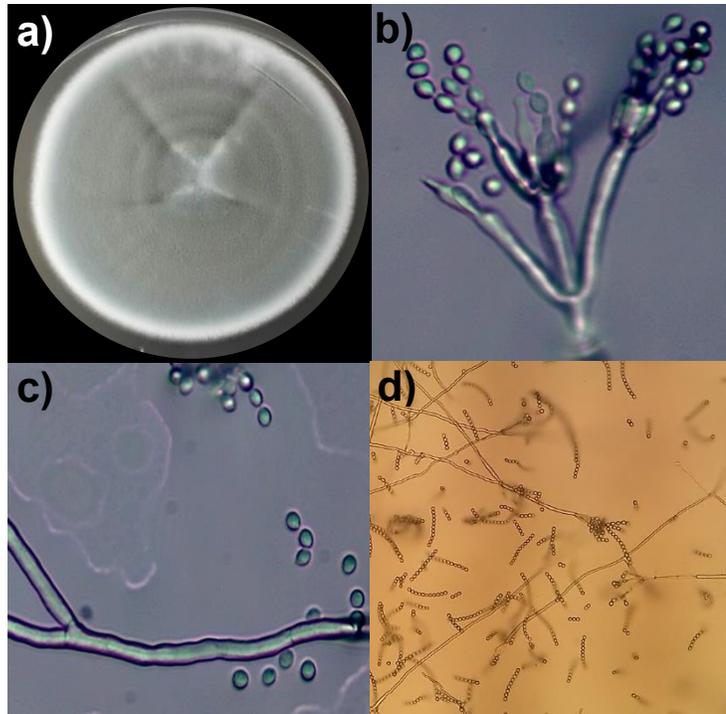


Figura 8. Cepa B1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).

G1. La pigmentación amarilla intensa del agar durante el crecimiento de esta cepa, es una característica sobresaliente. Además, macroscópicamente posee una textura grumosa amarilla al inicio y se torna verdosa formando anillos concéntricos posterior al tercer día de incubación, aproximadamente. Sus características microscópicas principales incluyen hifas hialinas septadas con ramificaciones como pequeños árboles. Se puede observar la formación de clamidosporas entre o en el ápice de las hifas, las fiálides son en forma de bolos y los conidios elipsoidales. Las características descritas pueden observarse en la Figura 9.

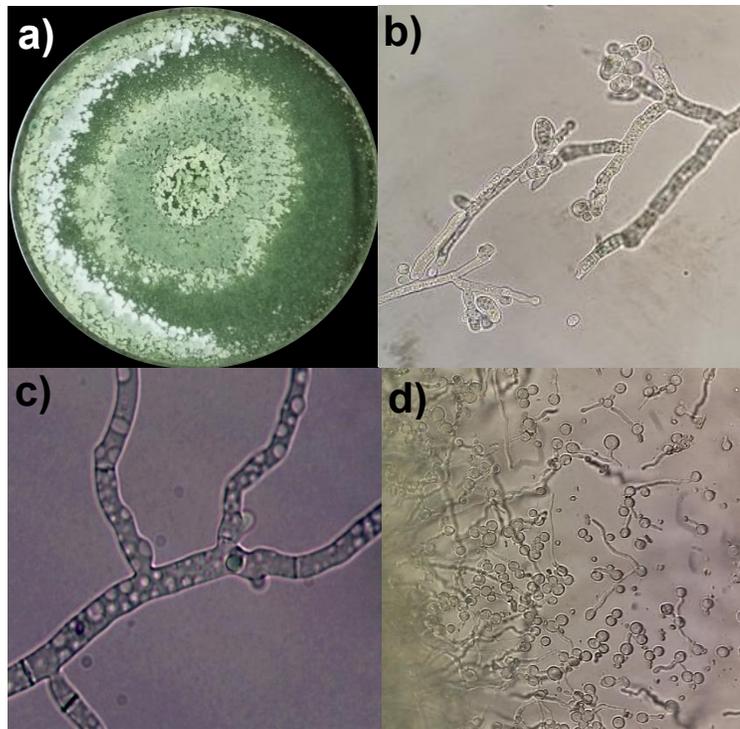


Figura 9. Cepa G1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).

D1. Macroscópicamente esta cepa presenta micelio aéreo delgado que se extiende en todo el agar. Posteriormente adquiere una textura arenosa de color marrón claro. Por otro lado, la presencia de hifas septadas, múltiples fiálides alargadas formando cadenas y conidias piriformes en el ápice del fiálide, son características microscópicas de esta cepa y se muestran en la Figura 10.

I1. En la primera etapa de crecimiento, el cultivo presenta un micelio blanco algodonoso, pero a medida que madura la colonia, produce esporas pigmentadas oscuras que le dan un aspecto grisáceo con bordes blancos. La principal característica microscópica de este hongo son los conidios con forma ovoide y elíptica, que se forman al final de los conidióforos. Además, se pueden observar hifas hialinas en la Figura 11.

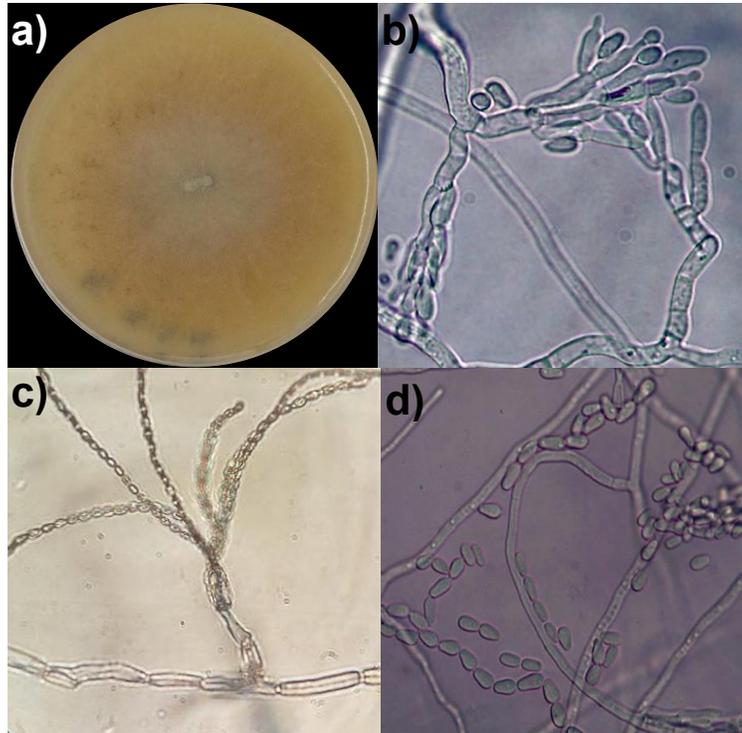


Figura 10. Cepa D1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).

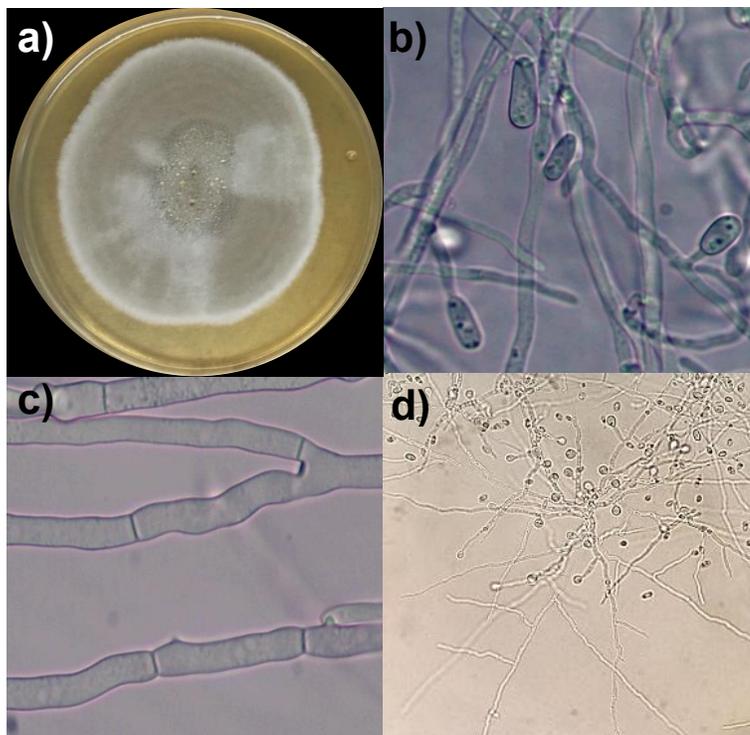


Figura 11. Cepa I1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).

J1. Macroscópicamente, las colonias crecen rápidamente con un micelio blanco algodónoso que adquiere un color verde intenso y textura arenosa con el tiempo. Posteriormente, produce un exudado amarillento, aproximadamente a los 5 días de incubación; su crecimiento se extiende en todo el agar presentando rugosidad. Las características microscópicas principales son conidióforos ramificados, hifas septadas, conidios esféricos en cadenas, y fiálides con forma de botella agrupados en racimos al final de los conidióforos, como se puede observar en la Figura 12.

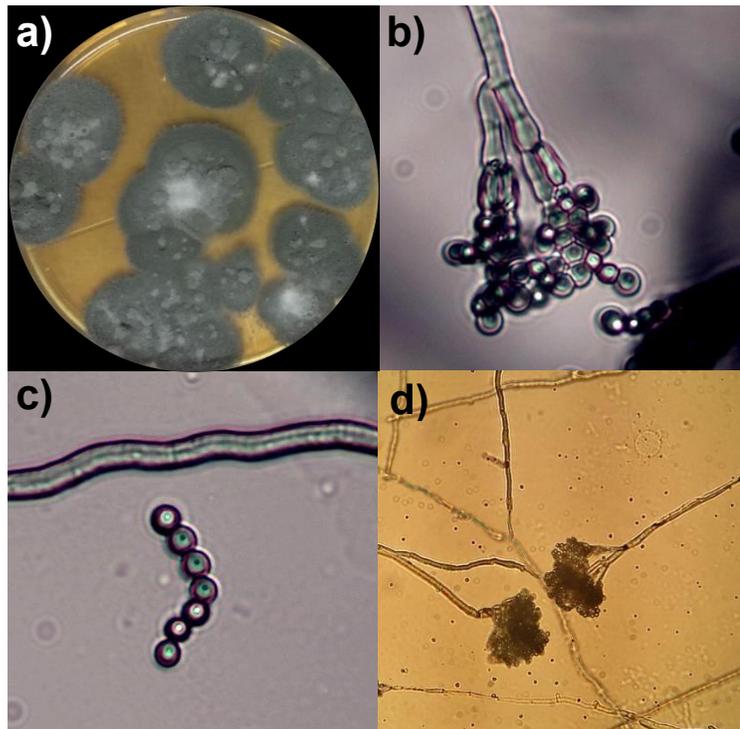


Figura 12. Cepa J1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).

K1. Esta cepa fúngica, se caracteriza macroscópicamente por presentar hifas aéreas color blanco, tipo velloso. Una de las características importantes de este hongo es la pigmentación rojo intenso del agar durante su crecimiento.

Microscópicamente, se observan macroconidios alargados y agrupados alrededor de las hifas septadas en forma de falsas cabezas en monofiálides cortos, como se muestra en la Figura 13.

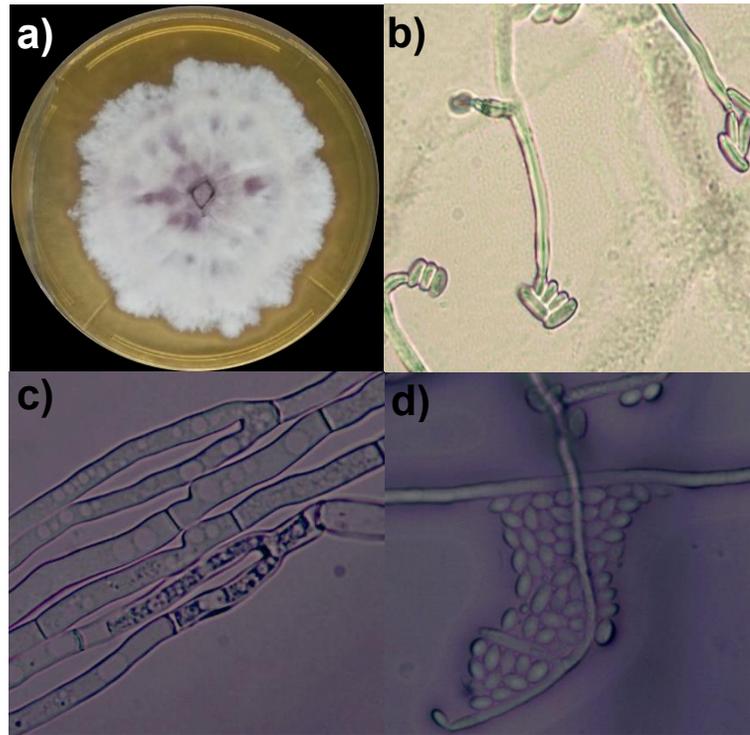


Figura 13. Cepa K1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).

L1. Esta cepa muestra un crecimiento moderado con textura arrugada/rugosa de color coral. A nivel microscópico, se observa la presencia de conidios elipsoidales perfectamente agrupados en el ápice de las fiálides. Además, presenta hifas septadas delgadas y alargadas, ver Figura 14.

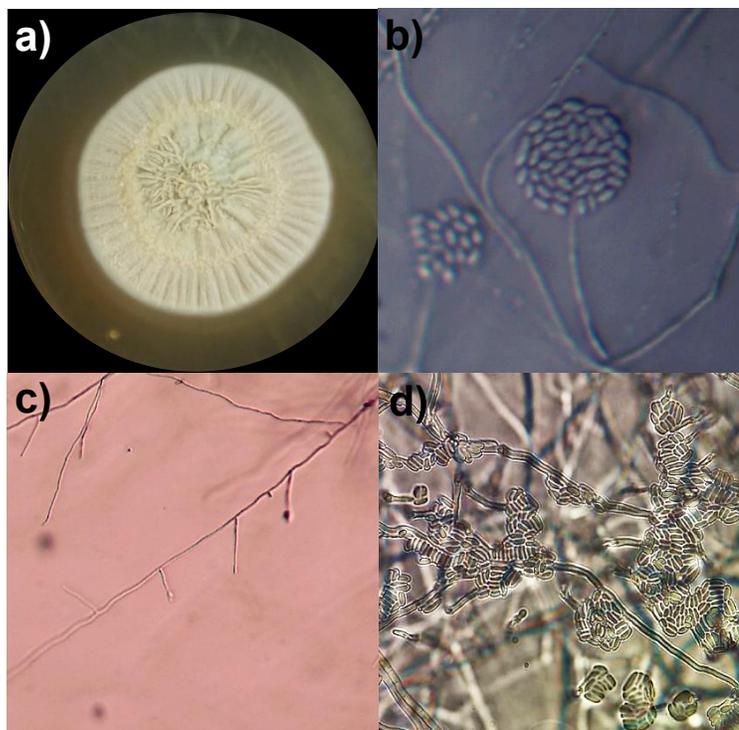


Figura 14. Cepa L1. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b-d).

Los aislados fúngicos obtenidos, muestran que sitios con presencia de metales pesados son una fuente de aislamiento de una amplia variedad de hongos nativos. Sin embargo, el número de aislados por cada tipo de muestra disminuyó conforme aumentaba la concentración de metales presentes en estas. De esta forma, cuatro cepas fúngicas fueron aisladas del efluente de curtiduría, 3 cepas del sedimento de la industria metalúrgica y sólo una cepa (J1) del suelo con una alta concentración de Cr(VI). Estos resultados, indican el efecto adverso que el Cr(VI) tiene sobre la microbiota dentro de los diferentes ecosistemas.

4.3 Identificación de las cepas fúngicas metal tolerante basado en la secuenciación del gen 18S DNAr

El análisis de las secuencias nucleotídicas de cada una de las cepas fúngicas en estudio, se realizó utilizando la base de datos GenBank (NCBI).

Los fragmentos secuenciados presentaron una homología significativa a los genes DNAr de las especies: **A1)** *Aspergillus ustus* (99%); **B1)** *Penicillium janthinellum* (97%); **G1)** *Trichoderma longibrachiatum* (99%); **I1)** *Pseudallescheria boydii* (99%); **J1)** *Penicillium chrysogenum* (99%); K1) *Fusarium oxysporum* (99%); L1) *Acremonium sclerotigenum* (99%). Las especies de hongos obtenidos, concuerdan con las características microscópicas y macroscópicas presentadas por cada una de ellas. Sin embargo, los resultados obtenidos para la cepa D1 fueron inconclusos ya que el cromatograma del producto de PCR presentaba picos encimados, lo que indica que pudieron amplificarse más de una región de genes ribosomales (DNAr) distintas, o bien, que al realizar la PCR se amplificaron bandas inespecíficas al mismo tiempo que bandas específicas (DNAr). Es por ello, que para la identificación de esta cepa se requeriría repetir nuevamente el procedimiento ya descrito y considerar el utilizar otros primers.

La clasificación taxonómica de cada uno de los aislados fúngicos identificados se presenta en la Tabla VIII.

En estudios previos, se han reportado a las cepas fúngicas del género *Aspergillus*, como las principalmente aisladas de sitios industriales, seguidas de los géneros *Fusarium* y *Penicillium*. Especies como *A. niger* (Arshad y Aishatu 2015), *A. flavus*, *A. versicolor* (Iram et al.2012), *A. sp* (Bennett et al. 2013), *F. clamydosporium* (Sharma y Malaviya 2014), *F. solani* (Sen y Dastidar 2011), *F. sp.*(Ezzouhri et al. 2009), *P. chrysogenum* (Jayanthi et al. 2014), *P. commune* (Sharma y Malaviya 2016), se han aislado en su mayoría de efluentes de curtiduría y suelos industriales.

