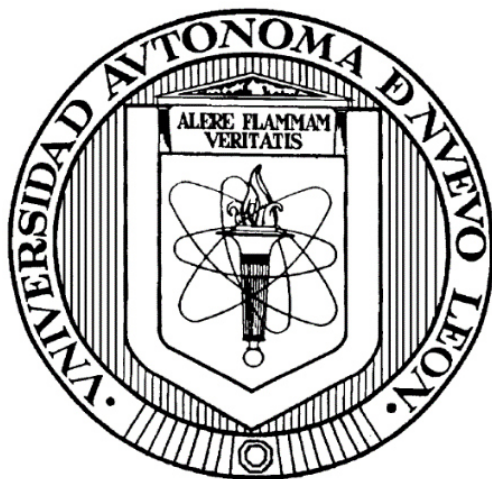


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**APLICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA REMOCIÓN
SIMULTÁNEA DE METALES Y COLORANTES**

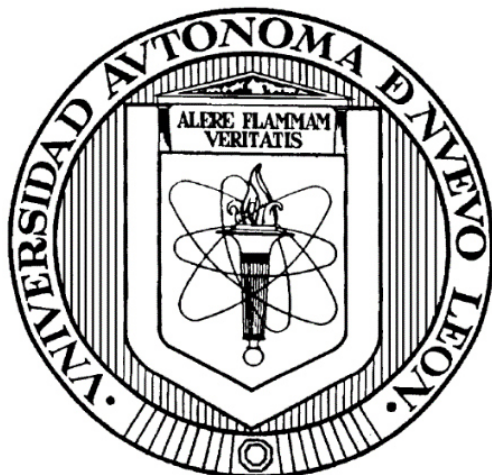
POR

LIC. JULIANA SETTIMI NORONHA RIBEIRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

SEPTIEMBRE, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**APLICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA REMOCIÓN
SIMULTÁNEA DE METALES Y COLORANTES**

POR

LIC. JULIANA SETTIMI NORONHA RIBEIRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARIA TERESA GARZA GONZÁLEZ**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2018

**APLICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA REMOCIÓN
SIMULTÁNEA DE METALES Y COLORANTES**

Aprobación de la tesis

**Dra. María Teresa Garza González
Presidenta**

Secretario

Vocal

**Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado**

**APLICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS
PARA LA REMOCIÓN SIMULTÁNEA
DE METALES Y COLORANTES**

Revisión de la Tesis:

Dra. María Teresa Garza González
ASESORA DE TESIS

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
COMITÉ TUTORIAL

Comité: Dr. José Rubén Morones Ramírez
COMITÉ TUTORIAL

Comité: Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
COMITÉ TUTORIAL

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A la Facultad de Ciencias Químicas.

A CONACYT.

A mi asesora, Dra. María Teresa Garza González, por la asesoría impecable.

A mi familia, mi base.

A Keri Arzaluz, por la inspiración y apoyo.

A mis amigos Anna, Maryangel, Patricia y Ulises, por ser mi familia en México al largo de los dos años de maestría.

A María de los Ángeles García Hernández e Ismael Bernal, por haberme conducido en mis primeros días en el laboratorio y por haber sanados tantas dudas que tuve.

A la Maestra Adriana Liñan, Gloria y Elias, por siempre apoyarme con los análisis necesarios.

A Dios, que me ayuda a nunca desistir, por más difícil que sea el reto.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Contextualización	1
1.2	Modelado empírico e isotermas.....	8
1.3	Antecedentes.....	10
1.4	Análisis crítico de la literatura	13
1.5	Hipótesis.....	14
CAPÍTULO 2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo General.....	15
2.2	Objetivos Específicos	15
CAPÍTULO 3	METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	17
3.1	Caracterización de la biomasa y de los contaminantes	17
3.1.1	Hongos utilizados	17
3.1.2	Obtención de la biomasa.....	18
3.1.3	Caracterización de la biomasa fúngica.....	18
3.1.4	Caracterización del colorante	20
3.1.5	Caracterización del metal	21
3.1.6	Determinación de las concentraciones de los contaminantes	21
3.2	Pruebas de remoción utilizando biomasa seca	22
3.2.1	Cinéticas de adsorción	22
3.2.2	Isotermas de adsorción	22
3.2.3	Evaluación de la desorción.....	23
3.3	Pruebas de remoción en medio de cultivo	24
3.3.1	Optimización de la remoción simultánea	24
3.3.2	Determinación del mecanismo de remoción de los contaminantes en medio de cultivo	25
CAPÍTULO 4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1	Caracterización de la biomasa y de los contaminantes	26

