



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos**

**Uso de Biocompositos de Quitosano, Alginato y Biomasa de
Aspergillus australensis con Aplicación Potencial para
Bioeliminar Cobre en Aguas de Uso Agrícola**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C Ana Gabriela Contreras Cortés

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2019

APROBACIÓN

Uso de Biocompositos de Quitosano, Alginato y Biomasa de *Aspergillus australensis* con Aplicación Potencial para Bioeliminar Cobre en Aguas de Uso Agrícola

M.C Ana Gabriela Contreras Cortés

Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Directora de la tesis

Dr. Francisco Javier Almendáriz Tapia
Codirector de la tesis

Dr. Francisco Rodríguez Félix
Miembro del Comité de tesis

Dr. Armando Burgos Hernández
Miembro del Comité de tesis

Dr. Manuel Ángel Quevedo
Miembro del Comité de tesis

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2019

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Doctorado en Ciencias de Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador de Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

M.C. Ana Gabriela Contreras Cortés

Dr. Francisco Rodríguez Félix
Coordinadora del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2019

AGRADECIMIENTOS

- Quiero agradecer la Universidad de Sonora y al DIPA que me recibieron para llevar a cabo mis estudios de Doctorado en Ciencias de los Alimentos.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para estudios de doctorado. Y por el financiamiento otorgado a través del proyecto No. 2015-01-1594.
- A mi Directora de tesis la Dra. Maribel Plascencia y a mi Co-Director el Dr. Francisco Javier Almendariz, quienes me recibieron y apoyaron continuamente para llevar a cabo este proyecto. Muchas gracias por todos los consejos, orientación y motivación constante en cada etapa de mi formación como Doctora y por hacerme sentir como parte de la familia y del gran grupo de trabajo que se tiene en el laboratorio.
- A los miembros del comité Dr. Armando Burgos, Dr. Manuel Quevedo y Dr. Francisco Rodríguez por la orientación y motivación constante durante este proceso de formación.
- Al Dr. Agustín Gómez Álvarez del departamento de Ing. Química el cual fue pieza clave y de apoyo en la cuantificación del cobre, y también formó parte del comité extendido para las evaluaciones predoctorales.
- A la Dra. Ana Luque, por su apoyo para la interpretación y análisis de FT-IR y orientación con ensayos de fitotoxicidad con semillas. Y por su continua motivación en cada etapa del experimental.
- Un especial agradecimiento al Dr. Mario Onofre, a la Dra. Carina Rosas Burgos y a la M.C Violeta Parra que son parte del laboratorio de Microbiología y Micotoxinas que fueron un apoyo constante durante el transcurso de mis estudios de Doctorado.

- Quiero agradecer a Carolina, Rocío, Samara, Iliana por todo su apoyo y compañía durante largos días de trabajo y que aun así se buscaba tiempo para convivir fuera de la universidad. Por la gran amistad que se fue dando y que continuará fuera de la universidad.
- A todos los alumnos de posgrado que estaban realizando sus estudios en el Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas del DIPA, Susana, Naza, Ana Karen, Joel, Daniel, Julián, Jacqueline, Carlos por su apoyo, pláticas y motivación. Se extraña estar dialogando sobre las distintas series, películas etc. que veíamos. Muchas gracias a todos por su amistad.
- También quiero agradecer a mis compañeras de generación Karina y Machuy por los consejos, tips y la amistad brindada.
- Un especial agradecimiento a Coty Favela por su apoyo en trámites y papeleo, por su compañía y amistad y continua motivación para seguirme superando.
- Un agradecimiento a los Frikies, Claudia, Ivan, Encinas, Cadena por sus consejos, compañía y largas charlas que llegamos a tener a lo largo de los años.
- A mi mamá Josefina Cortes, por todo su apoyo para poder lograr la meta de ser Doctora en Ciencias. A mis hermanos y sobrinos que me acompañaban, aunque no estuviéramos cerca.
- Por último, quiero agradecer a Alfonso y Leslie por su amistad brindada, por todo su apoyo, consejos, compañía y motivación para seguir adelante. Por escucharme en los momentos difíciles y siempre hacerme reír cuando más lo necesitaba. Triada del mal por siempre.

RESUMEN

Las actividades antropogénicas (metalurgia, minería, etc.) han contribuido a la introducción de metales pesados al medio ambiente. Los metales pesados son considerados tóxicos y esto ha causado gran preocupación a nivel mundial dado que no pueden ser degradados a formas no tóxicas. Esto genera efectos prolongados en los distintos ecosistemas. Los métodos tradicionales para remover metales pesados como pueden ser la precipitación química, intercambio iónico, osmosis inversa presentan desventajas por su elevado costo e ineficiencia al intentar trabajar con concentraciones traza. Actualmente el uso de materiales adsorbentes de origen biológico ha sido explorado y considerado como una alternativa ecoamigable. El propósito de la siguiente investigación fue sintetizar un biomaterial estable y no tóxico a base de quitosano, alginato y micelio de *Aspergillus australensis* (hongo metalotolerante) para remover metales como el Cu^{2+} y a su vez ser capaz de trabajar en diferentes condiciones ambientales. Los resultados obtenidos mostraron que el biomaterial logró una máxima adsorción de 26.1 mg de Cu^{2+} por g de biocomposito, y su eficiencia de remoción del metal fue de un 79%. Tras llevar a cabo ensayos de fitotoxicidad usando las aguas residuales de las cinéticas de biosorción una vez completado el tratamiento de remoción se pudo observar una baja toxicidad del agua tratada hacia las semillas (lechuga y chile), lo cual fue dependiente de la concentración residual del cobre. En cuanto a la toxicidad de los compositos en los ensayos de toxicidad con *Artemia salina* se encontró que había una toxicidad media hacia el organismo lo cual fue atribuido al bajo pH del biomaterial. Con base en lo anterior se concluyó que el biomaterial obtenido muestra potencial para ser empleado como biosorbente para remover metales pesados.

ÍNDICE

	Página
1.INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	7
2.1 El río San Pedro.....	7
2.2 Actividad minera de la región.....	8
2.3 Metales pesados.....	8
2.4 Toxicidad de los metales.....	9
2.5 El cobre.....	10
2.6 Alternativas para remover metales pesados.....	12
2.7 Biorremediación.....	12
2.8 Biosorción.....	13
2.9 Mecanismo de biosorción de metales pesados.....	13
2.10 Factores que afectan el proceso de biosorción.....	14
2.11 Hongos filamentosos para remover metales pesados	17
2.12 Síntesis de compositos.....	17
2.13 Quitosano.....	18
2.14 Propiedades del quitosano.....	18
2.15 El alginato.....	19
3.Justificación.....	20
4.HIPÓTESIS.....	21
5.OBJETIVO GENERAL.....	22
5.1 Objetivos particulares.....	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1 Aislamiento del hongo.....	23
6.2 Pruebas de tolerancia.....	23
6.3 Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento del hongo.....	24
6.4 Inmovilización del micelio.....	25
6.5 Cinéticas de biosorción de CuSO_4	25
6.5.1 Biosorción utilizando biomasa inmovilizada viva.....	25
6.5.2 Biosorción utilizando biomasa inmovilizada muerta.....	26
6.5.3 Cuantificación de Cu^{2+} y capacidad de biosorción de la biomasa fúngica...	26
6.6 Análisis estadístico.....	27
6.7 Análisis del efecto del Cu^{2+} sobre los componentes celulares utilizando microscopía de fluorescencia.....	27
6.8 Pruebas de tolerancia al quitosano.....	29
6.9 Elaboración de compositos de quitosano.....	30
6.9.1 Preparación de gel de quitosano.....	30
6.9.2 Preparación de gel de alginato.....	30
6.9.3 Preparación de biomasa muerta en polvo.....	30

6.9.4 Elaboración de compositos de quitosano.....	30
6.9.5 Caracterización FT-IR del quitosano entrecruzado con biomasa, alginato y TPP.....	32
6.10 Biosorción usando perlas de QMPM.....	31
6.10.1 Biosorción de Cu^{2+} utilizando biomasa inmovilizada viva.....	31
6.10.2 Biosorción de Cu^{2+} utilizando biomasa inmovilizada muerta.....	31
6.10.3 Cuantificación de Cu^{2+} y capacidad de biosorción de la biomasa.....	31
6.10.4 Estudios con la isoterma de Langmuir.....	32
6.11 Estudio de la toxicidad y la eficacia del biosistema de remoción mediante ensayos <i>in vivo</i> utilizando plántulas de lechuga y chile (<i>Lactuca sativa</i> y <i>Capsicum annuum</i>) y <i>Artemia salina</i>	33
6.11.1 Ensayo de fitotoxicidad de semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) y chile (<i>Capsicum annuum</i>).....	33
6.11.2 Toxicidad aguda con <i>Artemia salina</i>	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
7.1 Identificación del hongo.....	36
7.2 Pruebas de tolerancia al cobre por el <i>Aspergillus australensis</i>	36
7.3 Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento del <i>Aspergillus australensis</i>	40
7.3.1 Efecto de pH.....	40
7.3.2 Efecto de la temperatura.....	40
7.4 Cinéticas para la remoción de CuSO_4	45
7.4.1 Inmovilización de la biomasa.....	45
7.4.2 Biosorción utilizando biomasa viva inmovilizada.....	45
7.4.3 Biosorción de Cu^{2+} utilizando biomasa muerta inmovilizada.....	49
7.5 Análisis del efecto del Cu^{2+} sobre los componentes celulares utilizando microscopía de fluorescencia.....	53
7.6 Pruebas de tolerancia al quitosano.....	53
7.7 Síntesis de compositos.....	59
7.7.1 Análisis de FT-IR de los compositos entrecruzados de QMPM-biomasa-alginato y TPP.....	59
7.8 Biosorción de cobre por los compositos.....	63
7.8.1 Perlas frescas.....	63
7.8.2 Perlas liofilizadas.....	64
7.8.3 Efecto de la concentración de cobre.....	68
7.9 Ensayos de toxicidad.....	73
7.9.1 Toxicidad aguda en <i>Artemia salina</i>	73
7.9.2 Fitotoxicidad aguda en semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>).....	76
7.9.3 Fitotoxicidad aguda en semillas de chile (<i>Capsicum annuum</i>).....	79
8. CONCLUSIONES.....	82
9. RECOMENDACIONES PARA ESTUDIOS POSTERIORES.....	83
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Apariencia del <i>Aspergillus australensis</i> , a) en caja Petri en medio de cultivo ASD adicionado con CuSO_4 , a 28°C, b) observación al microscopio del hongo teñido con azul de algodón.....	39
Figura 2. Crecimiento radial del <i>Aspergillus australensis</i> en medio Czapek-EL con CuSO_4 ; a) efecto de pH (5.5, 5.0 y 4.5); b) efecto de temperatura (28°C, 35°C y 40°C); c) efecto de pH y temperatura combinados.....	40
Figura 3. Determinación de la CMI durante el crecimiento radial del <i>Aspergillus australensis</i> en medio de cultivo ASD adicionado con diferentes concentraciones de cobre (CuSO_4), a 28°C.	45
Figura 4. Crecimiento radial del <i>Aspergillus australensis</i> en medio Czapek-YE adicionado con CuSO_4 ; a) efecto del pH (5.5, 5.0 y 4.5); b) efecto de la temperatura (28°C, 35°C y 40°C); c) efecto combinado del pH y la temperatura.....	46
Figura 5. Efecto del pH en la biosorción de Cu^{2+} usando biomasa viva inmovilizada de <i>Aspergillus australensis</i> , a diferente temperatura: a) 28°C, b) 35°C, c) 40°C.	51
Figura 6. Efecto del pH en la biosorción de Cu^{2+} utilizando biomasa muerta de <i>Aspergillus australensis</i> , a diferente temperatura: a) 28°C, b) 35°C, c) 40°C.....	54
Figura 7. Esporas de <i>Aspergillus australensis</i> e hifas cultivadas en medio con cobre a las 24 h, teñidas con acetoximetilo de calceína y IP (live/dead cell double staining kit), mostrando esporas viables (verdes) y no viables (rojas). a, a ₁) 50 ppm Cu^{2+} ; b, b ₁) 250 ppm Cu^{2+} ; c, c ₁) control.....	58
Figura 8. . Esporas de <i>Aspergillus australensis</i> e hifas cultivadas en medio con cobre, a las 24 h, teñidas con IP y blanco de calcofluor, donde se muestra daño a la integridad de la membrana celular (rojo) y la producción de glucanos/quitina (azul), respectivamente: a, a ₁ , a ₂) 50 ppm Cu^{2+} ; b, b ₁ , b ₂) 250 ppm Cu^{2+} ; c, c ₁ , c ₂) Control.....	59
Figura 9. Esporas de <i>Aspergillus australensis</i> e hifas cultivadas en medio con cobre, a las 24 h, teñidas con 2',7' diclorofluoreceína diacetato, mostrando estrés oxidativo general (verde) causado por la exposición del metal. a, a ₁) 50 ppm Cu^{2+} ; b, b ₁) 250 ppm Cu^{2+} ; c. c ₁) Control.....	61
Figura 10. Esporas de <i>Aspergillus australensis</i> cultivadas en medio con cobre, a las 24 horas, teñidas con azul de Nilo, mostrando la producción de gránulos de	

polihidroxicanoatos (PHA's) (naranja). a, a ₁) 50 ppm Cu ₂ ⁺ ; b, b ₁) 250 ppm Cu ₂ ⁺ ; c, c ₁) control.....	62
Figura 11 . Efecto del tipo de quitosano sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus australensis</i> , a 28°C, en agar Czapek adicionado: a) QBPM, b) QMPM, c) QAPM.....	64
Figura 12. Apariencia física de las perlas del composito sintetizado a partir de quitosano de medio peso molecular, biomasa de <i>Aspergillus australensis</i> y alginato, entrecruzados con TPP. a) perlas en base húmeda; b) perlas liofilizadas.	66
Figura 13. Espectro de FT-IR de las perlas de los materiales elaborados: a) composito de QMPM-Biomasa de <i>A.australiensis</i> -Alginato; b) biomasa <i>A. australiensis</i> ; c) alginato de sodio; d) quitosano de medio peso molecular (QMPM).....	67
Figura 14. Biosorción de Cu ²⁺ a 35°C, a diferentes valores de pH: a) composito de QMPM-B-A húmedo; b) composito de QMPM-B-A liofilizado.	71
Figura 15. Cinéticas de biosorción de cobre utilizando perlas liofilizadas del composito de QMPM-Biomasa de <i>Aspergillus australensis</i> -Alginato, a pH de 5.0, 35°C: a) 50 ppm, b) 100 ppm y c) 200 ppm de Cu ²⁺	76
Figura 16. . Isoterma de adsorción de Cu ²⁺ utilizando perlas de QMPM-Biomasa de <i>Aspergillus australiensis</i> -Alginato, empleando el modelo de Langmuir.....	77
Figura 17. Efecto de los compositos en los nauplios de <i>Artemia salina</i>	82
Figura 18. Evaluación de la toxicidad de los compositos (a) y agua residual después del proceso de biosorción de Cu ²⁺ (b) en la germinación de las semillas de <i>Lactuca sativa</i>	84
Figura 19. Evaluación de la toxicidad de los compositos (a) y agua residual después del proceso de biosorción de Cu ²⁺ (b) en la germinación de las semillas <i>Capsicum annum</i>	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Parámetro cinéticos y porcentaje de inhibición del crecimiento radial del <i>Aspergillus australensis</i> en ASD con CuSO ₄ , a los 9 días de exposición.....	41
Tabla 2. Parámetros cinéticos del crecimiento radial de <i>Aspergillus australensis</i> en ASD con CuSO ₄ , después de 7 días de incubación a diferentes pH y temperaturas.....	47
Tabla 3. Efecto de pH y temperatura en el crecimiento radial de <i>Aspergillus australensis</i> tras 7 días de incubación.....	49
Tabla 4. Remoción de cobre usando biomasa viva inmovilizada de <i>Aspergillus australensis</i> , a diferentes valores de pH y temperatura.....	52
Tabla 5. Remoción de cobre usando biomasa muerta de <i>Aspergillus australensis</i> , a diferentes valores de pH y temperatura.....	55
Tabla 6. Remoción de cobre usando compositos frescos y liofilizados en diferentes condiciones de pH.....	72
Tabla 7. Adsorción de Cu ²⁺ en perlas de compositos entrecruzados de QMPM-biomasa-alginato-TPP.....	78

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el Estado de Sonora ha venido desarrollándose en el sector industrial, siendo una de las principales fuentes de producción y empleo. Se han identificado más de 200 empresas autoabastecidas que usan aguas subterráneas y superficiales. Es importante aclarar que una importante cantidad del volumen total de agua superficial es utilizada por empresas mineras, como la empresa Mexicana de Cobre. Este sector ocupa casi el 83% del agua que se destina para la industria autoabastecida, actividad que se lleva a cabo principalmente en los municipios de Cananea, Nacozari y Magdalena (Conagua, 2008).

Debido al desarrollo de esta industria, se ha incrementado la descarga de desechos hacia el medioambiente, principalmente al suelo y agua, lo cual ha llevado a la acumulación de metales pesados. Tal es el caso del Río San Pedro, el cual se ubica en la región Noroeste del Estado de Sonora, a pocos kilómetros de la ciudad de Cananea. Al respecto se ha reportado la contaminación por metales pesados provenientes de la explotación de cobre en esta mina. Además de estos metales, el Río San Pedro ha recibido constantemente descargas de desechos ácidos, así como de aguas negras de origen doméstico e industrial provenientes de la ciudad y poblaciones aledañas. Lo anterior repercute de manera negativa en la actividad agrícola de la región, que se practica principalmente en las tierras planas próximas a los escurrimientos principales y del Río San Pedro (Moreno-Vázquez, 1995; Gómez-Álvarez et al. 1997), lo cual representa un serio riesgo para la salud pública.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 El Río San Pedro

El río San Pedro es una corriente que fluye de Cananea, Sonora, México, hacia los Estados Unidos y descarga en el río Gala, el cual es un importante afluente que llega al río Colorado. El río San Pedro es de suma importancia dado que está ubicado en medio de dos de los desiertos más grandes de Norte América. En los años 1800s fue considerado un oasis para los viajeros durante la colonización del oeste y hoy en día sigue siendo considerado de suma importancia para la migración de aves en el tramo que va de América central y del norte.

Las actividades agrícolas de la región han agotado la mayoría del agua (aunque no está completamente deshidratado). No obstante, existen largo tramos del río que están secos, se están llevando a cabo esfuerzos de mitigación para reabastecer algunas porciones de los tramos inferiores; esto a través de la compra de tierras de cultivo ribereñas, seguido por el cese del bombeo del agua subterránea del acuífero de la corriente (Haney, 2002).

Por otra parte, el área del río San Pedro provee un hábitat para diferentes plantas y animales, incluyendo el umel o lenteja de agua (*Lilaeopsis schaffneriana*) que está en peligro de extinción; el río también da sustento a distintas comunidades bióticas regionales poco comunes como lo es el bosque de la galería de sauces y álamos de Sonora, pastizales de Wright sacaton y Ciénegas (marismas de elevación media). Además, el corredor ribereño proporciona una ruta migratoria para aves canoras neotropicales (Skagen et al. 1998, Arias, 2000).

2.2 Actividad minera de la región

El distrito minero de Cananea se encuentra ubicado en la parte central-norte del estado de Sonora, a unos 60 km de la frontera internacional. Este distrito alberga uno de los depósitos más grandes de cobre y ha sido el enfoque de la actividad minera desde el siglo 18. El distrito ha producido más de 3 billones de libras de

cobre (Cu), una cantidad substancial de molibdeno (Mo) y en menor proporción zinc (Zn), plomo (Pb), plata (Ag) y oro (Au) (Cendejas et al. 1998). El sitio actual de la actividad minera incluye un gran depósito a cielo abierto y vertederos de minas que abarcan alrededor de 3,000 a 4,000 acres (1,215-1,620 hectáreas). Los relaves de la mina asociados probablemente cubran otros 2500 acres (1,000 hectáreas).

Los relaves son comúnmente arrojados a lo largo de arroyos cercanos a las minas, donde se da lugar a interacciones con el agua circulante, aire y lluvia; esto oxida a los sulfuros, particularmente la pirita, generando desechos ácidos. Las corrientes por lo tanto transportan altos contenidos de hierro (Fe), sulfatos (SO_4) y elementos traza potencialmente tóxicos como arsénico (As), cadmio (Cd), Pb, Zn, Cu, mercurio (Hg), antimonio (Sb) y selenio (Se) (Dinelli et al. 2001; Fernández et al. 1986; Monterroso y Macías 1998; Williams y Smith, 2000). Estos elementos se pueden lixiviar al agua subterránea o superficial, pueden ser absorbidos por las plantas, se pueden enlazar semipermanentemente con los componentes del suelo como las arcillas o materia orgánica, que posteriormente puede llegar a afectar la salud humana (Stoica et al. 2000).

2.3 Metales Pesados

El término metal pesado se define comúnmente como aquellos metales que tienen pesos específicos que van de 5 g/cm^3 (Holleman y Wiberg, 1985). Otra definición frecuentemente usada establece que un metal pesado es cualquier elemento que exhibe propiedades metálicas, que incluye metales de transición, lantánidos, actínidos, así como los metaloides arsénico y antimonio. Típicamente el término se refiere a los elementos con número atómico 21 o mayor (Hogan, 2011).

Existen cerca de 40 elementos que caen en esta categoría. Los metales pesados se encuentran distribuidos en forma dispersa en la formación de rocas y factores como la industrialización y urbanización han incrementado la contribución antropogénica de éstos en la biósfera. Los metales pesados tienen la mayor disponibilidad en suelo y ambientes acuáticos y en menor proporción en la atmósfera como partículas o vapores (Kumar y Madhoolika, 2005).

2.4 Toxicidad de los metales pesados

La toxicidad de los metales pesados depende de la concentración, la forma química y la persistencia. Un elemento indispensable para un ser vivo en concentraciones traza puede llegar a ser tóxico en concentraciones elevadas. Por otra parte, la mayoría de los metales pesados se combina con otras formas químicas antes de entrar en los organismos, o bien cuando se encuentra en el interior de los mismos; por tanto, antes de determinar la toxicidad de un elemento es necesario determinar la forma química en la que se encuentra. La persistencia se define como el tiempo que tarda un contaminante en transformarse en una forma no tóxica (Navarro-Aviño et al. 2007).

Los metales pesados están considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen una gran toxicidad, en parte debido a su elevada tendencia a bioacumularse. La bioacumulación es un aumento de la concentración de una sustancia química en un organismo biológico en un cierto plazo, de forma que llega a ser superior a la de la sustancia química en el ambiente. La toxicidad es causada frecuentemente por la imposibilidad del organismo afectado para mantener los niveles necesarios de excreción. El proceso se agrava durante el paso por las distintas cadenas tróficas, debido a que los niveles de incorporación sufren un fuerte incremento a lo largo de sus sucesivos eslabones, siendo en los superiores donde se detectan los mayores niveles de contaminantes. A este proceso se le denomina biomagnificación, es decir, muchas toxinas que están diluidas en un medio, pueden alcanzar concentraciones dañinas dentro de las células, especialmente a través de la cadena trófica.

Otro aspecto importante a considerar es la presencia simultánea (mezcla) de los metales pesados, ya que sus efectos pueden ser tóxicamente tanto sinérgicos como antagónicos (la toxicidad se reduce al mezclarse); por tanto, existe cierta dificultad para predecir los efectos reales de los contaminantes en el medio. Los efectos de un compuesto o de la mezcla de ellos pueden ser inocuos, letales o subletales (no matan al individuo, aunque producen daños a nivel genético o fisiológico). Con frecuencia, los daños subletales suelen ser más perjudiciales para la población en

general, ya que afectan al desarrollo o a la reproducción (Navarro-Aviño, 2007). Muchos de ellos son tóxicos aún en bajas concentraciones; el As, Cd, cromo (Cr), Cu, Pb, Hg, níquel (Ni), Se, Ag y Zn, entre otros, no son sólo citotóxicos, sino también cancerígenos y mutagénicos (Dixit et al. 2015).

2.5 El cobre

El Cu es un metal importante muy usado debido a sus aplicaciones tecnológicas, es también un metal esencial que participa en diferentes enzimas en todas las formas de vida; en el caso de los humanos, los niveles elevados pueden causar irritación del tracto respiratorio, su ingestión puede causar náuseas, vómitos y diarrea. Un exceso de Cu en la sangre puede causar anemia, dañar el hígado y los riñones (Ho et al. 2002). Treinta gramos de CuSO_4 son potencialmente letales para los humanos. La enfermedad de Wilson, es una enfermedad que causa que el metal sea retenido en el cuerpo y puede llevar a daño en el hígado y cerebro si no es tratado. El nivel sugerido de Cu en el agua para beber para el caso de los humanos varía dependiendo de la fuente, pero tiende a estar vinculado a 1.3 mg/L de acuerdo a la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA). Se ha encontrado que demasiado Cu en el agua también daña la vida marina. El efecto observado a concentraciones elevadas en peces y otras criaturas es daño a las branquias, hígado, riñones y el sistema nervioso (Ying, 2007).

Los reportes epidemiológicos muestran evidencia que hay una elevada incidencia de cáncer entre los artesanos del Cu, lo que ha sugerido que este metal es un carcinogénico. Se ha detectado una elevada incidencia de cáncer en el estómago en humanos en áreas con niveles altos de Zn:Cu en el suelo (Luckey and Venugopal, 1977). Sin embargo, números estudios para determinar la carcinogenicidad de varios compuestos de Cu en experimentos con animales de laboratorio, son considerados inadecuados por los estándares de las actuales metodologías (US NRC, 2000). No obstante, es evidente que los limitados datos disponibles no sugieren que el Cu o sus sales sean carcinogénicos en animales, al tener niveles normales en la homeostasis del cobre. La EPA clasifica al metal dentro

del grupo D, lo cual significa que no es clasificable como carcinogénico hacia los humanos.