TABLA VIII

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS FÚNGICOS METAL TOLERANTES

Género/especie	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia
<i>Aspergillus ustus</i>			Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae
<i>Penicillium janthinellum</i>			Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>			Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae
<i>Pseudallescheria boydii</i>	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae
<i>Penicillium chrysogenum</i>			Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae
<i>Fusarium oxysporum</i>			Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae
<i>Acremonium sclerotigenum</i>			Sordariomycetes	Hypocreales	No asignado

- Datos obtenidos del portal de información Global Biodiversity Information Facility (GBIF)

Sin embargo, aun cuando diversas especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* se han reportado, no se han encontrado estudios con las especies aisladas en el presente trabajo (*A. ustus*, *P. janthinellum* y *F. oxysporium*). Además, las diversas especies fúngicas que se obtuvieron (*T. longibrachiatum*, *P. boydii* y *A. sclerotigenum*), son campo fértil de investigación ya que no existen reportes de ellas.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada cepa fúngica aislada, se depositaron en la base de datos de secuencias del GenBank con números de acceso; **KY784634**–SA1 (*Aspergillus ustus*), **KY784635**–SB1 (*Penicillium janthinellum*), **KY784636**–SG1 (*Trichoderma longibrachiatum*), **KY784637**–SI1 (*Pseudallescheria boydii*), **KY784638**–SJ1 (*Penicillium chrysogenum*), **KY784639**–SK1 (***Fusarium oxysporum***) y **KY784640**–SL1 (*Acremonium sclerotigenum*).

Las secuencias del gen rRNA 18S de los hongos obtenidos se compararon con secuencias conocidas en la base de datos GenBank, mostrados en la Figura 15. La construcción del árbol filogenético se realizó con aquéllas que presentaron una mayor homología a las secuencias problema y fueron alineadas para calcular la distancia evolutiva entre ellas.

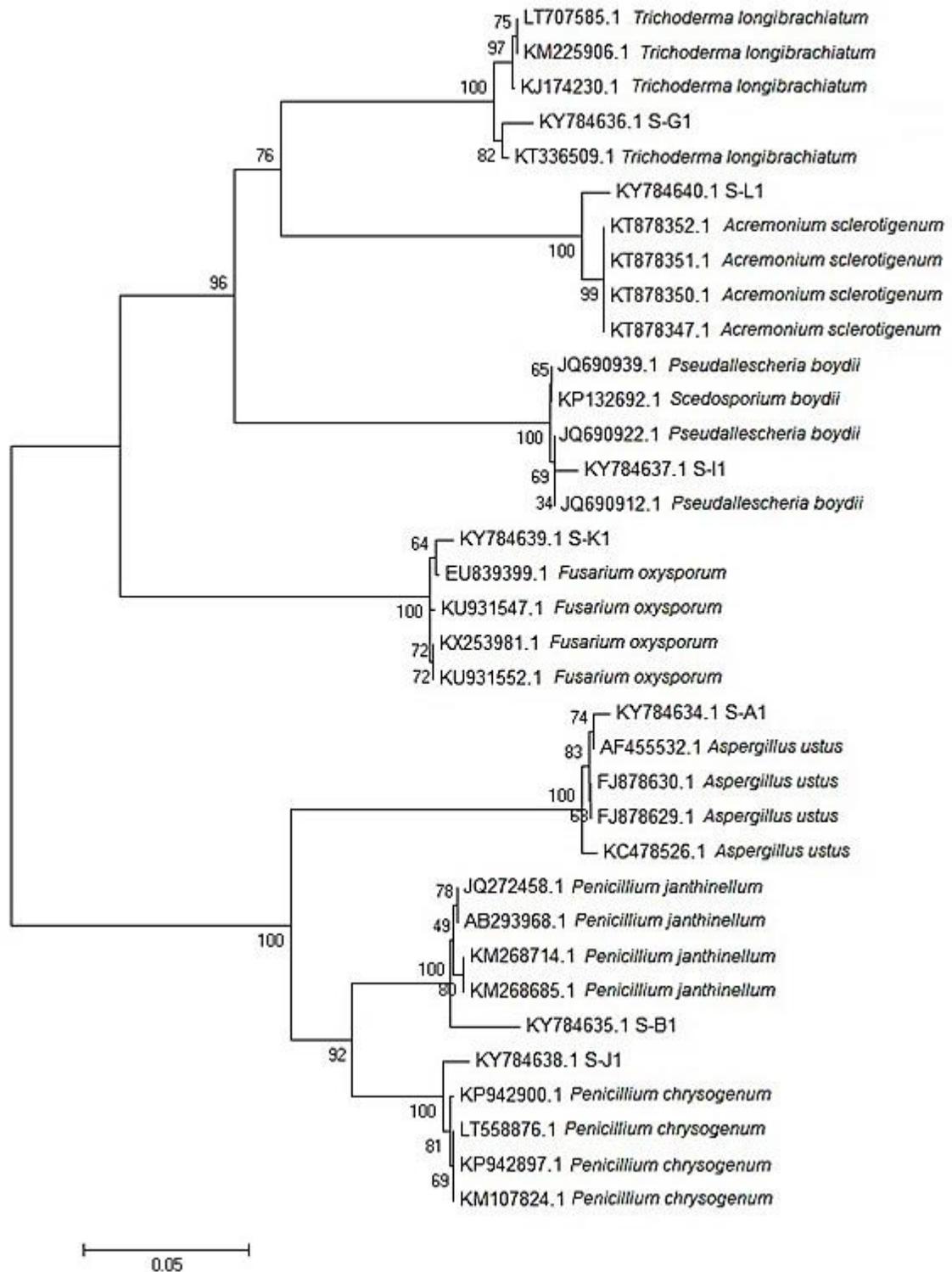


Figura 15. Árbol filogenético de las cepas fúngicas basado en la comparación de secuencias del gen 18S rRNA que muestran la relación entre ellos.

4.4 Determinación de la tolerancia a Cr(VI) por las cepas fúngicas aisladas

La tolerancia a Cr(VI) por los hongos aislados se evaluó a partir de la concentración mínima inhibitoria (CMI) presentada por cada uno a diferentes concentraciones de Cr(VI). En la Figura 16, se muestra el crecimiento fúngico alrededor de los discos en presencia y ausencia de Cr(VI), lo cual sirvió de comparación para determinar la concentración en la que se observaban halos de inhibición o disminución del crecimiento.

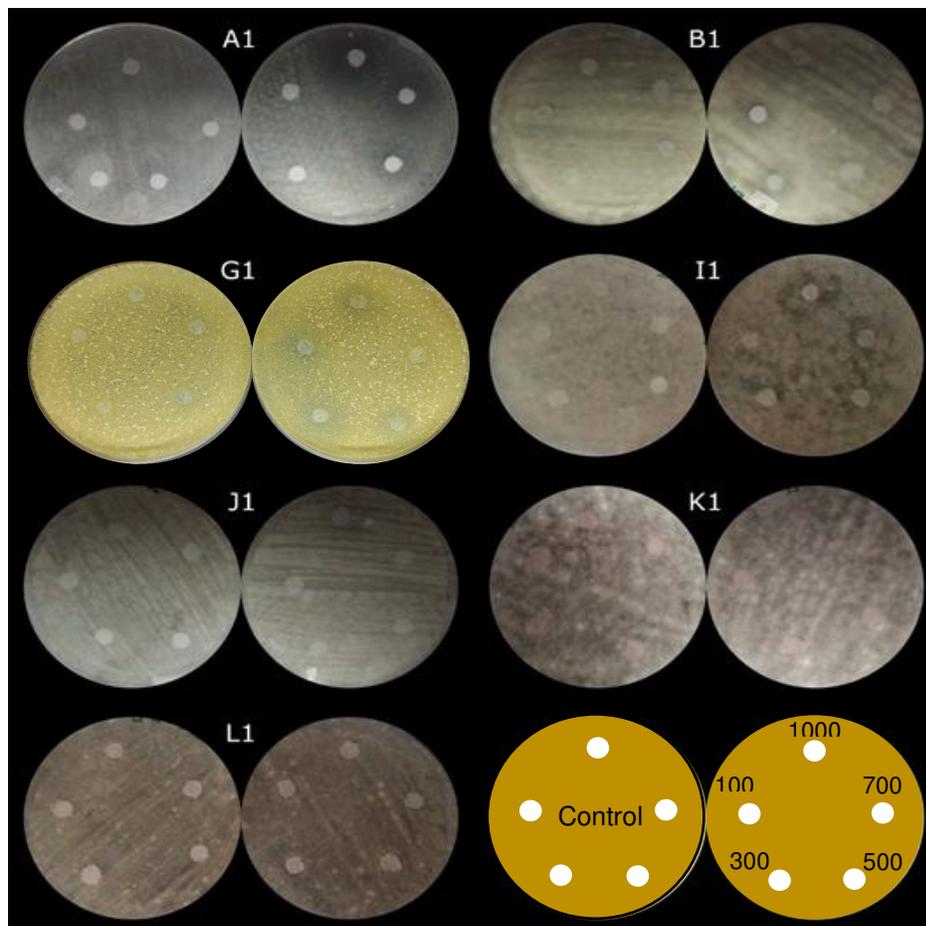


Figura 16. Ilustración del ensayo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Los datos obtenidos indican una CMI diferente para cada cepa de hongo. La tolerancia máxima fue presentada por *P. janthinellum* (B1), *P. chrysogenum*

(J1), *F. oxysporium* (K1), *A. sclerotigenum* (L1) y *T. longibrachiatum* (G1), en las que no se observa una disminución de su crecimiento a 1000 mg L⁻¹ de Cr(VI). Las cepas *P. boydii* (I1) y *A. ustus* (A1) mostraron una disminución de crecimiento de 500 a 1000 mg L⁻¹ de Cr (VI), lo cual se cuantifica con mayor precisión a partir de la determinación del índice de tolerancia.

Los resultados obtenidos en la determinación del índice de tolerancia de cada aislado fúngico a diferentes concentraciones de Cr(VI), se muestran en la Figura 17.

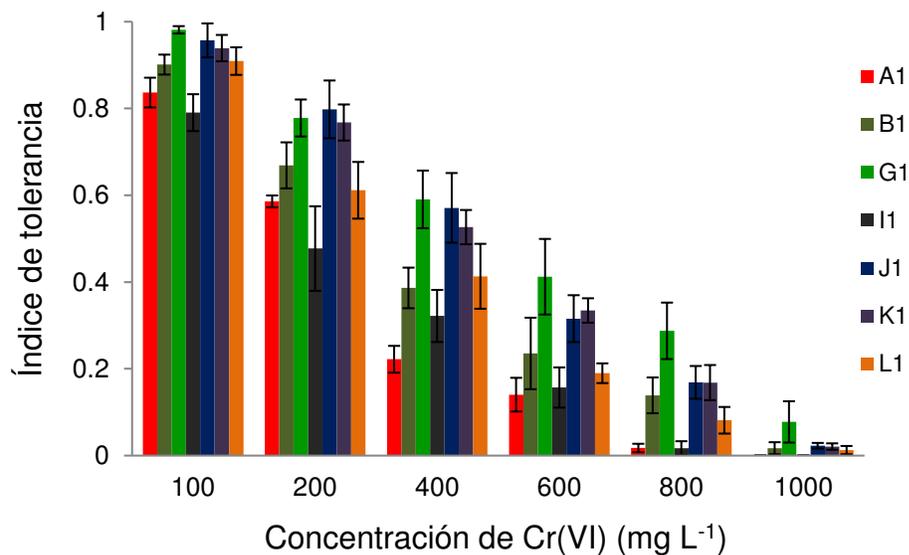


Figura 17. Índice de tolerancia a Cr(VI) por cada cepa fúngica aislada.

El mayor índice de tolerancia calculado corresponde a *T. longibrachiatum* con un valor de 0.077 a 1000 mg L⁻¹ de Cr(VI), seguido por *P. chrysogenum*, *F. oxysporum*, *P. janthinellum* y *A. sclerotigenum* con valores de 0.022, 0.020, 0.017 y 0.012 a 1000 mg L⁻¹ de Cr(VI), respectivamente. En el caso de *P. boydii* y *A. ustus* presentaron inhibición del crecimiento a 1000 mg L⁻¹ de Cr(VI) y valores de índice de tolerancia de 0.009 y 0.017 a 800 mg L⁻¹ de Cr(VI), respectivamente.

Estudios previos, han reportado resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo. Arshad y Aishtul (2015), evaluaron la tolerancia a Cr(VI) de *Aspergillus niger* en la forma de concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 350 y 400 mg L⁻¹ de Cr(VI). Por otro lado, Jayanthi y colaboradores (2014), estudiaron la tolerancia presentada por *P. chrysogenum* y *A. niger* en medio sólido y líquido, resultando en 800 y 512 mg L⁻¹, respectivamente para ambos hongos. Especies del género *Fusarium* han presentado tolerancias de 1300 mg L⁻¹ (Ezzouhri et al. 2009) y 1000 mg L⁻¹ (Iram et al. 2012) de Cr(VI) para el caso de *F. sp.* y 1000 mg L⁻¹ por *F. solani* (Sen y Dastidar 2011).

Las cepas de hongos *T. longibrachiatum*, *P. janthinellum*, *F. oxysporum* y *A. sclerotigenum*, aun cuando se aislaron de muestras que no contenían Cr(VI) presentaron tolerancias similares a la presentada por la cepa *P. chrysogenum* aislada del suelo contaminado con Cr(VI). Lo anterior, puede atribuirse a los mecanismos empleados por los hongos para aumentar su resistencia a los metales pesados y que para estas cepas en particular; fueron eficientes para tolerar altas concentraciones de Cr(VI).

4.5 Estudios de eliminación de Cr(VI) por los aislados fúngicos metal tolerantes

Para los estudios posteriores de eliminación de Cr(VI), se realizó una selección de las cepas fúngicas en base a la capacidad de eliminación de Cr(VI) presentada por cada una de ellas, utilizando biomasa activa y un pH dentro del óptimo en su crecimiento. En la Figura 18, se muestra el comportamiento de cada uno de los aislados fúngicos con 50 mg L⁻¹ de Cr(VI) el cual fue cuantificado al inicio y hasta un tiempo de 168 h por la metodología antes descrita.

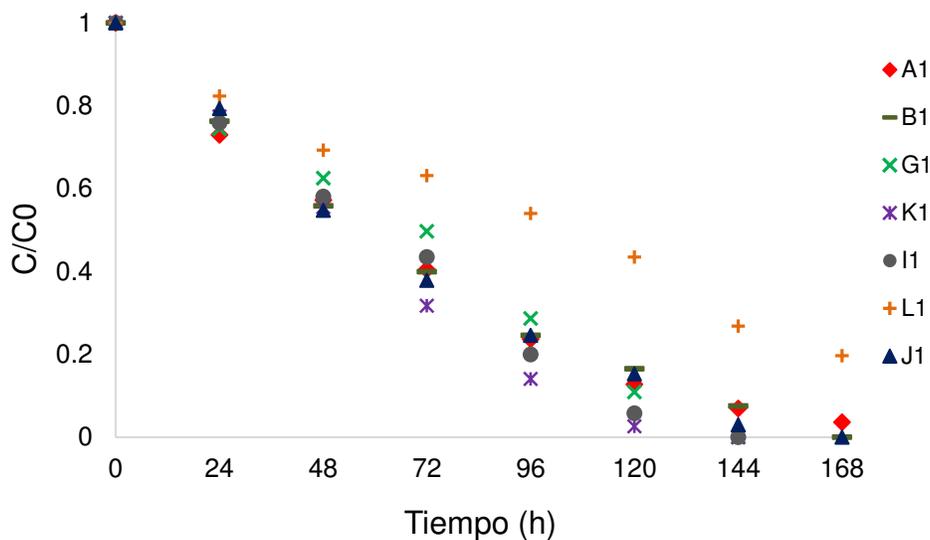


Figura 18. Cinéticas de eliminación de Cr(VI) de cada aislado fúngico. Biomasa fúngica activa; $[\text{Cr(VI)}]_0=50 \text{ mg L}^{-1}$; pH 4; T= 28 °C; 150 rpm; t = 168 h.

La completa eliminación de Cr(VI) fue alcanzada por las cepas *P. boydii* (I1) y *F. oxysporum* (K1) a las 144 h de contacto con Cr(VI); *P. janthinellum* (B1), *T. longibrachiatum* (G1), y *P. chrysogenum* (J1) a las 168 h, mientras que las cepas *A. ustus* y *A. sclerotigenum* alcanzaron una eliminación de Cr(VI) del 96 y 43 %, respectivamente, a las 168 h. Los aislados fúngicos *P. janthinellum*, *T. longibrachiatum*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum*, que presentaron una mayor tolerancia a Cr(VI) fueron aquéllos que alcanzaron una completa eliminación del metal, sobresaliendo *F. oxysporum* a las 144 h de contacto. Sin embargo, la cepa fúngica *P. boydii* a pesar de presentar una tolerancia moderada al Cr(VI) logró eliminarlo completamente del medio a las 144 h, no así para *A. ustus* que presentó una tolerancia similar y sólo alcanzó el 96% de eliminación de Cr(VI). Por el contrario, *A. sclerotigenum* aun cuando presentó una tolerancia de 1000 mg L⁻¹ fue el hongo con el menor porcentaje (43%) de eliminación del metal.

En base a lo anterior, cinco de los ocho aislados fúngicos fueron seleccionados para los estudios posteriores, los cuales son: *T. longibrachiatum* (G1), *P. boydii* (I1), *Fusarium oxysporum* (K1), *P. chrysogenum* y *A. ustus* (A1). Se tomó la decisión de trabajar con este último y no con *P. janthinellum* para tener cinco géneros distintos de estudio, seleccionando únicamente con *P. chrysogenum* ya que fue el aislado obtenido de la muestra de suelo con Cr(VI).

4.5.1 Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa activa e inactiva

La influencia en la eliminación de Cr(VI) al utilizar biomasa metabólicamente activa (BA) e inactiva (BI) se puede observar en las Figuras 19 y 20.