4.1.1 Biomasa fúngica.....	26
4.1.2 Zinc.....	29
4.1.3 Verde malaquita	31
4.2 Pruebas de remoción con biomasa seca.....	33
4.2.1 Cinéticas de adsorción	33
4.2.2 Isotermas de adsorción	37
4.2.3 Recuperación del metal adsorbido	42
4.2.4 Elucidación del mecanismo de remoción con biomasa seca.....	44
4.3 Pruebas de remoción de Zn (II) y Verde de Malaquita en medio de cultivo	45
4.3.1 Resultados para <i>A. ustus</i> y <i>P. janthinelum</i>	45
4.3.1 Resultados para <i>T. longibrachiatum</i>	45
4.3.1.1 Prueba de remoción en las condiciones óptimas	53
4.4 Elucidación del mecanismo de remoción en medio de cultivo	54
4.4.1 Mecanismo de <i>T. longibrachiatum</i>	54
Capítulo 5 Conclusiones	57
Capítulo 6 Referencias bibliográficas.....	59

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Zn(II)	Zinc bivalente
L	Litros
mg	Miligramos
g	Gramos
mL	Mililitros
mEq	Miliequivalentes
pH_{PCC}	Potencial de carga cero
°C	Grados Celsius
rpm	Revoluciones por minuto
N	Normalidad
k₁, k₂	Constantes de velocidad
V	Volumen
C_o	Concentración inicial

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Algunos estudios realizados para remoción de metales y colorantes con hongos	11
Tabla 2	Volúmenes de HCL y NaOH utilizados en la determinación del potencial de carga cero de las biomosas.	19
Tabla 3	Factores y niveles utilizados en la optimización de la remoción en medio de cultivo	24
Tabla 4	Composición del medio Lee utilizado.	25
Tabla 5	Composición del medio PDB utilizado en este trabajo	25
Tabla 6	Valores de potencial de carga cero para las tres cepas estudiadas	27
Tabla 7	Bandas presentes en los espectros de IR de las biomosas y sus atribuciones	29
Tabla 8	Valores de R2 para las cinéticas de remoción inactiva	36
Tabla 9	Valores de R2 para los ajustes de los modelos de isotermas	40
Tabla 10	Valores de q_{max} de Zn(II) para las biomosas estudiadas	41
Tabla 11	Valores de capacidad máxima de adsorción utilizando biomasa de diferentes hongos	42
Tabla 12	Recuperación de Zn(II) en la desorción ácida	43
Tabla 13	Recuperación de Zn(II) adsorbidos para distintas biomosas fúngicas	43
Tabla 14	Experimentos realizados en el diseño Box-Behnken y resultados para <i>T. longibrachiatum</i> .	45
Tabla 15	Resultados esperados y obtenidos en el punto óptimo del modelo	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la pared celular de los hongos	7
Figura 2	Curva de titulación para la cepa de <i>P. janthinelum</i> estudiada	27
Figura 3	Espectros de IR obtenidos para las tres cepas fúngicas estudiadas	28
Figura 4	Diagrama de especiación del zinc en presencia de nitrato	30
Figura 5	Diagrama de especiación del zinc en presencia de sulfato	30
Figura 6	Formas moleculares del verde malaquita de acuerdo al pH del medio	31
Figura 7	Espectro de UV-Vis obtenido para el colorante verde malaquita	32
Figura 8	Cinéticas de adsorción de Verde malaquita y Zinc para las tres cepas	35
Figura 9	Isotermas obtenidas para verde malaquita	38
Figura 10	Isotermas obtenidas para el zinc	39
Figura 11	ANOVA del modelo obtenido para remoción de color (<i>T. longibrachiatum</i>)	46
Figura 12	ANOVA del modelo obtenido para remoción de Zn(II) (<i>T. longibrachiatum</i>)	47
Figura 13	Gráfica de los residuales normalizados para el modelo de remoción de color (<i>T. longibrachiatum</i>)	48
Figura 14	Gráfica de los residuales normalizados para el modelo de remoción de Zn(II) (<i>T. longibrachiatum</i>)	49
Figura 15	Análisis de pH x Tiempo para remoción de color (<i>T. longibrachiatum</i>)	50
Figura 16	Análisis de pH x Medio para remoción de color (<i>T. longibrachiatum</i>)	50
Figura 17	Análisis de Tiempo x Medio para remoción de color (<i>T. longibrachiatum</i>)	51
Figura 18	Análisis de pH x Tiempo para remoción de Zn(II) (<i>T. longibrachiatum</i>)	52