El cobre también es un metal de transición esencial que está involucrado en varios procesos fisiológicos en las plantas debido a que puede existir en múltiples estados de oxidación *in vivo*. Bajo condiciones fisiológicas el cobre puede existir como Cu^{2+} y Cu^+ . Este metal actúa como un elemento estructural y regulatorio de proteínas y participa en el transporte de electrones fotosintético, respiración mitocondrial, respuestas al estrés oxidativo, metabolismo de la pared celular y señalización hormonal (Raven et al. 1999). Por lo tanto, las plantas requieren Cu como un micronutriente esencial para que tengan un desarrollo y crecimiento normal; cuando este ión no está disponible las plantas presentan síntomas específicos de deficiencia, la mayoría de los cuales afectan hojas jóvenes y órganos reproductivos. Las propiedades redox que hacen que el Cu sea un elemento esencial, a su vez contribuyen a su inherente toxicidad. El ciclo redox entre el Cu^{2+} y Cu^+ puede catalizar la producción de radicales hidroxilo sumamente tóxicos, los cuales dañan DNA, lípidos, proteínas y otras biomoléculas (Halliwell y Gutteridge, 1984). Por lo tanto, a elevadas concentraciones, el Cu puede volverse extremadamente tóxico causando síntomas como la clorosis y necrosis, retraso en el crecimiento, decoloración de hojas e inhibición de las raíces (Van Assche y Clijsters, 1990; Marschner, 1995).

2.6 Alternativas para la remoción de metales pesados

La atenuación natural o reducción lenta en el medio ambiente de los metales pesados se lleva a cabo por procesos de lixiviación, erosión y absorción por parte de plantas, este último de gran impacto en especies vegetales destinadas para consumo humano y animal. La liberación indiscriminada de metales pesados hacia el suelo y agua es una preocupación mundial, dado que no pueden ser degradados a formas no tóxicas provocando efectos prolongados en los ecosistemas (Dixit et al. 2015).

Para lograr que el medio ambiente sea seguro, los cuerpos de agua y suelos contaminados deben ser recuperados para liberarlos de la presencia de los metales pesados y elementos traza. Existen diferentes técnicas para remover estos metales pesados, como lo son la precipitación química, ósmosis inversa, tecnología de membranas, evaporación y tratamiento electroquímico. No obstante, la mayoría de estas técnicas se vuelven inefectivas cuando las concentraciones de los metales son menores a los 100 mg/L (Ahluwalia y Goyal, 2007). La mayoría de las sales de los metales pesados son solubles en agua, por lo que no pueden separarse por métodos físicos (Hussein et al. 2004). Adicionalmente, los métodos fisicoquímicos son inefectivos y costosos cuando las concentraciones de los metales son muy bajas.

En este contexto, el uso de la biorremediación y la síntesis de composites de base biológica son dos tecnologías innovadoras y prometedoras las cuales están disponibles para la remoción de metales pesados y recuperación de suelos y aguas contaminados.

2.7 Biorremediación

La biorremediación se define como el proceso biológico que utiliza agentes como hongos, bacterias, plantas o las enzimas derivadas de ellos, para remover desechos tóxicos del ambiente. Se le considera una herramienta efectiva para tratar ambientes contaminados y recuperarlos de manera eco-amigable (Kaur y Parihar, 2014). La biorremediación se puede clasificar en dos tipos: biorremediación *in situ* y la biorremediación *ex situ*.

- Biorremediación *in situ*: Son tecnologías que remueven metales pesados de suelo, agua y aire contaminado, sin la necesidad de mover los contaminantes. El tratamiento se lleva a cabo en el mismo sitio contaminado. Este método causa menos disturbios ecológicos dado que evita la excavación o el transporte de los contaminantes, evitando la contaminación de otros sitios; es económicamente viable (Gaur et al. 2014).

- Biorremediación *ex situ*: Son aquellas tecnologías que se aplican al suelo o agua contaminados, los cuales han sido excavados (suelo) o bombeados (agua) y se han trasladado a otro sitio para llevar a cabo su tratamiento (Juwarker et al. 2014).

2.8 Biosorción

La biosorción es un proceso incluido en la tecnología de la biorremediación que utiliza materiales biológicos para remover contaminantes a través de diferentes mecanismos como la adsorción, absorción, complejación de superficie, precipitación o intercambio iónico. Depende de varios factores como la sustancia o contaminante que se va a sorber, cuestiones ambientales (pH, temperatura, humedad, etc.), biosorbente utilizado y la presencia o ausencia de procesos metabólicos (en organismos vivos) (Gadd, 2010).

2.9 Mecanismo de biosorción de metales pesados

La composición química de las células microbianas es responsable del fuerte comportamiento biosorbente de la biomasa microbiana hacia los iones metálicos (Volesky y Holan, 1995). Existen diferentes grupos funcionales que logran la atracción y secuestro de los contaminantes, entre los que se encuentran los carboxilatos, hidroxilo, carbonilo, carboxilo, imina, imidazol, sulfonato, sulfhidrilo, tioéter, fenólico, amida, amina, fosfato y fosfodiéster, presentes dentro de los componentes de la pared celular, tales como los polisacáridos, lípidos y proteínas (Gupta et al. 2000). La importancia de cualquier grupo funcional dado para la biosorción de un determinado metal empleando biomasa depende de factores tales como el número de sitios en el material biosorbente, la accesibilidad a los sitios, el estado químico del sitio (disponibilidad) y la afinidad entre el sitio y el metal (fuerza de unión) (Viera y Volesky, 2000). El mecanismo de biosorción es un proceso complejo influenciado por el estatus de la biomasa (viva o muerta, composición

química de la pared celular, fuente u origen, etc.), tipos de biomateriales, propiedades de la solución metálica y condiciones ambientales (pH, temperatura, cantidad de biosorbente, etc).

El mecanismo de biosorción es un proceso que consta de dos pasos: biosorción pasiva y biosorción activa. La biosorción pasiva es un mecanismo independiente del metabolismo, que ocurre en la superficie de la pared celular para llevar a cabo la absorción de metales, conocido como unión extracelular. Esta unión se debe a la interacción entre los iones metálicos y los grupos funcionales presentes en la pared celular. Por su parte, el proceso de biosorción activa es dependiente del metabolismo, conocido como unión intracelular; se considera que es un mecanismo relativamente lento, responsable de que los iones metálicos penetren a la membrana celular (Goyal et al. 2003). Estos enlaces complejos son dependientes de los iones metálicos y del sistema biológico. Aunque los grupos funcionales son responsables del enlace a los metales, la presencia de los grupos funcionales no asegura que la biosorción sea exitosa debido a la posible presencia de barreras estéricas conformacionales, u otras barreras.

2.10 Factores que afectan el proceso de biosorción

La biosorción depende de muchos factores, algunos de los cuales se relacionan con la biomasa y metal, mientras que otros están relacionados con las condiciones ambientales. Los principales factores que afectan el proceso de biosorción son:

- 1) **Temperatura:** En contraste con el proceso de bioacumulación, la eficiencia de biosorción no se ve afectada en rangos de 20-35°C, aunque las elevadas temperaturas (por arriba de 50°C) pueden incrementar la biosorción en algunos casos; sin embargo, una temperatura elevada puede causar daño permanente a las células microbianas vivas y, por consiguiente, disminuir la sorción de los iones metálicos (Ahalya et al. 2003; Goyal et al. 2003). Las reacciones de adsorción son generalmente exotérmicas y la extensión de la adsorción se incrementa con la disminución de la temperatura.

- 2) **Características de la Biomasa:** La naturaleza de la biomasa o productos derivados puede ser considerado uno de los factores importantes, incluyendo la naturaleza de la aplicación tales como células libres suspendidas, preparaciones inmovilizadas, biopelículas libres. Los tratamientos físicos como la ebullición, secado, disminución mecánica, esterilización en autoclave, entre otros, pueden afectar las propiedades de unión, mientras que los tratamientos con álcalis mejoran la capacidad de biosorción; esto se puede evidenciar en algunos sistemas con hongos dado que ocurre la desacetilación de la quitina, lo cual permite formar complejos de quitosano-glicanos, que tienen una mayor afinidad por los metales (Wang y Chen, 2006). El crecimiento, la nutrición de la biomasa y la edad también pueden influenciar la biosorción debido al tamaño de las células, composición química de la pared, formación de productos extracelulares, etc.
- 3) **Acidez:** El pH es uno de los parámetros más importantes en los procesos de biosorción. La biosorción es similar a un proceso de intercambio de iones y la biomasa puede ser considerada como un material natural para el intercambio de iones, los cuales principalmente son grupos débilmente ácidos y básicos. Por lo tanto, el pH de la solución influye sobre la naturaleza de los sitios de unión de la biomasa y la solubilidad del metal; asimismo, afecta la química de la solución de los metales, la actividad de los grupos funcionales en la biomasa y la competencia de los iones metálicos. La biosorción de los metales ha mostrado ser fuertemente dependiente del pH en todos los sistemas examinados, incluyendo biomasa de bacterias, cianobacterias, algas y hongos. La competencia entre los cationes y protones por los sitios de unión significa que la biosorción de metales como el Cu, Cd, Ni, Co y Zn, frecuentemente se reduce a valores de pH bajos (Deng y Wang, 2012).
- 4) **Concentración de la biomasa:** La concentración de biomasa en la solución afecta la biosorción. En un equilibrio dado a una determinada concentración, la biomasa adsorbe mayor cantidad de iones metálicos cuando la densidad

de células es baja (Gourdon et al. 1990). La interacción electrostática entre las células juega un papel importante en la captación del metal. A bajas concentraciones, la captura del metal se incrementa; por el contrario, cuando se incrementa la concentración de biosorbente ocurre una interferencia entre los sitios de unión. Una elevada concentración de la biomasa restringe el acceso de los iones metálicos a los sitios de unión (Malkoc y Nuhoglu, 2005).

- 5) **Concentración inicial del metal:** La concentración inicial de metal provee una fuerza importante para superar toda la resistencia de la transferencia de masa del metal entre las fases sólidas y líquidas (Zouboulis et al. 1997). La cantidad de metal adsorbido por la biomasa se incrementa de acuerdo al aumento de la concentración inicial del metal. El porcentaje óptimo de remoción de metal se puede lograr con una concentración de metal baja. Por lo tanto, a una concentración dada de biomasa, la adsorción de metal aumenta con el aumento de la concentración inicial.
- 6) **Afinidad del metal por el biosorbente:** Los pretratamientos fisicoquímicos afectan la permeabilidad y la carga de la superficie de la biomasa, logrando que los grupos funcionales sean accesibles para la unión. Esta afinidad puede ser manipulada mediante el tratamiento de la biomasa con álcalis, detergentes ácidos y calor, que pueden incrementar la captación del metal (Ahalya et al. 2003).

2.11 Hongos filamentosos para remover metales pesados

Los hongos son un tipo de biomasa que es excelente para remover metales. Debido a esto, estos microorganismos han recibido especial atención. La biomasa de hongos filamentosos constituye un material absorbente eficiente y económico para secuestrar metales pesados de las soluciones acuosas debido a que: a) Posee un elevado porcentaje de compuestos químicos en la pared celular; b) Tiene excelentes propiedades para secuestrar o ligar metales; c) Está disponible en grandes

cantidades que pueden provenir de las industrias de los antibióticos y de los alimentos; d) Provee un ambiente ecoamigable.

La estructura de la biomasa de los hongos posee un amplio rango de morfologías que van desde levaduras unicelulares a hongos polimórficos y filamentosos, muchos de los cuales tienen cuerpos fructíferos microscópicos complejos. En el campo de la biosorción, tanto las células vivas como muertas poseen la habilidad para remover metales (Wang & Chen, 2009).

2.12 Síntesis de compositos

Para llevar a cabo la remoción de metales pesados, una de las técnicas que se ha propuesto como alternativa es la síntesis de materiales compositos que pueden ser aplicados para propósitos de biorremediación; los compositos son aquellos que se producen cuando dos o más materiales o fases se usan en conjunto para obtener un material con una combinación de propiedades que no puede lograrse de otra forma, o bien que no presentan los componentes de manera individual.

La síntesis de compositos es una estrategia ampliamente usada para la elaboración de diversos materiales poliméricos de base biológica (biocompositos), como puede ser aquellos elaborados a base de quitosano.

2.13 Quitosano

Entre los polímeros que han mostrado tener buena capacidad de adsorción de metales pesados se encuentra el quitosano. Este es un producto que resulta de la desacetilación de la quitina, donde el grupo acetamida (R-NHCOCH_3) de la quitina es hidrolizada a un grupo primario amina (R-NH_2) para producir el quitosano. A diferencia de la quitina, el quitosano es soluble en soluciones ácidas diluidas, aunque precipita en forma de sólidos a pH elevado. El tratamiento del quitosano con soluciones a elevados pH se ha usado para transformarlo a distintas formas físicas tales como membranas, nanopartículas, nanofibras, etc. (Yong et al. 2015).

Aunque el elevado contenido de grupos -NH_2 le confiere propiedades antimicrobianas (Rebea et al. 2003), se ha reportado que el quitosano (en polvo o soluciones del biopolímero) presenta una baja o nula toxicidad a plantas, animales y humanos (Baldrick, 2010; Kean y Thanou, 2010). Esta propiedad, en conjunto con su rápida degradabilidad, convierte al quitosano en un polímero adecuado para aplicaciones ambientales y de uso agrícola (Uthairatanakij et al. 2007).

Estudios actuales muestran que en general el quitosano es un material relativamente no tóxico y biocompatible; sin embargo, se debe tener cuidado al asegurar la pureza del biopolímero ya que los residuos como proteínas, metales, minerales y otros contaminantes presentes en el material después del proceso de obtención, potencialmente pueden ocasionar efectos deletéreos negativos tanto en los procesos de síntesis de compuestos derivados de quitosano, como en la dosificación del mismo (Kean y Thanou, 2010).

2.14 Propiedades del quitosano

El quitosano es un polisacárido que tiene múltiples grupos funcionales, principalmente hidroxilos (-OH), acetamidos y aminos. Es un copolímero conformado por monómeros de glucosamina y N-acetilglucosamina, con variación en su peso molecular dependiendo del grado de degradación de la quitina y el polímero del quitosano. El quitosano es principalmente glucosamina con $\geq 60\%$ de grupos amina. Las propiedades físicas y químicas dependen principalmente del grado de desacetilación, el peso molecular y el grado de polidispersidad, entre otros; los grupos -OH causan interacciones intermoleculares, como lo son los puentes de hidrógeno y otras interacciones no específicas (Roberts, 1992).

El quitosano es un excelente adsorbente de metales traza debido al exceso de grupos -OH y -NH_2 que posee, y a la flexibilidad de su estructura. La adsorción de los metales traza es selectiva e independiente del tamaño y dureza de los iones metálicos, o de la forma física del quitosano (polvo, películas o solución) (Yong et al. 2015).

Inicialmente se propuso que la interacción entre los iones metálicos y el quitosano ocurrían debido al intercambio iónico, absorción y quelación. Posteriormente, se sugirió que la adsorción metálica del quitosano no depende de la fuerza iónica o del pH de la solución (Vold et al. 2003). En la actualidad, el mecanismo de adsorción se inclina por la formación de un complejo, en lugar de las atracciones electrostáticas (Lu et al. 2008). La estabilidad de dichos complejos se resalta por la quelación, donde el ión metálico forma un tipo de complejo metal-quitosano (Klepka et al. 2008). Entre los metales que se han removido usando al quitosano se puede mencionar al Cu, Pb, Hg, Cd, Zn, entre otros. A este polímero se le considera uno de los mejores quelantes para captar metales traza (Yong et al. 2015).

2.15 Alginato

El alginato es un polisacárido soluble en agua que es extraído de las algas marrones. Químicamente se compone por bloques alternos de residuos ácidos unidos de 1-4 α -L-gulurónico y β -D-Mannurónico. Existen reportes de que el alginato ha sido reportado como mucoadhesivo, biodegradable y biocompatible, por lo cual tiene numerosas aplicaciones farmacéuticas, alimenticias, entre otras. En la última década ha aumentado su uso como coagulante y sorbente para la remoción de iones metálicos. A la función carboxilato de este polisacárido se le atribuye la elevada afinidad por los cationes divalentes como el Pb(II), Cu(II), Cd(II), etc. (Wang et al. 2016). El alginato constituye un material muy versátil debido a sus propiedades gelificantes, formador de películas, espesante y estabilizador. Además, se ha reportado que este biopolímero es sumamente útil para darle estabilidad a las formulaciones de quitosano (Sarmiento, 2012).

Con base a lo anterior, el presente estudio, de carácter científico básico orientado, pretende desarrollar biocompositos de base biológica formulados a partir de matrices de quitosano/alginato y biomasa de hongos filamentosos tolerantes a cobre, y evaluar su uso potencial para remover cobre presente en efluentes contaminados en la región del Río San Pedro, Sonora; así mismo, se pretende desarrollar un método biotecnológico sustentable e innovador que permita

biorremediar dichos efluentes en zonas rurales, a fin de obtener aguas tratadas para su empleo en actividades agrícolas en áreas aledañas a las empresas mineras.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la presencia de metales pesados en el Río San Pedro, Sonora, es importante llevar a cabo estudios que permitan la remoción de estos contaminantes de aguas para uso agrícola. Al ser citotóxicos, cancerígenos y mutagénicos, estos contaminantes representan un serio riesgo para la salud humana y animal al consumir productos agrícolas cultivados en esta región.

La síntesis de compositos y la biorremediación constituyen una alternativa para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales pesados.

4. HIPÓTESIS

Los biocompositos formulados a base de quitosano/alginato y biomasa de un hongo filamentoso tolerante a cobre, aislado a partir de sedimentos contaminados con metales, constituyen un sistema biológico capaz de remover eficientemente cobre en aguas contaminadas sintéticas. Además de ser eficientes para remover el metal, estos biocompositos presentarán una baja toxicidad en ensayos *in vitro* e vivo.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema biotecnológico para biore mover Cu^{2+} en aguas contaminadas, usando compositos de base biológica y biomasa de un hongo metalotolerante.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar e identificar un hongo filamentoso a partir de sedimentos contaminados con metales, provenientes de la región del río San Pedro, Sonora.
2. Evaluar la tolerancia a cobre de la cepa aislada de los sedimentos contaminados provenientes del Río San Pedro, Sonora.
3. Elaborar y caracterizar biocompositos de base biológica utilizando mezclas de quitosano/alginato/biomasa del hongo tolerante a cobre.
4. Evaluar la biorremoción de Cu^{2+} por los biocompositos de quitosano/alginato/biomasa fúngica, en sistemas en lote.
5. Determinar la toxicidad aguda y la eficacia del biosistema para remover cobre utilizando ensayos *in vivo* (*Artemia salina* y semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y de chile verde (*Capsicum annuum*)).

6. METODOLOGÍA

ETAPA I

6.1 Aislamiento del hongo

Se tomaron muestras de sedimentos contaminados de la región del río San Pedro, Sonora, México. Las muestras fueron colectadas en 3 sitios diferentes, sitio 1 en 30°59'38.85000''N y 110°18'47.63520''W (notación sexagesimal), sitio 2 en 30°59'38.75640''N y 110°18'42.96600''W, y sitio 3 en 30°59'36.38400''N y 110°18'18.65520''W. Estas muestras se almacenaron en botes de plástico y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C, hasta el aislamiento de los microorganismos. Para el aislamiento, se tomaron 10 g de cada una de las muestras de sedimentos y se suspendieron (por separado) en 100 mL de solución salina normal esterilizada (SSN) también se le conoce como solución salina fisiológica; posteriormente, se tomó 1 mL de la suspensión y se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-6} con SSN. Se tomaron 0.1 mL de cada dilución y se esparcieron en placas con agar Sabouraud dextrosa (ASD) (BD, BIXON, USA) previamente adicionado con 50 ppm de sulfato de cobre (CuSO_4 , JT Baker, USA) y 100 µg/mL de cloranfenicol ($\geq 98\%$, HPLC, C0378 Sigma, USA).

Las placas con agar ASD se incubaron a 28 ± 2 °C por 5 días. Finalmente, las colonias del hongo se seleccionaron en base a la frecuencia de ocurrencia en todas las diluciones (Ahmad et al. 2006). Una vez seleccionada la cepa, se procedió a la obtención de cultivos puros mediante la realización de la técnica de cultivos monospóricos (Koneman, 2001). Las placas con las colonias desarrolladas del hongo aislado se mantuvieron mediante subcultivos en placas de ASD adicionado con 50 ppm de CuSO_4 para mantener activo el metabolismo del microorganismo. El cultivo monospórico del hongo se envió al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional en Reynosa, Tamaulipas, México, para su identificación a género.

6.2 Pruebas de Tolerancia al Cobre

La tolerancia al cobre del hongo aislado se determinó como la concentración mínima inhibitoria (CMI) a partir de los datos experimentales de crecimiento radial, empleando el método de inoculación en pozo (Ahmad et al. 2006; Quintana-Obregón et al. 2011). La CMI es aquella concentración de metal pesado que se considera necesaria para inhibir el crecimiento visible del hongo, la cual fue determinada en este estudio por medio de análisis Probit. Las placas con agar ASD se prepararon usando diferentes concentraciones de CuSO_4 (50 - 2500 ppm) y la inoculación se llevó a cabo depositando en el centro de cada placa una concentración de 1×10^5 esporas/mL. Placas con agar ASD sin CuSO_4 se utilizaron como control. Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado y se incubaron a 28 ± 2 °C por 9 días. El crecimiento radial de las colonias del hongo se midió manualmente cada 24 h y comparó con respecto al control. Los datos experimentales se ajustaron al modelo modificado de Gompertz (Ecuación 1) para estimar los parámetros cinéticos del crecimiento radial del hongo.

Ec. 1

$$\ln(D_t/D_o) = A \exp\{-\exp[(V_m \cdot e/A)(\lambda - t) + 1]\}$$

donde:

A = crecimiento máximo durante la fase estacionaria. V_m = velocidad de crecimiento máxima (1/0.5 días). λ = fase lag (0.5 días). $e = \exp(1)$.

6.3 Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento del hongo

Para obtener un mayor crecimiento micelial, se prepararon placas enriquecidas con extracto de levadura (Czapek-YE) con la siguiente composición: K_2HPO_4 1.0 g/L, NaNO_3 3.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO_4 0.01 g/L, extracto de levadura 5 g/L, sacarosa 30 g/L, agar 15 g/L. Se agregaron 50 ppm de CuSO_4 al medio de cultivo, se ajustó el pH a 5.5, 5.0 y 4.5 (por separado) y se esterilizó a 121°C y 15 psi por 20 min. Posteriormente, el centro de cada placa se inoculó con una

suspensión de esporas conteniendo una concentración de 1×10^5 esporas/mL. Placas de Czapek-YE sin CuSO_4 y pH sin ajustar se emplearon como control. Todos los tratamientos se prepararon por triplicado y se incubaron a temperaturas de 28, 35 y $40 \pm 1^\circ\text{C}$, por 7 días. La extensión radial de las colonias se midió cada 24 h y con los datos experimentales se elaboraron gráficos de superficie de respuesta. Los parámetros cinéticos se estimaron de acuerdo a la metodología descrita en el punto 2.2.

6.4 Inmovilización del micelio

Como matriz de inmovilización de la biomasa del hongo se utilizó una muestra comercial de un textil compuesto de 100% poliéster (Tergal tropical liso, SKU5618L, adquirido en la tienda comercial Parisina). El textil se lavó mediante inmersión total en un recipiente con agua destilada caliente y se mantuvo a 60°C por 90 min; se adicionaron 50 mL de detergente líquido (sin agentes blanqueadores) al agua, para remover aceites o sustancias residuales presentes en el textil. Finalmente el textil se sacó del agua, se drenó y se cortó en pequeños cuadros de 2 x 2 cm, los cuales se secaron en estufa a 105°C por 3 h, posteriormente los textiles se pesaron y se envolvieron en papel aluminio individualmente, estos se colocaron en un frasco tipo Gerber y se esterilizaron a 121°C y 15 psi por 20 min previo a su uso (Gomes et al. 2014).

Para la inmovilización del micelio del hongo, se tomó una pieza de textil previamente esterilizada y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL adicionado con 100 mL de caldo Czapek-YE. Subsecuentemente, se inocularon los matraces con una suspensión a una concentración de 5×10^5 esporas/mL. Los matraces se incubaron con agitación orbital a 100 rpm, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 días. El textil con la biomasa desarrollada e inmovilizada se retiró con pinzas estériles y lavó con agua destilada desionizada hasta alcanzar un $\text{pH} \leq 8$ (Gomes et al. 2014).

6.5 Cinéticas de biosorción de CuSO₄

6.5.1 Biosorción utilizando biomasa inmovilizada viva

Se preparó medio Czapek-YE y se ajustó el pH del medio a 5.5, 5.0 y 4.5 con solución HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N, según fuese necesario. Posteriormente el textil con la biomasa inmovilizada viva se colocó en un matraz Erlenmeyer con 150 mL de caldo Czapek-YE el cual contenía una concentración de 20 mg L⁻¹ de Cu²⁺ (82 ppm de CuSO₄). Se tomaron muestras de 10 mL a diferentes periodos de tiempo (0, 15, 30, 45, 60, 80, y 100 min, y a las 24 h). Como control se empleó medio de cultivo con textil sin biomasa (Kumar et al. 2014; Gomes et al. 2014) con una concentración de 20 mg L⁻¹ de CuSO₄. Las cinéticas de biosorción de cobre se llevaron a cabo a diferentes condiciones de pH (4.5, 5.0 y 5.5) y temperaturas de incubación (28, 35 y 40°C). Las muestras se conservaron adicionando 200 µL of HNO₃ (JT Baker, USA) y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis, para determinar la concentración residual de Cu²⁺ por medio espectroscopia de absorción atómica (EAA).

6.5.2 Biosorción utilizando biomasa muerta

Una vez obtenido el textil con la biomasa inmovilizada como se mencionó en la sección 6.4, el matraz con la biomasa se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C y se secó en estufa por 24 h a 60°C; posteriormente se agregaron 150 mL de una solución con una concentración de 20 mg L⁻¹ de Cu²⁺ (82 ppm de CuSO₄), se ajustó el pH y se inoculó tal como se mencionó anteriormente. Se tomaron muestras a diferente tiempo, 0, 15, 30, 45, 60, 80 y 100 min, y a las 24 h. El medio de cultivo con el textil sin biomasa se usó como control (Gomes et al. 2014) con una concentración de 20 mg L⁻¹ de Cu²⁺. Este procedimiento se llevó a cabo a diferentes valores de pH (4.5, 5.0, y 5.5) y de temperatura de incubación (28, 35, y 40°C).