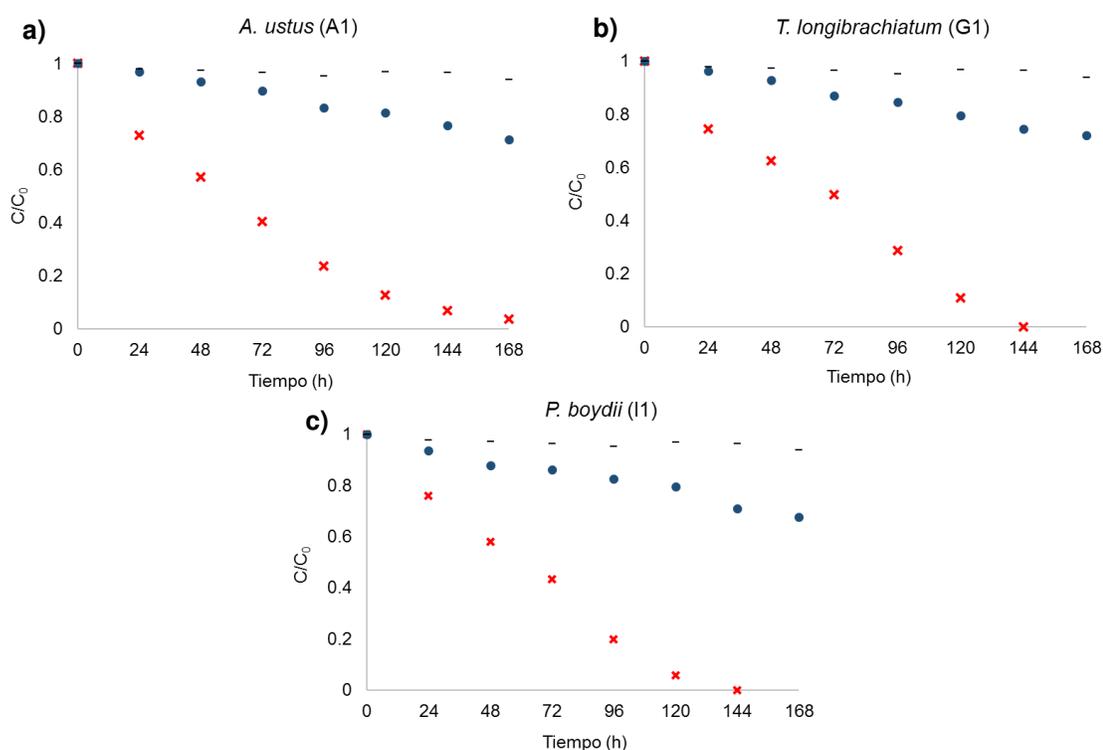


Figura 19. Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa (x) e inactiva (●) de **a)** *A. ustus*, **b)** *T. longibrachiatum*, **c)** *P. boydii*. Dosis de biomasa, 2 g L⁻¹; [Cr(VI)]₀, 50 mg L⁻¹; pH 4; T, 28 °C; 150 rpm, (-) control.

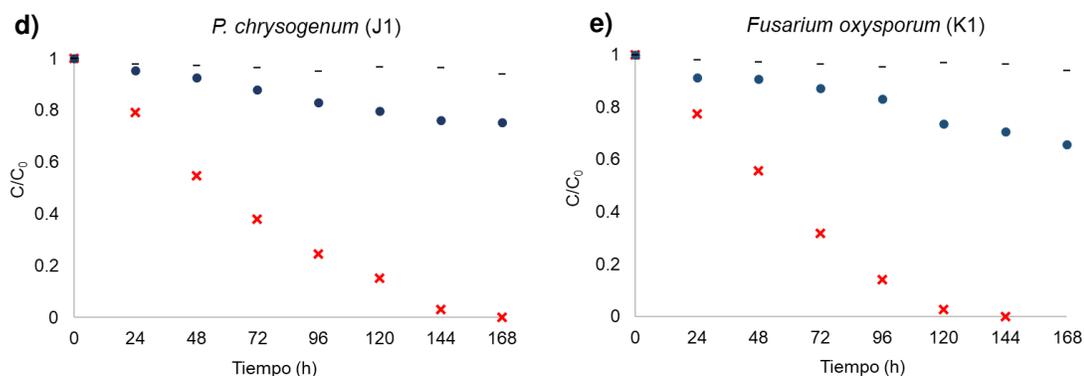


Figura 20. Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa (x) e inactiva (●) de **d)** *P. chrysogenum* y **e)** *F. oxysporum*. Dosis de biomasa, 2 g L⁻¹; [Cr(VI)]₀, 50 mg L⁻¹; pH 4; T, 28 °C; 150 rpm; (-) control.

Los datos experimentales obtenidos mostraron que se favoreció la eliminación de Cr(VI) utilizando biomasa metabólicamente activa a las condiciones experimentales establecidas. El porcentaje de eliminación de Cr(VI) por aislado fúngico a las 144 h, fueron los siguientes: *T. longibrachiatum* (100% BA – 29% BI); *P. boydii* (100%- 29.69% BI); *F. oxysporum* (100%- 34.3% BI), Mientras que los porcentajes de eliminación por *A. ustus* (96% BA -27.42% BI) y, *P. chrysogenum* (100% BA- 24.6% BI) se obtuvieron en un tiempo de 168 h.

Muchos de los mecanismos de eliminación de metales empleados por hongos, involucra no sólo la interacción del microorganismo con el metal a nivel de su pared celular, también interacciona con moléculas orgánicas y sistemas de transporte propios del hongo que pueden favorecer la eliminación de estos. La biomasa inactiva, presenta la desventaja de interactuar principalmente a nivel de su pared celular con el Cr(VI). Sin embargo, los grupos funcionales presentes en ella al pH experimental utilizado, no promueve una mayor eliminación de los aniones de Cr(VI). Por otro lado, la biomasa al estar metabólicamente activa tiene la ventaja de incluir otros mecanismos de eliminación, además de que al contar

con nutrientes esenciales dentro del medio se favorece el crecimiento del hongo como se muestra en la Figura 21, favoreciendo la eliminación del Cr(VI).



Figura 21. Ensayo de eliminación de Cr(VI) por biomasa activa de *Fusarium oxysporum*.

Estudios previos de eliminación de Cr(VI) con biomasa activa de *Paecilomyces sp.* (Acosta y Cárdenas 2010), *P. chrysogenum* (Pazouki et al. 2007) y *A. flavus* (Sathvika et al. 2015) han reportado una eliminación del 100% del Cr(VI) en tiempos de contacto similares a los obtenidos (168-200 h), con una concentración de Cr(VI) inicial de 50 mg L⁻¹ y pH experimental entre 5 y 4.

4.5.2 Efecto del pH en la eliminación del Cr(VI) por biomasa activa e inactiva

La disminución del pH tuvo una influencia positiva sobre la eliminación de Cr(VI) para ambos casos, lo que se vio reflejado en el aumento del porcentaje de eliminación del metal para la biomasa inactiva y en la disminución del tiempo para la completa eliminación del Cr(VI) con biomasa metabólicamente activa. En las Figuras 22 y 23 se muestran las cinéticas de eliminación de Cr(VI) con biomasa activa e inactiva a pH 2 y el comportamiento presentado en cada caso.

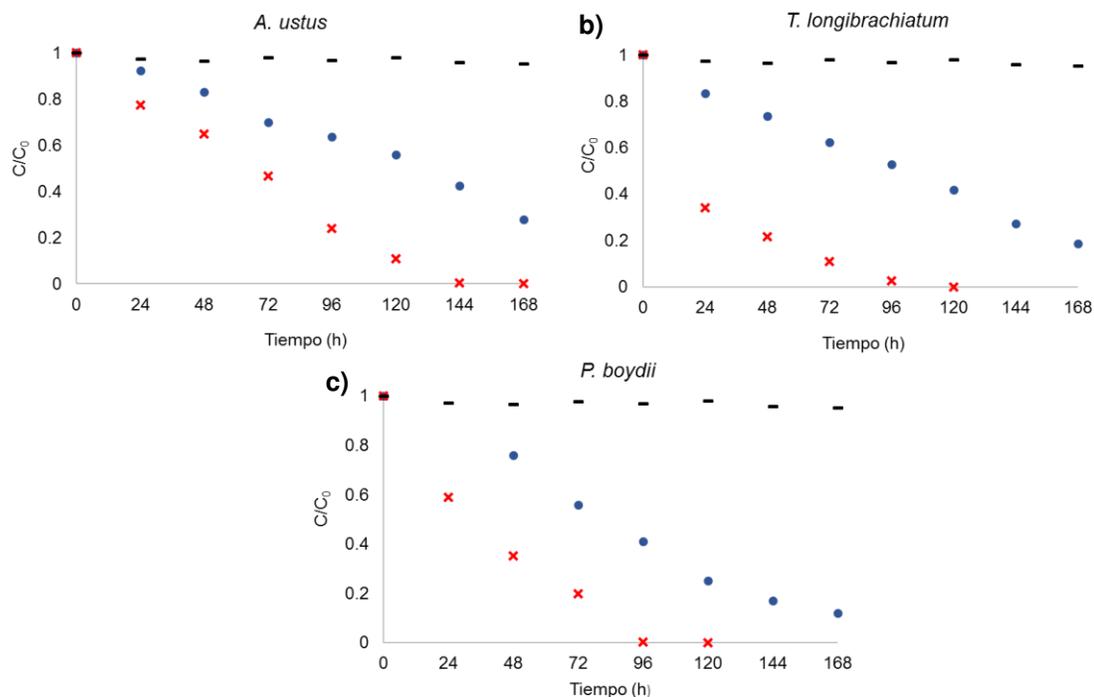


Figura 22. Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa (x) e inactiva (●) de **a)** *A. ustus*, **b)** *T. longibrachiatum*, **c)** *P. boydii*. Dosis de biomasa, 2 g L⁻¹; [Cr(VI)]₀, 50 mg L⁻¹; pH 2; T, 28 °C; 150 rpm; (-) control.

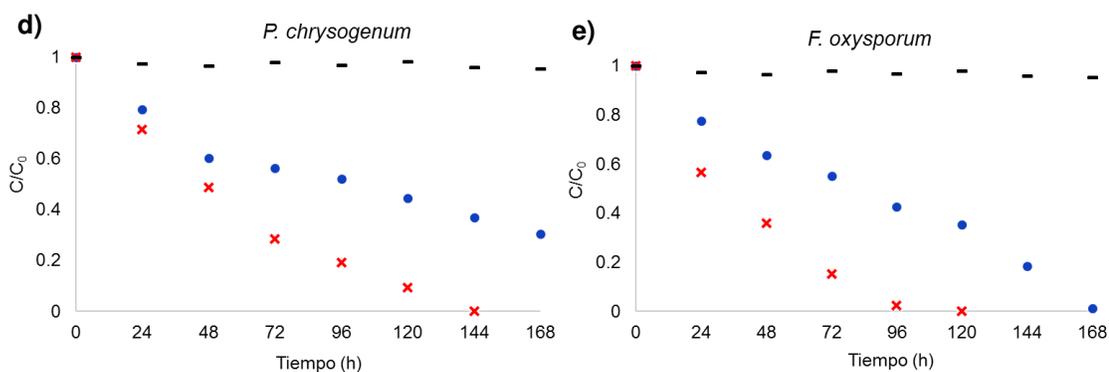


Figura 23. Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa (x) e inactiva (●) de **d)** *P. chrysogenum* y **e)** *F. oxysporum*. Dosis de biomasa, 2 g L⁻¹; [Cr(VI)]₀, 50 mg L⁻¹; pH 2; T, 28 °C; 150 rpm; (-) control.

El tiempo de eliminación de Cr(VI) con biomasa metabólicamente activa de *F. oxysporum*, *P. boydii* disminuyó de 144 a 96 h; *T. longibrachiatum* de 168 a 120 h; *P. chrysogenum* de 168 a 144 h y *A. ustus* alcanzó la completa eliminación

a las 144 h. Por otro lado, los porcentajes de eliminación de Cr(VI) por biomasa inactiva incrementaron para cada aislado fúngico; *F. oxysporum* alcanzó el 98.74% de eliminación a las 168 h; las cepas *P. boydii* (34.3 a 88.01%), *P. chrysogenum* (29.69 a 77%), *T. longibrachiatum* (29% a 81.51%) y *A. ustus* (27.42 a 72.23%), ver Figura 24.

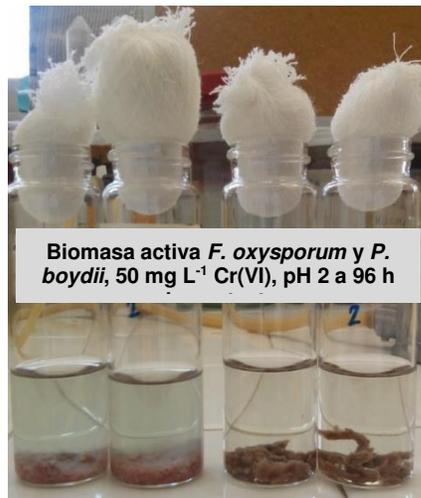


Figura 24. Ensayo de eliminación de Cr(VI) por biomasa activa de *Fusarium oxysporum* y *P. boydii*

El incremento en la eliminación de Cr(VI) al disminuir el pH puede relacionarse a que a un pH más ácido se incrementan los sitios de unión cargados positivamente sobre la superficie de la biomasa promoviéndose la interacción entre los aniones de Cr(VI). En estudios previos, se ha reportado la eliminación de Cr(VI) por biomasa inactiva de *A. awamori* (Gochev et al. 2010), *A. sp.* (De Sotto et al. 2015), *Mucor racemosus* (Liu et al. 2007) y *Pythium sp.* (Kavita et al. 2011) con porcentajes de eliminación del 68 al 100% y pH entre 1.5 -1.0.

4.5.3 Efecto de la concentración inicial de Cr(VI) por biomasa activa e inactiva

Se evaluó la eliminación de Cr(VI) por biomasa activa e inactiva de los aislados fúngicos incrementando la concentración inicial de Cr(VI) y pH 2. De acuerdo con los resultados obtenidos, el aumento de la concentración de Cr(VI) en el medio no afectó la capacidad de eliminación del metal por la biomasa metabólicamente activa, ver Figuras 25 y 26. Sin embargo, el tiempo de contacto entre el hongo y el metal aumentó para alcanzar la eliminación completa de este. Los resultados de eliminación por biomasa inactiva mostraron mayores porcentajes de eliminación que a pH 4 aun con el doble de concentración de Cr(VI) utilizada.

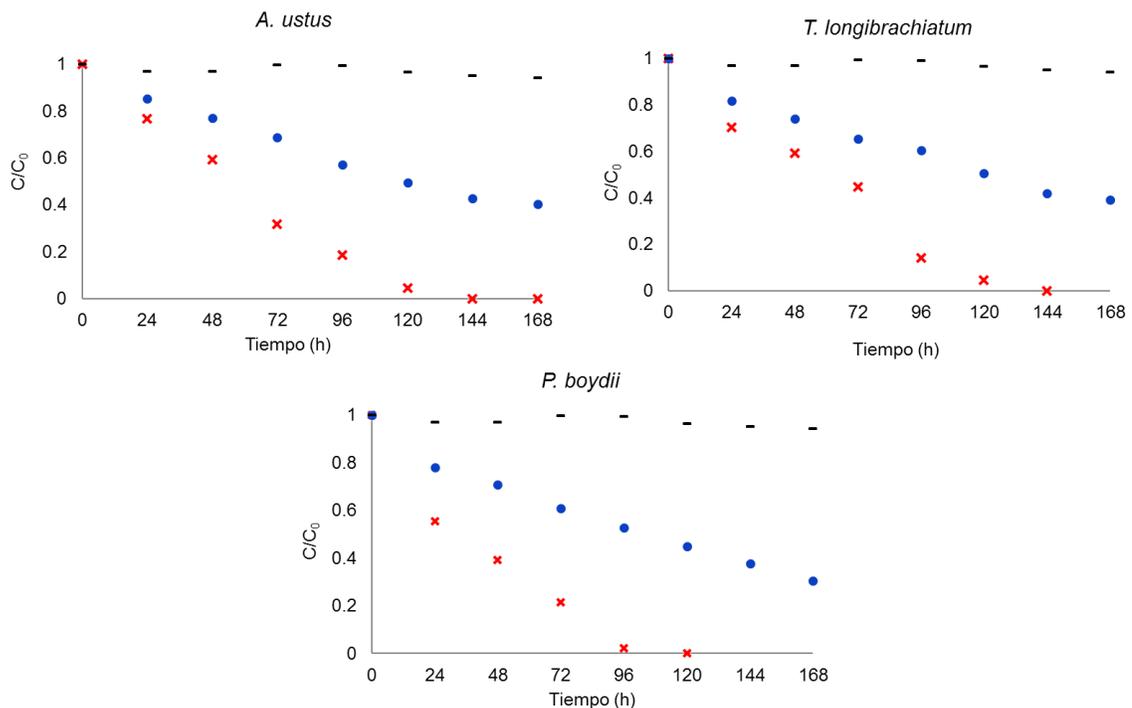


Figura 25. Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa (x) e inactiva (●) de a) *A. ustus*, b) *T. longibrachiatum*, c) *P. boydii*. Dosis de biomasa, 2 g L⁻¹; [Cr(VI)]₀, 100 mg L⁻¹; pH 2; T, 28 °C; 150 rpm; (-) control.

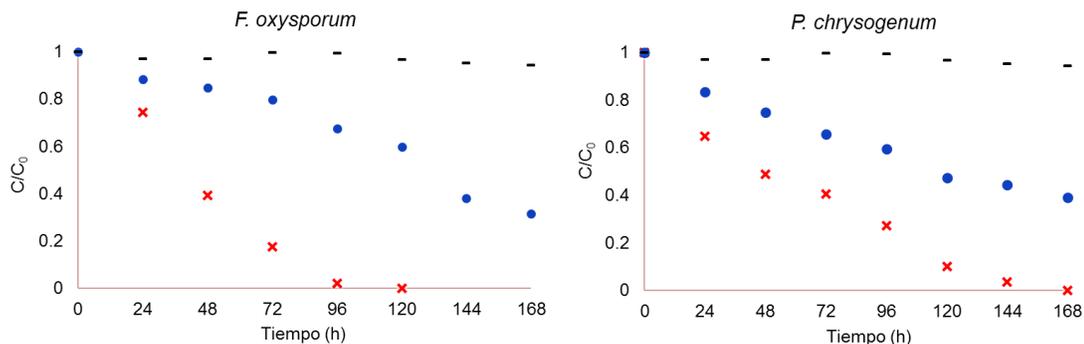


Figura 26. Cinéticas de eliminación de Cr(VI) por biomasa fúngica activa (x) e inactiva (●). Dosis de biomasa, 2 g L⁻¹; [Cr(VI)]₀, 100 mg L⁻¹; pH 2; T, 28 °C; 150 rpm; (-) control.

La biomasa inactiva de *A. ustus*, *T. longibrachiatum*, *P. chrysogenum*, *F. oxysporum* y *P. boydii* presentaron porcentajes de eliminación de 62.07, 61.69, 58.34, 68.04 y 66.97, respectivamente.