Figura 19	Análisis de pH x Medio para remoción de Zn(II) (<i>T. longibrachiatum</i>)	52
Figura 20	Análisis de Tiempo x Medio para remoción de Zn(II) (<i>T. longibrachiatum</i>)	53
Figura 21	Células de <i>T. longibrachiatum</i> tras crecimiento en medio sin y con contaminantes (A y B respectivamente)	56

RESUMEN

Dos tipos de contaminantes los cuáles generan grande preocupación son los metales y los colorantes. Una manera viable de tratar este tipo de residuo es el uso de hongos. Los hongos filamentosos utilizados en este trabajo (*Aspergillus ustus* UANL, *Penicillium janthinelum* UANL y *Trichoderma longibrachiatum*) fueron aislados de un suelo contaminado con metales en García, Nuevo León. Su utilización es investigada con el organismo activo e inactivo, y son evaluadas la bioacumulación y la biosorción. Los contaminantes utilizados son el metal zinc y el colorante verde malaquita.

Las pruebas de adsorción son realizadas en solución de contaminante preparada en agua bidestilada. Las pruebas de bioacumulación son realizadas con biomasa activa en medio de cultivo agregado de contaminante. La determinación de la concentración de metal es llevada a cabo por absorción atómica (AAS) y el color por UV-Vis. La concentración de colorante para realización de las isotermas es determinada por una curva de calibración en UV-Vis.

Las cepas de *Aspergillus ustus*, *Penicillium janthinelum* y *Trichoderma longibrachiatum* estudiadas en este trabajo presentaron la capacidad de remover el colorante verde malaquita y el metal zinc de manera individual. Sin embargo, solamente el *T. longibrachiatum* fue capaz de realizar la remoción simultánea.

La adsorción del colorante verde malaquita es mejor descrita por un modelo cinético de 1er orden e isoterma de Freundlich, mientras que la del metal

zinc es mejor descrita por un modelo cinético de 2^a orden e isoterma de Langmuir.

El mecanismo de remoción de ambos contaminantes con biomasa seca fue determinado como adsorción por atracción de cargas y formación de enlaces de van der Waals.

Sólo *T. longibrachiatum* removió simultáneamente la verde malaquita y el zinc.

De acuerdo al modelo obtenido con la optimización de Box-Behnken, los parámetros significativos en la remoción del zinc fueron pH, tiempo y medio de cultivo. En cambio, para la verde malaquita sólo fue significativo el pH.

La optimización simultánea arrojó las siguientes condiciones óptimas: pH 6, 68h y medio PDB. Los resultados de remoción obtenidos en la confirmación del modelo son muy similares a los predichos por el modelo.