6.5.3 Cuantificación de Cu²⁺ y capacidad de biosorción de la biomasa fúngica

De las cinéticas de biosorción mencionadas anteriormente usando biomasa viva y muerta, las muestras del sobrenadante se analizaron por medio de absorción atómica. Para ello se utilizó un equipo Perkin Elmer AAnalyst 400, empleando una flama de aire/acetileno. Previó al análisis, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente. La cantidad de cobre adsorbido por la biomasa se calculó usando la ecuación 2 (Iram et al. 2015):

Ec. 2

$$q = \left(\frac{C_i - C_f}{m} \right) V$$

donde:

q = mg de iones metálicos adsorbidos por gramo de biomasa (mg/L). C_i = concentración inicial del ión metálico (mg/L). C_f = concentración final del ión metálico (mg/L). m = biomasa seca (g). V = volumen de la solución (L).

6.6 Análisis del efecto del Cu²⁺ sobre los componentes celulares utilizando microscopía de fluorescencia

Para visualizar el efecto del Cu²⁺ en los componentes celulares del hongo, se llevaron a cabo observaciones microscópicas empleando diferentes fluorocromos. Se utilizó un microscopio invertido (Modelo DMI8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipado con filtros fluorescentes (546/10 filtro de excitación RHOD y emisión 585/40, filtro de excitación DAPI 350/50 y emisión 460/40, filtro de excitación FITC 480/40 y emisión 527/30), cámara monocromática DFC450C (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) y software de fluorescencia (LAS AF ver 3.1.0., Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany).

Para llevar a cabo las tinciones se prepararon cajas Petri de vidrio estériles las cuales contenían portaobjetos de 20 x 20 mm. A cada caja Petri se agregaron 25 mL de medio de cultivo CZAPEK-YE, se inoculó con una concentración de 1x10⁵ esporas/mL y se incubó por 16 h a 28 ± 2°C. Después de este tiempo se retiraron cuidadosamente los portaobjetos con el hongo desarrollado y se tiñeron las

estructuras con los diferentes fluorocromos. Se tuvieron 3 tratamientos: 1) control sin Cu^{2+} , 2) 50 ppm de Cu^{2+} , y 3) 250 ppm de Cu^{2+} . A continuación, se describe cada método de tinción:

- a) **Blanco de calcofluor.** Se aplicaron 2 gotas de calcofluor (Blanco de Calcofluor, F3543, Sigma, USA) a los portaobjetos con el hongo desarrollado en medio con y sin Cu^{2+} y se incubaron en oscuridad a 4°C por 15 min. El blanco de calcofluor se caracteriza por teñir polisacáridos como la quitina y glucanos, evidenciando la pared celular (Hernández-Tellez et al. 2017).
- b) **Ioduro de propidio.** El ioduro de propidio (IP) es un colorante empleado para la observación de los ácidos nucleicos. El procedimiento consistió en añadir 2 gotas de IP (P4170, Sigma, USA) a una concentración de 0.02 mg/mL, posteriormente se incubó por 15 min en oscuridad, a 4°C (Hernández-Tellez et al. 2017). El IP emite fluorescencia roja cuando hay lesiones en la membrana celular, debido a la intercalación del colorante con el DNA.
- c) **Viabilidad celular.** Para determinar la viabilidad del hongo tras exponerse al Cu^{2+} se empleó un kit de viabilidad (células vivas/muertas, kit de doble tinción, Sigma, USA). Se preparó la solución mezclando 10 μL de la solución A y 5 μL de la solución B, los cuales se agregaron a 5 mL de PBS. Posteriormente se agregaron 2 gotas del colorante a los portaobjetos inoculados, incubando a 37°C por 15 min. La solución A se compone por calceína-AM que tiñe las células viables de un color verde, mientras que la solución B se compone por IP, que tiñe las células no viables de rojo.
- d) **Estrés oxidativo general (ROSS).** Para determinar el grado de estrés oxidativo general del hongo tras ser expuesto al cobre, se empleó el colorante 2, 7 diclorofluoreceína diacetato (Sigma, USA) a una concentración de 100 μM (p/v), disuelto en una mezcla metanol-agua (30:70). Una vez preparada la solución, se agregaron 2 gotas a los portaobjetos inoculados y se incubaron por 20 min en oscuridad, a 4°C .

e) Azul de Nilo. Se preparó una solución azul de Nilo al 1% (p/v) en agua tridestilada. Se agregaron 2 gotas del colorante a los portaobjetos inoculados y se incubaron a 37°C por 10 min (Ostlr-Holt, 1982, modificado). El poli-p-hidroxibutirato (PHB) es un polímero éster que funciona como fuente de energía y carbono en algunos microorganismos como bacterias y hongos, y que se cree están relacionados como un mecanismo de defensa ante situaciones de estrés como puede ser la exposición a metales pesados como el cobre. La presencia de PHB se evidencia mediante azul de Nilo.

6.7 Pruebas de Tolerancia al Quitosano

Se prepararon placas con agar ASD adicionado con una concentración conocida (1-4 g/L) de quitosano de bajo (QBPM), medio (QMPM) y alto peso molecular (QAPM). Posteriormente las placas se inocularon en el centro mediante la técnica de inoculación en pozo, depositando una concentración de 1×10^5 esporas/mL. Como control se emplearon placas con agar ASD sin quitosano. Las placas se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 días, haciendo mediciones manuales del crecimiento radial cada 24 h. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

6.8 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis estadístico empleando un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza (a un nivel de significancia de $P=0.05$) usando el programa JMP (JMP 5.0, SAS Institute Inc.). Las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey de rangos múltiples, a un intervalo de confianza del 95%. Los datos experimentales se presentaron como medias con su error estándar (media $\pm$ error std). Se llevó a cabo un análisis factorial para determinar el efecto del pH y la temperatura en el crecimiento del hongo y en el proceso de biosorción. Las variables analizadas fueron pH con 3 niveles (5.5, 5.0 y 4.5) y temperatura con 3 niveles (28°, 35° and 40 °C). Se elaboraron gráficos de superficie de respuesta usando el programa STATISTICA versión 8.

ETAPA II

6.9 Elaboración de compositos de quitosano

6.9.1 Preparación de una solución de quitosano

Se pesaron 2 g de hojuelas de quitosano de medio peso molecular (QMPM) y se disolvieron mediante agitación magnética en 100 mL de una solución de ácido acético glacial al 5% (v/v), a temperatura ambiente.

6.9.2 Preparación de gel de alginato

Se pesó 1 g de alginato de sodio y se agregó a 100 mL de agua destilada desionizada caliente (60-70°C), homogenizando hasta la disolución completa del alginato.

6.9.3 Producción e inactivación de biomasa de *Aspergillus australensis*

La biomasa se obtuvo mediante fermentación en matraces Erlenmeyer de 250 mL, adicionados con 100 mL de medio de cultivo líquido Czapek-YE; cada matraz fue inoculado con la suspensión de esporas (5×10^5 esporas/mL) e incubado bajo agitación orbital a 150 rpm, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, por 5 días. Para inactivar el micelio desarrollado, los matraces con los micelios fueron esterilizados a 121°C por 20 min. Posteriormente la biomasa se filtró y lavó con agua desionizada hasta alcanzar un $\text{pH} \leq 8$ (Gomes et al. 2014). Al micelio fúngico inactivado, secado y pulverizado, se le denominó como la biomasa muerta en polvo.

6.9.4 Elaboración de compositos de QMPM-Biomasa-Alginato

Fase 1: Se colocaron 8.5 mL de la solución de QMPM (20 g/L) en un vaso de precipitado de 50 mL y se agregaron 0.05 g de biomasa inactivada. La mezcla se

homogenizó mediante agitación magnética por 45 min y posteriormente se agregaron 1.5 mL de la solución de alginato de sodio al 1%. La mezcla de los biopolímeros y la biomasa se mantuvo en agitación magnética durante 2 h para obtener el gel de polimerización.

Fase 2: Para obtener las perlas de compuesto, la mezcla de QMPM-Biomasa-Alginato se adicionó gota a gota a una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) con una concentración de 1 g/L, empleando una bomba peristáltica (Fisher Scientific Mini-Pump Variable Flow). Posteriormente, las perlas precipitadas fueron separadas del exceso de la solución de TPP y caracterizadas en base a su tamaño y análisis de FTIR (Nghah et al. 2002; Šillerová et al. 2015).

6.9.5 Morfología y análisis de FT-IR

La forma y tamaño de los materiales sintetizados se determinó mediante observación visual, utilizando una escala graduada en cm y un estereomicroscopio. El tamaño se reportó como el promedio de al menos tres mediciones del diámetro de cada perla. En total se midieron mínimo 10-15 perlas. La caracterización estructural de los componentes individuales y del material obtenido se llevó a cabo usando un espectrómetro Thermo Scientific Nicolet iS50 FT-IR (Madison, WI, USA). Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con un promedio de 32 escaneos en un rango espectral de 4000-400 cm^{-1} . El análisis se llevó a cabo en medio líquido (agua), con el accesorio de reflexión total atenuada (RTA). Los espectros del quitosano, el alginato y la biomasa se usaron para elucidar las interacciones en el material.

6.10 Biosorción usando perlas del composito QMPM-Biomasa-Alginato

6.10.1 Biosorción de Cu^{2+} utilizando perlas húmedas

Se pesaron 0.15 g de perlas húmedas y se colocaron en un matraz Erlenmeyer previamente adicionado con 150 mL de una solución de Cu^{2+} a diferentes concentraciones (20, 50, 100 y 200 ppm). Como control se empleó la solución de Cu^{2+} con concentración de 20, 50, 100 y 200 ppm. Adicionalmente se emplearon controles de perlas de sólo QMPM y de sólo alginato.

Tomando como base los resultados obtenidos a partir de las cinéticas de absorción a diferente temperatura utilizando biomasa muerta, los análisis de biosorción empleando las perlas del composito se llevaron a cabo a 35°C, a diferentes valores de pH (5.5, 5.0 y 4.5). Los matraces se mantuvieron en agitación orbital a 120 rpm y se tomaron muestras de 10 mL a diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 45, 60, 80 y 100 min, y a las 24 h). Las muestras se conservaron con HNO_3 (JT Baker, USA) y se analizaron por EAA como se mencionó en la sección 6.5.3.

6.10.2 Biosorción de Cu^{2+} utilizando perlas liofilizadas

Se pesaron 0.15 g de perlas liofilizadas y se colocaron en un matraz Erlenmeyer con 150 mL de una solución de Cu^{2+} a diferentes concentraciones (20, 50, 100 y 200 ppm). Como control se usó una solución de Cu^{2+} con 20, 50, 100 y 200 ppm de cobre, sin perlas. Los análisis de biosorción del metal empleando los compositos liofilizados se llevaron a cabo siguiendo la metodología previamente descrita en la sección 6.10.1.

6.10.3 Cuantificación de cobre y capacidad de biosorción de las perlas de QMP-Biomas-Alginato

Las muestras del sobrenadante se analizaron por medio de absorción atómica utilizando una flama de aire/acetileno empleando un equipo Perkin Elmer AAnalyst

400. Previo al análisis las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente. La cantidad de cobre adsorbido por los materiales elaborados se calculó usando la ecuación 2 (Iram et al. 2015):

Ec. 2

$$q = \left(\frac{C_i - C_f}{m} \right) V$$

donde:

q = mg iones metálicos adsorbido por gramo de perlas (mg/L); C_i = concentración inicial del ion metálico (mg/L); C_f = concentración final del ion metálico (mg/L); m = perlas en base seca (g); V = volumen de la solución (L).

6.10.4 Estudios de Isoterma de Langmuir

Para llevar a cabo el estudio de la Isoterma de Langmuir se evaluaron procesos de biosorción a diferentes concentraciones de Cu^{2+} (20, 50, 100 y 200 ppm). Las concentraciones residuales al final de los procesos de biosorción se ajustaron al modelo de Langmuir (Ec. 2). Este modelo muestra el límite de adsorción que puede ser interpretado como el recubrimiento completo de la superficie del adsorbente por una cantidad máxima de adsorbato (límite de monocapa); la isoterma de Langmuir se relaciona con superficies homogéneas (Wang y Chen, 2009).

Ec (2)

$$q_e = (q_{\max} b C_e) / (1 + b C_e)$$

donde:

q_e = capacidad de adsorción en el equilibrio (mg/g); $q_{\max}$ = capacidad de adsorción máxima (mg/g); C_e = concentración de iones en el equilibrio (mg/L); b = constante de Langmuir.

ETAPA III

6.11 Estudio de la toxicidad y la eficacia del biosistema de remoción mediante ensayos *in vivo* utilizando plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*) y chile verde (*Capsicum annuum*), y nauplios de *Artemia salina*

6.11.1 Análisis de fitotoxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y chile verde (*Capsicum annuum*)

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (168 h de exposición) que permite evaluar el efecto fitotóxico de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Los puntos finales para la evaluación del efecto fitotóxico fueron la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo (Castillo, 2004).

Las semillas de lechuga se obtuvieron en un comercio local en Hermosillo, Sonora. Se emplearon semillas sin curar (sin plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo. Las semillas se limpiaron, se distribuyeron en grupos de 20 y cada grupo se colocó sobre un papel filtro en el interior de una caja Petri; posteriormente se agregaron 4 mL de la solución residual de CuSO_4 (sobrenadante obtenido de las cinéticas de biosorción de cobre), evitando la formación de bolsas de aire. Al colocar las semillas se dejó espacio para la elongación de las raíces desarrolladas entre cada semilla. Las cajas Petri se taparon y se colocaron en bolsas de plástico para evitar la pérdida de la humedad, adicionalmente se cubrieron con papel aluminio y se incubaron en oscuridad por un periodo de 7 días a $22-25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. Como control se emplearon semillas regadas con agua destilada sin Cu^{2+} . Las variables que se midieron fueron el porcentaje de germinación de las semillas y elongación de la raíz (Barrena et al. 2009).

El análisis de fitotoxicidad con semillas de chile (*Capsicum annuum*) variedad “Anaheim” se llevó a cabo siguiendo el protocolo antes descrito, incrementando el periodo de incubación a 14 días. Adicionalmente se evaluó el efecto de los compositos elaborados sobre la germinación de las semillas bajo las mismas condiciones de incubación. Se colocaron 20 semillas por caja Petri y estas fueron cubiertas con las distintas perlas sintetizadas (perlas de sólo quitosano, de sólo alginato, perlas de quitosano-biomasa-alginato húmedas y perlas de quitosano-biomasa-alginato liofilizadas).

6.11.2 Toxicidad aguda con nauplios de *Artemia salina*

La prueba de toxicidad aguda con nauplios de *Artemia salina* se llevó a cabo de acuerdo al método de Molina-Salina y Said-Fernández (2006). Para preparar el modelo de la prueba, primeramente, los huevecillos de *Artemia salina* se mantuvieron a -20°C previo a su uso. Para su eclosión, se pesaron 5 g de los huevecillos, se colocaron en un matraz Erlenmeyer adicionado con 500 mL de agua de mar estéril y se dejaron incubar a 25°C bajo iluminación artificial durante 24 h, manteniendo la aireación mediante una bomba de aire para peceras.

Tras la eclosión, los nauplios de *Artemia salina* fueron separados en grupos de 10 especímenes, transfiriéndolos con una pipeta Pasteur del matraz de eclosión y colocándolos en tubos de ensaye los cuales contenían 5 mL de agua de mar estéril y el tipo de perla a analizar (perlas de QMPM , perlas de alginato, perlas del composito QMPM-biomasa-alginato).

Las perlas se agregaron con una espátula en proporciones de 0.25, 0.50, 0.75, y 1 g respectivamente. Adicionalmente también se evaluaron diferentes concentraciones de Cu^{2+} (20, 50 y 100 ppm) adicionados al agua del mar para determinar los efectos sobre la *Artemia salina*. Posteriormente, los tubos se mantuvieron bajo iluminación artificial a 25°C por 24 h. Después de este periodo, los nauplios sobrevivientes fueron contados con la ayuda de una lupa y se determinó el porcentaje de mortalidad en los diferentes tratamientos, así como en

los controles. Una vez concluida la prueba, los nauplios fueron sacrificados mediante la adición de 100 μ L de una solución de fenol al 5 % (p/v).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA I

7.1 Identificación del Hongo

De acuerdo al resultado del análisis llevado a cabo en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, para la identificación a género del hongo aislado del Río San Pedro, Sonora, se usó el método para la secuenciación de los espaciadores internos transcritos y/o dominios 26sF/26sR y ITS1/ITS4. Basado en los resultados usando los pimers IT, el hongo filamentoso fue identificado como *Aspergillus australensis*, con un 99% de identidad. Esta identificación se realizó por medio del alineamiento de secuencia según la página electrónica <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis morfológico donde el hongo mostró borde y forma filamentosa, con elevación, superficie algodonosa, consistencia dura y de color blanco (Figura 1).

7.2 Pruebas de tolerancia al cobre por el *Aspergillus australensis*

La capacidad del hongo aislado para crecer en medio suplementado con CuSO_4 se reportó como tolerancia al cobre. Los resultados obtenidos mostraron que *A. australensis* creció en medio de cultivo adicionado con hasta 2000 ppm de CuSO_4 (Figura 2). El mayor crecimiento radial se observó a una concentración de cobre de 250 y 500 ppm (3.73 ± 0.1 y 3.15 ± 0.1 cm, respectivamente) en comparación con el crecimiento en el medio control (2.56 ± 0.1 cm), a los 9 días de incubación. Al estimar los parámetros cinéticos de crecimiento y el porcentaje de inhibición (Tabla 1), se encontró una mayor velocidad máxima de crecimiento del hongo en el medio adicionado con 250 ppm Cu^{2+} ($0.024 \pm 0.001 \text{ cm}^{-1}$), comparado con el control ($0.019 \pm 0.001 \text{ cm}^{-1}$).

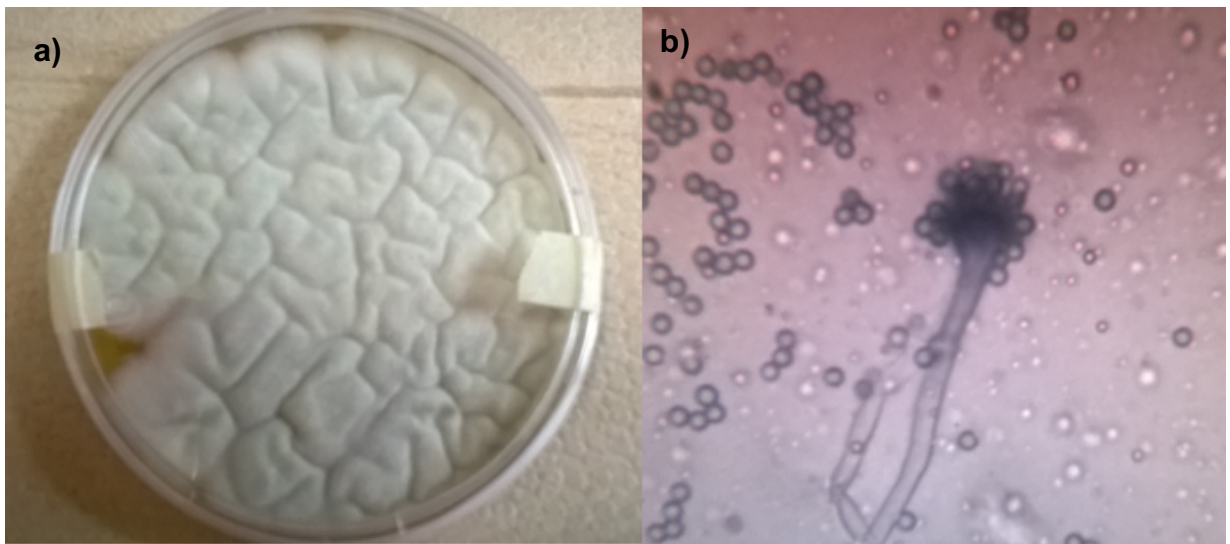


Figura 1. Apariencia del *Aspergillus australensis*, a) en caja Petri en medio de cultivo ASD adicionado con CuSO_4 , a 28°C , b) observación al microscopio del hongo teñido con azul de algodón.

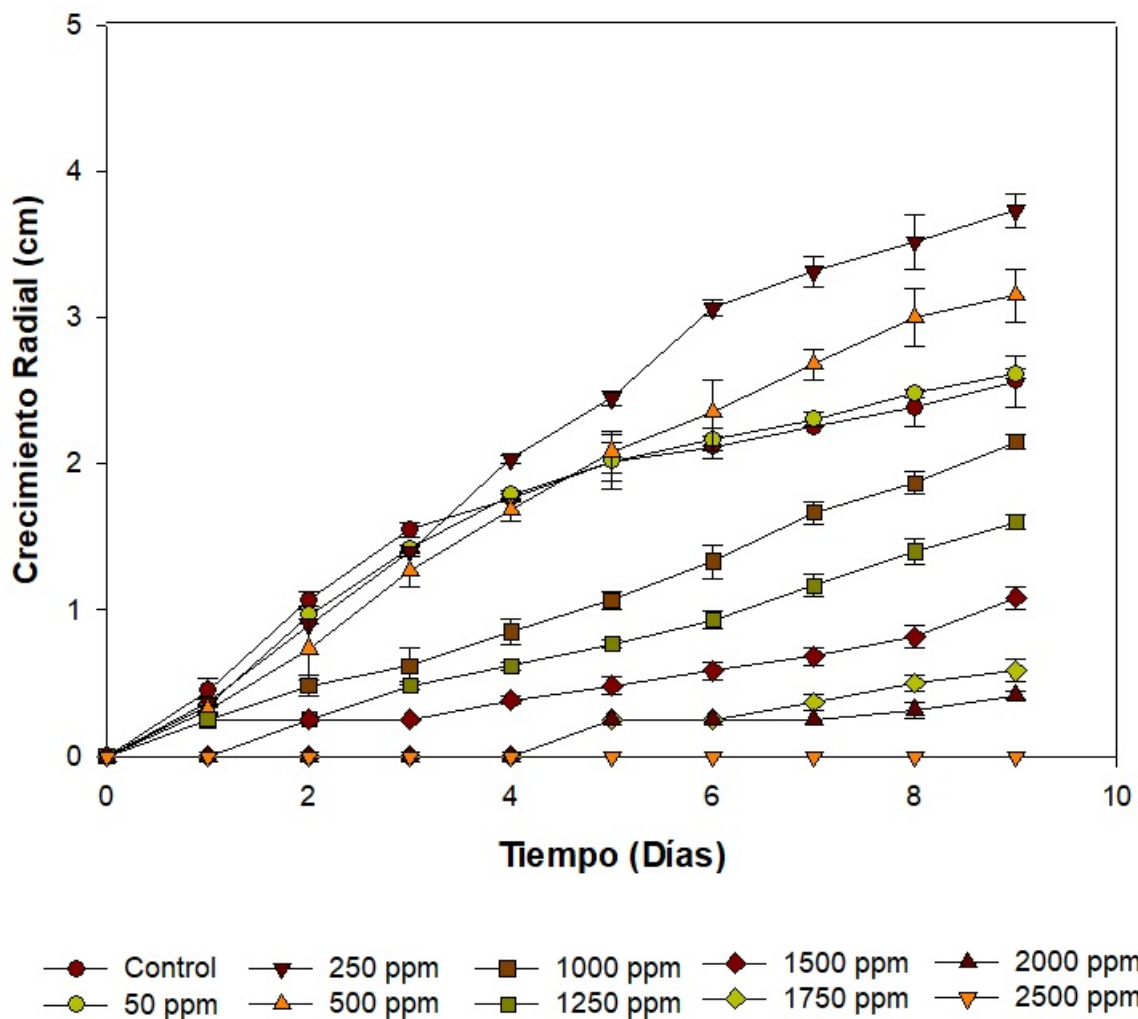


Figura 2. Crecimiento radial de *Aspergillus australensis* en medio de cultivo agar ASD adicionado con diferentes concentraciones de cobre (CuSO_4), a 28°C.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de crecimiento radial y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus australensis* en medio de cultivo agar ASD adicionado con diferentes concentraciones de cobre (CuSO₄), a los 9 días de incubación.

Tratamientos	A	Vm	λ	R ²	% de Inhibición
Control	2.49±0.06	0.019 ± 0.001	1.0 ± 4.81	0.99	0
50 ppm	2.59 ±0.04	0.019 ± 0.001	2.8 ±3.20	0.99	0
250 ppm	4.11 ±0.09	0.024 ± 0.001	14.9 ±2.32	0.99	0
500 ppm	3.56 ± 0.18	0.019 ± 0.001	10.5 ± 4.72	0.99	0
1000 ppm	4.28 ± 0.01	0.01 ± 0.00	23.8 ± 0.10	0.99	16.2
1250 ppm	4.63 ± 0.01	0.01 ± 0.00	44.8 ± 0.10	0.99	37.7
1500 ppm	3.67 ± 0.01	0.007 ± 0.001	69.3 ± 0.10	0.98	57.8
1750 ppm	-	-	-	-	77.3
2000 ppm	-	-	-	-	83.7
2500 ppm	-	-	-	-	100

Los valores representan la media de 3 repeticiones. A: crecimiento radial máximo durante la fase estacionaria; Vm: velocidad de crecimiento máxima (1/0.5 días); λ : fase lag (0.5 días); R²: coeficiente de determinación.

Está reportado en la literatura que el cobre participa directamente en el metabolismo microbiano y es considerado como un metal esencial, necesario para llevar a cabo diversas funciones metabólicas; sirve como un cofactor esencial para varias enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, incluida la catalasa, superóxido dismutasa, entre otras (Harvey y Mc Ardle, 2008; Stern, 2010). Esto podría explicar el incremento en el crecimiento radial observado en este estudio, a las bajas concentraciones de cobre analizadas.

El cobre puede ser incorporado en diferentes metaloenzimas y está asociado al metabolismo de los carbohidratos (Cervantes, 1994), lo cual puede explicar el incremento en el metabolismo del hongo para sobrevivir a determinadas concentraciones de cobre (CuSO_4). Algunos autores han reportado rangos de tolerancia al cobre de 10 – 300 ppm de CuSO_4 para los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus sp.* y *Funalia trogii* (Sing y Yu, 1998; Kahraman et al. 2005; Hemambika et al., 2011), lo cual indica que la tolerancia a metales pesados varía dependiendo de la especie microbiana. En este experimento, la adaptabilidad mostrada por *Aspergillus australensis* puede estar relacionada con un gen responsable de sintetizar la proteína metalotioneína, la cual es responsable de unir diferentes metales de transición (Dameron y Harrison, 1998). Esta proteína ha sido postulada como responsable de la detoxificación de varios metales de la clase II b en diferentes especies de microorganismos (Lerch, 1980; Gadd, 1993, Perego y Howell, 1997).