4.6 Mecanismos de eliminación de Cr(VI) por los aislados fúngicos

Las cinéticas de eliminación de Cr(VI) mostraron la gran influencia que tiene el pH en el proceso, además del comportamiento de las biombras activas e inactivas al cambio de este factor. Con la finalidad de entender el mecanismo por el cual se puede estar llevando a cabo la eliminación del Cr(VI), se determinó la concentración de cromo total al final de las pruebas de eliminación del metal. Los resultados obtenidos en los ensayos a pH 4, 50 mg L⁻¹ de Cr(VI) y, pH 2, 100 mg L⁻¹ utilizando biomasa activa (BA) e inactiva (BI) en ambos casos, se muestran en la Tabla IX.

TABLA IX

DETERMINACIÓN DE CROMO TOTAL EN LAS CINÉTICAS DE ELIMINACIÓN DE Cr(VI) POR BIOMASA

FÚNGICA ACTIVA E INACTIVA, pH4 (SUPERIOR), pH2 (INFERIOR)

Hongo	[Cr(VI)] ₀	[Cr(VI)] _F	[Cr total]	%	[Cr(VI)] ₀	[Cr(VI)] _F	[Cr total]	%
	BA mg L ⁻¹	BA mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	Reducción	BI mg L ⁻¹	BI mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	Reducción
A1	51.37	1.87	54.5	96.75	59.7	42.57	58.66	27.42
G1	52.07	0	56.38	100	62.03	44.69	62.96	29.01
J1	51.73	0	54.89	100	57.92	43.73	58.02	24.62
K1	51.32	0	55.79	100	57.29	37.63	50.50	34.31
I1	52.10	0	36.56	70.2	59.34	40.23	57.22	29.7
A1	119.34	0	118.1	100	120.45	45.57	120.17	62.07
G1	126.06	0	123.2	100	126.28	49.31	128.73	61.29
J1	126.28	0	129.7	100	129.89	54.91	131.82	58.34
K1	116.59	0	113.3	100	116.56	36.72	114.92	68.04
I1	111.18	0	93.7	84.27	111.01	33.89	102.63	61.92

A1) *A. ustus*; G1) *T. longibrachiatum*; J1) *P. chrysogenum*; K1) *F. oxysporum*; I1) *P. boydii*

La diferencia entre la concentración de Cr(VI) (mg L^{-1}) y la concentración de cromo total (mg L^{-1}) obtenidas al final del proceso de eliminación determina la concentración de cromo trivalente (Cr(III)) presente en solución acuosa, es decir, representa la biotransformación de Cr(VI) a Cr(III) durante el proceso de eliminación de Cr(VI). El porcentaje de reducción por BA de *A. ustus*, *T. longibrachiatum*, *P. chrysogenum* y *F. oxysporum* a las dos condiciones experimentales fueron del 100%. Las diferencias presentadas en la $[\text{Cr(VI)}]_0$ y la de $[\text{Cr total}]$ al final de los ensayos ($\pm 5 \text{ mg L}^{-1}$), se desprecian por calibración y diferencia en los parámetros de los equipos. Los porcentajes de eliminación de Cr(VI) por BI de *A. ustus*, *T. longibrachiatum*, *P. chrysogenum* y *F. oxysporum* incrementaron de un 30 al 60% aproximadamente con respecto a la disminución del pH.

Sin embargo, la BA de *P. boydii* mostró una disminución del cromo total al final de la eliminación de Cr(VI) de 15.54 y 17.48 mg L^{-1} , a pH 2 y 4, respectivamente. El porcentaje de Cr(III) en el medio representa el 70 al 80 % para ambos casos. Este comportamiento no se ve reflejado al utilizar BI, debido a que los porcentajes de eliminación (30 a 60%) en estas condiciones (pH 2 y 4) es menor.

4.6.1 Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Se realizaron los espectros por FT-IR de las biomasas antes y después de estar en contacto con Cr(VI), como se muestra en las Figuras 27 y 28.

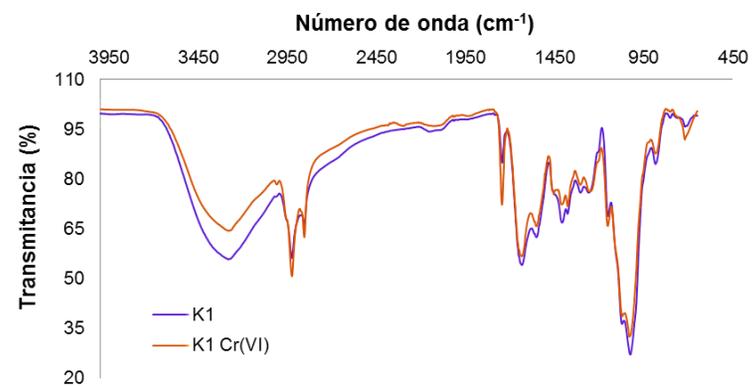
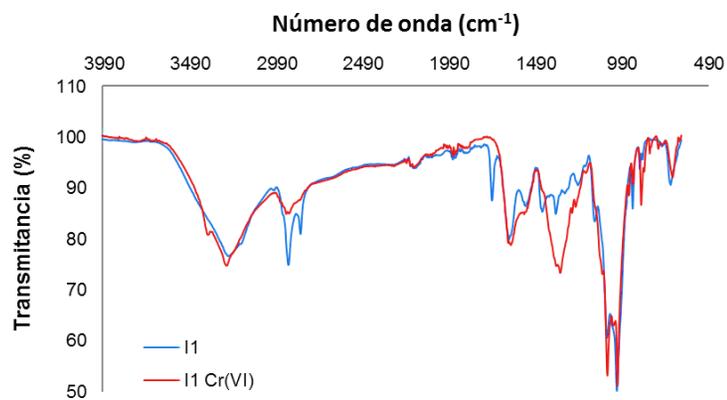
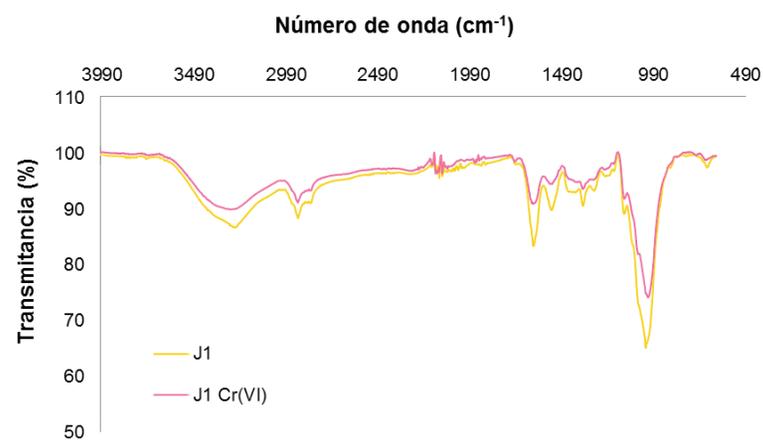
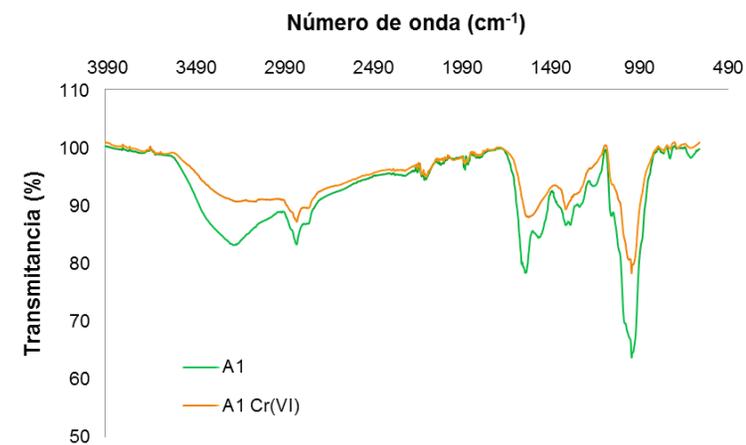


Figura 27. Espectros FT-IR de las biomásas fúngicas *A. ustus* (A1), *P. chrysogenum* (J1), *P. boydii* (I1) y *F. oxysporum* (K1) antes y después de estar en contacto con 100 mg L⁻¹ de Cr(VI), pH 2.

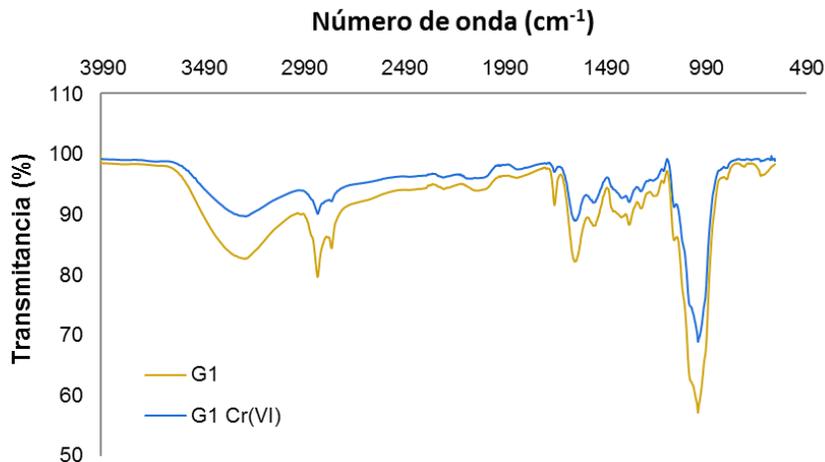


Figura 28. Espectro de FT-IR de la biomasa fúngica *T. longibrachiatum* (G1) antes y después de estar en contacto con 100 mg L⁻¹ de Cr(VI), pH 2.

La técnica de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, permite determinar la naturaleza de los grupos funcionales superficiales e identificar aquellos que interaccionan con el Cr(VI). La banda de absorción alrededor de 3260-3270 cm⁻¹ es indicativa de grupos -OH y -NH de estiramiento pertenecientes a proteínas y carbohidratos que constituyen la pared celular. La banda correspondiente a 2924 cm⁻¹ es representativa de grupos -CH₃ de estiramiento y de los grupos funcionales =CH₂ debido a la presencia de ácidos grasos encontrados en fosfolípidos de las membranas fúngicas. Las bandas observadas alrededor de 1630 y 1540 cm⁻¹ se atribuyen a amidas primarias correspondiente al estiramiento carbonílico de proteínas y N-H de flexión, respectivamente. Los grupos C=O se extienden en la banda 1750 cm⁻¹ demostrando la presencia de grupos carboxilos, mientras que la banda a 1030 cm⁻¹ identificadas como la vibración de estiramiento -CN de las fracciones de

proteínas, dicho estiramiento puede reflejarse también en longitudes de onda de 1350 cm^{-1} .

De forma general, existe una disminución en la absorción de las bandas para cada grupo funcional característico de la biomasa fúngica, principalmente los hongos *A. ustus*, *T. longibrachiatum* y *P. chrysogenum*, muestran una disminución más evidente de estas, indicando la participación de estos grupos en la reducción de Cr(VI). Para la biomasa fúngica de *P. boydii* se observa la desaparición de bandas a 2924 y 1750 cm^{-1} pertenecientes a grupos $-\text{CH}_3$ y $\text{C}=\text{O}$ lo que puede indicar la adsorción de Cr(VI) en esos grupos, además, se observa un incremento en la intensidad de la banda a 1350 cm^{-1} perteneciente a vibraciones de C-N de estiramiento propias de aminas. Por su parte, la biomasa de *F. oxysporum* mostró principal disminución de la intensidad en la banda 3260 cm^{-1} perteneciente a los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$, e incremento en la banda de absorción en 1750 cm^{-1} de grupos carboxilos.

Los principales componentes de la pared celular fúngica (proteínas, fosfolípidos, y polisacáridos) juegan un importante rol en la biorreducción de Cr(VI). Aunque algunos grupos funcionales se expresan diferente en las biomásas de los aislados fúngicos, los resultados obtenidos se asemejan a los descritos en otras investigaciones, incluyendo *A. niger* (Gu et al. 2014); *Penicillium griseofulvum* (Evy et al. 2015); *A. awamori* (Gochev et al. 2010), *Mucor racemosus* (Liu et al. 2007); *Neurospora crassa* (Tunali et al. 2005).

4.6.2 Potencial de carga cero de las cepas fúngicas metal tolerantes

La determinación del potencial de carga cero permite dilucidar si el mecanismo de eliminación de Cr(VI) está influenciado por la atracción electrostática entre los grupos funcionales presentes en la pared celular de la biomasa y el Cr(VI). Las concentraciones de H⁺ y OH⁻ adsorbidos sobre la superficie de la biomasa fúngica son iguales en el potencial de carga cero, por lo tanto, la carga superficial es neutra. La distribución de la carga superficial con respecto al pH de la solución, proporciona información para explicar la capacidad de la biomasa fúngica para adsorber ciertos iones. De esta forma, la biosorción de cationes es favorable a pH > pH_{PCC}, mientras que la biosorción de aniones se ve favorecida a pH < pH_{PCC}. En la Figura 29, se muestra el potencial de carga cero para la cepa *T. longibrachiatum*, representativo de los aislados fúngicos.

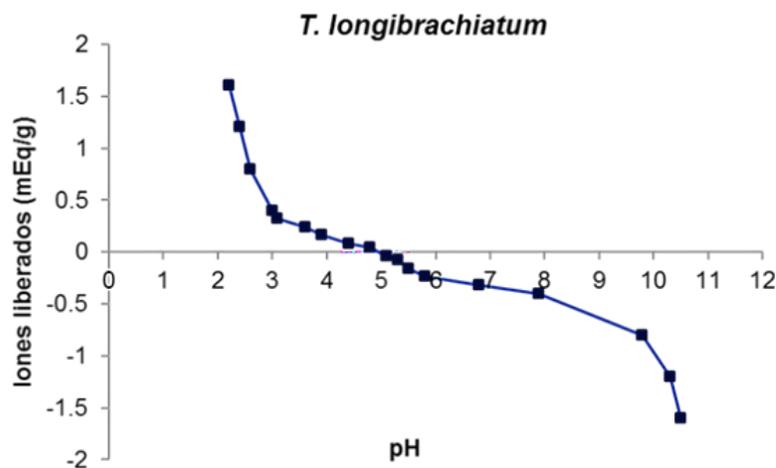


Figura 29. Potencial de carga cero (PCC) de *T. longibrachiatum* (G1).

El potencial de carga cero, determinado para las biomásas fúngicas en estudio, son; *A. ustus* (5.2); *T. longibrachiatum* (4.8); *P. boydii* (5.4); *P. chrysogenum* (5.5); *F. oxysporum* (5.8)

Por lo tanto, valores de pH por debajo del potencial de carga cero favorecería la atracción de aniones por la carga superficial neta positiva de la biomasa y contrariamente a un pH por arriba del PCC.

4.6.3 Biorreducción de Cr(VI) por las cepas fúngicas metal tolerantes

Los estudios de eliminación de Cr(VI) de solución acuosa realizado por biomasa activa e inactiva de los aislados fúngicos, mostraron que el porcentaje de eliminación con respecto al tiempo se favoreció al disminuir el pH a 2. Además, el Cr(III) que no se encontraba presente al inicio del proceso de eliminación de Cr(VI), apareció en solución acuosa en la misma proporción que la concentración inicial de Cr(VI) en el medio (en la mayoría de los casos). Por lo tanto, es de esperarse que la velocidad de eliminación de Cr(VI) incremente a medida que disminuya el pH, lo cual puede explicarse por los factores anteriormente mencionados.

De acuerdo con Park y colaboradores (2005), a medida que disminuye el pH, la carga de la superficie fúngica global se vuelve mayormente positiva y el ion cromato se une a los grupos cargados positivamente tales como aminos. Sin embargo, grupos donadores de electrones adyacentes reducen el Cr(VI) adsorbido a Cr(III) y por repulsión electrostática el Cr(III) permanece en solución. Dicho comportamiento se observó para las cepas fúngicas *A. ustus*, *P. chrysogenum*, *T. longibrachiatum*, y *F. oxysporum*, en dónde se encontró completamente el Cr(III) en solución acuosa.

Sin embargo, la reducción completa de Cr(VI) se alcanza principalmente por biomasa activa lo que puede atribuirse al crecimiento acelerado del hongo por

presencia de nutrientes esenciales en el medio, creándose así, nuevos sitios de unión. Además, se ha reportado que el NADH (dador inicial de electrones en la cadena respiratoria) así como algunas otras biomoléculas (quinonas, aminoácidos y proteínas) pueden fungir como donadores de electrones (O'Donnell et al. 2011) para que se lleve a cabo la reducción de Cr(VI) por biomasa metabólicamente activa y no únicamente por aquellos propios de la pared celular.

Para el caso especial de *P. boydii*, la disminución del cromo total al final de la reducción de Cr(VI) puede indicar la biosorción de Cr(VI), o bien, la microprecipitación de especies de óxido de Cr(III) sobre la biomasa fúngica. Este último, indicaría que el mecanismo de eliminación de Cr(VI) por las biomasas fúngicas metal tolerantes es a partir de la reducción del Cr(VI) a Cr(III). Para determinar la especiación de cromo en la biomasa de *P. boydii*, se analizó la biomasa por Espectroscopia Electrónica de Barrido (SEM), antes y después de la reducción de Cr(VI), ver Figura 30.

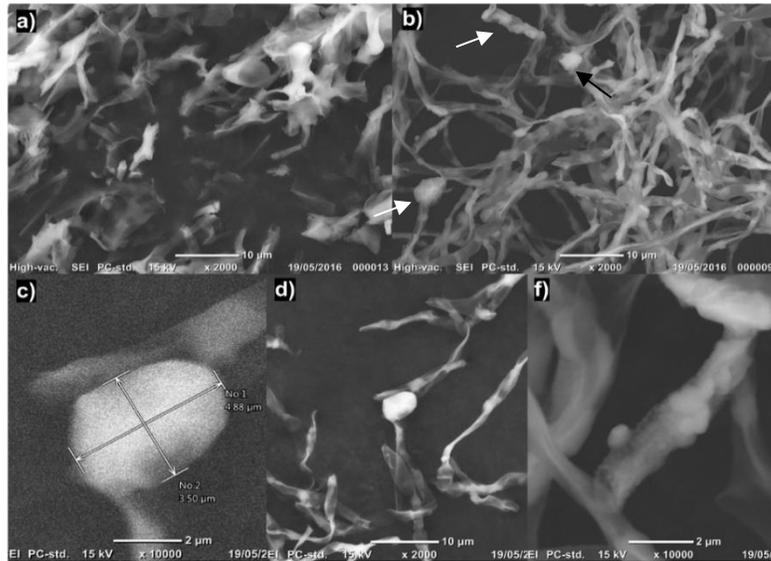


Figura 30. Micrografías por SEM de la biomasa de *P. boydii*; antes(a) y después (b, c, d, f) de la reducción de Cr(VI).