Las imágenes de microscopía óptica obtenidas muestran variaciones morfológicas que pueden indicar que, durante la remoción simultánea, *T. longibrachiatum* está bioacumulando los contaminantes. Sin embargo, no se descarta que puede estar pasando la adsorción junto con la bioacumulación.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Contextualización

La rápida urbanización e industrialización ha llevado a un creciente desecho de productos tóxicos en el medio ambiente. En general, los contaminantes químicos se clasifican en dos categorías: orgánicos (como solventes industriales, pesticidas, colorante) e inorgánicos (como metales, fertilizantes químicos, etc.) metales tóxicos y radio nucleídos en el medio ambiente.

Los metales tóxicos no son biodegradables, y se acumulan en los organismos, a través de la cadena alimenticia (Meenambigai, et al., 2016), lo que hace que sean uno de los mayores problemas ambientales y de salud actualmente a nivel mundial.

Recientemente, gran atención ha sido dada al desecho de efluentes que contienen colorantes sintéticos. La presencia de estos colorantes en las aguas es indeseable debido a los numerosos problemas que pueden causar,

además de los provocados por sus productos de descomposición (Ozdemir, et al., 2013).

Se ha encontrado contaminación por metales en agua, sedimento y ostras en el lago San Andres, en México, por ejemplo. (Vázquez-Sauceda, et al., 2011)

La industria textil mexicana juega un papel importante, tanto en el mercado nacional como en el estadounidense. Su aportación económica a diversas entidades del país la ubican como una actividad productiva dinámica y relevante.

Los colorantes textiles pueden ser clasificados de acuerdo con su solubilidad en agua como catiónico (colorantes básicos), aniónicos (ácido, directo y colorantes reactivos) y no iónico (VAT y colorantes dispersos) (Güzel, et al., 2015). Los tintes básicos se utilizan para teñir fibras acrílicas. Los tintes ácidos se utilizan en la lana, la seda, o nylon. Los tintes dispersos se utilizan en poliéster o nylon.

La mayoría de los estudios sobre la biodegradación de los colorantes se han centrado en hongos y bacterias. Sin embargo, la decoloración de productos tales como compuestos de amina aromáticos pueden inhibir la actividad bacteriana (Qu, et al., 2010). Por el contrario, los hongos pueden degradar compuestos orgánicos complejos mediante catálisis de enzimas extracelulares incluyendo lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa (Gomi, et al., 2011).

Es de gran importancia, así, buscar una forma rápida, eficiente, práctica y barata de tratar efluentes industriales altamente contaminados.

El tratamiento de aguas residuales industriales contaminadas normalmente pasa a través de dos métodos: bióticos y abióticos. Métodos abióticos incluyen métodos físico-químicos, mientras que los métodos bióticos incluyen organismos vivos y derivados de los mismos. La precipitación química y tratamiento electroquímico son ineficientes, en particular cuando el ion metálico se encuentra a bajas concentraciones de 1-100mg/L (Lodeiro, et al., 2006). Estos métodos también producen un gran volumen de los lodos, difícil de tratar y algunas tecnologías como la de membrana de intercambio iónico y procesos de adsorción con carbón activado son extremadamente caros. Por lo tanto, se puede concluir que estos métodos convencionales tienen desventajas significativas, incluyendo la eliminación incompleta de los metales, el alto costo, altos requerimientos de reactivos y / o la generación de los productos residuales y de lodos tóxicos o desechos que requieren disposición. Estas desventajas han resultado en el desarrollo de tecnologías de separación alternativas (Dhankhar & Hooda, 2011).

El uso de microorganismos para la acumulación de metales pesados fue reportado por primera vez a principios de 1980 (Duddridge & Wainwright, 1980). Desde entonces, muchos estudios han sido publicados en esta área. El potencial biosortivo de hongos tales como *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Saccharomyces* ha sido explorado (Volesky & Tsezos, 1981; Galun, et al., 1984; De Rome & Gadd, 1987; Siegel, et al., 1986; Brady & Duncan, 1993; Puranik & Paknikar, 1997).