Con respecto a la concentración mínima inhibitoria (CMI), de acuerdo al análisis Probit se encontró una CMI de 609.69 ppm de CuSO_4 , a los 9 días (Figura 3). Ahmad et al. (2006) reportaron valores de CMI de 300 – 600, 125 – 550 y 300 – 850 ppm para diferentes especies de hongos tras exponerlos a metales como Cr^{6+} , Cd, y Ni, respectivamente, los cuales fueron expresados como tolerancia. La tolerancia de una especie de microorganismo a los metales pesados constituye un factor importante a considerar al momento de seleccionar la especie más adecuada para llevar a cabo procesos de biosorción, además del tipo de metal y la concentración que puede ser removida del mismo.

7.3 Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento del *Aspergillus australensis*

Debido a que los procesos de biosorción de metales son afectados por factores ambientales extrínsecos, en este estudio se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento radial a diferentes valores de pH y temperatura y se obtuvieron gráficos de superficie de respuesta.

7.3.1 Efecto de pH

El crecimiento radial se midió a valores de pH de 5.5, 5.0 y 4.5 cada 24 h. Se observó que al reducir el pH del medio de cultivo de 5.5 a 4.5, el hongo presentó un mayor ($P \leq 0.05$) crecimiento radial comparado con el control (Figura 4a). Asimismo, a estos valores de pH se encontró una mayor ($P \leq 0.05$) velocidad de crecimiento (Tabla 2). Esto indica que el hongo tiene una preferencia por las condiciones ácidas para poder crecer adecuadamente.

La tolerancia del hongo a pH ácidos se puede atribuir a mecanismos de defensa asociados a los procesos de transporte, como pueden ser los sistemas antiporte, potasio/protones (K^+/H^+), o bien sodio (Na^+/H^+). Adicionalmente, la respuesta de tolerancia a medio ácido puede estar relacionada con la síntesis de ATP's, que transloca protones que expulsan protones al medio. Otro mecanismo de defensa puede estar asociado a la síntesis de proteínas que se encargan de la reparación de las proteínas desnaturalizadas (Bencina et al. 2009).

7.3.2 Efecto de la temperatura

El crecimiento radial se midió a 28°C, 35°C y 40°C, cada 24 h. Se observó que *Aspergillus australensis* presentó un mejor crecimiento a temperaturas de incubación elevadas, encontrando un incremento en la extensión radial comparado con el control (Figura 4b). Esto se corroboró con los valores estimados de la velocidad de crecimiento, la cual fue mayor ($P \leq 0.05$) cuando el hongo creció a

35°C y 40°C, comparado con el control (Tabla 2). La tolerancia microbiana a temperaturas extremas puede ser atribuida a la presencia de enzimas termoestables o solutos termoprotectores que mantienen estables a las proteínas. Además, puede estar relacionada con la presencia de un elevado contenido de ácidos grasos en la membrana del microorganismo. Un fenómeno común es la síntesis de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (PST), lo cual ocurre debido a la exposición repentina a elevadas temperaturas. La síntesis de PST es una respuesta adaptativa para aumentar la termotolerancia bajo condiciones de estrés (Masheswari et al. 2000).

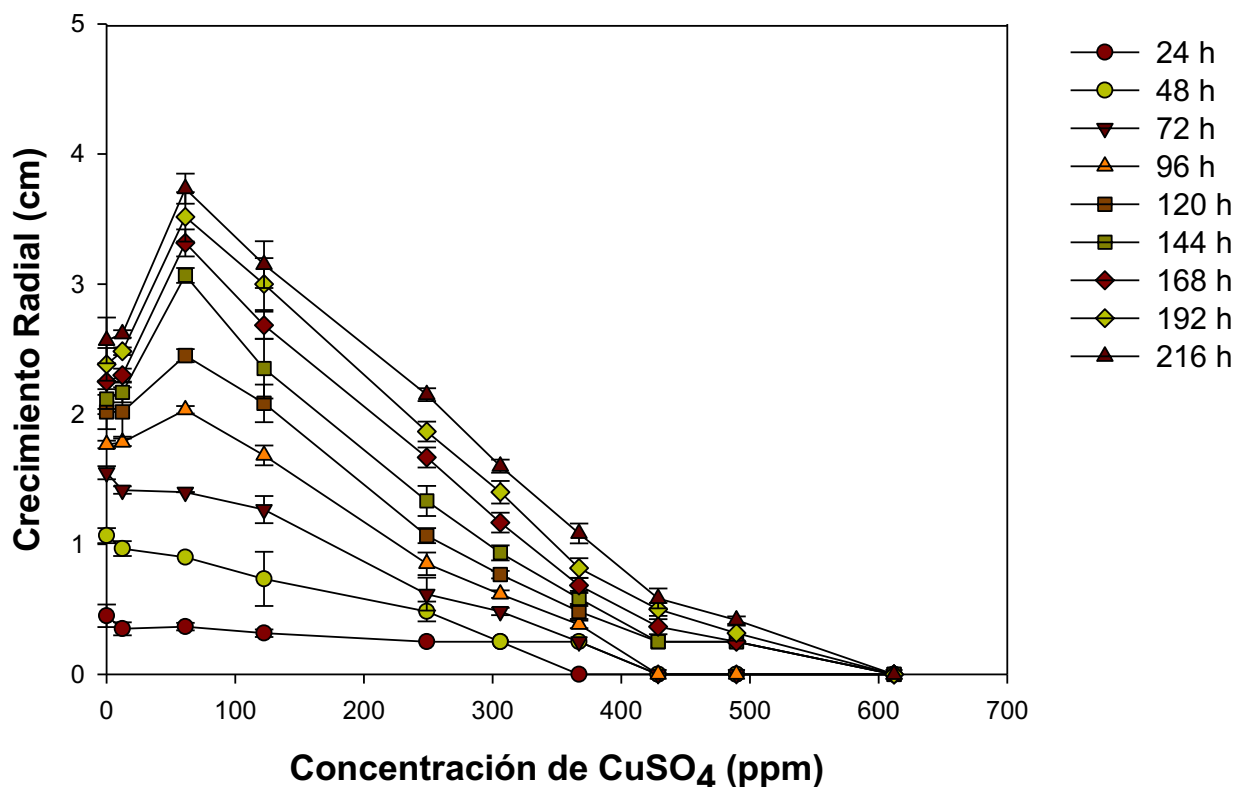
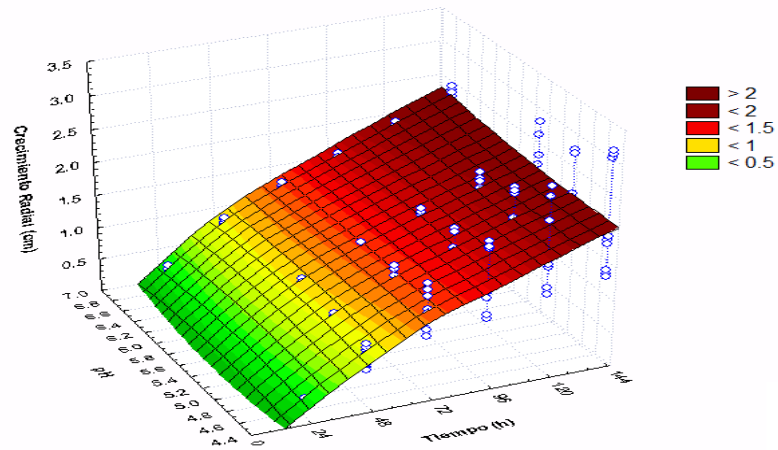
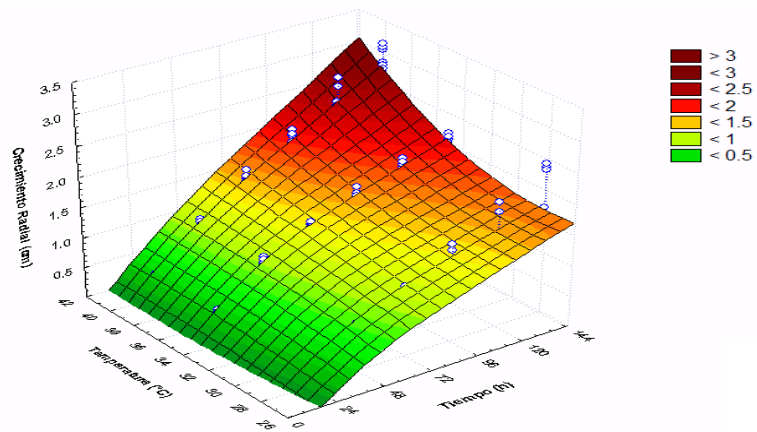


Figura 3. Determinación de la CMI durante el crecimiento radial del *Aspergillus australensis* en medio de cultivo ASD adicionado con diferentes concentraciones de cobre (CuSO₄), a 28°C.

a)



b)



c)

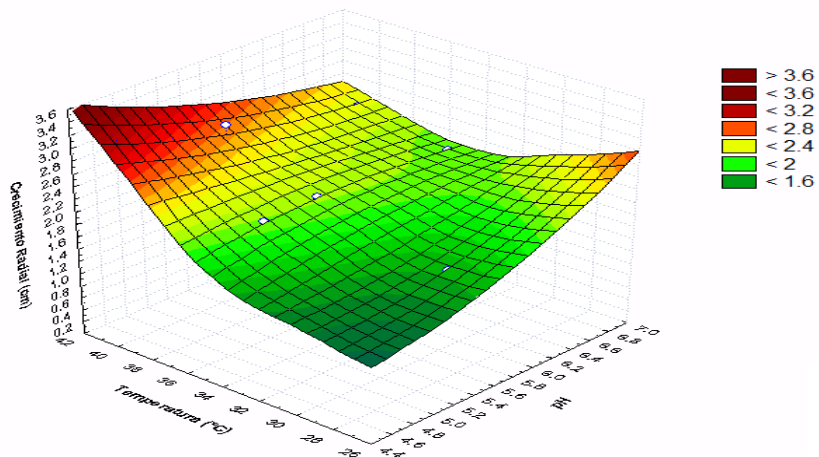


Figura 4. Crecimiento radial del *Aspergillus australensis* en medio Czapek-YE adicionado con CuSO_4 ; a) efecto del pH (5.5, 5.0 y 4.5); b) efecto de la temperatura (28°C, 35°C y 40°C); c) efecto combinado del pH y la temperatura.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento radial de *Aspergillus australensis* en medio de cultivo ASD adicionado con CuSO₄, a los 7 días de incubación a diferentes valores de pH y temperatura.

28 °C	Control	pH = 5.5	pH = 5.0	pH = 4.5
A	3.03 ± 0.28	1.65 ± 0.0	1.41 ± 0.0	1.44 ± 0.0
Vm	0.02 ± 0.001	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0
λ	19.44 ± 3.51	6.48 ± 0.0	5.79 ± 0.0	2.54 ± 0.0
R²	0.99	0.99	0.99	0.99
35 °C	Control	pH = 5.5	pH = 5.0	pH = 4.5
A	2.10 ± 0.0	2.29 ± 0.13	3.45 ± 0.17	1.89 ± 0.0
Vm	0.02 ± 0.0	0.018 ± 0.001	0.021 ± 0.001	0.019 ± 0.0
λ	7.49 ± 0.0	1.04 ± 4.71	8.00 ± 2.28	7.65 ± 0.0
R²	0.99	0.98	0.99	0.98
40 °C	Control	pH = 5.5	pH = 5.0	pH = 4.5
A	2.79 ± 0.16	3.40 ± 0.47	3.45 ± 0.17	3.81 ± 0.29
Vm	0.018 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.020 ± 0.001	0.027 ± 0.001
λ	-0.019 ± 3.22	1.14 ± 5.44	8.00 ± 2.28	16.85 ± 3.18
R²	0.99	0.98	0.99	0.99

Los valores representan la media de 3 repeticiones. A: crecimiento radial máximo durante la fase estacionaria; Vm: velocidad de crecimiento máxima (1/0.5 días); λ: fase lag (0.5 días); R²: coeficiente de determinación.

En este estudio, al analizar el efecto combinado del pH y temperatura sobre el crecimiento del hongo, se encontró un incremento ($P \leq 0.05$) en la extensión radial de *A. australensis* al reducirse el pH e incrementarse la temperatura (Figura 4c, Tabla 3). Cuando el hongo se desarrolló en medio de cultivo con pH ajustado a 4.5 e incubado 40°C, se observó un incremento de un 33% en el radio de las colonias (3.1 ± 0.03 cm) en comparación con el control (2.31 ± 0.017 cm).

Tabla 3. Efecto de pH y temperatura en el crecimiento radial de *Aspergillus australensis* en medio ASD, a los 7 días de incubación.

Tratamiento (°C)	Tratamiento (pH)	Crecimiento Radial (cm)
28	Control (6.8)	2.05 ± 0.05 ^{cd}
28	5.5	2.08 ± 0.02 ^{gh}
28	5	2.06 ± 0.01 ^h
28	4.5	1.35 ± 0.03 ^h
35	Control (6.8)	2.05 ± 0.05 ^{ef}
35	5.5	2.08 ± 0.01 ^{ef}
35	5	2.06 ± 0.01 ^{ef}
35	4.5	1.35 ± 0.03 ^{fg}
40	Control (6.8)	2.31 ± 0.01 ^{de}
40	5.5	2.61 ± 0.14 ^{bc}
40	5	2.78 ± 0.01 ^b
40	4.5	3.1 ± 0.03 ^a

Los valores representan el promedio de tres repeticiones $\pm$ el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

7.4 Cinéticas de remoción de cobre

7.4.1 Inmovilización de la biomasa

El hongo *Aspergillus australensis* presentó la habilidad para crecer y permanecer inmovilizado en textiles elaborados a partir de poliéster (100%), después de 5 días de incubación. La cantidad de biomasa viva obtenida en peso húmedo fue de 6.35 ± 0.10 g/cuadro de textil. Después de esterilizar y secar la biomasa, la cantidad de biomasa muerta en peso seco fue de 0.45 ± 0.08 g/cuadro de textil. La cantidad de biomasa libre producida fue de 6.17 ± 0.1 g (peso húmedo). Estos resultados son similares a los obtenidos por Gomes et al. (2014), quienes al emplear diferentes textiles (a base de poliéster) y algunas fibras naturales para inmovilizar al hongo *Rhizopus sp.*, obtuvieron una biomasa inmovilizada en rangos de 0.14 – 0.38 g; de acuerdo con los autores, cualquier tipo de textil puede ser usado para inmovilizar biomasa de hongos y la fijación puede variar dependiendo de la porosidad del textil. Por otra parte, Esser (2014) reportó que la fijación del micelio del hongo a diferentes tipos de superficies se puede atribuir a la unión de una capa mucilaginoso de cisteína y a polipéptidos (complejo de proteínas) producidos por el microorganismo, así como también a algunos carbohidratos como las glicoproteínas.

7.4.2 Biosorción utilizando biomasa viva inmovilizada

La concentración residual de Cu^{2+} presente en el sobrenadante de las muestras se determinó por medio de espectroscopía de absorción atómica. La concentración inicial de Cu^{2+} en el medio de cultivo fue de 20 ppm (adicionado como 82 ppm de CuSO_4 , control). Los resultados obtenidos mostraron que la biomasa viva de *Aspergillus australensis* redujo la concentración de cobre en los tres valores de pH evaluados (Figura 5a, Tabla 4).

El micelio inmovilizado del hongo fue capaz de reducir la concentración de Cu^{2+} a un valor de 15.71 ± 0.35 ppm después de 24 h de exposición al metal, a 28°C , lo que representa una eficiencia de remoción del 23%. Al incrementar la temperatura

a 35°C, la biomasa viva disminuyó la concentración de cobre en los tres pH's evaluados, encontrando una menor ($P \leq 0.05$) concentración del metal en el sobrenadante de la cinética realizada a pH de 4.5 (11.94 ± 0.45 ppm), equivalente a una eficiencia de remoción de 38%. Este valor fue semejante al obtenido a pH de 5.5 y 40°C, en donde se encontró una eficiencia de remoción de 40% con respecto al control (Figura 5c, Tabla 4).

Al evaluar el efecto combinado del pH y la temperatura, se encontró una mayor remoción de cobre cuando la biomasa de *A. australensis* creció en medio de cultivo a un pH de 4.5, a 35-45°C). Estos resultados son similares a los observados por Price et al. (2001), quienes al emplear especies de hongos para remover cobre en solución (0.01 mM CuSO₄) lograron valores de remoción en un rango de 0.09 a 0.52 mg de cobre/g de biomasa seca de *Aspergillus pendulus* y *A. niger*, respectivamente; asimismo, con biomasa seca de *Geotrichum* y *Fusarium verticillioides* removieron 0.41 y 0.29 mg de cobre/g de biomasa, respectivamente (Price et al, 2001). En un estudio similar, Yahaya et al. (2009) evaluaron el efecto del pH y temperatura en la biosorción de cobre usando células inmovilizadas de *Pycnoporus sanguineus* en perlas de alginato, reportando que la máxima biosorción (2.18 mg de cobre/g de biomasa) se obtuvo a pH 5, a 40°C.

La biosorción del cobre en un biosorbente es una reacción química cuando se utiliza la biomasa viva, ya que el proceso requiere energía para poder transportar el metal dentro del hongo (Akar et al. 2005). En el presente estudio, la biomasa viva presentó una mayor eficiencia para remover cobre al incrementar la temperatura de 28°C a 40°C; por otra parte, no se encontró un efecto por parte del textil utilizado para la inmovilización durante el proceso de biosorción, lo que indica que todo el cobre fue removido por la biomasa del hongo.

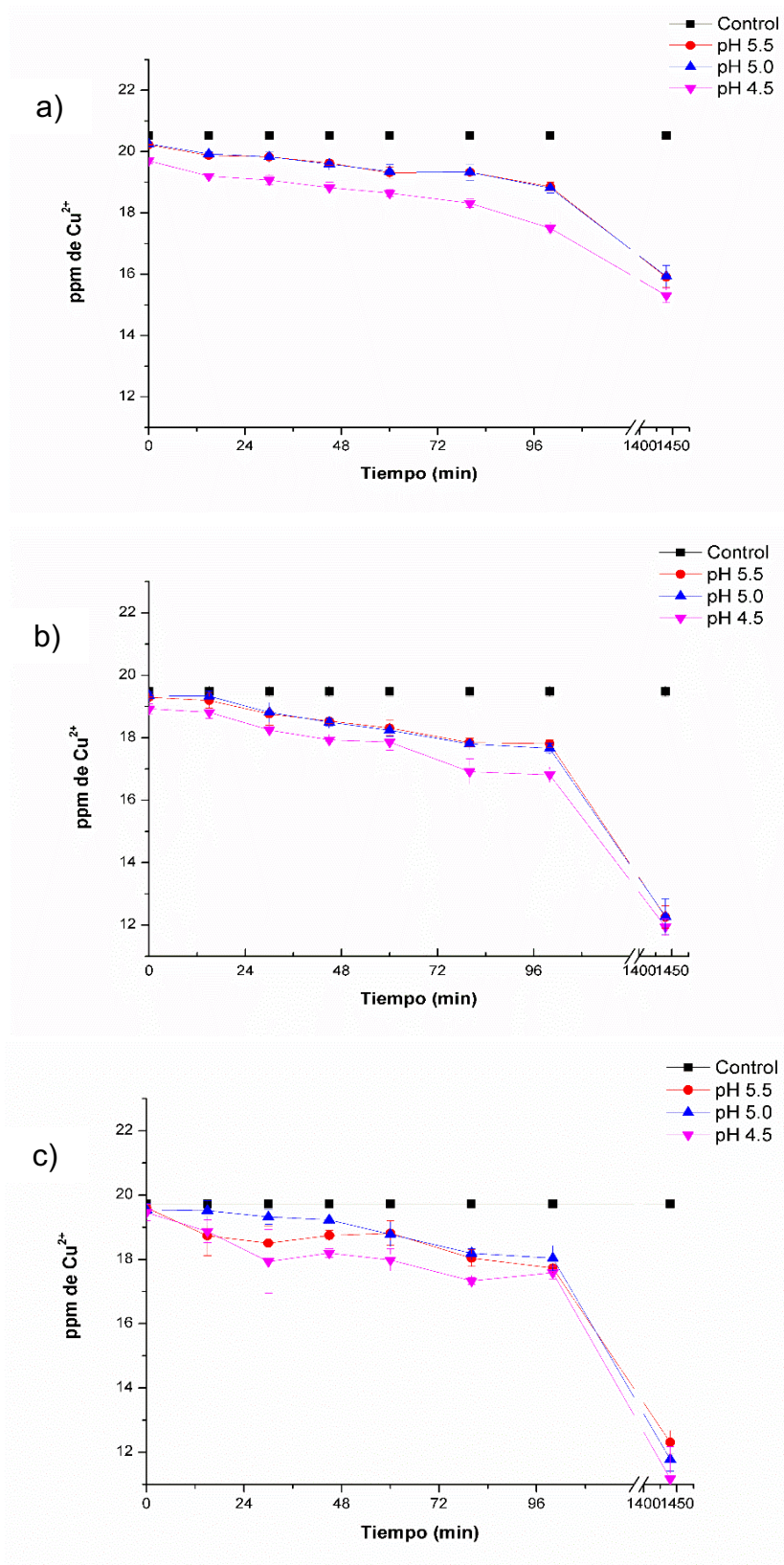


Figura 5. Efecto del pH en la biosorción de Cu^{2+} usando biomasa viva inmovilizada de *Aspergillus australensis*, a diferente temperatura: a) 28°C, b) 35°C, c) 40°C.

Tabla 4. Remoción de cobre empleando biomasa viva inmovilizada de *Aspergillus australensis*, a diferentes valores de pH y temperatura.

Tratamiento		Remoción de metal	Remoción de cobre por la biomasa
(°C)	(pH)	(%)	(mg de metal/g seco)
Control	6.8	-	-
T1	28	22.64 ± 2.72 ^a	1.54 ± 0.19 ^a
T2		20.59 ± 0.62 ^a	1.53 ± 0.20 ^a
T3		25.43 ± 2.02 ^a	1.74 ± 0.13 ^a
Control	6.8	-	-
T1	35	37.09 ± 3.14 ^a	2.41 ± 0.20 ^a
T2		36.99 ± 5.02 ^a	2.35 ± 0.24 ^a
T3		38.72 ± 2.35 ^b	2.51 ± 0.15 ^b
Control	6.8	-	-
T1	40	37.58 ± 3.17 ^a	2.47 ± 0.20 ^a
T2		40.26 ± 3.32 ^c	2.65 ± 0.21 ^c
T3		40.21 ± 4.19 ^c	2.66 ± 0.26 ^c

Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

7.4.3 Biosorción de Cu^{2+} utilizando biomasa muerta inmovilizada. Al llevar a cabo la biosorción de cobre empleando biomasa muerta e inmovilizada se encontró una disminución de la concentración inicial de cobre, de 20 a 14.65 ± 0.10 ppm de Cu^{2+} , a las 24 h, a los tres valores de pH evaluados, a 28°C (Figura 6a, Tabla 5). Esto representa una eficiencia de remoción del 28%. Cuando la cinética de biosorción se realizó a 35°C , se encontró una remoción promedio de cobre de 30% (6.80 ppm of Cu^{2+}), la cual fue mayor ($P \leq 0.05$) con respecto a la remoción lograda a 28°C . Un comportamiento semejante se encontró a 40°C (Figura 6c), en donde al emplear la biomasa inactivada inmovilizada se logró remover en promedio un 30% de cobre en cada pH evaluado (Tabla 5).

En general, la cantidad de cobre adsorbido por la biomasa muerta inmovilizada se mantuvo en un rango de 1.90-2.46 mg of metal/g de biomasa seca. Estos resultados difieren a los reportados por Gómez et al. (2014), quienes al utilizar biomasa de *Rhizopus sp.* inmovilizada en textiles (polyester y fibras naturales) logrando reducir cobre de una concentración inicial de 20 ppm de Cu^{2+} , a valores de 3.1 - 5.6 ppm; de acuerdo a los autores, la capacidad de adsorción de la biomasa de *Rhizopus sp.* fue de 4.5-7.2 mg of metal/g de biomasa, al llegar al equilibrio.

Por otra parte, Verma et al. (2013) reportaron el uso de biomasa muerta de *Penicillium citrinum*, libre o inmovilizada en perlas de alginato, encontrando que el hongo fue capaz de remover entre 82 y 84% of Cu^{2+} , respectivamente, a pH de 5.0 y temperatura de 30°C . La capacidad de adsorción fue de 3.30 and 3.38 mg of cobre/g de biomasa muerta, libre o inmovilizada, respectivamente.

Debido a las propiedades del alginato para atrapar o quelar diversos metales pesados como el cobre, este biopolímero puede ayudar a incrementar el proceso de biosorción (Verma et al. 2013).

El mecanismo específico para remover metales pesados puede diferir cualitativa y cuantitativamente dependiendo de la especie del microorganismo, la fuente de la biomasa y su procesamiento (Tobin et al. 1984), además de las condiciones o parámetros fisicoquímicos usados durante el proceso de biosorción tales como la temperatura, el pH y la concentración.