Las micrografías por SEM, indican la presencia de microprecipitación sobre el micelio de *P. boydii*, lo que no es observable en la biomasa antes de la reducción de Cr(VI).

Sin embargo, para confirmar la presencia de cromo, así como, el estado de oxidación en que se encuentra unido a la biomasa, se realizó un análisis por Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). En los espectros de alta resolución (Figura 31), se analizaron las señales de C1s, O1s y Cr2p; la cual es la de interés; identificando la posición del pico principal de ésta, se observa que corresponde a 576.03 eV; situada en el de los óxidos, en específico correspondiente a la señal de Cr(III) (Cr_2O_3 en las tablas de referencia del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST)).

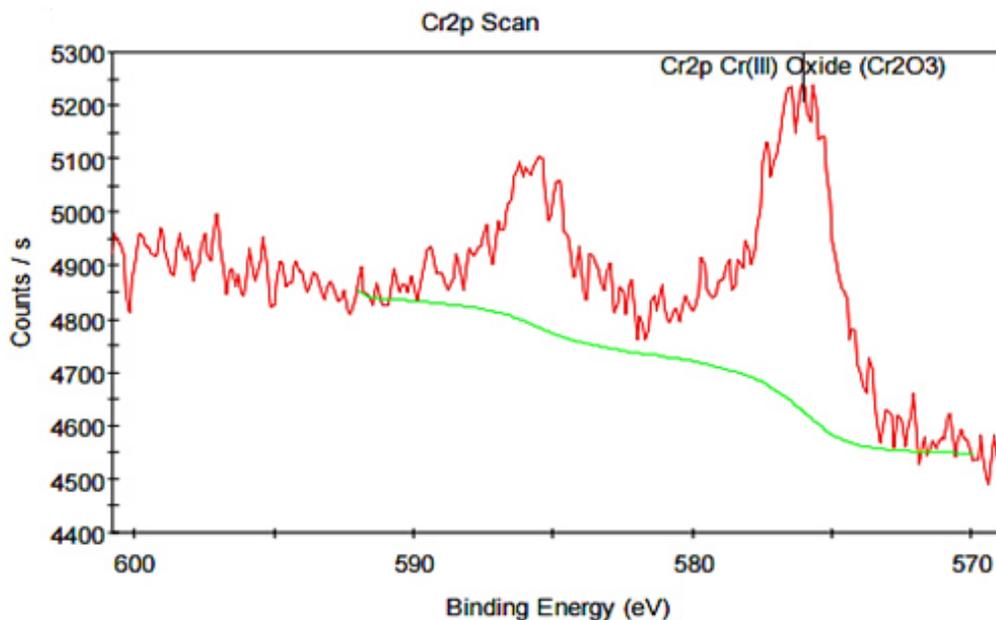


Figura 31. Espectro Cr2p de la biomasa de *P. boydii* después de la reducción de Cr(VI).

Estos resultados confirman que la eliminación de Cr(VI) por las biomásas fúngicas es a partir de una completa reducción de Cr(VI) a Cr(III).

4.6.4 Capacidad reductora de Cr(VI) de los aislados fúngicos

En la Figura 32 se muestra la capacidad de reducción de Cr(VI) obtenida para la biomasa fúngica *A. ustus*, en ella se puede observar que en las primeras 240 horas es cuando se alcanza la mayor capacidad de reducción por la biomasa. Posteriormente la capacidad de reducción aumenta más lento hasta alcanzar el equilibrio, es decir, la biomasa fúngica llega a su punto de saturación.

Las capacidades de reducción obtenidas por cada biomasa fúngica, así como, los parámetros del modelo cinético de pseudo primer orden se presentan en la Tabla X.

Como se puede observar, el orden de la capacidad de reducción obtenidas de mayor a menor por aislado fúngico son; *F. oxysporum* (345.82 mg g⁻¹); *P.*

boydii (337.93 mg g⁻¹); *P. chrysogenum* (298.48 mg g⁻¹); *A. ustus* (284.02 mg g⁻¹); *T. longibrachiatum* (261.67 mg g⁻¹).

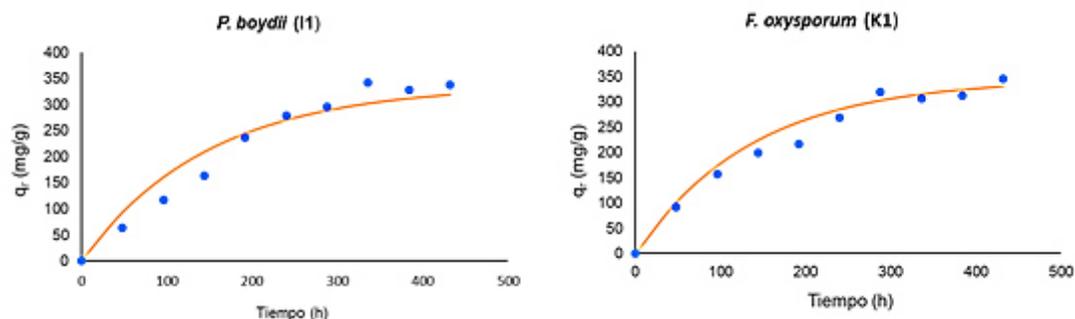


Figura 32. Capacidad de reducción de Cr(VI) de las biomazas de *P. boydii* y *F. oxysporum*. Datos experimentales (●); modelo de pseudo primer orden (-).

TABLA X

PARÁMETROS CINÉTICOS DEL MODELO DE PSEUDO PRIMER ORDEN

Biomasa	q_r (mg g ⁻¹)	k_1 (h ⁻¹)	q_c (mg g ⁻¹)	R^2
<i>A. ustus</i>	284.02	0.0074	272.79	0.98
<i>T. longibrachiatum</i>	261.67	0.0070	249.46	0.97
<i>P. boydii</i>	337.93	0.0067	319.46	0.95
<i>P. chrysogenum</i>	298.48	0.0088	291.97	0.98
<i>F. oxysporum</i>	345.82	0.0072	331.05	0.97

4.7 Biorreducción de metales valiosos (Au y Ag) por filtrado extracelular fúngico

Se ha demostrado la capacidad de la biomasa fúngica metal tolerante en la reducción de Cr(VI). Sin embargo, se ha reportado que los hongos tienen la ventaja de producir y excretar enzimas, proteínas, y moléculas orgánicas como agentes reductores de metales. Es por ello que fueron evaluados los filtrados

extracelulares de las cepas fúngicas en cuanto a su capacidad de reducir iones Ag^+ y Au^{3+} , utilizando como precursores sales metálicas de $AgNO_3$ y $HAuCl_4$.

Inicialmente, la reducción de oro y plata fue evaluada a partir del cambio de coloración en las mezclas de reacción. La reducción de oro requiere tres pasos de reducción (Siddiqi y Husen 2016) y se observa un cambio en las soluciones de color amarillo pálido a vino, ver Figura 33.

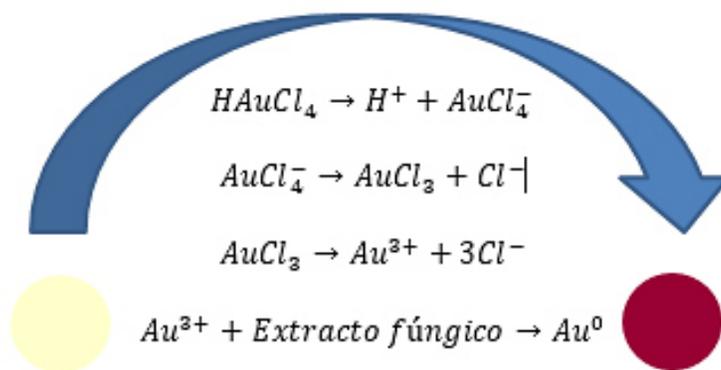


Figura 33. Reacciones de reducción de los iones $AuCl_4^-$.

La reducción de los iones de plata se refleja en el color de los filtrados celulares, que varían de amarillo claro a marrón, en un paso (Siddiqi y Husen 2016), ver Figura 34.

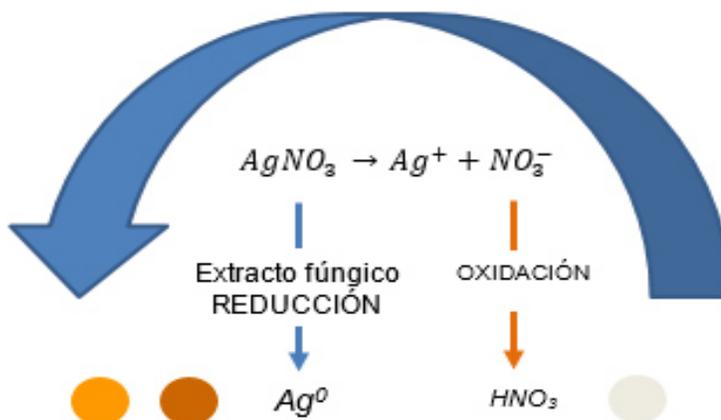


Figura 34. Reacción de reducción de los iones Ag^+ .

En la Figura 35, se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de biorreducción de iones Ag^+ y Au^{3+} a una concentración de 50 mg L^{-1} . Las soluciones de la mezcla de reacción presentaron un cambio de coloración en la solución al contacto con el filtrado extracelular fúngico, cuya intensidad de coloración dependió de cada hongo en estudio.



Figura 35. Pruebas de biorreducción de iones Ag^+ y Au^{3+} por filtrados extracelulares fúngicos.

La reducción de los iones Ag^+ y Au^{3+} por los diferentes filtrados extracelulares de los aislados fúngicos, se sometió a análisis espectral a diferentes tiempos de medición utilizando el espectrofotómetro UV-visible. El cambio de color de las soluciones se debió a la excitación de las vibraciones de los plasmones superficiales, característicos en la formación de nanopartículas de oro y plata localizada en la longitud de onda máxima de 530 y 420 nm, respectivamente. Las cinéticas de reacción se monitorearon cada 24 h para cada filtrado extracelular fúngico.

La evolución de absorbancias respecto al tiempo en la reacción de reducción de iones Ag^+ y Au^{3+} por el filtrado extracelular de *A. ustus* (A1) se muestra en la Figura 36.

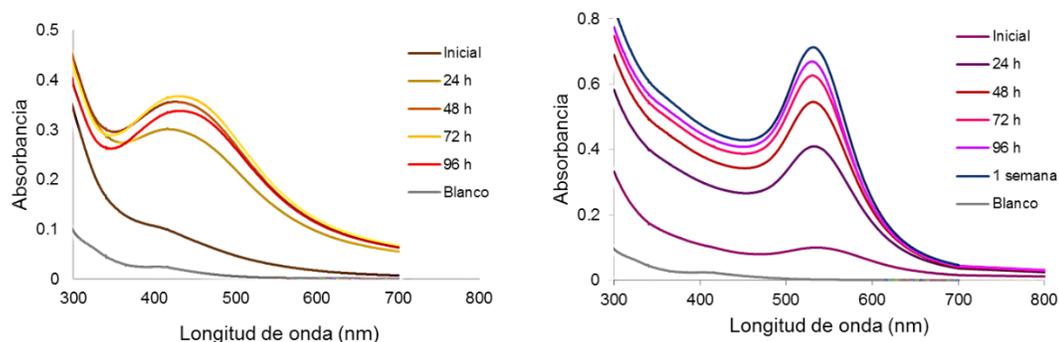


Figura 36. Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag (izquierda); Au (derecha); Filtrado extracelular *A. ustus*.

La longitud de onda máxima de LSPR (Resonancia Superficial de Plasmón Localizado) se encontró en 430 y 533 nm para plata y oro, respectivamente, aumentando en intensidad con el tiempo. Las absorbancias obtenidas para plata, aumentaron de 0.299 en 24 h de reacción a 0.366 a las 96 h. Sin embargo, un mejor comportamiento se observó para oro, en la primera hora de reacción se obtuvo una absorbancia de 0.099, incrementando de 0.408 en 24 h a 0.670 a las 96 h. Posteriormente, a una semana de reacción la solución de AuNPs se mantuvo estable con un incremento en la absorbancia de 0.712.

La cinética de reducción de Ag^+ y Au^{3+} por el filtrado extracelular de *T. longibrachiatum*, mostró un incremento en las absorbancias para oro de 0.326 a 0.401, de 24 a 96 h, respectivamente, y 0.457 en una semana. La longitud de onda máxima de LSPR se encontró en 534 nm, como se observa en la Figura 37.

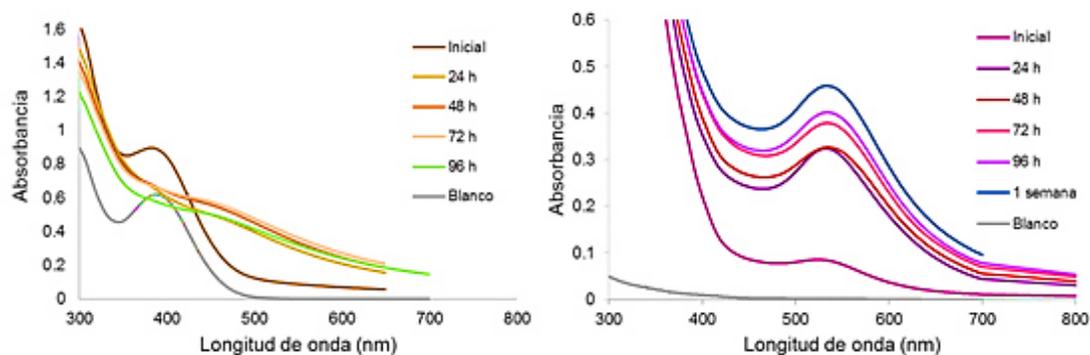


Figura 37. Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag (izquierda); Au (derecha); Filtrado extracelular *T. longibrachiatum*.

En el caso de plata, la intensa pigmentación del filtrado extracelular de *T. longibrachiatum* presenta absorbancia (0.61) a la misma longitud de onda (400 nm) que la del plasmón superficial para las AgNPs por lo que las señales se traslapan.

En la Figura 38, se muestra la aparición de picos de absorbancia en los espectros UV-Vis a 425 y 536 nm para plata y oro, respectivamente, confirmando la síntesis de nanopartículas para ambos metales por *P. boydii*. Las absorbancias correspondientes a las longitudes máximas de LSPR para oro y plata, aumentaron con respecto al tiempo sin mostrar desplazamiento alguno en la longitud de onda. A las 24 h de reacción se observa una absorbancia de 0.248 y 0.509 a las 96 h para plata. Las absorbancias para el caso de oro fueron menores, aumentando de 0.109 a 0.22 en 24 y 96 h, respectivamente.

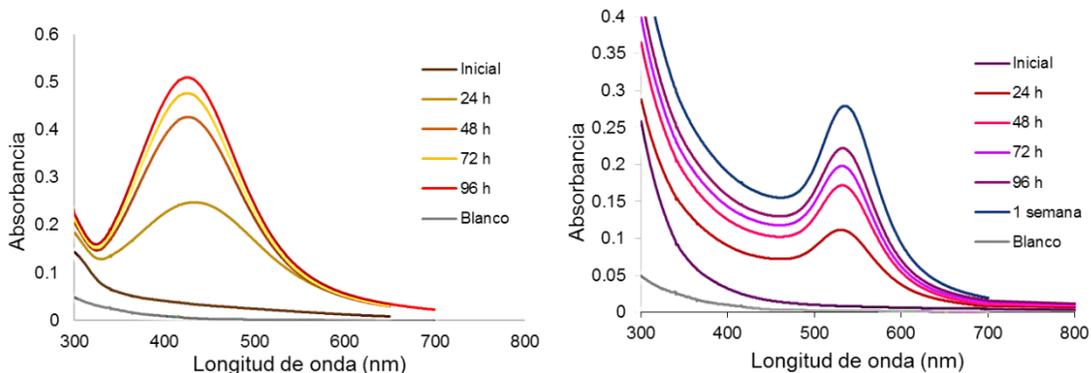


Figura 38. Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag (izquierda); Au (derecha); Filtrado extracelular *P. boydii*.

El filtrado extracelular de *P. chrysogenum* mostró los valores de absorbancia más altos para ambos metales, localizándose las longitudes máximas de LSPR en 530 y 430 nm para oro y plata. Las absorbancias obtenidas a las 96 h para ambos metales fueron de 1.596 para el caso de plata y 0.705 para oro, como se observa en la Figura 39.

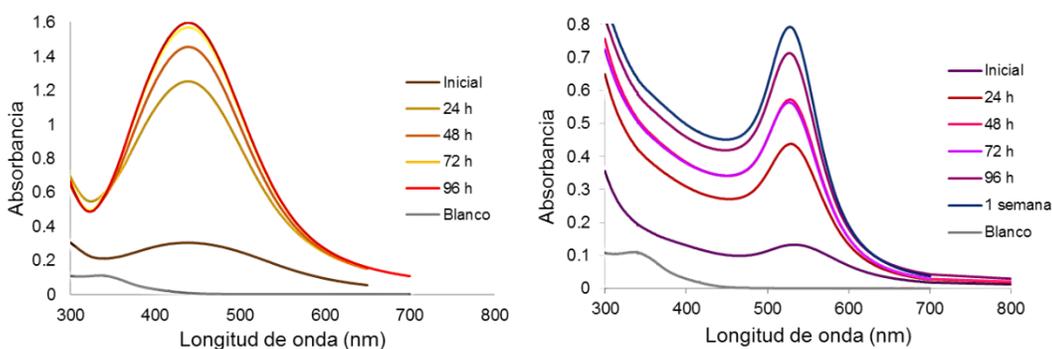


Figura 39. Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag (izquierda); Au (derecha); Filtrado extracelular *P. chrysogenum*.

Además, se puede observar que la reducción de los iones Ag^+ y Au^{3+} es inmediata a partir de este hongo, obteniéndose absorbancias al inicio de la reacción de 0.132 y 0.302 para oro y plata, respectivamente. Los espectros UV-

Vis de las reacciones de reducción de los iones Ag^+ y Au^{3+} con el filtrado extracelular de *F. oxysporum* en función del tiempo, se muestran en la Figura 40.