La adsorción se ha observado que es un proceso eficiente para la eliminación de metales pesados de las aguas residuales. La eliminación de

metales pesados de las aguas residuales por adsorción se lleva a cabo típicamente usando carbón activado o alúmina activada, pero el carbón activado no es recuperable, mientras la alumina presenta costos de adquisición. Las resinas poliméricas que pueden formar complejos con iones de metales pesados son mejores adsorbentes. Sin embargo, por lo general tienen una baja capacidad de adsorción (Dhankhar & Hooda, 2011). En los últimos años, el foco de la investigación se ha centrado en métodos biológicos como la bioacumulación y la biosorción que han demostrado tener un buen potencial para reemplazar los métodos convencionales para la eliminación de metales (Dhankhar & Hooda, 2011).

Shumate y Strandberg (Shumate II & Strandberg, 1985) definen biosorción como "interacciones físico-químicas no direccionales que pueden ocurrir entre las especies de metal o compuestos radioactivos y los componentes celulares de especies biológicas." Sin embargo, algunos investigadores han utilizado dicho término para definir también interacciones de biomateriales con distintos tipos de colorantes (Sen, et al., 2016).

Los hongos filamentosos constituyen una buena alternativa para el tratamiento de dichos efluentes. En primer lugar, los hongos presentan una excelente capacidad de unión con contaminantes, debido a la variedad de grupos funcionales presentes en sus paredes celulares, las cuales constituyen un alto porcentaje de su peso seco. En segundo lugar, los hongos son fáciles de cultivar en gran escala, ya que tienen un ciclo de multiplicación corto. En tercer lugar, la biomasa fúngica es fácilmente disponible como productos de desecho industriales. Esto proporciona una

ventaja económica a los biosorbentes de hongos, en comparación con otros tipos de biomasa microbiana. En cuarto lugar, una gran parte de los hongos biosorbentes no son patógenos. Por lo tanto, ellos son generalmente considerados seguros y son fácilmente aceptados por el público cuando se aplica en la práctica (Dhankhar & Hooda, 2011).

Sería entonces de gran interés buscar una manera de utilizar la biomasa fúngica en el tratamiento de residuos acuosos contaminados con metales y colorantes.

Los hongos han demostrado fuerte capacidad de adaptación y eficiencia en la eliminación de estos compuestos aromáticos. La exploración y el estudio de nuevas cepas de hongos capaces de degradar los colorantes eficientemente sigue siendo necesaria para la aplicación en el campo (Sen, et al., 2016). El uso de hongos filamentosos en el proceso de decoloración es una alternativa atractiva debido al bajo costo y a la posibilidad de mineralización total de colorante (Husain & Husain, 2007; Asgher, et al., 2008a; Asgher, et al., 2008b). La decoloración puede efectuarse por adsorción o degradación enzimática.

En este contexto, los hongos proporcionan un sistema eficiente debido a su gran área de superficie y la fácil separación sólido-líquido (Mishra & Malik, 2013). Los hongos también poseen múltiples mecanismos para la degradación de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Awasthi, et al., 2014). Sin embargo, los hongos capaces de eliminar eficazmente un metal en particular no siempre pueden ser igualmente eficaces en la eliminación de otro metal o un colorante. Además, hay muchas variaciones en la capacidad

de asimilación de metales o tintes entre diferentes cepas (Mishra & Malik, 2014a). Los efluentes industriales son combinaciones de muchos metales y contaminantes orgánicos (Ruta, et al., 2010; Yadav, et al., 2010). Por ejemplo, el efluente de industrias textiles contiene ambos colorantes residuales y metales (utilizados como mordantes). Además, las industrias de pulpa y papel, curtido y tintes son algunas de las que más generan efluentes ricos en metales, así como en colorantes (Mishra & Malik, 2014b).