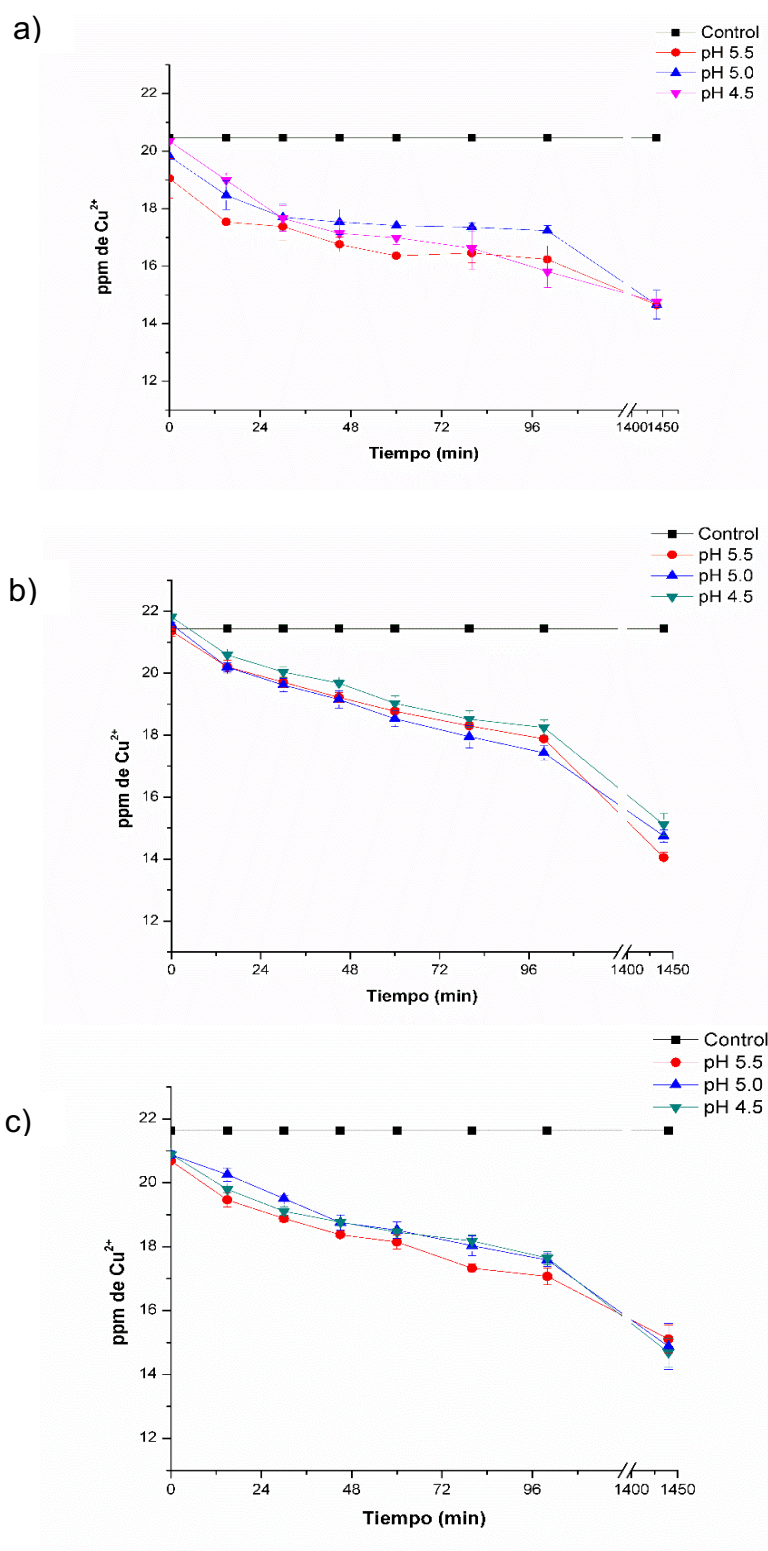


Figura 6. Efecto del pH en la biosorción de Cu^{2+} utilizando biomasa muerta de *Aspergillus australensis*, a diferente temperatura: a) 28°C, b) 35°C, c) 40°C.

Tabla 5. Remoción de cobre empleando biomasa muerta de *Aspergillus australensis*, a diferentes valores de pH y temperatura.

Tratamiento		Remoción de metal	Remoción de cobre por la biomasa
(°C)	(pH)	(%)	(mg de metal/g seco)
Control		6.8	-
T1	28	5.5	28.42 ^a
T2		5.0	1.94 ± 0.035 ^a
T3		4.5	1.93 ± 0.286 ^a
Control		6.8	27.87 ^a
T1	35	5.5	1.90 ± 0.036 ^a
T2		5	-
T3		4.5	-
Control		6.8	-
T1	40	5.5	34.46 ^b
T2		5	2.46 ± 0.303 ^b
T3		4.5	2.23 ± 0.299 ^b
Control		6.8	2.11 ± 0.314 ^b
T1	40	5.5	-
T2		5	30.163 ^b
T3		4.5	2.17 ± 0.826 ^b
			2.25 ± 0.317 ^b
			2.36 ± 0.292 ^b

Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Al igual que otros microorganismos, los hongos filamentosos pueden adsorber metales del ambiente por procesos fisicoquímicos y mecanismos biológicos. Se considera que la pared de las hifas es el sitio principal para llevar a cabo la acumulación de los metales, lo cual se puede atribuir a la presencia de varios grupos químicos en la pared, como el grupo acetamido de la quitina, los grupos amino y fosfato de los ácidos nucleicos, los grupos amino, amido, sulfhidrilo y carboxilo de las proteínas, y los grupos hidroxilos de los polisacáridos. Estos grupos pueden atraer o ligar iones metálicos (Holan y Volesky 1995). Además de las metalotioneínas, otros componentes celulares tales como la fitoquitlatina y la enzima superóxido dismutasa pueden participar en la quelación de metales (Price et al. 2001).

El pH es uno de los parámetros más importantes para llevar a cabo la remoción de metales pesados, ya que se relaciona directamente con la habilidad de los iones de hidrógeno para activar sitios en la superficie del biosorbente (Lodeiro et al. 2006). Un medio ambiente con pH ácido favorece el incremento de los sitios activos y fortalece la atracción de cargas, dando como lugar un incremento en la biosorción de metales como el Cu^{2+} (Chia-Chay et al. 2010).

La temperatura también tiene un efecto sobre el proceso de biosorción, ya que puede ocasionar la presencia de componentes químicos celulares ionizados debido a la desnaturalización, afectando la estabilidad y configuración de la pared celular y por ende la integridad de la misma.

Con base a lo anterior, es posible deducir que los sitios de unión del hongo aislado se vieron afectados simultáneamente por efecto de la temperatura y del pH, dando como resultado una reducción en la remoción de metales pesados, especialmente al utilizar la biomasa viva. Por tal motivo, es importante que estos parámetros sean evaluados al planear procesos de biosorción con biomasa viva como material biosorbente, a fin de optimizar y seleccionar los valores de temperatura y pH que favorezcan el mayor crecimiento del microorganismo.

En relación al empleo de sistemas que involucren el uso de la biomasa muerta, el proceso responsable de la remoción de los metales es fisicoquímico; debido a ello,

es insignificante el efecto de la temperatura en los mecanismos independientes de la energía (Bayramoğlu et al. 2003).

7.5 Efecto del Cu^{2+} sobre los componentes celulares de *Aspergillus australensis* utilizando microscopía de fluorescencia

Tras la exposición del hongo al metal se observó la presencia de células viables en las dos concentraciones analizadas (50 y 250 ppm de Cu^{2+}) y en el control, sin embargo, cuando el hongo creció en medio adicionado con la mayor concentración del metal se detectó la presencia de células no viables (Figura 7). Esto sugiere que aunque el cobre puede afectar viabilidad del hongo, la tolerancia desarrollada por el microorganismo le permite ser capaz de seguir creciendo a una mayor concentración del metal.

Al evaluar el efecto del metal sobre la integridad de la membrana plasmática, las tinciones con IP evidenciaron una intensa coloración roja en las células inoculadas en medio adicionado con ambas concentraciones de cobre, lo cual está relacionado con la interacción del IP con el DNA del hongo; esto sugiere que a concentraciones > 50 ppm de Cu^{2+} , el metal es capaz de inducir afectaciones en la membrana celular (Figura 8), lo cual es congruente con el efecto encontrado en la viabilidad de las células (Figura 7).

Al evaluar el efecto del cobre sobre el estado de estrés oxidativo general del hongo, se encontró que el metal es capaz de generar estrés oxidativo (Figura 9), lo cual puede explicar las afectaciones en la viabilidad y en la pérdida de la integridad de la membrana celular (Figuras 7 y 8). Con relación al estrés ocasionado por la exposición a metales pesados, se ha observado que las células bacterianas tienden a producir compuestos como biosurfactantes, proteínas o biopolímeros, siendo los últimos los más reportados. En este estudio se empleó la tinción con azul Nilo para evidenciar la presencia de polihidroxialcanoatos (PHA's) en el hongo, específicamente gránulos de polihidroxibutirato (PHB), el polímero más común entre los PHA's (Ostlr-Holt, 1982, modificado).

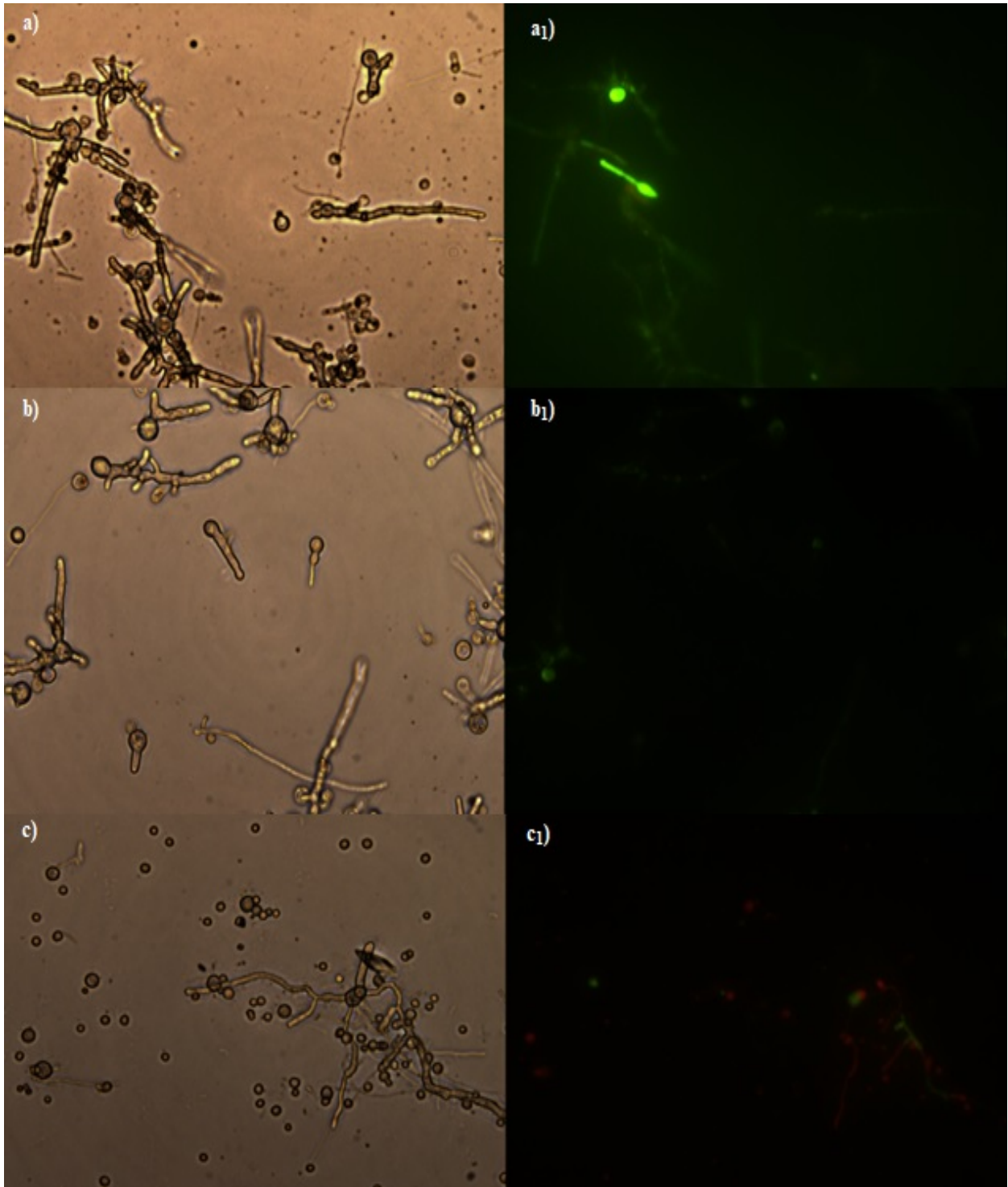


Figura 7 Esporas de *Aspergillus australensis* e hifas cultivadas en medio con cobre a las 24 h, teñidas con acetoximetilo de calceína y IP (live/dead cell double staining kit), mostrando esporas viables (verdes) y no viables (rojas). a, a₁) 50 ppm Cu²⁺; b, b₁) 250 ppm Cu²⁺; c, c₁) control

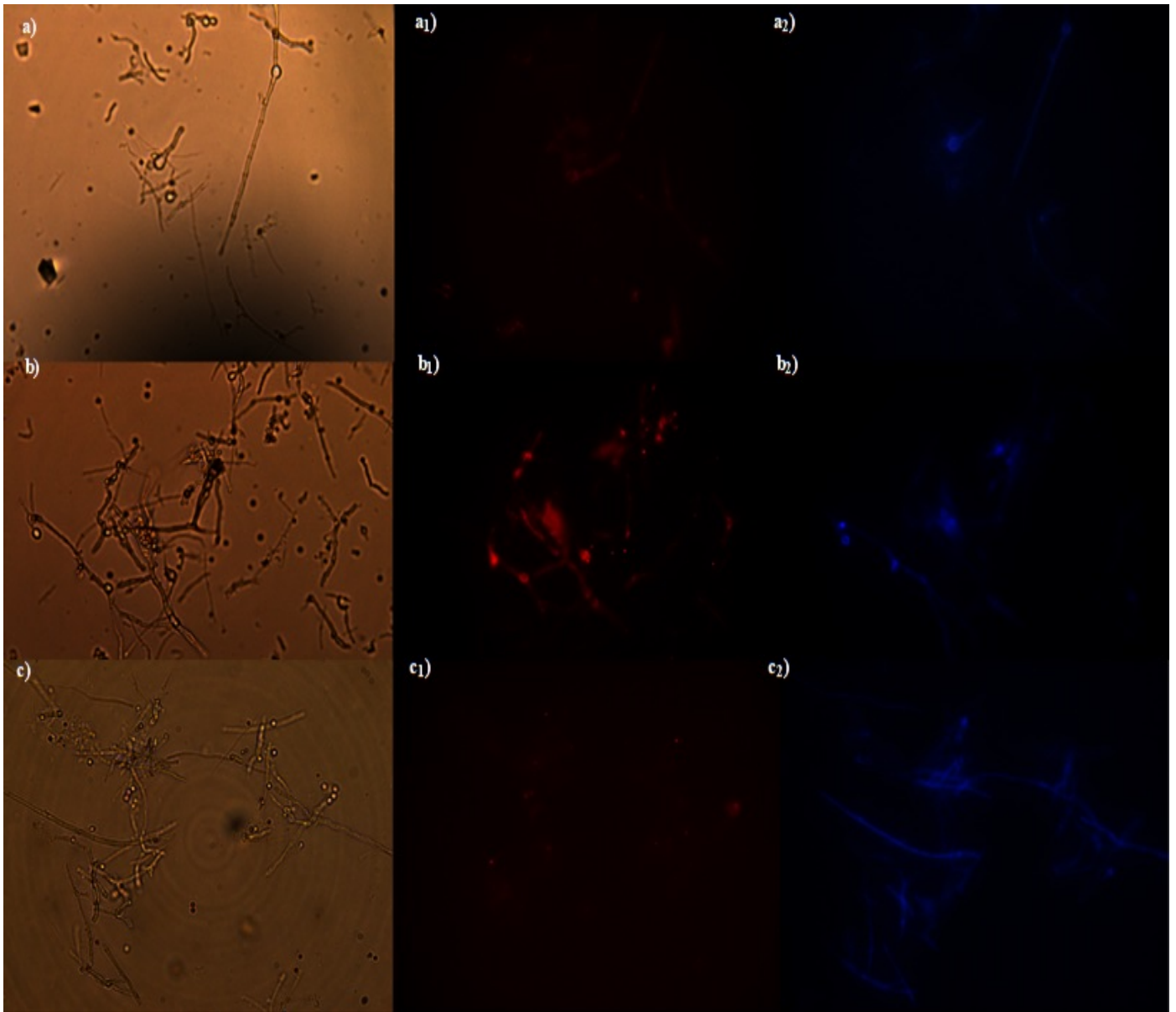


Figura 8. Esporas de *Aspergillus australensis* e hifas cultivadas en medio con cobre, a las 24 h, teñidas con IP y blanco de calcofluor, donde se muestra daño a la integridad de la membrana celular (rojo) y la producción de glucanos/quitina (azul), respectivamente: a, a₁, a₂) 50 ppm Cu²⁺; b, b₁, b₂) 250 ppm Cu²⁺; c, c₁, c₂) Control.

Al comparar las estructuras fúngicas desarrolladas en los medios de cultivo adicionados con cobre, se observaron gránulos con una fluorescencia de color amarilla-naranja, indicando la presencia de PHB (Figura 10).

Los hongos han demostrado la habilidad para tolerar y detoxificar metales a través de mecanismos como la transformación de valencia, precipitación intracelular y extracelular (Gadd,1993). La habilidad de un organismo para sobrevivir en un ambiente tóxico debido a la presencia de metales es conocida como resistencia a los metales, la cual implica la activación de diferentes mecanismos como resultado de la respuesta directa al tipo de metal.

Los mecanismos biológicos implicados en la supervivencia del hongo incluyen precipitación extracelular, precipitación, complejación y cristalización, transformación de metales, biosorción hacia la pared celular y pigmentos, disminución en el transporte o impermeabilidad, eflujo, compartimentación intracelular y secuestro (Ross 1975; Mehra and Wig; Gadd, 1993).

Un organismo en particular puede depender directa o indirectamente de una o varias de estas estrategias para sobrevivir. La síntesis de las metalotioneínas o péptidos c-glutamil es un mecanismo para resistir la presencia de Cu^{2+} en *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, la unión o precipitación del cobre alrededor de la pared celular, así como el transporte intracelular, son también componentes de la respuesta celular (Gadd and White, 1989).

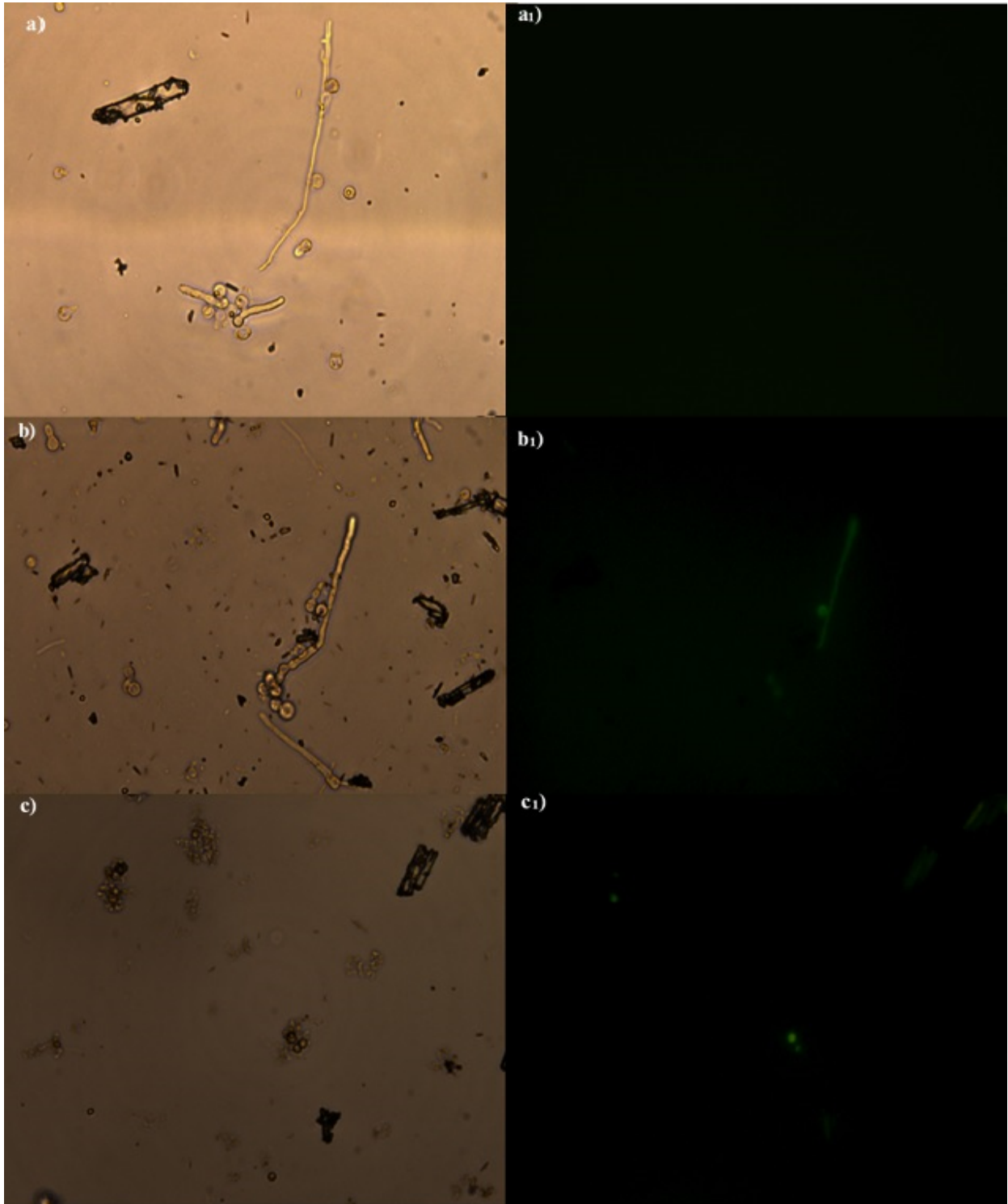


Figura 9. Esporas de *Aspergillus australensis* e hifas cultivadas en medio con cobre, a las 24 h, teñidas con 2',7' diclorofluoreceína diacetato, mostrando estrés oxidativo general (verde) causado por la exposición del metal. a, a₁) 50 ppm Cu²⁺; b, b₁) 250 ppm Cu²⁺; c. c₁) Control.

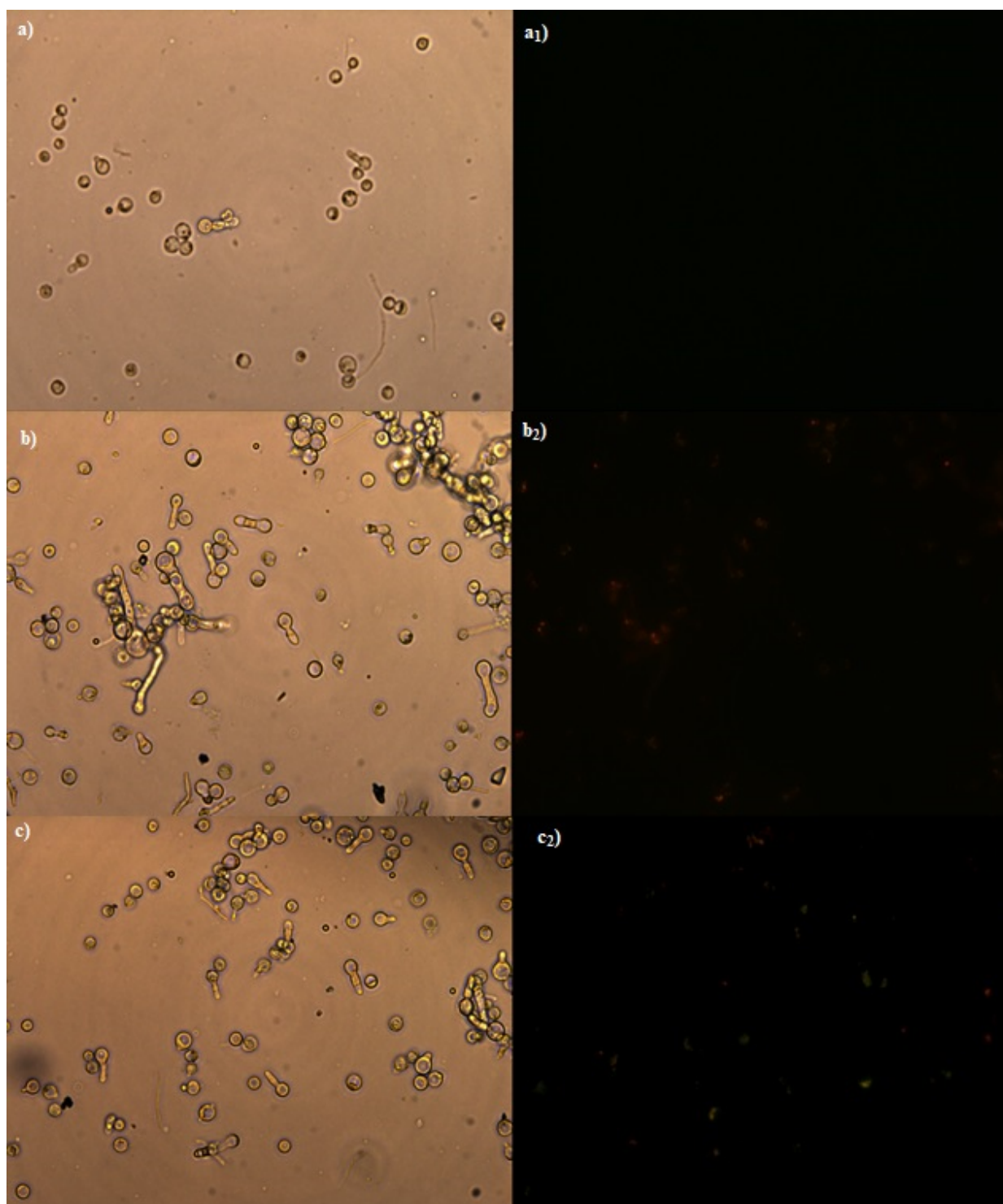


Figura 10. Esporas de *Aspergillus australensis* cultivadas en medio con cobre, a las 24 horas, teñidas con azul de Nilo, mostrando la producción de gránulos de polihidroxialcanoatos (PHA's) (naranja). a, a₁) 50 ppm Cu₂⁺; b, b₁) 250 ppm Cu₂⁺; c, c₁) control.

7.6 Pruebas de tolerancia al quitosano

Los resultados obtenidos en las pruebas de tolerancia al quitosano se pueden observar en la Figura 11. La mayor ($P \leq 0.05$) inhibición (~ 90%) del crecimiento radial del hongo se encontró en el medio ASD adicionado con 4 g/L de quitosano de alto peso molecular (QAPM) (Figura 9c), mientras que en los medios adicionados con los quitosanos de bajo (BPM) y medio (MPM) peso mostraron un comportamiento similar (73.1 y 71.3%, respectivamente). Para los tres tipos de quitosano, se observó una mayor inhibición del crecimiento conforme se incrementó la concentración del biopolímero (Figuras 11a y 11b). Lo anterior muestra la conveniencia de utilizar quitosano de bajo o medio peso molecular para propósitos de biorremediación de metales como el cobre al utilizar matrices biopoliméricas elaboradas a base de mezclas de quitosano y biomasa microbiana viva, como materiales biosorbentes.