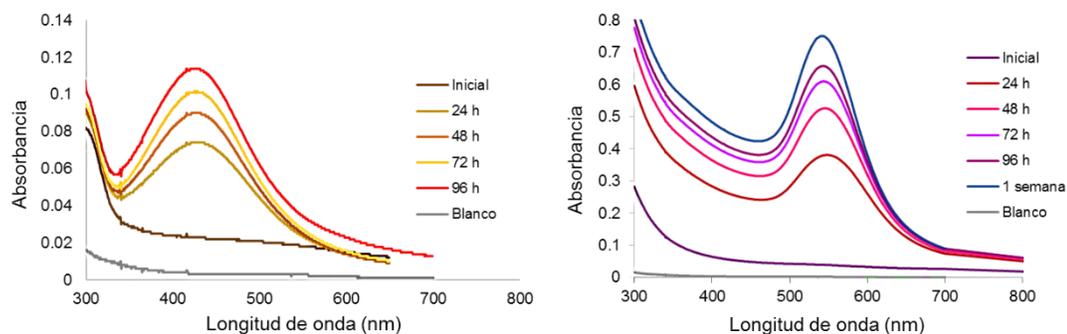


Figura 40. Espectros UV-Vis a diferentes tiempos. Ag (izquierda); Au (derecha); Filtrado extracelular *F. oxysporum*.

La longitud máxima de LSPR exhibido para AgNPs fue de 422 nm, con una absorbancia a las 24 h de 0.074, incrementando a las 96 h en 0.101. En el caso de AuNPs, el plasmón superficial de resonancia se localizó a una longitud de 538 nm y presentó una absorbancia a las 24 h de 0.381; 0.655 a las 96 h; 0.745 en una semana.

En el 2014, Agnihotri S. y colaboradores presentan un espectro UV-Vis de AgNPs que exhibe fuertes picos de extinción en longitudes de ondas específicas, los cuales se relacionan a tamaños promedios de nanopartículas, ver Figura 41. Los máximos de absorción de AgNPs desplazados hacia una mayor longitud de onda corresponden con el aumento en el tamaño de las nanopartículas. Además, el ancho total a la mitad del máximo pico de absorción determina la dispersión de las nanopartículas, atribuyendo que un mayor ensanchamiento de este, representa polidispersidad.

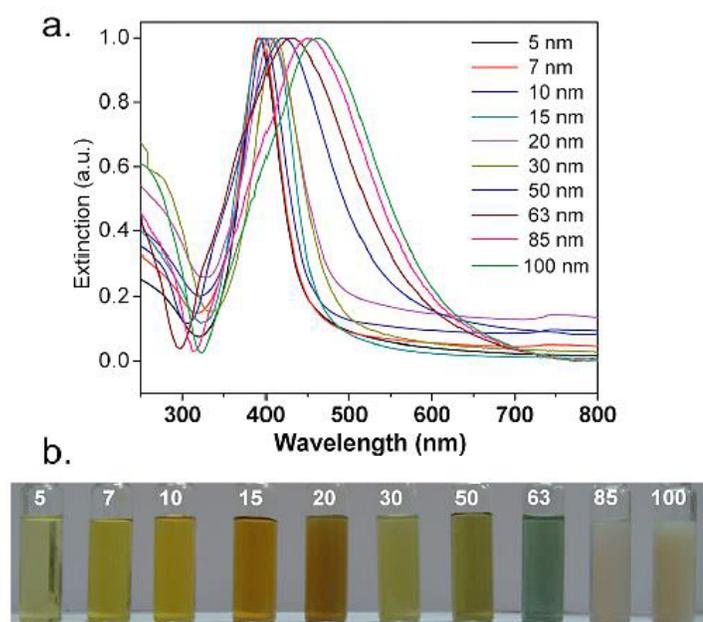


Figura 41. (a) Espectro de extinción UV-Vis. (b) Color distintivo de diferentes tamaños de nanopartículas de plata (Agnihotri et al. 2014).

De acuerdo con Agnihotri y colaboradores, se puede asumir que para *A. ustus* existe polidispersidad en el tamaño de las nanopartículas de plata entre 20 y 85 nm. Sin embargo, para *P. boydii* se esperan tamaños de nanopartículas entre 15 -20 nm con mayor monodispersión; *P. chrysogenum* (30-50 nm); *F. oxysporum* (15-30 nm).

Resultados similares se han reportado para especies de *Trichoderma* (*asperellum*, *harzianum*, *longibrachiatum*, *pseudokoningii* y *virens*) con capacidad de biosintetizar AgNps entre 8-60 nm (Prameela Devi et al. 2013); *Aspergillus tamarii*, 25- 50 nm (Kumar et al. 2015); *F. oxysporum*, 20- 50 nm (Husseiny et al. 2015); *Pleurotus ostreatus*, 50 nm (Devika et al. 2012); *A. flavus*, 6-17 nm (Jain et al. 2011); *Penicillium citrinum*, 109 nm (Honary et al. 2013).

En el 2007, Njoki y colaboradores presentan un espectro UV-Vis normalizado para AuNPs con diferentes tamaños de partículas en solución acuosa, como se observa en la Figura 42.

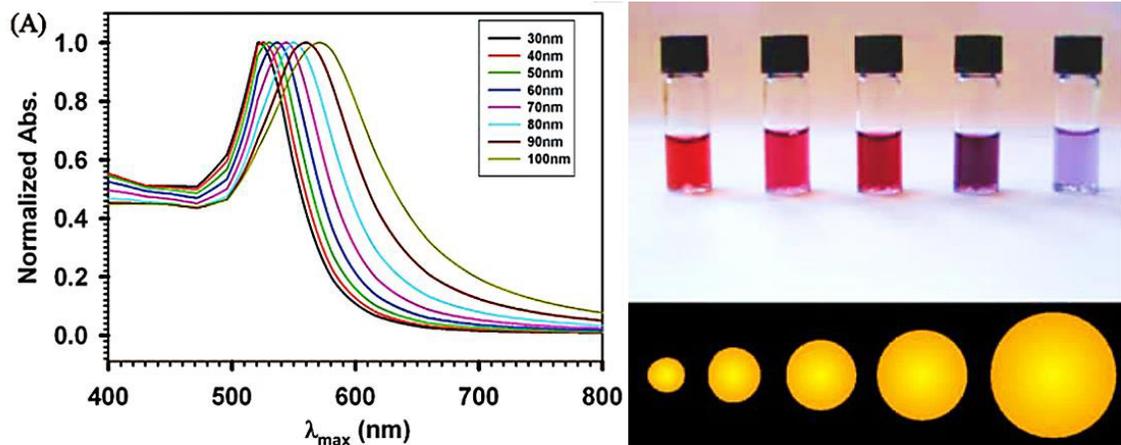


Figura 42. Espectro UV-vis (normalizado) para AuNPs con diferentes tamaños de partículas en solución acuosa (Njoki N et al. 2007).

Los resultados espectrales obtenidos para AuNPs indican en relación a lo publicado por Njoki y colaboradores los siguientes tamaños de partículas; *A. ustus*, 30- 50 nm; *T. longibrachiatum*, 30- 50 nm; *P. boydii*, 40- 50 nm; *P. chrysogenum*, 30- 40 nm; *F. oxysporum*, 50- 60 nm.

El filtrado extracelular fúngico ha sido estudiado para la biosíntesis de AuNPs por hongos como; *Alternaria alternata* (Sarkar et al. 2012); *F. solani* (Gopinath y Arumugam 2013); *Penicillium sp.*(Du et al. 2011); los cuales reportaron tamaños de partículas de 12- 5 nm, 20- 50 nm, y 30- 50 nm, respectivamente.

4.7.1 Biosíntesis de nanopartículas metálicas de iones Au^{3+} y Ag^+ vía microondas

Estudios han demostrado que la irradiación con microondas para la síntesis de nanopartículas, provoca un calentamiento rápido y uniforme del medio de reacción. Por lo tanto, proporciona una nucleación homogénea y condiciones de crecimiento que dan como resultado nanopartículas monodispersas en un tiempo de reacción corto. Sin embargo, a pesar de los beneficios que proporciona esta técnica, sólo ha sido aplicado para la síntesis verde de nanopartículas a partir de extracto de plantas. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto de la irradiación de microondas sobre la síntesis de nanopartículas de iones Au^{3+} y Ag^+ a partir de los filtrados extracelulares de los hongos seleccionados. En la figura 43 se muestran los espectros de absorción de la síntesis de nanopartículas de oro y plata por cada filtrado fúngico. *T. longibrachiatum* mostró la mayor absorbancia (2.034) a la longitud de onda máxima de LSPR para plata. Mientras que, *A. ustus* mostró la mayor absorbancia (0.40) en el caso de oro.

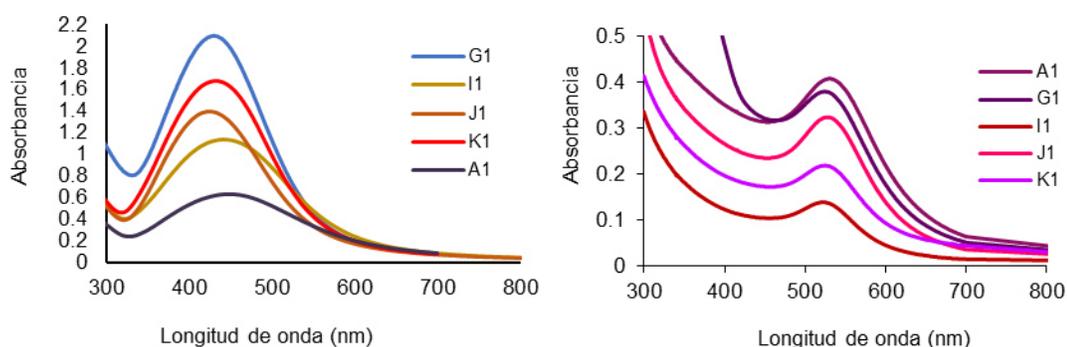


Figura 43. Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas con un tiempo de reacción de 1 min.

Además, se realizó una comparación de los resultados obtenidos en la síntesis de nanopartículas vía convencional a las 24 horas de reacción, y las producidas vía microondas en 1 min. En la figura 44, se muestran los espectros de absorción UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de plata y oro por el filtrado extracelular de *A. ustus*. El pico máximo de absorbancia se incrementó de 0.299 obtenido por el método convencional a 0.626 en en la síntesis de nanopartículas de plata vía microondas. Sin embargo, en la síntesis de nanopartículas de oro el pico máximo de absorbancia (0.404) fue el mismo por ambos métodos.

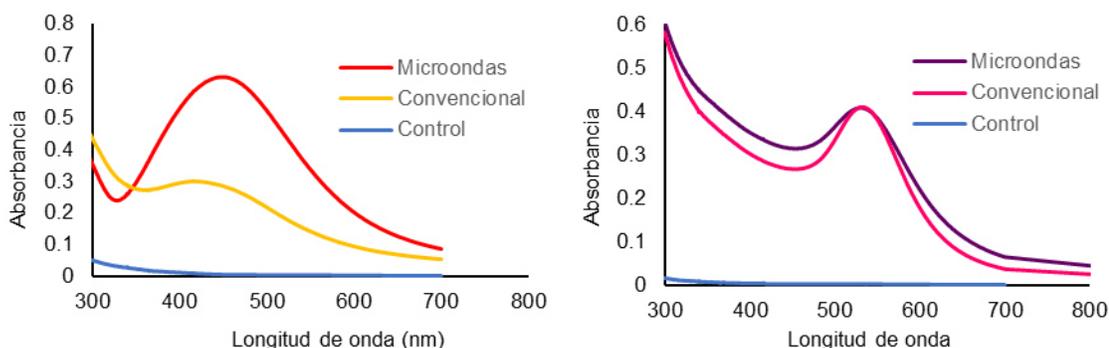


Figura 44. Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *A. ustus*.

Por otro lado, una mejor optimización de las síntesis de nanopartículas de plata se obtuvo con el filtrado extracelular de *T. longibrachiatum* vía microondas, como se muestra en la figura 45. La intensa pigmentación del filtrado interfirió en la caracterización por espectrofotometría UV-Vis utilizando el método convencional. Sin embargo, dicha pigmentación resultaba inapreciable después del calentamiento por microondas, alcanzando un pico máximo de absorbancia de 2.102 a una longitud de onda de 422 nm. Así mismo, hubo un ligero incremento en la absorbancia en la síntesis de nanopartículas de oro por el

método convencional a microondas, de 0.324 a 0.378. Sin embargo, este incremento en la absorbancia se vió acompañado con un ligero desplazamiento de la longitud máxima de LSPR de 533 a 529 nm, respectivamente.

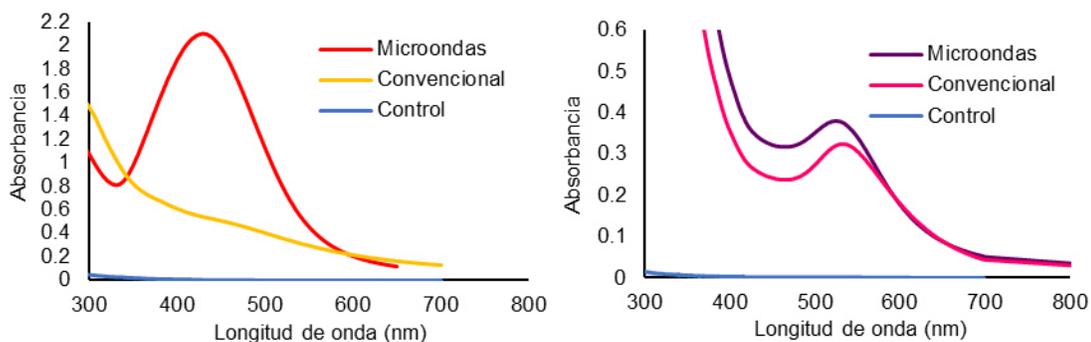


Figura 45. Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *T. longibrachiatum*.

Resultados similares fueron obtenidos con el filtrado extracelular de *P. boydii*. El pico máximo de absorbancia en la síntesis de nanopartículas de ambos metales se incrementó utilizando el método por microondas. Las absorbancias obtenidas fueron de 0.247 a 1.136 y 0.109 a 0.138 para plata y oro, respectivamente. En la figura 46, podemos ver los espectros UV-Vis para cada metal.

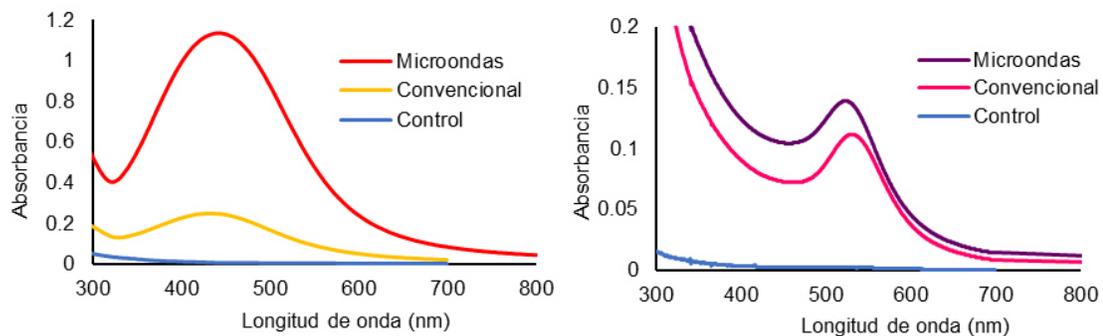


Figura 46. Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *P. boydii*.

Tal y como se puede observar en la figura 47, la síntesis de nanopartículas de plata por microondas a partir del filtrado extracelular de *P. chrysogenum* no sólo mostró un incremento en el pico máximo de absorbancia. Además, la banda obtenida es más afilada o estrecha que la que se observa por el método convencional. Lo anterior, demuestra que utilizando el método por microondas se obtiene una mayor monodispersión en el tamaño de las partículas de plata. Por el contrario, en la síntesis de nanopartículas de oro fue a partir del método convencional el que alcanzó una mayor absorbancia de 0.437.

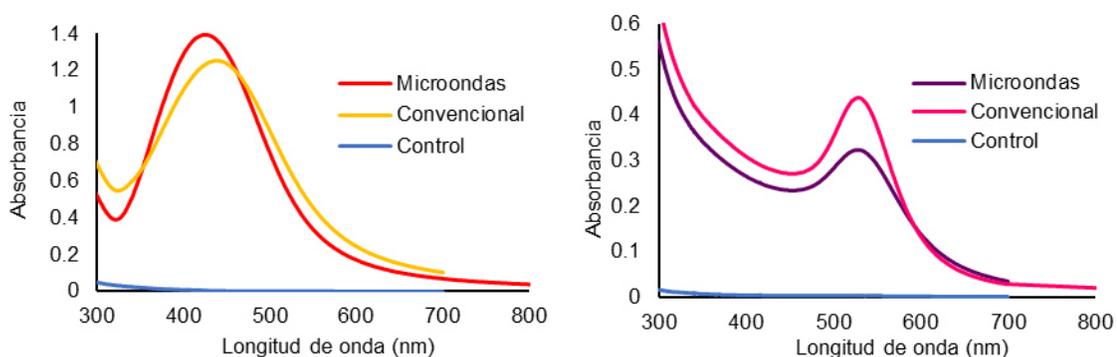


Figura 47. Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *P. chrysogenum*.

La síntesis de nanopartículas de plata por el filtrado extracelular de *F. oxysporum*, presentó resultados similares a los de *P. chrysogenum*, mostrando un incremento significativo en la absorbancia obtenida con el método por microondas de 0.074 a 0.159. No así para el caso de oro en dónde la absorbancia fue mayor por el método convencional con un valor de 0.378, ver figura 48.

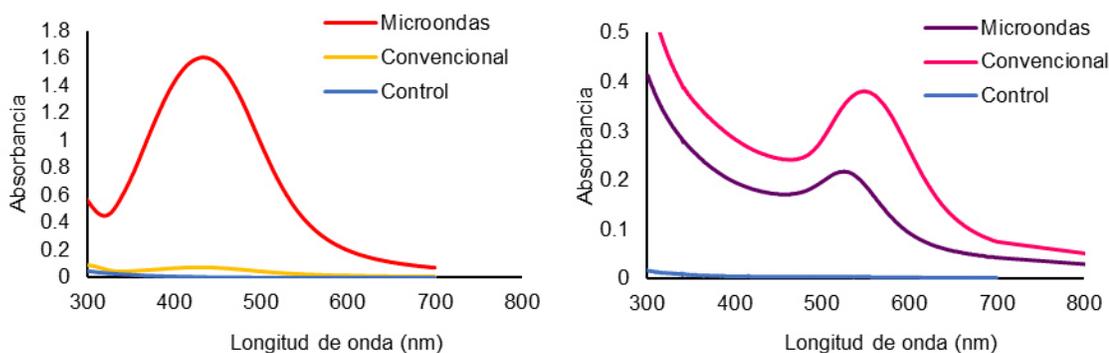


Figura 48. Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de Ag (izquierda) y Au (derecha), vía microondas y vía convencional por el filtrado extracelular de *F. oxysporum*.