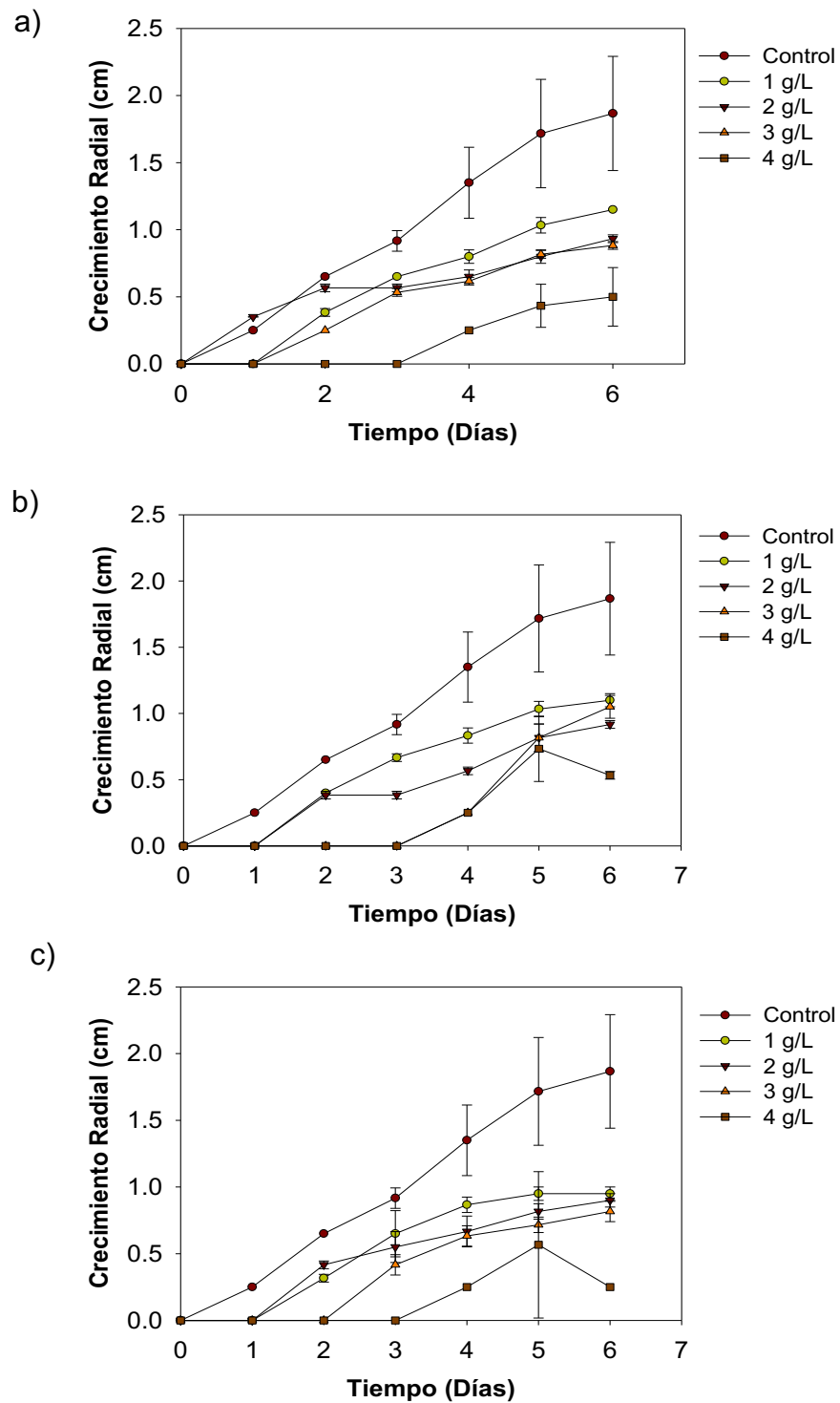


Figura 11. Efecto del tipo de quitosano sobre el crecimiento radial de *Aspergillus australensis*, a 28°C, en medio de cultivo agar Czapek adicionado: a) QBPM, b) QMPM, c) QAPM.

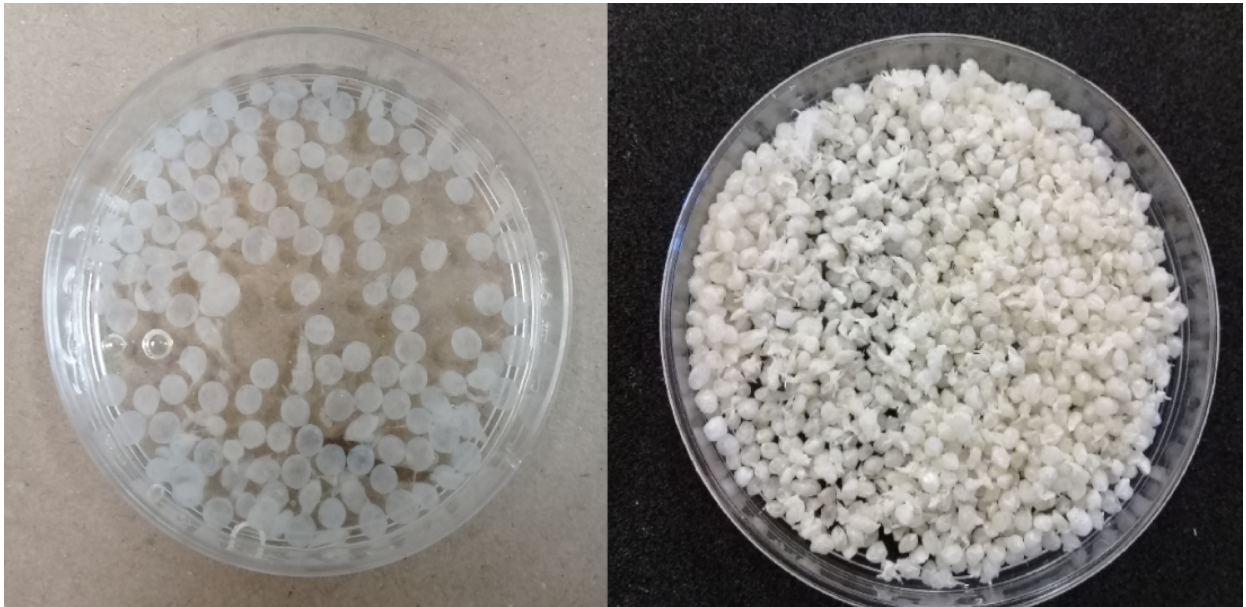
ETAPA II

7.7 Síntesis de compositos

Las perlas de los compositos de QMPM-biomasa-alginato obtenidos presentaron un tamaño promedio de 0.2 ± 0.01 cm en base húmeda, con un color blanco opaco y una consistencia firme al tacto. Después de liofilizar, el tamaño promedio de las perlas fue de 0.1 ± 0.01 cm, quedando de un color beige pálido, con consistencia firme al tacto, aunque de aspecto frágil comparado con el composito húmedo (Figura 12). El tamaño de las perlas sintetizadas en este estudio es similar a los valores reportados en la literatura para perlas elaboradas a partir de materiales poliméricos con aplicaciones en biorremediación, pudiendo ser empleadas en diferentes procesos de biosorción tales como sistemas por lote, en columnas empacadas o en camas fijas, entre otros.

7.7.1 Análisis de FT-IR de los compositos entrecruzados de QMPM-biomasa-alginato y TPP.

En la Figura 13 se presenta el espectro FT-IR obtenido para los diferentes biomateriales elaborados. En el espectro del quitosano (Figura 13d) de medio peso molecular (QMPM) se observaron los picos característicos en la región de $3,372\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a los grupos -OH y -NH , así como vibraciones y estiramiento del enlace -NH . En la región de $3,022$ y $2,753\text{ cm}^{-1}$ se observó el estiramiento de C-H (Molina-Salina et al. 2006, Barrena et al. 2009), mientras que la banda a $1,528\text{ cm}^{-1}$ se asocia al estiramiento C=O correspondiente a la amida I (Vakili et al. 2016). En el espectro del alginato (Figura 13c) se evidenció una banda en la región de $3,257\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al estiramiento de los grupos -OH , mientras que las bandas ubicadas entre $1,599$ y $1,405\text{ cm}^{-1}$ se pueden asociar a los grupos carboxílicos y al estiramiento de los grupos -COO^- . El pico observado a $1,025\text{ cm}^{-1}$ se relaciona con el estiramiento del grupo C-O-C (Guibal et al. 1998).



(a)

(b)

Figura 12. Apariencia física de las perlas del compuesto sintetizado a partir de quitosano de medio peso molecular, biomasa de *Aspergillus australiensis* y alginato, entrecruzados con TPP. a) perlas en base húmeda; b) perlas liofilizadas.

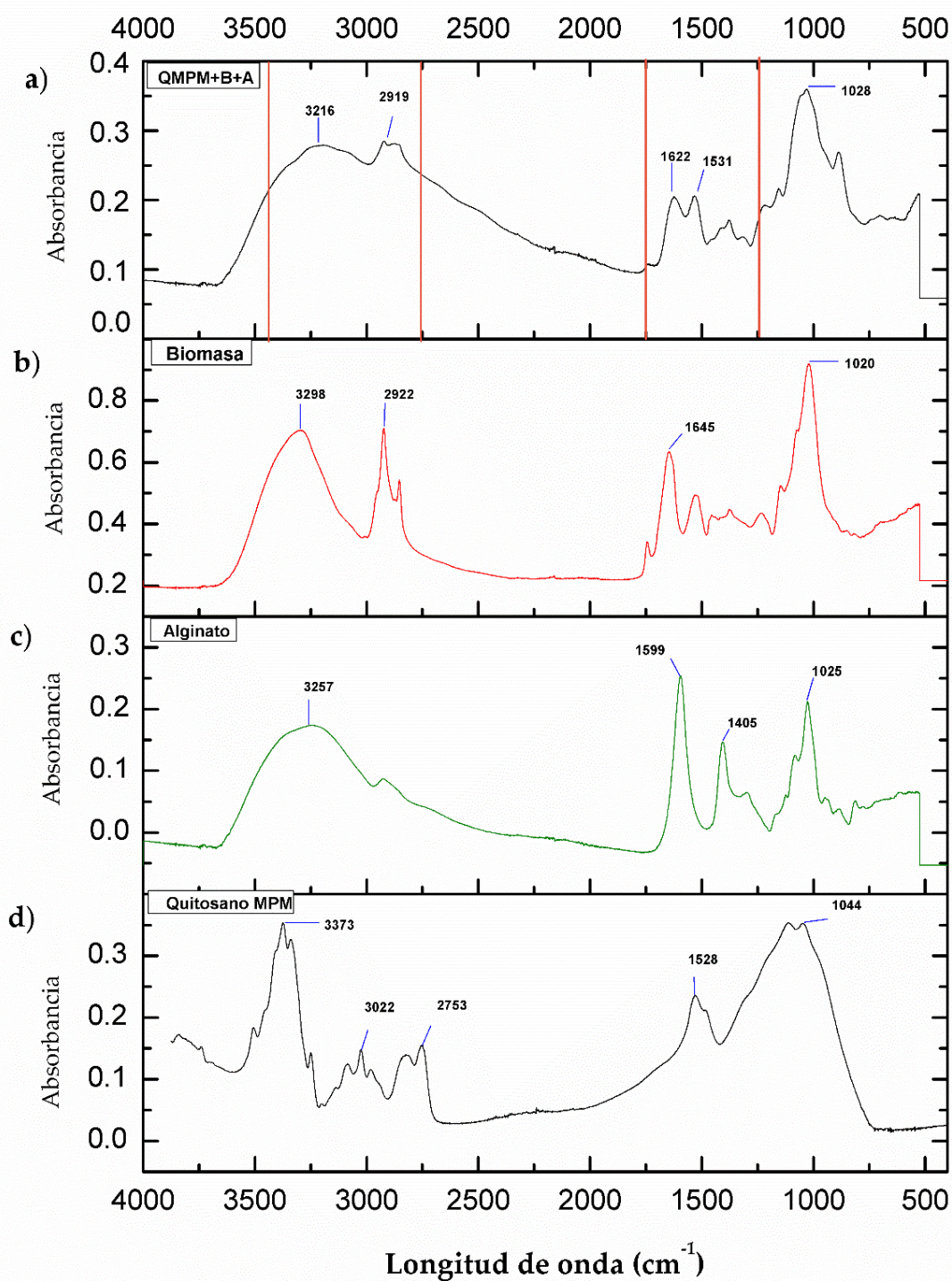


Figura 13. Espectro de FT-IR de las perlas de los materiales elaborados: a) compuesto de QMPM-Biomasa de *Aspergillus australensis*-Alginato; b) biomasa *A. australiensis*; c) alginato de sodio; d) quitosano de medio peso molecular (QMPM).

Al analizar el espectro de la biomasa del hongo (Figura 13b) se pueden observar los grupos característicos en la región de $3,298\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al estiramiento asimétrico de NH_2 de las aminas y a la presencia de grupos $-\text{OH}$. La señal a $2,922\text{ cm}^{-1}$ muestra estiramiento de los grupos C-H, mientras que la señal a 1645 cm^{-1} se relaciona con el estiramiento C=O debido a la deformación $-\text{NH}$, lo cual indica la presencia de amida I. La señal a $1,020\text{ cm}^{-1}$ se asocia al estiramiento de los grupos carboxílicos C-O. Estas señales observadas en este espectro coinciden con las reportadas para la biomasa del hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* (Adina et al. 2010).

En el espectro de IR del compuesto de QMPM-Biomasa-Alginato (Figura 13a) se puede observar el estiramiento en la región de $2,750$ y $3,400\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a los grupos $-\text{NH}$ y $-\text{OH}$. Asimismo, en la región de $1,622$ y $1,531\text{ cm}^{-1}$ se observa el estiramiento de los grupos C-O y $-\text{NH}$, y en la región de $1,028\text{ cm}^{-1}$ el estiramiento de los enlaces C-O y C-C. Dado que el quitosano es el componente mayoritario en el compuesto, la mayoría de las interacciones ocurre alrededor de esta molécula. El TPP actúa como un agente entrecruzante entre los diferentes biopolímeros en la matriz del material, de tal manera que la formación del compuesto se puede atribuir a la gelificación inotrópica (Lichawska et al. 2014).

Durante la síntesis de nanopartículas de quitosano-alginato empleadas para la liberación de moléculas funcionales, las cargas de los grupos $-\text{NH}_3$ del quitosano pueden interactuar con los productos de la disociación del TPP en la solución acuosa ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ and $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{-4}$) (Goycoolea et al. 2009). Considerando lo anterior, los grupos $-\text{NH}^{3+}$ del quitosano pueden además interactuar con los grupos $-\text{COO}^-$ cargados negativamente del alginato y con los grupos carboxílicos presentes en los componentes de la biomasa del hongo. Esto puede estar relacionado con la disminución significativa de la señal encontrada entre 1600 y 1500 cm^{-1} , que se puede atribuir a la interacción de los grupos amino con los grupos carboxílicos y carboxilatos (Dai et al. 2008). En adición, fue posible observar una señal cerca de los 1650 cm^{-1} la cual indica una interacción entre los grupos carbonilo presentes en la biomasa y en el alginato, con los grupos amino de la cadena del quitosano (Vaziry et al. 2018). Entre los principales constituyentes de la pared celular de los hongos

filamentosos se encuentra un gran número de hexaminas y proteínas (Loukidou et al. 2003). De este modo, la adición de la biomasa fúngica a la mezcla de quitosano-alginato proporciona grupos $-NH$, $-OH$ y grupos carboxílicos, los cuales pueden interactuar de manera similar con el TPP.

7.8 Biosorción de cobre por los compositos

7.8.1 Perlas húmedas

Al analizar los resultados de las cinéticas de biosorción del metal empleando las perlas del composito húmedo (Figura 14a) se encontró que la concentración de cobre disminuyó a los tres valores de pH evaluados (5.5, 5.0 y 4.5), encontrando una mayor ($P \leq 0.05$) remoción a pH de 4.5 (10.48 ± 0.54 ppm de Cu^{2+}) comparando con el control (21.67 ± 0.07 ppm de Cu^{2+}). Este valor representa una remoción de cobre de 51.8% (Tabla 6), mientras que a pH de 5.5 y 5.0 se logró una remoción del 43.6 y 47%, respectivamente. Estos valores son considerados aceptables ya que se logró remover más del 50% de la concentración inicial (20 ppm de Cu^{2+}) del metal. Con base a estos resultados, es factible lograr remover una mayor concentración de cobre empleando cinéticas de biosorción de 2 vías. En este estudio, la capacidad de adsorción del material elaborado a base de QMPM-Biomasa-Alginato fue de 11.19 mg de Cu^{2+} /g de composito.

Yu et al. (2013) sintetizaron nanopartículas de quitosano-TPP y micropartículas de alginato para la remoción de Cu^{2+} (0.5-50 mM), encontrando que las partículas húmedas permitieron remover cobre de manera dependiente de la concentración de quitosano empleado para la síntesis. Los autores reportaron un máximo de adsorción de 7.93 mg/g de partícula [quitosano 2 mg/mL (1.0 TPP)], 4.24 mg/g de partículas [2 mg/g de partículas (0.7) TPP] y 4.87 mg/g de partículas [quitosano 4 mg/mL (1.0 TPP)], después de una semana de exposición al metal.

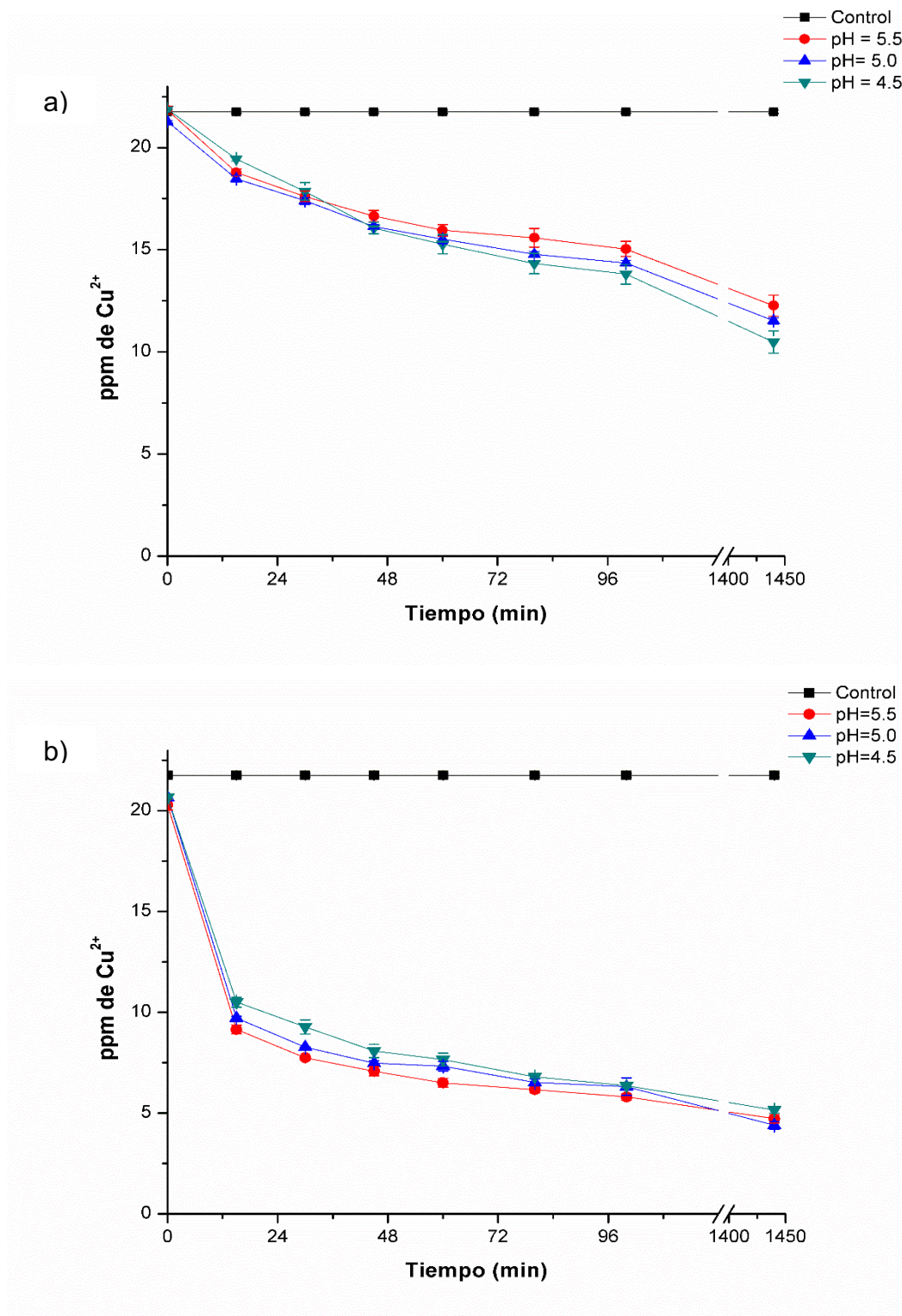


Figura 14 Biosorción de Cu^{2+} a 35°C , a diferentes valores de pH: a) composito de QMPM-B-A húmedo; b) composito de QMPM-B-A liofilizado.

Tabla 6. Remoción de cobre empleando perlas de los compositos QMPM-Biomasa-Alginato, húmedas y liofilizadas, a diferentes valores de pH, a 35°C.

	Tratamiento		Concentración residual (Cu ²⁺)	Remoción de cobre
	(°C)	(pH)	(ppm)	(%)
Control	35	5.5	21.765 ± 0.079 ^a	-
Composito húmedo	35	5.5	12.26 ± 0.51 ^b	43.36
		5.0	11.52 ± 0.15 ^{bc}	47.04
		4.5	10.48 ± 0.54 ^c	51.84
Composito liofilizado	35	5.5	4.72 ± 0.20 ^{de}	78.29
		5.0	4.39 ± 0.19 ^e	79.80
		4.5	5.15 ± 0.15 ^d	76.29

Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Contrario a lo que se esperaba, al aumentar la superficie del área, el pequeño tamaño de las partículas (18-244 nm) ocasionó una reducción en la capacidad de adsorción. Al combinar las partículas de quitosano con el alginato se incrementó la remoción de cobre a 12.63 mg/g de partículas.

Sánchez-Duarte et al. (2017) utilizaron perlas de quitosano puro (q-puro) y entrecruzado con TPP (q-TPP) o con glutaraldehído (q-Glu) para remover Cu²⁺ a partir de una concentración inicial de 416 ppm, encontrando que 1 g de perlas puede remover 15.9, 12.8 y 7.8% del metal, respectivamente. Tal como se esperaba, al incrementar la cantidad de perlas se logró una mayor remoción de Cu²⁺ (hasta

99.3% de Cu^{2+} en 4 h empleando 4.5 g de perlas de q-puro). Con base en lo anterior, los resultados obtenidos al evaluar la capacidad de biosorción del composito húmedo de quitosano-biomasa-alginato indican que el material obtenido (tamaño y cantidad de las perlas) tiene un elevado potencial para la remoción de Cu^{2+} .

7.8.2 Perlas liofilizadas

Al realizar las cinéticas de remoción del metal utilizando las perlas liofilizadas, se encontró que la concentración de cobre disminuyó ($P > 0.05$) en los medios con los tres valores de pH evaluados (Figura 14b), cuantificando valores de 4.7 ± 0.20 , 4.4 ± 0.19 y 5.2 ± 0.15 ppm de Cu^{2+} a pH de 4.5, 5.0 y 5.5, respectivamente. Estos valores corresponden a una eficiencia de remoción de 78.2, 79.8 y 76.2%, respectivamente (Tabla 6). La cantidad promedio de metal removido utilizando las perlas liofilizadas fue de 17.11 mg de Cu^{2+} /g de composito. Al comparar este resultado con respecto al valor observado al emplear las perlas húmedas, es posible deducir que las perlas liofilizadas tienen un mejor desempeño y una mayor eficiencia para llevar a cabo el proceso de biosorción, lo que se puede atribuir a que no existe interferencia relacionada con las moléculas de agua, ya que estas no se encuentran presentes en los poros del material.

Adicionalmente, en este trabajo se evaluó la capacidad de adsorción de cobre utilizando perlas de quitosano puro, las cuales fueron capaces de reducir la concentración inicial de cobre (21.67 ± 0.07 ppm) a un valor de 1.58 ± 0.94 ppm, que representa un 92.7% de remoción. Con respecto a la cantidad removida del metal, la menor efectividad de las perlas del composito de QMPM-Biomasa-Alginato para remover Cu^{2+} se puede atribuir al entrecruzamiento de los componentes del material con el TPP; esto pudo ocasionar que algunos sitios que podrían usarse para la biosorción se hayan perdido durante el proceso de entrecruzamiento. Sin embargo, debido a la baja resistencia del quitosano puro después de la liofilización, este material no es adecuado para el proceso de biosorción debido a que se puede romper fácilmente, pierde la forma y genera la formación de partículas con diferentes tamaños que sólo pueden ser removidas por medio de filtración o

centrifugación. En el caso de las perlas entrecruzadas de quitosano-biomasa-alginato, estas se pueden remover fácilmente por decantación y son resistentes a la manipulación. Adicionalmente, se ha reportado que las perlas de quitosano puro tienen la tendencia de protonarse los grupos amino presentes en medios con pH ácido, lo que ocasiona una disolución parcial o total de las perlas en soluciones ácidas (Sánchez-Duarte et al. 2017). Las perlas entrecruzadas de quitosano-biomasa-alginato sintetizadas en este estudio resultaron ser resistentes a las condiciones ácidas.

Con respecto al efecto del pH, se encontró que el pH de 5.0 fue el mejor para llevar a cabo la remoción de cobre. Estos resultados son similares a los de Giraldo et al. (2017), quienes reportaron que la capacidad de remoción de las perlas de quitosano-TPP se redujo a pH ácido; esto se atribuyó a la protonación de los grupos amino, causando repulsión electrostática entre los protones y los cationes en los sitios de adsorción en la matriz del material. La biosorción de los metales depende en gran medida de las condiciones de pH. Los cationes y protones compiten por los sitios de adsorción, lo que significa que la biosorción de metales como Cu, Cd, Ni, Co y Zn se reduce a bajos valores de pH (por debajo de 3) (Deng et al. 2012).

El rango de pH entre 4.5-5.5 utilizado para evaluar la capacidad de biosorción de cobre de las perlas de QMPM-Biomasa-Alginato fue el mismo al utilizado en el proceso de biosorción empleando la biomasa de *Aspergillus australensis*. No obstante, a estas condiciones de pH, la biomasa del hongo presentó un mejor desempeño para la remoción de cobre.

Por otra parte, a pH más elevados (> 5.8-6) el Cu^{2+} tiende a precipitar en forma de hidróxidos $\text{Cu}(\text{OH})_2$, por lo que no es recomendable llevar a cabo procesos de biosorción en condiciones alcalinas.

7.8.3 Efecto de la concentración de cobre

Para determinar el efecto de la concentración del cobre durante los procesos de biosorción, se evaluaron diferentes concentraciones de cobre (50, 100 y 200 ppm). Estas cinéticas se llevaron a cabo empleando las perlas liofilizadas debido a que las

cinéticas de biosorción llevadas a cabo a una concentración de 20 ppm de Cu^{2+} revelaron que estas fueron más eficientes en comparación con las perlas húmedas. Al analizar los resultados se observó que en el tratamiento con 50 ppm de Cu^{2+} , la concentración inicial de metal se redujo a un valor de 25.6 ± 0.40 ppm of Cu^{2+} después de añadir las perlas, obteniendo una remoción de 52% (Figura 15a). Por su parte, en los medios con concentración inicial de 100 y 200 ppm de Cu^{2+} , la cantidad del metal se redujo a 66.39 ± 0.87 y 151 ± 0.74 ppm (Figura 15b), respectivamente, lo que representa una eficiencia de remoción del 39.3% y 23.2%, respectivamente (Tabla 6).

Los datos experimentales obtenidos en esta cinética fueron ajustados al modelo de Langmuir (Figura 16, Tabla 7), encontrando que la cantidad de cobre adsorbido por las perlas fue mayor conforme se aumentó la concentración de cobre. Sin embargo, es importante resaltar que la eficiencia de remoción (%) disminuyó durante el proceso de biosorción, lo cual puede deberse al incremento de la concentración de Cu^{2+} . Aún así, fue posible observar una mayor adsorción del metal en cada una de las concentraciones evaluadas.

El valor estimado de q_{max} fue de 26.56 mg Cu^{2+} /g de perlas y el valor de la constante de Langmuir (b) fue de 0.385, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.927. Estos parámetros indican que los datos experimentales se ajustan al modelo de Langmuir, el cual se considera adecuado para describir el proceso de adsorción realizado en este estudio.

Los resultados obtenidos indican que el equilibrio de la biosorción ocurre dentro de los primeros 100 min después de que las perlas entran en contacto con el medio líquido (agua sintética). Estos resultados son similares a los reportados por Panuccio et al. (2008) y Ngah et al (2010), en donde se alcanzó el equilibrio alrededor de los 100 min.

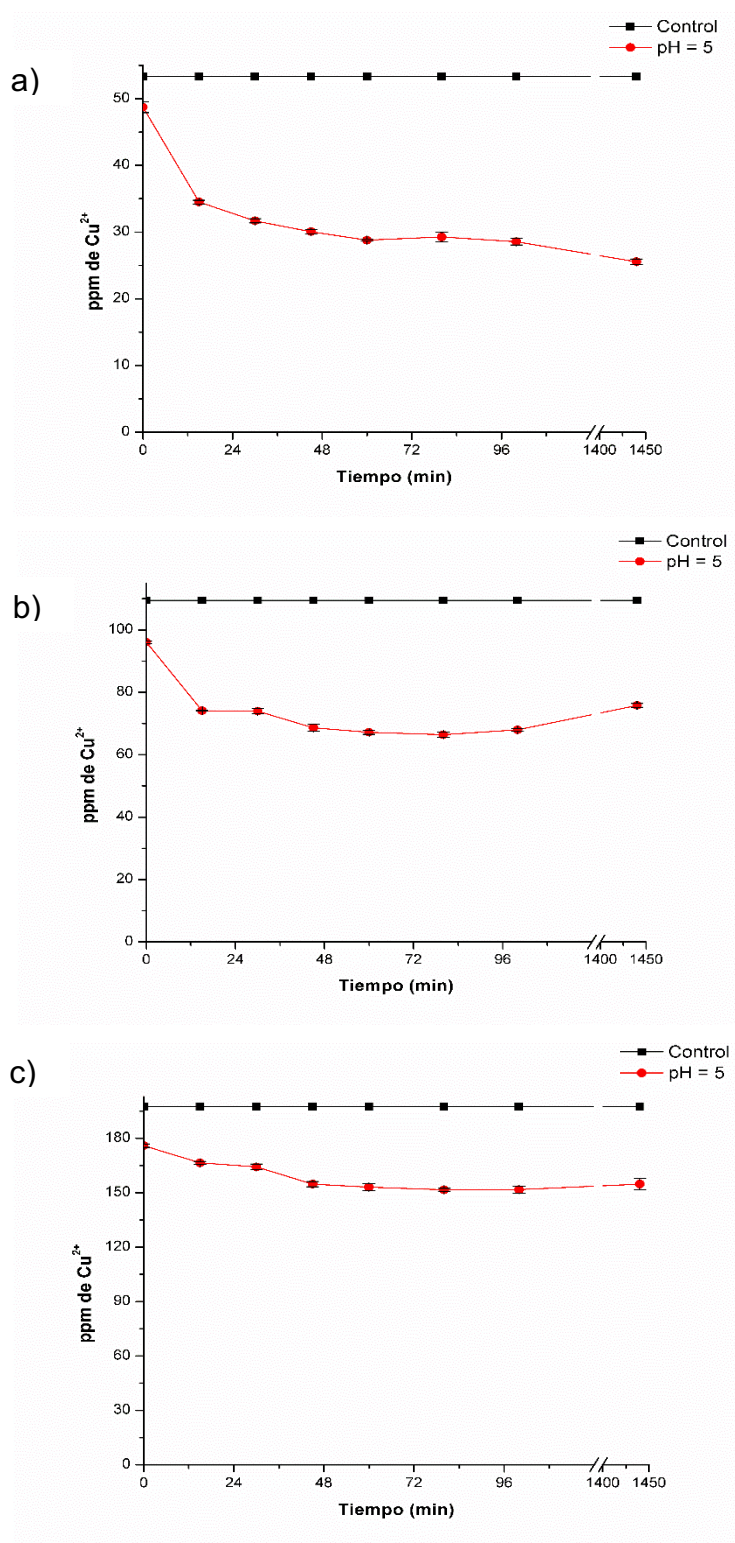


Figura 15. Cinéticas de biosorción de cobre utilizando perlas liofilizadas del compuesto de QMPM-Biomasa de *Aspergillus australiensis*-Alginato, a pH de 5.0, 35°C: a) 50 ppm, b) 100 ppm y c) 200 ppm de Cu^{2+} .

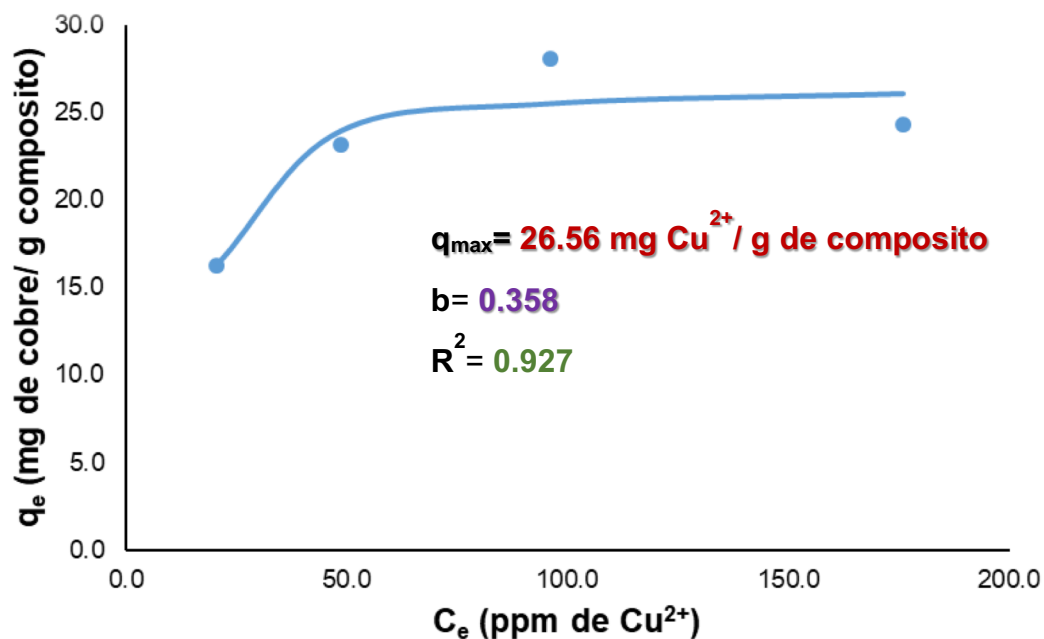


Figura 16. Isotherma de adsorción de Cu^{2+} utilizando perlas de QMPM-Biomasa de *Aspergillus australiensis*-Alginato, empleando el modelo de Langmuir.

Tabla 7. Adsorción de Cu^{2+} utilizando perlas de compositos entrecruzados elaborados a base de QMPM-biomasa-alginato.

Conc. Inicial (Co)	Conc. Equilibrio (Ec)	Eficiencia de remoción (%)	q (mg of Cu^{2+} /g of perlas)
20.7 ± 0.08	4.39 ± 0.19	79.80 ± 0.87	16.2
48.7 ± 0.82	25.6 ± 0.40	52.07 ± 0.76	23.9
96.1 ± 0.46	66.39 ± 0.87	39.34 ± 0.80	25.5
176.0 ± 0.91	151.61 ± 0.74	23.22 ± 0.37	26.1

Los valores representan el promedio $\pm$ error estándar.

En el presente estudio, las perlas del composito alcanzaron una capacidad máxima de adsorción de 26.1 mg of Cu^{2+} /g de perlas. Este valor coincide con el reportado por Ngha et al. [4], quienes empleando perlas de quitosano-TPP lograron remover 26.06 mg of Cu^{2+} /g del metal. De igual manera, Tsai et al (2016) elaboraron perlas de quitosano- montmorillonita para remover cobre y alcanzaron una maxima adsorción de 13.04 mg of Cu^{2+} /g de perlas. Al utilizar diversos materiales adsorbentes, Mokhter et al. (2018) lograron remover 68 mg.g-1 de Cu^{2+} utilizando silica modificada-quitosano. Shim et al. (2001) y Monser y Adhoum (2002) reportaron que el uso de carbon activado permite remover de 9-38 mg/g de cobre, mientras que Babel et al. (2003) lograron remover de 1-25 mg/g de Cu^{2+} utilizando un adsorbente a base de arcilla.

Al comparar los valores removidos de cobre en este estudio con los reportados en la literatura, es posible deducir que las perlas entrecruzadas de quitosano-biomasa de *Aspergillus australensis*-alginato poseen una buena capacidad de adsorción de metales como el cobre, constituyendo un material biosorbente de bajo costo para emplearse en procesos de biosorción.

ETAPA III

7.9 Análisis de toxicidad

7.9.1 Toxicidad aguda con *Artemia salina*

Tras la exposición de los nauplios de *A. salina* a los diferentes materiales, se observó que las perlas de QMPM puro, las perlas de alginato puro y la biomasa muerta del hongo no presentaron efectos tóxicos, encontrando valores de supervivencia de 90, 96 y 100%, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los del control, en donde se encontró una supervivencia de los nauplios del 100% (Figura 17).

En contraste, al evaluar la toxicidad aguda de las perlas entrecruzadas de QMPM-Biomasa-Alginato en proporciones de 1.0, 0.75, 0.5 y 0.25 g, se observó un menor ($P \leq 0.05$) porcentaje de supervivencia, con valores de 58, 56, 44 y 10%, respectivamente. Esto se puede atribuir a la presencia del ácido acético el cual es necesario para la preparación del gel de quitosano, el ácido acético presente en el gel de quitosano disminuye el pH de la solución a valores de 4.5-5.5 y se mantiene ese pH aun después de la combinación del quitosano con biomasa, alginato y TPP, lo cual puede explicar la baja supervivencia del crustáceo. En el caso de las perlas de quitosano puras dado que son precipitadas en una solución de NaOH el pH de las perlas queda en la alcalinidad lo que favorece la supervivencia de las artemias. En base a la bibliografía consultada la *A. salina* puede sobrevivir en un rango de pH de 7.0 -8.5 (Lavitzar et al. 2018; FAO, 2018).

En este estudio se encontró que los nauplios expuestos a las perlas liofilizadas del composito no lograron sobrevivir, lo cual se puede atribuir a la flotabilidad del material, ya que este permaneció en la superficie del agua, con la consecuente reducción de la cantidad de oxígeno necesario para que los nauplios pudieran sobrevivir (FAO, 2018).

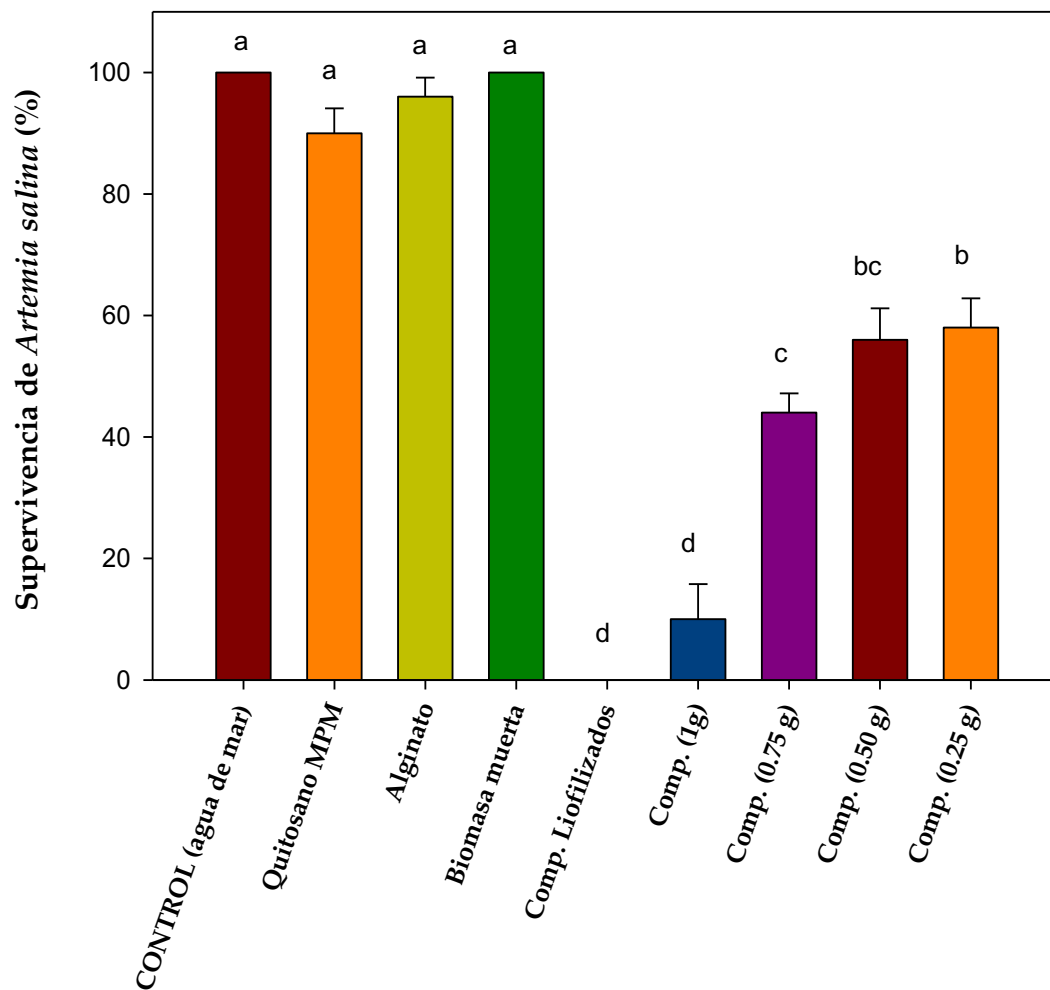


Figura 17. Efecto de los compositos en los nauplios de *Artemia salina*.

Con respecto a la biomasa microbiana, esta contiene varios componentes químicos tales como proteínas, carbohidratos, lípidos, entre otros, que pueden ser empleados como una fuente de alimentación. Esto puede explicar la supervivencia del 100% de los nauplios. Toi et al. (2013) reportaron el uso de biomasa bacteriana como un nutriente para *A. salina* cuando los nauplios se encuentran en condiciones limitantes de algas en el medio de crecimiento.

A. salina se alimenta mediante filtración no-selectiva, pudiendo consumir microalgas, bacterias, protozoos y partículas de detritus. Fernández (2001) reportó que el tamaño de las partículas de alimento para artemias puede tener un rango entre 6.8 y 27.5 μm , sin embargo, los organismos adultos son capaces de ingerir partículas con tamaño de hasta 50 μm . La biomasa empleada en este estudio se pulverizó hasta tener las características de un polvo fino, a fin de lograr una incorporación homogénea al momento de adicionarse al gel de polimerización durante la preparación de la mezcla para la obtención de las perlas entrecruzadas.

7.9.2 Fitotoxicidad aguda en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Al evaluar el efecto fitotóxico de los materiales se encontró que las semillas de lechuga desarrolladas sobre las perlas de QMPM puro, las perlas de alginato y las perlas del composito liofilizado, mostraron una disminución ($P \leq 0.05$) en el índice de germinación, el cual fue de 68, 61 y 48%, respectivamente, comparado con el control (87% de germinación) (Figura 18a). Para las perlas de quitosano puro, la toxicidad se puede atribuir al pH de las perlas, el cual fue de 12. Aunque este material fue lavado con abundante agua, se mantuvo la alcalinidad de las perlas tras ser precipitadas en la solución de NaOH.

Las semillas de lechuga requieren un pH entre 6.5 y 7.0 para desarrollarse adecuadamente (Foteinis y Chatzisyman, 2016). En este contexto, la elevada alcalinidad de las perlas de quitosano puro puede dar lugar a una baja absorción de los nutrientes necesarios para que ocurra la germinación y el crecimiento de las semillas (Shi et al. 2005). Esto puede explicar el por qué se afectó el crecimiento de las raíces de las plántulas desarrolladas sobre las perlas de QMPM puro, encontrando raíces con longitud promedio de 0.14 ± 0.03 cm en comparación con las raíces de las plántulas desarrolladas en el control (0.48 ± 0.24 cm). Por su parte, cuando las semillas se desarrollaron sobre las perlas de alginato también se observó una disminución en el índice de germinación comparado con el control, encontrando raíces con longitud promedio de 0.45 ± 0.06 cm, similar al control.

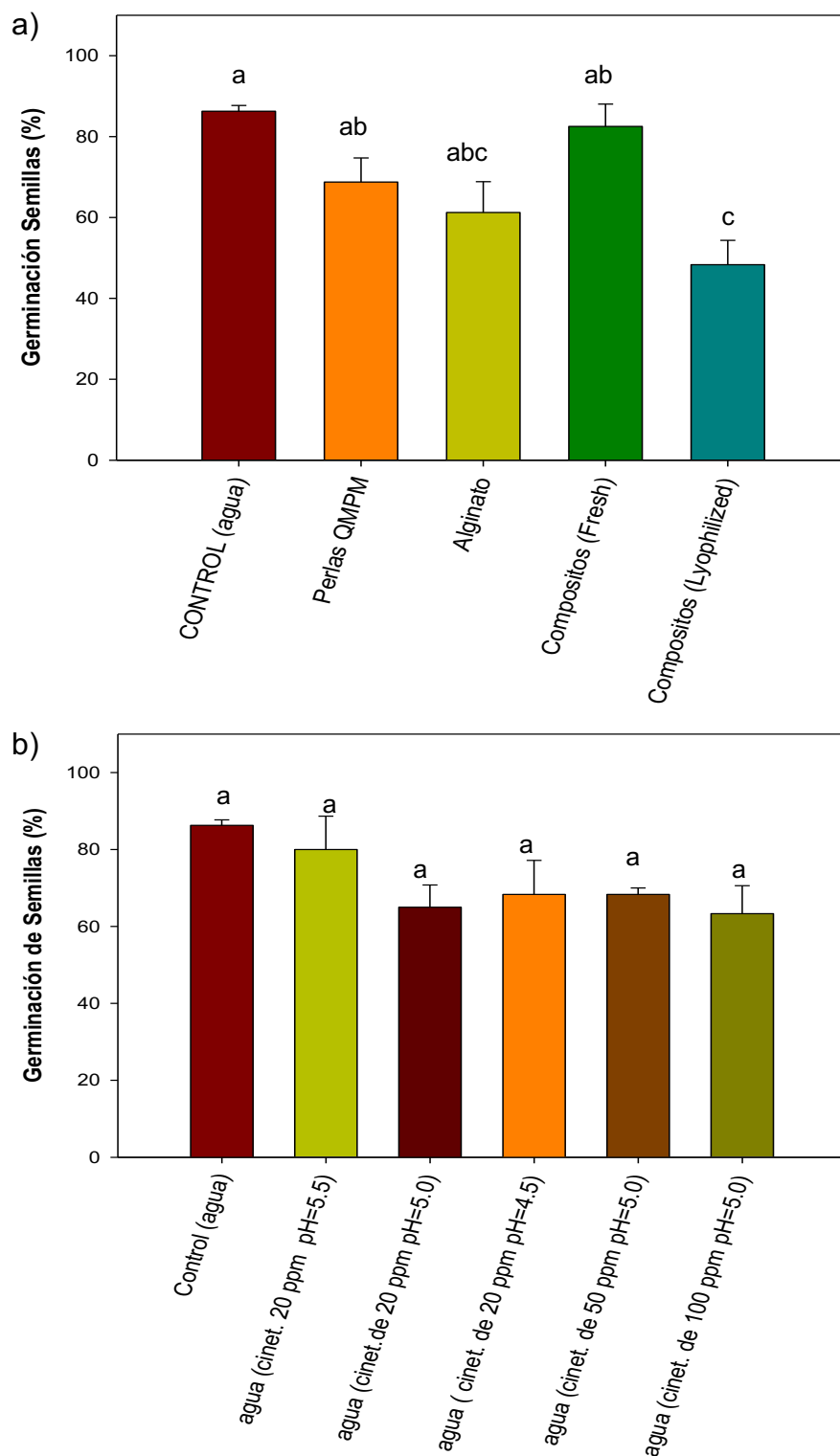


Figura 18. Evaluación de la fitotoxicidad de los compositos (a) y agua residual después del proceso de biosorción de Cu^{2+} (b) en la germinación de las semillas de *Lactuca sativa*.

Los bajos valores de germinación encontrados en las semillas expuestas a las perlas de alginato se puede deber a variaciones en la manipulación y la calidad del material biológico empleado para la síntesis del material (Draget et al. 1989) y no a un efecto tóxico del alginato. Lo anterior debido a que este material es considerado no tóxico y es ampliamente utilizado como soporte en diferentes procesos de inmovilización para el cultivo de tejidos de vegetales. Además, se considera que en este soporte, el desarrollo de dichos tejidos es un proceso lento (Smidsrod et al. 1990, Dreget et al. 1989).

Los resultados encontrados al evaluar la fitotoxicidad de las perlas del composito liofilizado se puede atribuir a la competencia por el agua, dado que el material liofilizado estaba completamente seco. Adicionalmente, tal como se observó en los ensayos con *Artemia salina*, la fitotoxicidad se puede asociar a afectaciones en el proceso de respiración debido a las perlas liofilizadas, reduciendo por lo tanto la germinación de las semillas y el crecimiento de la raíz. La elongación de la raíz fue menor ($P \leq 0.05$) en las plántulas que crecieron sobre las perlas del composito con respecto al control, con valores de elongación de 0.10 ± 0.05 y 0.48 ± 0.24 cm, respectivamente, que se puede atribuir a la falta de agua.

Al exponer las semillas de lechuga a las perlas del composito entrecruzado elaborado con QMPM-Biomasa-Alginato, el índice de germinación fue de 82.5% el cual fue similar al control. Esto se puede atribuir a la presencia de biomasa de *Aspergillus australensis* en la matriz del material, la cual posee diferentes componentes, entre ellos una gran cantidad de proteínas las cuales están presentes en la pared celular, que pueden llegar a aportar nutrientes adicionales para que se lleve a cabo una adecuada germinación. Con respecto a la elongación de la raíz de las plántulas desarrolladas, esta fue menor ($P \leq 0.05$) comparada con el control, con valores de 0.17 ± 0.05 y 0.48 ± 0.24 cm, respectivamente, que se puede atribuir al pH de las perlas (pH 4.5). Un medio con bajo pH (< 5) afecta la germinación de las semillas de lechuga, resultando en una disminución en la elongación de la raíz, e incluso en la inhibición completa del desarrollo a $\text{pH} \leq 3.5$ (Inoue et al. 2000).

No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) al analizar el efecto fitotóxico de las aguas residuales obtenidas después de llevar a cabo las cinéticas de biosorción

empleando los materiales sintetizados, lo cual indica que todas las aguas tratadas son dañinas para irrigar las semillas de lechuga debido a que afecta la germinación de las mismas (Figura 18b). No se encontró un efecto importante en la elongación de las raíces, observando valores de elongación desde 0.25 ± 0.08 a 0.7 ± 0.2 cm, a excepción del agua residual obtenida de la cinética realizada con una concentración inicial de 100 ppm de Cu^{2+} , en donde se encontraron raíces con menor elongación. Esto se puede atribuir a la elevada concentración de cobre a la cual fueron expuestas las plántulas, siendo inefectivo el atrapamiento del metal por parte de los materiales empleados. El cobre puede afectar procesos fisiológicos importantes y la biosorción de nutrientes cuando se encuentra en exceso, por ejemplo, a concentraciones de 20-30 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (Alaoui-Sosse et al. 2004).