De manera general, el calentamiento homogéneo de las mezclas de reacción vía microondas, favoreció la biosíntesis de nanopartículas de plata con cada filtrado extracelular. El pico máximo de absorbancia se incrementó en cada caso y se obtuvieron bandas agudas lo que indica una mayor monodispersión en el tamaño de las partículas. Para el caso de oro, sólo los valores de absorbancia para *T. longibrachiatum* y *P. boydii* se incrementaron vía microondas, y fueron iguales en el caso de *A. ustus*. Por lo tanto, las altas temperaturas aplicadas por esta técnica no afecta a las moléculas orgánicas con poder reductor, permitiendo así que en 1 minuto se obtenga no sólo la reducción de los metales, sino la síntesis de nanopartículas.

Por otro lado, el análisis por FT-IR de los filtrados extracelulares mostrados en la figura 49, presentan bandas características entre $3300-3200\text{ cm}^{-1}$ atribuidas a grupos -OH y -NH, pertenecientes a proteínas, carbohidratos y aminas primarias. Entre 1640 y 1500 cm^{-1} encontramos bandas propias de grupos C=O y N-H de flexión, que se atribuyen al estiramiento carbonílico de proteínas y amidas I de polipéptidos. Además, se encuentra una banda alrededor de 1030 cm^{-1} del enlace C-N de estiramiento en aminas. En los espectros por FT-IR de

las nanopartículas de oro y plata se observan las mismas bandas características de los componentes del filtrado extracelular. Esto indica, que las moléculas orgánicas con poder reductor que participan en la síntesis de las nanopartículas, también contribuyen en el recubrimiento de las partículas evitando su aglomeración y manteniendo su estabilidad.

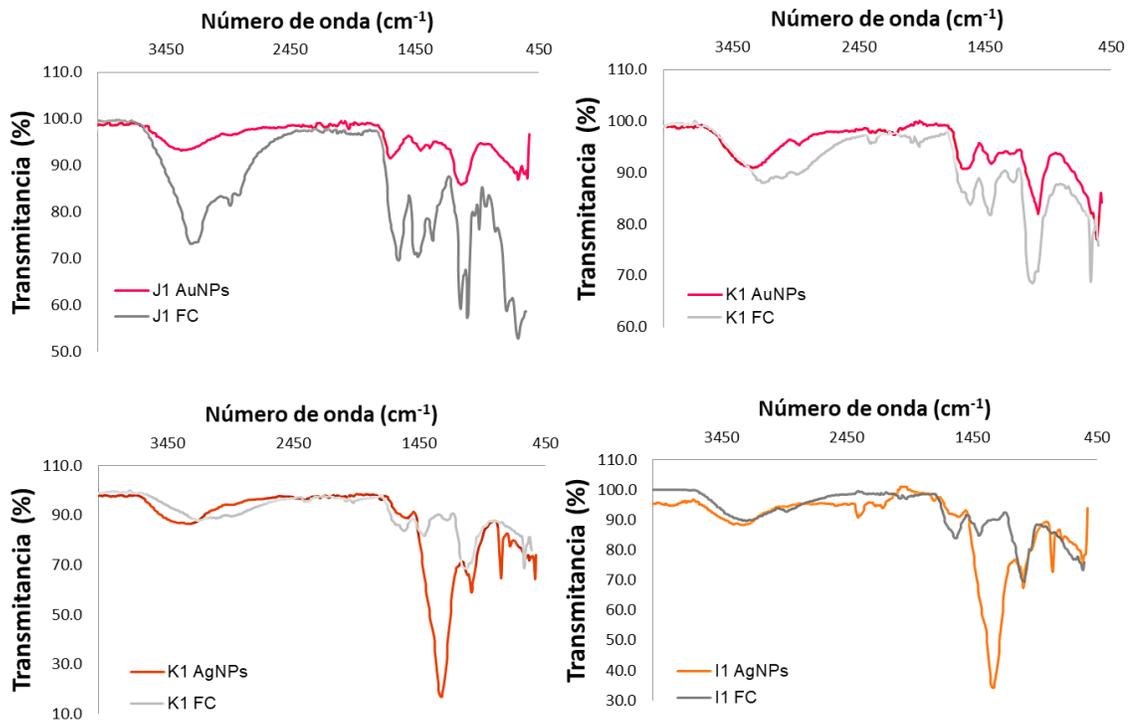


Figura 49. Espectros FT-IR de los filtrados extracelulares y (a) AuNPs sintetizadas por *P. chrysogenum* (J1) y *F. oxysporum* (K1); y AgNPs sintetizadas por *F. oxysporum* (K1) y *P. boydii* (I1).

Gopinath y Arumugam (2014), estudiaron la biorreducción de iones Au^{3+} a partir del filtrado extracelular de *Fusarium solani* a pH 8.5. El máximo pico de absorbancia fue encontrado a las 24 h de reacción y a una longitud de onda de 527 nm. Además, realizaron mediciones por FTIR para identificar las posibles biomoléculas responsables de la reducción de los iones Au^{3+} y el recubrimiento

de las nanopartículas de oro sintetizadas por el filtrado fúngico. Los espectros FTIR revelaron la presencia de grupos funcionales que concuerdan con los obtenidos en este estudio. Mukherjee y colaboradores en el 2002, indicaron que las bandas a 1650 y 1540 cm^{-1} se identifican como bandas de amidas I y II y son debido al estiramiento carbonílico y vibraciones N-H de estiramiento en los enlaces amida de proteínas. Incluso, las posiciones de estas bandas son cercanas a las reportadas para proteínas nativas. Además, sugieren que el mecanismo de la biosíntesis extracelular de nanopartículas sea por la enzima nitrato reductasa secretada por hongos y que está implicada en la biorreducción de iones metálicos, Sin embargo, numerosos agentes reductores y protectores son secretados por estos y pueden también estar involucrados en el proceso de biorreducción.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

Se obtuvieron ocho cepas fúngicas de los sitios seleccionados, dichos aislados obtenidos disminuyeron conforme aumentaba la concentración de metales presentes en ellos, lo que indica el efecto adverso que estos contaminantes tienen sobre la microbiota. El género y especie de cada una de las cepas pertenecieron a; (A1) *Aspergillus ustus*, (B1) *Penicillium janthinellum*, (D1) *Rasamsonia emersonii*, (G1) *Trichoderma longibrachiatum*, (I1) *Pseudallescheria boydii*, (J1) *Penicillium chrysogenum*, (K1) *Fusarium oxysporum*, (L1) *Acremonium sclerotigenum*; por lo que sitios con presencia de metales pesados son fuentes de aislamiento de una diversidad de hongos metal tolerantes. Las pruebas de CMI e índice de tolerancia a Cr(VI) realizadas, indicaron que aún cuando sólo *P. chrysogenum* se aisló de un suelo con una alta concentración de Cr(VI), cepas como *T. longibrachiatum*, *P. janthinellum*, *F. oxysporum* y *A. sclerotigenum*, presentaron la misma tolerancia al metal de 1000 ppm. Lo anterior, puede estar relacionado a que los mismos mecanismos utilizados por los hongos para resistir altas concentraciones de otros metales, pueden ser empleados para tolerar Cr(VI).

Las pruebas de eliminación de Cr(VI) por biomasa activa e inactiva de los hongos metal tolerantes, indicaron que la biomasa activa presenta un mayor porcentaje de eliminación de Cr(VI) con respecto al tiempo, a una concentración inicial de Cr(VI) de 50 mg L⁻¹. Las cepas fúngicas *T. longibrachiatum*, *P. boydii* y *F. oxysporum*, alcanzaron la completa eliminación de Cr(VI) a pH 4 en un tiempo

de 144 h de contacto, mientras que *P. chrysogenum* a las 168 h. Además, al disminuir el pH a 2, el tiempo de eliminación por las cepas *F. oxysporum* y *P. boydii* disminuyó de 144 a 96 h; *T. longibrachiatum* de 168 a 120 h; *P. chrysogenum* de 168 a 144 h y *A. ustus* alcanzó la completa eliminación a las 144 h.

Se determinó que el mecanismo de eliminación de Cr(VI) por los aislados fúngicos estudiados es a partir de la reducción de Cr(VI) a Cr(III). El potencial de carga cero evaluado para cada biomasa fúngica (5.0-5.7), permite dilucidar que la reducción a pH 2 se favorece debido a la protonación de grupos funcionales en la biomasa (caracterizados por FT-IR) atrayendo electrostáticamente a los aniones de Cr(VI) los cuáles son reducidos por grupos donadores de electrones propios de la pared celular de la biomasa fúngica. Debido a que la reducción se ve favorecida por la biomasa metabólicamente activa, se deben considerar otros factores como es el crecimiento del hongo por la presencia de nutrientes permitiendo la existencia de nuevos sitios, así como la participación de otros donadores de electrones pertenecientes al metabolismo. Sin embargo, la biomasa inactiva a pH1 presenta capacidades de reducción de Cr(VI) de 261.7 a 345.82 mg g⁻¹. Por su parte, la cepa de *P. boydii* presentó bioacumulación de cromo posterior a la reducción de Cr(VI). Los resultados fueron corroborados por SEM, observándose una microprecipitación y acumulación en el micelio del hongo. El análisis de la biomasa por XPS indicó la presencia de Cr₂O₃, lo que confirmó la completa reducción del Cr(VI) por los aislados fúngicos.

El análisis espectral de las soluciones de reducción entre los iones Ag^+ y Au^{3+} y el filtrado extracelular fúngico a diferentes tiempos, indicaron que el cambio de color (vino/marrón) de las soluciones se debió a la excitación de las vibraciones de los plasmones superficiales característicos en la formación de nanopartículas de oro y plata. Además, se logró optimizar la síntesis de nanopartículas de Ag(I) a partir de la irradiación por microondas, disminuyendo el tiempo de reacción a 1 min. Dicha técnica, ha sido ampliamente utilizada con extractos de plantas, sin embargo, no ha sido estudiada para hongos filamentosos. Los espectros por FT-IR mostraron grupos funcionales característicos de los componentes orgánicos reductores presentes en el filtrado extracelular, que además, se encuentran recubriendo a las nanopartículas de oro y plata dándoles estabilidad al evitar su aglomeración.

Por lo tanto, se logró obtener un aprovechamiento global de las propiedades de los hongos metal tolerantes, siendo la biomasa un agente reductor de aniones, que puede ser una alternativa para la detoxificación de sitios contaminados con Cr(VI) . Por su parte, el filtrado extracelular fúngico presenta propiedades como un agente reductor de cationes, como son los iones Ag^+ y Au^{3+} y cuya potencialidad para la síntesis biogénica de nanopartículas metálicas es de interés en amplias aplicaciones tecnológicas.

Capítulo 6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abigail M AE, Samuel MS, Chidambaram R (2015) Hexavalent chromium biosorption studies using *Penicillium griseofulvum* MSR1 a novel isolate from tannery effluent site: Box-Behnken optimization, equilibrium, kinetics and thermodynamic studies. J Taiwan Inst Chem Eng 49:156–164.
- Abubacker MN, Kirthiga B (2013) Biosorption of *Aspergillus flavus* NCBT 102 biomass in hexavalent chromium. Biosci Biotechnol Res Asia 10:767–773.
- Acosta R I, Arévalo R DL and Cárdenas G JF (2015) Hexavalent chromium (VI) Removal by *Penicillium* sp. IA-0. Advances in Bioremediation of wastewater and polluted soil. Environmental Engineering.
- Acosta R I, Cárdenas G JF (2010) Hexavalent chromium removal by a *Paecilomyces* sp. fungal strain isolated from environment. Bioinorg Chem Appl.
- Akhtar MS, Panwar J, Yun Y-S (2013) Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticle by Plant Extracts. ACS Sustainable Chem Eng 1(6):591-602.
- Anil Kumar S, Abyaneh K M, Gosavi S W, Kulkarni S K, Pasricha R, Ahamad A, Khan M I (2007) Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. Biotechnol Lett 29:439-445.
- Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S (2014) Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. RSC Adv 4(8):3974–3983.

- Ahmad I, Ansari M I, Aqil F (2006) Biosorption of Ni, Cr and Cd by metal tolerant *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* using single and multi-metal solution. Indian J Exp Biol 44(1):73–76.
- Ahmad I, Zafar S, Ahmad F (2005) Heavy metal biosorption potential of *Aspergillus* and *Rhizopus sp.* isolated from wastewater treated soil. J Appl Sci Environ Manag 9:123-126.
- Anahid S, Yaghmaei S, Ghobadinejad Z (2011) Heavy metal tolerance of fungi. Scientia Iranica 18(3 C):502–508.
- Anand P, Isar J, Saran S, Saxena RK (2006) Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. Bioresour Technol 97:1018–1025.
- Appenroth KJ, Bischoff M, Gabryś H, Stoeckel J, Swartz HM, Walczak T, Winnefeld K (2000) Kinetics of chromium(V) formation and reduction in fronds of the duckweed *Spirodela polyrhiza*-a low frequency EPR study. J Inorg Biochem 78:235–242.
- Arshad A, Aishatul B (2015) *Aspergillus niger*- a novel heavy metal bio-absorbent and pesticide tolerant fungus. Res J Chem Environ 19:57–66.
- Arslan P, Beltrame M, Tomasi A (1987a) Intracellular chromium reduction. Biochimica et Biophysica Acta 931(1):10–15.
- Arslan P, Beltrame M, Tomasi A (1987b) Intracellular chromium reduction. Biochimica et Biophysica Acta 931(1): 10–5.
- Arumugam A, Gopinath K (2013) Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using *Fusarium solani*. Appl Nanosci 4:657.
- Aylett B J (1985). Chemistry of the elements. Polyhedron 4(10):1799-1800.

- Baldrian P (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol* 32:78–91.
- Bánfalvi G (2011) Cellular Effects of Heavy Metals. *Media* 3–28.
- Barceloux D G (1999). Donald G. Barceloux 37(2):173–194.
- Barrera D CE, Lugo L V, Bilyeu B (2012) A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. *J Hazard Mater* 223-224:1–12.
- Beaumont JJ, Sedman RM, Reynolds SD, Sherman CD, Li LH, Howd R A, Sandy M S, Zeise L, Alexeeff G V (2008) Cancer mortality in a Chinese population exposed to hexavalent chromium in drinking water. *Epidemiology* 19:12–23.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett* 254:173–181.
- Bennett RM, Cordero PRF, Bautista GS, Dedeles GR (2013) Reduction of hexavalent chromium using fungi and bacteria isolated from contaminated soil and water samples. *Chem Ecol* 29:320–328.
- Blaudez D, Jacob C, Turnau K, Colpaert JV, Ahonen-Jonnarth U, Finlay R, Botton B, Chalot M (2000) Differential Responses of Ectomycorrhizal Fungi to Heavy Metals *in vitro*. *Mycol Res* 104:1366–1371.
- Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799–808.

- Calvo M C, Avila R M, Ulloa M F, Vazquez J R (2004) Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85:63–68.
- Cañizares V RO (2000) Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42(3):131–143.
- Cervantes C, Campos G AJ, Devars S, Gutiérrez C F, Loza T H, Torres G JC, Moreno S (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:335–347.
- Cervantes C, Espino S AE, Acevedo A F, León R IL, Rivera C ME, Ávila R M, Wrobel K K, Wrobel Z K, Gutiérrez C JF, Rodríguez Z JS, Moreno S R (2006) Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev Latinoam Microbiol* 48:203–210.
- Chen J P, Lim L L (2002) Key factors in chemical reduction by hydrazine for recovery of precious metals. *Chemosphere* 49(4):363–370.
- Cheung KH, Gu JD (2007) Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *Int Biodeterior Biodegrad* 59:8–15.
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212:475-486.
- Coreno A A, Acevedo A FJ, Reyna L GE, Tomasini A, Fernández FJ, Wrobel K, Wrobel K, Gutiérrez C JF (2009) Cr(VI) reduction by an *Aspergillus tubingensis* strain: Role of carboxylic acids and implications for

natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination. *Chemosphere* 76:43–47.

- Corona J, Saldana A (2010) Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Rev latinoam Biotecnol Amb Algal* 1:47–63.
- Costa M (2003) Potential hazards of hexavalent chromate in our drinking water. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 188:1–5.
- Cotton F A, Wilkinson G, Murillo C. A, Bochmann M (1999) *Advanced Inorganic Chemistry: Sixth Edition.*
- Das A P, Singh S (2011) Occupational health assessment of chromite toxicity among Indian miners. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine* 15(1):6–13.
- Das SK, Guha AK (2009) Biosorption of hexavalent chromium by *Termitomyces clypeatus* biomass: Kinetics and transmission electron microscopic study. *J Hazard Mater* 167:685–691.
- Das SK, Mukherjee M, Guha AK (2008) Interaction of chromium with resistant strain *Aspergillus versicolor*: Investigation with atomic force microscopy and other physical studies. *Langmuir* 24:8643–8650.
- Dayan AD, Paine AJ (2001) Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol* 20:439–451.
- De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zancchi P (1990) Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Research* 238(2): 99–172.

- De Sotto R, Monsanto RZ, Edora JL, Bautista RH, Bennett RM, Dedeles GR (2015) Reduction of Cr(VI) using indigenous *Aspergillus* spp. Isolated from heavy metal contaminated sites. *Mycosphere* 6(1):53-59.
- Dönmez G, Aksu Z (2002) Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochem* 38:751–762.
- Dönmez, Koçberber N (2005) Bioaccumulation of hexavalent chromium by enriched microbial cultures obtained from molasses and NaCl containing media. *Process Biochem* 40:2493–2498.
- Du L, Xian L, Feng J X (2011) Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus *Penicillium* sp. *Journal of Nanoparticle Research* 13(3):921–930.
- Dursun A Y, Uslu G, Tepe O, Cuci Y, Ekiz HI (2003b) A comparative investigation on the bioaccumulation of heavy metal ions by growing *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillus niger*. *Biochem Eng J* 15:87–92.
- Ezzouhri L, Castro E, Moya M, Espinola F, Lairini K (2009) Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *J Microbiol* 3:35–48.
- Fogarty R V, Tobin JM (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol* 19:311–317.
- Faryal R, Sultan A, Tahir F, Ahmed S, Hameed A, Faryal R, Al E T (2007) Biosorption of lead by indigenous fungal strains. *Pak J Bot* 39(2):615–622.
- Fogarty R V, Tobin J M (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology* 19(4):311–317.