7.9.3 Fitotoxicidad aguda en semillas de chile (*Capsicum annuum*)

En la figura 19a se muestran los resultados obtenidos para los ensayos de fitotoxicidad en semillas de chile. La exposición de las semillas de chile a las perlas de alginato puro no inhibió la germinación de las semillas con respecto al control; sin embargo, la exposición a las perlas de QMPM puro ocasionó un efecto adverso al disminuir la germinación, que se puede atribuir al pH alcalino de este material (Shi et al. 2005). De igual forma se afectó la elongación de la raíz con respecto al control, las cuales presentaron longitud promedio de 0.10 ± 0 y 2.06 ± 0.4 cm, respectivamente. Las perlas del compuesto entrecruzado (húmedas) también afectaron la germinación de las semillas y la elongación de la raíz comparado con el control, encontrando 53% de semillas germinadas y raíces con longitud promedio de 0.43 ± 0.03 cm. La longitud promedio de las raíces desarrolladas en el tratamiento control fue de 2.06 ± 0.4 cm. La disminución en la elongación de la raíz se puede atribuir al bajo pH, lo cual se relaciona con una afectación en la absorción de nutrientes.

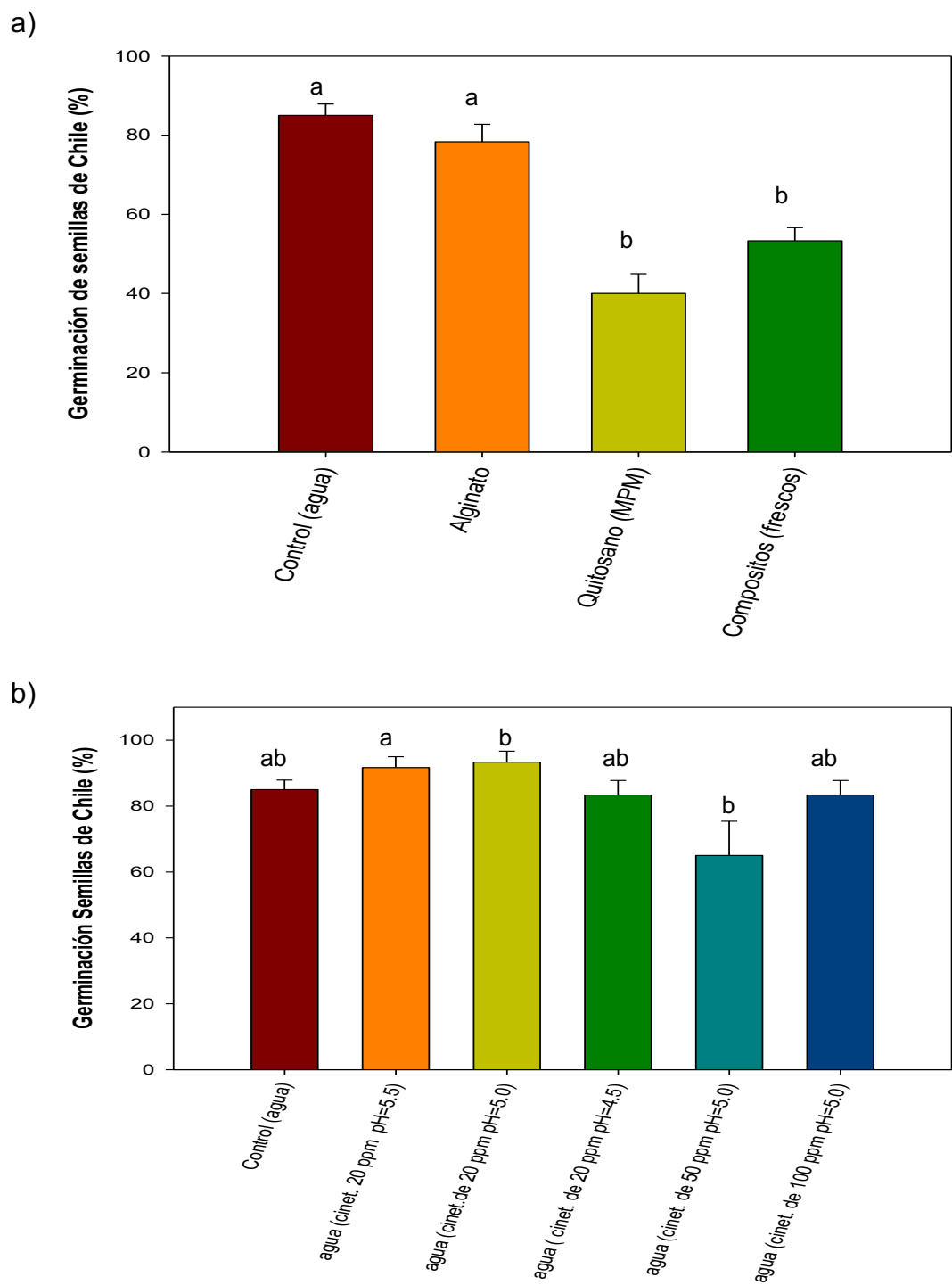


Figura 19. Evaluación de la fitotoxicidad de los compositos (a) y agua residual después del proceso de biosorción de Cu^{2+} (b) en la germinación de las semillas *Capsicum annuum*.

La germinación de las semillas de chile normalmente ocurre a valores de pH entre 6.8-7.5 (Romic et al. 2003), lo cual puede explicar la baja germinación observada en este estudio. En el caso de las perlas del compuesto entrecruzado, la presencia de la biomasa del hongo no afectó la germinación de la semillas con respecto a los demás tratamientos, a diferencia del ensayo con las semillas de lechuga. Esto se puede atribuir a la sensibilidad de las semillas de chile al pH, así como al pretratamiento al que son sometidas para su comercialización. Sin embargo, la elongación de la raíz (0.43 ± 0.03 cm) se vio afectada en menor proporción con respecto a las raíces de las plántulas desarrolladas sobre las perlas de QMPM puro (Figura 19a).

Al analizar los resultados de la germinación de las semillas de chile irrigadas con las aguas residuales obtenidas después del proceso de biosorción empleando los materiales sintetizados, no se encontraron efectos negativos ($P > 0.05$) en la germinación de las semillas entre los diferentes tratamientos incluyendo el control, logrando obtener en general un índice de germinación entre 83 y 90% (Figura 19b). Por el contrario, se encontró una reducción ($P \leq 0.05$) en la elongación promedio de la raíz de las plántulas irrigadas con las aguas residuales de los tratamientos con concentración inicial de 50 y 100 ppm de Cu^{2+} , observando raíces con una elongación promedio de 0.36 ± 0.02 a 0.39 ± 0.09 cm, respectivamente, comparado con el control (2.06 ± 0.4 cm). Esto se puede atribuir a la presencia de cobre (Yruea, 2005).

En este estudio, la concentración de cobre se redujo a un mínimo de 4.72 ± 0.2 - 4.39 ± 0.19 ppm de Cu^{2+} . Como se describió anteriormente, la concentración residual no se encuentra por debajo de los niveles tóxicos para tener una adecuada germinación y crecimiento de las semillas de lechuga y chile. Sin embargo, es posible lograr una mayor reducción de la concentración de cobre al implementar cinéticas de 2 vías; por lo tanto, es recomendable llevar a cabo más estudios que permitan optimizar el proceso de biosorción presentado en este estudio.

7. Conclusiones

El hongo filamentoso Aspergillus australensis aislado en este estudio e identificado, mostró una elevada tolerancia a la presencia de cobre (hasta 2000 ppm de CuSO_4), la cual aumentó a pH más bajo y temperatura elevada (pH 4.5 y 40°C). La biomasa viva presentó un proceso de biosorción activo, que favoreció una mayor remoción de cobre en comparación con el proceso de biosorción empleando biomasa muerta.

Las perlas liofilizadas del compuesto de quitosano-biomasa-alginato mostraron una mayor eficiencia para remover cobre en comparación con las perlas húmedas, logrando establecer que las mejores condiciones para el proceso de biosorción son a un pH = 5.0, a 35°C. Utilizando el modelo de Langmuir, se logró establecer la máxima capacidad de adsorción, la cual fue de 26.56 mg Cu^{2+} / g de perlas del compuesto.

Se logró conocer la toxicidad aguda y la fitotoxicidad de los compuestos entrecruzados de quitosano-biomasa fúngica-alginato, la cual se puede atribuir al bajo pH del material. Asimismo, se logró determinar el riesgo toxicológico asociado a la irrigación de semillas y plántulas con el agua residual obtenida después de la remoción de cobre empleando los materiales sintetizados, la cual resultó ser potencialmente dañina para la germinación de semillas de lechuga y chile. Sin embargo, la toxicidad puede estar relacionada con la alta concentración de cobre utilizada en los bioensayos, y no con el material.

Se logró desarrollar un sistema biotecnológico basado en compuestos entrecruzados de quitosano-biomasa de *Aspergillus australiensis*-alginato, eficaz para remover Cu^{2+} en aguas contaminadas.

9. Recomendaciones

- Evaluar la biosorción de los compositos entrecruzados de quitosano-alginato-biomasa fúngica en columnas y biorreactores.
- Evaluar la biosorción de los compositos entrecruzados de quitosano-alginato-biomasa fúngica utilizando otros metales.
- Evaluar la interacción de los compositos entrecruzados de quitosano-alginato-biomasa fúngica con las aguas reales provenientes del río San Pedro, Sonora.

10. Referencias bibliográficas

1. Adina C, Florinela F, Abdelmoumen T, Carmen S. Application of FTIR Spectroscopy For A Rapid Determination Of Some Hydrolytic Enzymes Activity On Sea Buckthorn Substrate. vol. 15. 2010.
2. Ahalya, N., Ramachandra, T. V., & Kanamadi, R. D. (2003). Biosorption of heavy metals. Res. J. Chem. Environ, 7(4), 71-79
3. Ahluwalia, S. y Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. Bioresour. Technol. 98, 2243–2257.
4. 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 journal of experimental biology, 44(1), 73.
5. Akar T, Tunali S, Kiran I. *Botrytis cinerea* as a new fungal biosorbent for removal of Pb (II) from aqueous solutions. Biochem Eng J 2005; 25:227–35.
6. Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D., & Badot, P. M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. Plant Science, 166(5), 1213-1218.
7. Arias HM (2000) International groundwaters. The upper San Pedro River basin case. Nat Resour J 40:199–221
8. Babel, S., & Kurniawan, T. A. (2003). Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. Journal of hazardous materials, 97(1-3), 219-243.
9. Barrena R, Casals E, Colón J, Font X, Sánchez A, Puentes V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. Chemosphere 2009; 75:850–7.
10. Bayramoğlu G, Bektaş S, Arica MY. Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. J Hazard Mater 2003; 101:285–300.
11. Bencina M, Bagar T, Lah L, Krasevec N. A comparative genomic analysis of calcium and proton signaling/homeostasis in *Aspergillus* species. Fungal Genet Biol 2009;46 Suppl 1: S93–104.
12. Cendejas CR, Vázquez M, García CJA (1998) Geología y yacimientos minerales de la Carta Cananea, Estado de Sonora, Clave H12–5, Escala 1:250,000 (Geology and ore deposits from the Cananea Chart, Sonora State, number H12-5, scale 1:250,000) Compendios de Geología y Minería (Geology and Mining Compilations), Consejo de Recursos Minerales (Agency for Minerals Resources), México
13. Cervantes C, Gutierrez-Corona F. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiol Rev 1994; 14:121–37.
14. Chia-Chay T, Redzwan G, Hong-Hooi L, Soon-Kong Y, Surif S, Abdul-Talib S. Copper (II) biosorption characteristic of *Pleurotus spent* mushroom compost. 2010 Int. Conf. Sci. Soc. Res. (CSSR 2010), IEEE; 2010, p. 6–10.
15. Conagua. (2008). Estadísticas del agua en el estado de Sonora. En línea: www.ceasonora.gob.mx. 08/02/2015

16. Dai, Y. N., Li, P., Zhang, J. P., Wang, A. Q., & Wei, Q. (2008). A novel pH sensitive N-succinyl chitosan/alginate hydrogel bead for nifedipine delivery. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 29(3), 173-184.
17. Dameron CT, Harrison MD. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:1091S-1097S.
18. Deng, X., & Wang, P. (2012). Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. *Bioresource technology*, 121, 342-347.
19. Dinelli E, Lucchini F, Fabbri M, Cortecchi G (2001) Metal distribution and environmental problems related to sulfide oxidation in the Libiola copper mine area (Liguria Apennines, Italy). *J Geochem Explor* 74:141–152
20. Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., Shukla, R., Sing, B., Ra, J. Sharma, P., Lade, H. y Paul, D. (2015). Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*. 7. 2189-2212
21. Draget, K. I., Østgaard, K., & Smidsrød, O. (1989). Alginate-based solid media for plant tissue culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 31(1), 79-83.
22. Esser K. *The mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Springer; 2004.
23. FAO. Manual Para el Cultivo y uso de *Artemia* en Acuicultura. Disponible en línea. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB474S/AB474S00.htm#TOC> (En línea: Diciembre 9, 2018).
24. Fernández RR, Fernández LS, Arlegui JE (1986) Abandono de Minas: Impacto Hidrológico (Hydrologic impact of abandoned mines). IGME, Madrid
25. Fernández, R. G. (2001). *Artemia* bioencapsulation I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *Journal of Crustacean Biology*, 21(2), 435-442.
26. Foteinis, S., & Chatzisymeon, E. (2016). Life cycle assessment of organic versus conventional agriculture. A case study of lettuce cultivation in Greece. *Journal of cleaner production*, 112, 2462-2471.
27. Gadd GM. Interactions of fungi with toxic metals, *Transley review*. *New Phytol* 1993;124:25–60. Gadd, G. M. (2010). "Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation," *Microbiology*, vol. 156, pp. 609-643.
28. Gaur, N. Flora, G. Yadav, M. y Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation based abolition of heavy metals. *Environmental Sci: Processes & Impacts*. 16, p 180-193
29. Giraldo, J. D., Rivas, B. L., Elgueta, E., & Mancisidor, A. (2017). Metal ion sorption by chitosan–tripolyphosphate beads. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(46), 45511.
30. Gomes, P., Lennortsson, P., Person, N. y Taherzadeh, M. (2014). Heavy metal biosorption by *Rhizopus* sp. Biomass Immobilized on Textiles. *Water Air soil Pollution*. 225:1834
31. Gómez-Álvarez, Agustín; Villalba-Atondo, A.I.; y Romero-Acosta, A.A., 1997, Estudio de la contaminación por metales pesados en el agua superficial del río San Pedro, Sonora, México: Universidad de Sonora, Departamento de Geología, Boletín, v. 14, núm. 2, p. 1–16

32. Gourdon R, Bhende S, Rus E, Sofer SS. (1990). Comparison of cadmium biosorption by Gram-positive and Gram-negative bacteria from activated sludge. *Biotechnol Lett.* 12:839–42.
33. Goyal N, Jain SC, Banerjee UC. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Adv Environ Res* 2003;7:311–9.
34. Goycoolea, F. M., Lollo, G., Remunán-López, C., Quaglia, F., & Alonso, M. J. (2009). Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules*, 10(7), 1736-1743.
35. Guibal, E., Milot, C., & Tobin, J. M. (1998). Metal-anion sorption by chitosan beads: equilibrium and kinetic studies. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 37(4), 1454-1463.
36. Gupta R, Ahuja P, Khan S, Saxena RK, Mohapatra H. Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Curr Sci* 2000; 78:967–73.
37. Haney JA (2002) Groundwater modeling and biodiversity conservation on the Lower San Pedro River. *Southwest Hydrology* 1:8 Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1–14.
38. Harvey LJ, McArdle HJ. Biomarkers of copper status: a brief update. *Br J Nutr* 2008;99: S10–3.
39. Hemambika B, Johncy Rani M, Rajesh Kannan V. Biosorption of heavy metals by immobilized and dead fungal cells: A comparative assessment. *J Ecol Nat Environ* 2011; 3:168–75.
40. Hernández-Téllez CN, Rodríguez-Córdova FJ, Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Lizardi-Mendoza J, et al. Activity of chitosan-lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech* 2017; 7:279.
41. Ho YS, Huang CT, Huang HW. Equilibrium sorption isotherm for metal ions on tree fern. *Process Biochem* 2002; 37:1421–30. doi:10.1016/S0032-9592(02)00036-5.
42. Hogan, C. (2011). Heavy metal. <http://www.eoearth.org/view/article/153463/>. En línea: 03/20/2015
43. Holan ZR, Volesky B. Accumulation of cadmium, lead, and nickel by fungal and wood biosorbents. *Appl Biochem Biotechnol* 1995; 53:133–46.
44. Holleman, A. F. and E. Wiberg: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 868. (1985).
45. Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Camakaris, J., Harper, J.F., Cobbett, C.S. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 1327–1339.
46. Inoue, Y., Yamaoka, K., Kimura, K., Sawai, K., & Arai, T. (2000). Effects of low pH on the induction of root hair formation in young lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) seedlings. *Journal of Plant Research*, 113(1), 39-44.
47. Iram, S., Shabbir, R., Zafar, H., & Javaid, M. (2015). Biosorption and Bioaccumulation of Copper and Lead by Heavy Metal-Resistant Fungal Isolates. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 1-7.

48. Juwarker, A., Misra, R. y Sharma, J. (2014). Recent trends in bioremediation. *Geomicrobiology and Biogeochemistry Soil Biology*. Vol. 39, p 81-100
49. Kahraman S, Asma (Hamamci) D, Erdemoglu S, Yesilada O. Biosorption of Copper (II) by Live and Dried Biomass of the White Rot Fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Funalia troglia*. *Eng Life Sci* 2005;5:72–7.
50. Kaur, P. y Parihar, L. (2014). Bioremediation: Step towards Improving Human Welfare. *Annual Research & Review in Biology*. 4(20): 3150-3164
51. Koneman EW, Benencia F, KONEMAN EW, SCHRECKENBERGER PC, WINN WC. Diagnóstico Microbiológico : texto y atlas color. Médica Panamericana; 1999.
52. Kumar, R. y Agrawal, M. (2005). Biological effects of heavy metals: An overview. *Journal of Environmental Biology*. Pp 302-312
53. Lavtizar, V., Kimura, D., Asaoka, S., & Okamura, H. (2018). The influence of seawater properties on toxicity of copper pyriithione and its degradation product to brine shrimp *Artemia salina*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 132-138.
54. Lerch K. Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature* 1980; 284:368–70.
55. Lichawska, M. E., Bodek, K. H., Jezierska, J., & Kufelnicki, A. (2014). Coordinative interaction of microcrystalline chitosan with oxovanadium (IV) ions in aqueous solution. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 50.
56. Lodeiro P, Barriada JL, Herrero R, Sastre de Vicente ME. The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: Kinetic and equilibrium studies. *Environ Pollut* 2006; 142:264–73.
57. Loukidou, M. X., Matis, K. A., Zouboulis, A. I., & Liakopoulou-Kyriakidou, M. (2003). Removal of As (V) from wastewaters by chemically modified fungal biomass. *Water Research*, 37(18), 4544-4552.
58. Luckey TD, Venugopal B. Introduction to Heavy Metal Toxicity in Mammals. *Physiol. Chem. Basis Met. Toxic.*, Boston, MA: Springer US; 1977, p. 1–37.
59. Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:461–88.
60. Malkoc, E., & Nuhoglu, Y. (2005). Investigations of nickel (II) removal from aqueous solutions using tea factory waste. *Journal of hazardous materials*, 127(1-3), 120-128.
61. Marschner, H. (2011). Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic press.
62. Mokhter, M., Magnenet, C., Lakard, S., Euvrard, M., Aden, M., Clément, S. Lakard, B. (2018). Use of modified colloids and membranes to remove metal ions from contaminated solutions. *Colloids and Interfaces*, 2(2), 19.
63. Molina-Salinas G, Said-Fernández S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline* 2006; 3:633–8.
64. Monser, L., & Adhoum, N. (2002). Modified activated carbon for the removal of copper, zinc, chromium and cyanide from wastewater. *Separation and purification technology*, 26(2-3), 137-146.

65. Monterroso C, Macias F (1998) Drainage waters affected by pyrite oxidation in a coal mine in Galicia (NW Spain): composition and mineral stability. *Sci Total Environ* 216:121–132
66. Moreno-Vázquez, J.L., 1995, El agua en Sonora -escasa, mal utilizada y contaminada. In: Restrepo, I., ed., *Agua, salud y derechos humanos: México, D.F., Comisión Nacional de Derechos Humanos*, p. 221-257.
67. Navarro-Aviño, J. Aguilar, I. y López-Maya, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 16(2). Pp10-25
68. Ngah, W. W., & Fatinathan, S. (2010). Adsorption characterization of Pb (II) and Cu (II) ions onto chitosan-tripolyphosphate beads: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. *Journal of environmental management*, 91(4), 958-969.
69. Ngah, W. W., Endud, C. S., & Mayanar, R. (2002). Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. *Reactive and Functional Polymers*, 50(2), 181-190.
70. Ostle, A. G., & Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(1), 238-241.
71. Panuccio, M. R., Crea, F., Sorgonà, A., & Cacco, G. (2008). Adsorption of nutrients and cadmium by different minerals: experimental studies and modelling. *Journal of environmental management*, 88(4), 890-898.
72. Perego P, Howell SB. Molecular Mechanisms Controlling Sensitivity to Toxic Metal Ions in Yeast. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 147:312–8.
73. Price MS, Classen JJ, Payne GA. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. *Bioresour Technol* 2001; 77:41–9.
74. Raven JA, Evans MCW, Korb RE. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth Res* 1999; 60:111–49. doi:10.1023/A:1006282714942.
75. Romic, D., Romic, M., Borosic, J., & Poljak, M. (2003). Mulching decreases nitrate leaching in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivation. *Agricultural Water Management*, 60(2), 87-97.
76. Sánchez-Duarte, R. G., del Rosario Martínez-Macías, M., Correa-Murrieta, M. A., Saldívar-Cabral, J., Sánchez-Machado, D. I., & López-Cervantes, J. (2017). Síntesis de hidrogeles de quitosano a partir de cáscara de camarón para ensayos de adsorción de cobre. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 93-98.
77. Sarmiento, B., & das Neves, J. (Eds.). (2012). *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting and polymer therapeutics*. John Wiley & Sons.
78. Shi, D., & Sheng, Y. (2005). Effect of various salt–alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. *Environmental and experimental Botany*, 54(1), 8-21.
79. Shim, J. W., Park, S. J., & Ryu, S. K. (2001). Effect of modification with HNO₃ and NaOH on metal adsorption by pitch-based activated carbon fibers. *Carbon*, 39(11), 1635-1642.
80. Šillerová, H., Komárek, M., Liu, C., Poch, J., & Villaescusa, I. (2015). Biosorbent encapsulation in calcium alginate: Effects of process variables on

- Cr (VI) removal from solutions. International journal of biological macromolecules, 80, 260-270.
81. Sing C, Yu J. Copper adsorption and removal from water by living mycelium of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Water Res 1998; 32:2746–52.
 82. Skagen SK, Melcher CP, Howe WH, Knopf FL (1998) Comparative use of riparian corridors and oases by migrating birds in southwest Arizona. Conserv Biol 12:896–909.
 83. Smidsrød, O., & Skja, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in biotechnology, 8, 71-78.
 84. Stern BR. Essentiality and Toxicity in Copper Health Risk Assessment: Overview, Update and Regulatory Considerations. J Toxicol Environ Heal Part A 2010; 73:114–27.
 85. Stoica AI, Baiulescu GE, Abould-Enein HY (2000) Analytical studies on the pollution of Arges River. Toxicol Environ Chem 77:1
 86. Tobin JM, Cooper DG, Neufeld RJ. Uptake of Metal Ions by *Rhizopus arrhizus* Biomass. Appl Environ Microbiol 1984; 47:821–4.
 87. Toi, H. T., Boeckx, P., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Van Stappen, G. (2013). Bacteria contribute to *Artemia* nutrition in algae-limited conditions: A laboratory study. Aquaculture, 388, 1-7.
 88. Tsai, W. C., Ibarra-Buscano, S., Kan, C. C., Futralan, C. M., Dalida, M. L. P., & Wan, M. W. (2016). Removal of copper, nickel, lead, and zinc using chitosan-coated montmorillonite beads in single-and multi-metal system. Desalination and Water Treatment, 57(21), 9799-9812.
 89. US NRC (2000) Copper in drinking water. Washington, DC, National Research Council, National Academy Press.
 90. Vakili M, Rafatullah M, Hakimi Ibrahim M, Zuhairi Abdullah A, Salamatinia B, Gholami (Malaysia) Z. Iranica journal of energy and environment: (IJEE). vol. 7.IDOSI; 2010.
 91. Van Assche, F., & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant, Cell & Environment, 13(3), 195-206.
 92. Vaziri, A. S., Alemzadeh, I., Vossoughi, M., & Khorasani, A. C. (2018). Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. Carbohydrate polymers, 199, 266-275.
 93. Verma A, Shalu, Singh A, Bishnoi NR, Gupta A. Biosorption of Cu (II) using free and immobilized biomass of *Penicillium citrinum*. Ecol Eng 2013; 61: 486–90.
 94. Vieira RH, Volesky B. Biosorption: a solution to pollution? Int Microbiol 2000; 3: 17–24.
 95. Volesky B and Holan Z, "Biosorption of heavy metals," Biotechnol. Progr., vol. 11, pp. 235-250, 1995.
 96. Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. Biotechnology advances, 24(5), 427-451.
 97. Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnology advances, 27(2), 195-226.

98. Williams TM, Smith B (2000) Hydrochemical characterization of acute acid mine drainage at Iron Duke Mine Mazowe, Zimbabwe. *Environ Geol* 39:272–278
99. Yahaya, Y. A., Don, M. M., & Bhatia, S. (2009). Biosorption of copper (II) onto immobilized cells of *Pycnopus sanguineus* from aqueous solution: Equilibrium and kinetic studies. *Journal of Hazardous Materials*, 161(1), 189-195.
100. Yingh, C. P. (2007). "Biosorption of copper (II) and chromium (VI) onto activated sludge: isotherms and kinetic models," M.Sc. Thesis, University Sains Malaysia, Malaysia.
101. Yong, S. K., Shrivastava, M., Srivastava, P., Kunhikrishnan, A., & Bolan, N. (2015). Environmental applications of chitosan and its derivatives. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 233 (pp. 1-43). Springer, Cham.
102. Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145-156.
103. Yu, K., Ho, J., McCandlish, E., Buckley, B., Patel, R., Li, Z., & Shapley, N. C. (2013). Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 425, 31-41.
104. Zouboulis, A. I., Matis, K. A., & Hancock, I. C. (1997). Biosorption of metals from dilute aqueous solutions. *Separation and Purification Methods*, 26(2), 255-295.