- Fu F, Wang Q (2011) Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J Environ Manage* 92:407–418.
- Gadd GM, White C (1990) Biosorption of radionuclides by fungal biomass. *J Chem Technol Biotechnol* 49(4):331-343.
- Gadd GM (1993a) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124:25–60.
- Gadd GM (1993b) Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiol Rev* 11:297–316.
- Gadd GM, White C (1993) Microbial treatments of metal Pollution – a working biotechnology?. *Trends Biotechnol* 11(8):353-359.
- Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* 111:3–49.
- Gadd GM (2000) Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol* 11:271–279.
- Gadd GM (2010) Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156:609–643.
- Gochev VK, Velkova ZI, Stoytcheva MS (2010) Hexavalent chromium removal by waste mycelium of *Aspergillus awamori*. *Journal of Serbian Chem Soc* 75:551–564.
- González G M, Benabdellah K, Ferrol N, Azcón A C (2009) Mechanisms Underlying Heavy Metal Tolerance in Arbuscular Mycorrhizas. *Mycorrhizas-Functional Processes and Ecological Impact* 107–122.

- Gopinath K, Arumugam A (2014) Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using *Fusarium solani*. *Appl Nanosci* 657-662.
- Gordon B, Callan P, Vickers C (2008) WHO guidelines for drinking-water quality. *WHO Chronicle* 38(3): 564. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>.
- Gu Y, Xu W, Liu Y, Zeng G, Huang J, Tan X, Jian H, Hu X, Li F, Wang D (2014) Mechanism of Cr(VI) reduction by *Aspergillus niger*: enzymatic characteristic, oxidative stress response, and reduction product. *Environ Sci Pollut Res* 6271–6279.
- Halim M, Conte P, Piccolo A (2003) Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere* 52(1):265–275.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Ed.
- Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A (1998) Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour Technol* 64:7–15.
- Holda A, Mlynarczykowska A (2016) Use of dead and living fungal biomass for the removal of hexavalent chromium. *Physicochem. Probl. Miner. Process.* 52:551-563.
- Honary S, Gharaei-fathabad E, Barabadi H, Naghibi F (2013). Fungus-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles : A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis, 13(2), 1427–1430.
- Hughes N, Poole K (1991). Metal speciation and microbial growth-the hard (and Soft) facts. *Microbiology* 137:725–734.

- Huisman JL, Schouten G, Schultz C (2006) Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry. *Hydrometallurgy* 83:106–113.
- Husseiny S M, Salah T A, Anter H A (2015). Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 4(3):225–231.
- Iram S, Parveen K, Usman J, Nasir K, Akhtar N, Arouj S, Ahmad I (2012) Heavy metal tolerance of filamentous fungal strains isolated from soil irrigated with industrial wastewater. *Biologija* 58:107–116.
- Jain N, Bhargava A, Majumdar S, Tarafdar J C, Panwar J (2011) Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: a mechanism perspective. *Nanoscale*, 3(2), 635–641.
- Jamali N, Ghaderian SM, Karimi N (2014) Effects of cadmium and zinc on growth and metal accumulation of *Mathiola flavida* BOISS. *Environ Eng Manag J* 13:2937–2944.
- Jayanthi M, Kanchana D, Saranraj P, Sujitha D (2014) Bioadsorption of Chromium by *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger* Isolated from Tannery Effluent. *Intl J* 5:40–47.
- Kadirvelu K, Cloirec P Le (2000) Removal of Cu(II), Pb(II), and Ni(II) by adsorption onto Activated Carbon Cloths. *Langmuir* 2000 16:8404-8409.
- Kang SY, Lee JU, Kim KW (2007) Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Eng J* 36:54–58.

- Kavita B, Limbachia J, Keharia H (2011) Hexavalent chromium sorption by biomass of chromium tolerant *Pythium* sp. J Basic Microbiol 51:173–182.
- Khambhaty Y, Mody K, Basha S, Jha B (2009) Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of hexavalent chromium by dead fungal biomass of marine *Aspergillus niger*. Chem Eng J 145:489–495.
- Khan A T, Maqsood Z T (2007) Critical Behavior of Iron (III) with a Typical Catecholate. Scientia Iranica 14(2): 106-111.
- Kotaś J, Stasicka Z (2000) Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. Environ Pollut 107:263–283.
- Ksheminska H, Jaglarz A, Fedorovych D, Babyak L, Yanovych D, Kaszycki P, Koloczek H (2003) Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*: toxicity and accumulation of Cr(III) and Cr(VI) and the influence of riboflavin on Cr tolerance. Microbiol Res 158:59–67.
- Ksheminska HP, Honchar TM, Gayda GZ, Gonchar M V. (2006) Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures. Cent Eur J Biol 1:137–149.
- Kumar R R (2015) Mycogenic synthesis of silver nanoparticles by the Japanese environmental isolate *Aspergillus tamarii*. J Nanoapart Res 14:1-5.
- Landaburu A J, García V, Pongrácz E, Keiski RL (2009) The removal of zinc from synthetic wastewaters by micellar-enhanced ultrafiltration: statistical design of experiments. Desalination 240:262–269.

- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, Van Breemen N (2001) Linking plants to rocks: Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol* 16:248–254.
- Lee K L, Buckley, H R, Campbell C C (1975). An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *J. Med Vet Mycol* 13:148–153.
- Liu KJ, Jiang JJ, Shi XL, Gabrys H, Walczak T, Swartz HM (1995) Low-frequency EPR study of chromium(V) formation from chromium(VI) in living plants. *Biochem Biophys Res Commun* 206:829–834.
- Liu KJ, Shi X (2001) *In vivo* reduction of chromium(VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222:41–47.
- Liu T, Li H, Li Z, Xiao X, Chen L, Deng L (2007) Removal of hexavalent chromium by fungal biomass of *Mucor racemosus*: Influencing factors and removal mechanism. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1685–1693.
- Sukumar M (2010) Reduction of hexavalent chromium by *Rhizopus Oryzae*. *African Journal of Environmental Science and Technology* 4(7):412–418.
- Macaskie L E (1990). An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 49(4):357–379.
- Macreadie IG, Castelli LA, Mehra RK, Thorvaldsen J, Winge D (1994) Heterologous gene expression and protein secretion from *Candida glabrata*. *Biotechnol Appl Biochem* 19(3):265–269.

- Makarov V V, Love A J, Sinitsyna O V, Makarova S S, Yaminsky I V (2014). "Green" Nanotechnologies : Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Acta Naturae* 6(1):35–44.
- Malik P, Shankar R, Malik V, Sharma N, Mukherjee T K (2014) Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis. *Journal of Nanoparticles* 14:1-14.
- Maliszewska I (2013) Microbial mediated synthesis of gold nanoparticles : preparation , characterization and cytotoxicity studies. *Dig J Nanomater Biostruct* 8(3):1123–1131.
- Mehra R K, Winge D R (1991) Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 45(1):30–40.
- Mishra A, Kumari M, Pandey S, Chaudhry V, Gupta K C, Nautiyal C S (2014) Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma sp.* *Bioresource Technology* 166:235-242.
- Mittal A K, Chisti Y, Banerjee U C (2013) Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances* 31(2):346–356.
- Moghaddam A B, Namvar F, Moniri M, Tahir P, Azizi S, Mohamad R (2015) Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications, 16540–16565.
- Morales B L, Cristiani U E (2008) Hexavalent chromium removal by a *Trichoderma inhamatum* fungal strain isolated from tannery effluent. *Water Air Soil Pollut* 187:327–336.

- Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R, and Sastry M (2002) Extracellular synthesis of Gold Nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *ChemBioChem* 461-463.
- Murugavelh S, Mohanty K (2014) Mechanism of Cr(VI) bioaccumulation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ Eng Manag* 13:281-287.
- Myers CR, Myers JM (1993) Ferric reductase is associated with the membranes of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *FEMS Microbiol Lett* 108:15–22.
- Nath K, Singh D, Shyam S, Sharma Y K (2009) Phytotoxic effects of chromium and tannery effluent on growth and metabolism of *Phaseolus mungo* Roxb. *Journal of Environmental Biology* 30(2):227–234.
- Nies DH, Koch S, Wachi S, Peitzsch N, Saier MH (1998) CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J Bacteriol* 180:5799–5802.
- Nriagu JO, Pacyna JM (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333:134–139.
- O' Donnell A, Harvey L M, MCNeil B (2011) The roles of the alternative NADH dehydrogenases during oxidative stress in cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Fungal biology* 115:359-369.
- Owlad M, Aroua MK, Daud WAW, Baroutian S (2009) Removal of hexavalent chromium-contaminated water and wastewater: A review. *Water Air Soil Pollut* 200:59–77.
- Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 49:1–76.

- Park D, Lim S R, Yun Y S, Park J M (2007). Reliable evidences that the removal mechanism of hexavalent chromium by natural biomaterials is adsorption-coupled reduction. *Chemosphere* 70(2): 298–305.
- Park D, Yun YS, Jo JH, Park JM (2005) Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Water Res* 39:533–540.
- Park D, Yun Y S, Park J M (2004). Reduction of Hexavalent chromium with the brown seaweed *Ecklonia biomass*. *Environmental Science and Technology*, 38(18), 4860–4864.
- Pazouki M, Keyanpour-Rad M, Shafie S, Shahhoseini S (2007) Efficiency of *Penicillium chrysogenum* PTCC 5037 in reducing low concentration of chromium hexavalent in a chromium electroplating plant wastewater. *Bioresour Technol* 98:2116–2122.
- Pellerin C, Booker SM (2000) Reflections on hexavalent chromium: Health hazards of an industrial heavyweight. *Environ Health Perspect* 108:402–407.
- Perotto S, Girlanda M, Martino E (2002) Ericoid mycorrhizal fungi: Some new perspectives on old acquaintances. In: *Plant and Soil*. pp 41–53.
- Perrone GG, Grant CM, Dawes IW (2005) Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16:218–230.
- Pesti M, Gazdag Z, Emri T, Farkas N, Koósz Z, Belágyi J, Pócsi I (2002) Chromate sensitivity in fission yeast is caused by increased glutathione

reductase activity and peroxide overproduction. J Basic Microbiol 42:408–19.

- Peter N Njoki, Lim I-Im S, Mott D, Park H Y, Bilal K, Suprav M, Ravishanker S, Jin Luo, C.-J Z (2007) Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. J. Phys. Chem. C, 111, 14664–14669.
- Polte J (2015). Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. CrystEngComm, 17, 6809–6830.
- Devi P, Kulanthaivel T S, Borah J L, Prabhakaran N, Srinivasa N (2013) Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma species*. Indian Journal of Experimental Biology, 51(7), 543–547.
- Preetha B, Viruthagiri T (2005) Biosorption of zinc (II) by *Rhizopus arrhizus* : equilibrium and kinetic modelling. Afr J Biotechnol 4(4):506–508.
- Prigione V, Zerlottin M, Refosco D, Tigini V, Anastasi A, Varese GC (2009) Chromium removal from a real tanning effluent by autochthonous and allochthonous fungi. Bioresour Technol 100:2770–2776.
- Quality G. D (2011) WHO. Geneva, World Health Organization, 4th Ed., 564.
- Rana N, Mohanpuria P, Yadav S K (2008). Biosynthesis of nanoparticles : Technological concepts and future applications and future applications. J Nanopart Res 10:507-517.
- Rankin D (2009). CRC handbook of chemistry and physics, 89th edition, edited by David R. Lide. Crystallography Reviews 15.

- Ravindranath S P, Henne K L, Thompson D K, Irudayaraj J (2011) Surface-enhanced Raman imaging of intracellular bioreduction of chromate in *Shewanella oneidensis*. PLoS ONE, 6(2).
- Razalee S (2012). Relationship between Body Composition, Smoking and Physical Fitness of Malaysian Armed Forces Naval Trainees. Open Access Scientific Reports Bergqvist 1(11):1–5.
- Reader U and Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett Appl Microbiol 1:17-20.
- Reddy M S, Kour M, Aggarwal S, Ahuja S, Marmeisse R, Fraissinet-Tachet, L (2015) Metal induction of a *Pisolithus albus* metallothionein and its potential involvement in heavy metal tolerance during mycorrhizal symbiosis. Environmental Microbiology.
- Ren B, Zhang Y, Zhao L, Zhang X (2015) Biosorption of chromium by the spores of *Aspergillus niger*. Meic-15: 833–836.
- Reya I I, Rajamehala M, Lakshmi Prabha M, Emilin Renitta R (2012) Comparative study on biosorption of hexavalent chromium using *Aspergillus oryzae* NCIM 637 and *Aspergillus sojae* NCIM 1198 from electroplating effluent. International Journal of ChemTech Research 4(4):1708–1719.
- Rivera M E, Cardenas G J F, Martlnez J V M, Acosta T I (2015) Remoción de Cr(VI) por una cepa de *Aspergillus Niger* resistente a cromato. Informacion Tecnologica 26(4):13–20.
- Ross I S (1975) Some effects of heavy metals on fungal cells. Transactions of the British Mycological Society 64(2):175–193.

- S, M. (2012). No Title. *Indian Journal of Science and Technology*, 5(May 2011), 2443–2444.
- Sarkar J, Ray S, Chattopadhyay D (2012) Mycogenesis of gold nanoparticles using a phytopathogen *Alternaria alternata*, 637–643.
- Sathvika T, Manasi M, Rajesh V, Rajesh N (2015) Prospective application of *Aspergillus species* immobilized in sodium montmorillonite to remove toxic hexavalent chromium from wastewater. *RSC Adv* 5(129):107031–107044.
- Sen M, Dastidar M G (2011) Biosorption of Cr (VI) by resting cells of *Fusarium* 8(2):153–158.
- Shah M, Fawcett D, Sharma S, Tripathy S K (2015) Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials* 8(11):7278-7308.
- Sharma S, Adholeya A (2011) Detoxification and accumulation of chromium from tannery effluent and spent chrome effluent by *Paecilomyces lilacinus* fungi. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:309–317.
- Sharma S, Malaviya P (2014) Bioremediation of Tannery Wastewater by Chromium Resistant Fungal Isolate *Fusarium chlamydosporium* SPFS2-g. 9:721–727.
- Shroff K A, Vaidya V K (2013) Dead fungal biomass of *Rhizopus arrhizus* for decontamination of hexavalent chromium: Biosorption kinetics, equilibrium modelling and recovery. *Nature Environment and Pollution Technology* 12(1): 25–34.

- Shugaba A, Buba F, Kolo BG, Nok AG, Ameh DA, Lovi JA (2013) Uptake and reduction of hexavalent chromium by *Aspergillus niger*, and *Aspergillus parasiticus*. J Pet Environ Biotechnol 3:3.
- Siddiqi K S, Husen A (2016) Fabrication of Metal Nanoparticles from Fungi and Metals Salts: Scope and Application. Nanoscale Res. Lett 11:98.
- Sivakumar D (2016) Biosorption of hexavalent chromium in a tannery industry wastewater using fungi species. 2:105–124.
- Soumik S (2013) Hexavalent Chromium (Cr(VI)) Removal by Live Mycelium of a *Trichoderma harzianum* Strain. Molecular Soil Biology 4(1):1–6.
- Srivastava P, Kowshik M (2013) Mechanisms of Metal Resistance and Homeostasis in Haloarchaea. Archaea 13:1-16.
- Suzuki T, Miyata N, Horitsu H, et al (1992) NAD(P)H-dependent chromium(VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: A Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). J Bacteriol 174:5340–5345.
- Tahir A, Abdel-Megeed A, Zahid S (2014) Temperature and pH kinetics for enhanced biosorption of Cr(VI) by highly chromium resistant fungi *Gliocladium spp.* SPP. ZIC. Pak. J. Bot. 46(6):2285-2292.
- Tamás MJ, Labarre J, Toledano MB, Wysocki R (2006) Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. Top. Curr. Genet. 14:395–454.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D Filipinski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30(12):2725–2729.

- Taylor P, Chemistry N, Mohammadi B, Salouti M (2015) Synthesis and Reactivity in Inorganic , Metal-Organic , Extracellular Bioynthesis of Silver Nanoparticles by *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium expansum*. Synth React Inorg M 45:844-847.
- Tunali S, Kiran I, Akar T (2005) Chromium(VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass. Minerals Engineering 18(7):681–689.
- U.S. EPA. (2006). In Situ Treatment Technologies for Contaminated Soil. In Situ.
- Vadkertiová R, Sláviková E (2006) Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. Journal of Basic Microbiology, 46(2), 145–152.
- Vangronsveld J, Van Assche F, Clijsters H (1994) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: In situ metal immobilization and revegetation. Environ Pollut 87:51–59.
- Vigalys R and Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bacteriol 172: 4238-4246.
- Villaescusa I, Fiol N, Martínez M, Miralles N, Poch J, Serarols J (2004) Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes. Water Research 38(4):992–1002.
- Villegas LB, Fernández PM, Amoroso MJ, De Figueroa LIC (2008) Chromate removal by yeasts isolated from sediments of a tanning factory and a mine site in Argentina. BioMetals 21:591–600.

- Volesky, B., & Holan, Z. R. (2003). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* 11(3):235–250.
- Zhang X-H, Zhang X, Wang X-C, Jin L-F, Yang Z-P, Jiang C-X, Chen Q, Ren X-B, Cao J-Z, Wang Q, Zhu Y-M (2011) Chronic occupational exposure to hexavalent chromium causes DNA damage in electroplating workers. *BMC Public Health* 11:224.
- Zheng S, Huang H, Zhang R, Cao L (2014) Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by fruiting bodies of the jelly fungus (*Auricularia polytricha*). *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8729–8736.
- Zhu W, Zhao DX, Miao Q, et al (2009) *Arabidopsis thaliana* metallothionein, AtMT2a, Mediates ROS balance during oxidative stress. *J Plant Biol* 52:585–592.
- Zouboulis AI, Loukidou MX, Matis KA (2004) Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochem* 39:909–916.