Generalmente, todos los tipos de biomateriales (plantas, bacterias, algas, hongos etc.) tienen un buen potencial de biosorción en relación con todos los tipos de iones metálicos. Como la biosorción es un proceso que pasa en la superficie, se puede decir que el rendimiento de un biosorbente depende del estado iónico de la biomasa. Los hongos tienen un alto porcentaje de material de la pared celular, lo que aumenta la variedad de grupos funcionales que participan en el atrapamiento de iones metálicos. Además, los hongos presentan gran cantidad de quitina en su pared celular. Dichas características aumentan la capacidad de los hongos para secuestrar contaminantes (Dhankhar & Hooda, 2011).

La figura 1 ilustra la representación esquemática de una pared celular genérica de hongos.

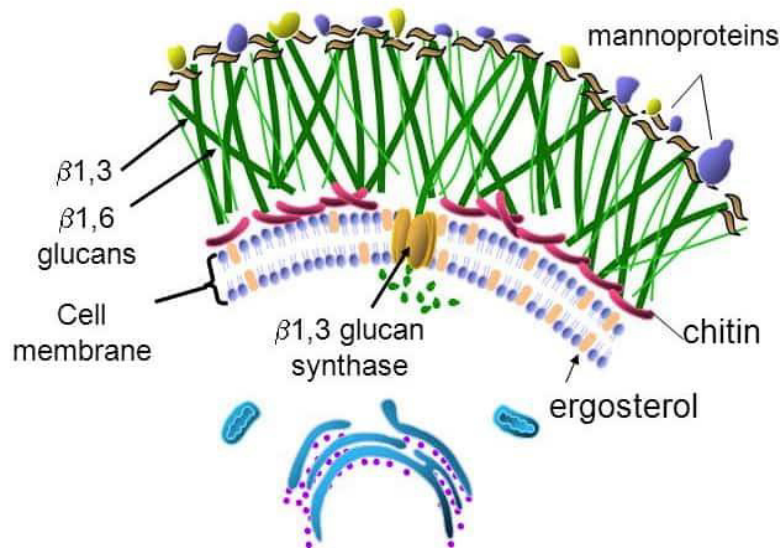


Figura 1. Estructura de la pared celular de los hongos. (Anon., 2016)

La pared celular de un hongo desempeña funciones esenciales en la interacción con su entorno, y puede constituir 30% o más de su peso seco. Se compone principalmente de polisacáridos, que son típicamente alrededor de 80% de la pared en peso seco, y en ella se anclan una gran variedad de diferentes proteínas, a menudo altamente glicosiladas, ancladas de varias maneras, y lípidos, pigmentos, y sales inorgánicas están presentes en cantidades mucho más pequeña. El material base de la pared celular es generalmente en forma de $\beta[1\rightarrow3]$ -glucano. Esto forma una triple hélice muy estable. El empaquetamiento de estas estructuras de triple hélice parece estar controlada por el tamaño y la frecuencia de cadenas muy cortas $[1\rightarrow6]$. Por último, la capa más externa de la pared celular se compone de varias proteínas, que llevan cadenas laterales compuestas de polisacáridos de manosa. La composición de la pared a menudo varía entre las especies fúngicas (Dhankhar & Hooda, 2011).

La capacidad de eliminación de metal de la biomasa fúngica es comparable con otros sólidos convencionales, tales como carbón activado y otros sólidos. El costo de cultivo de la biomasa para la biosorción se ha demostrado competitivo con el costo de adsorbentes convencionales (resinas de intercambio iónico y carbón activado) Esto hace que algunos biomateriales sean una alternativa económicamente interesante, ya que tienen capacidad de remoción de metales y otros contaminantes comparables con la de los adsorbentes tradicionalmente usados (De Gisi, et al., 2016).

1.2 Modelado empírico e isothermas

Modelos empíricos son relaciones matemáticas sencillas, caracterizadas por un número limitado de parámetros ajustables los cuales dan una buena descripción del comportamiento experimental al largo de un determinado rango de condiciones experimentales (Esposito, et al., 2002). A pesar de que los modelos empíricos convencionales no reflejan el mecanismo de adsorción del adsorbato, ellos son capaces de reflejar las curvas experimentales. (Kratochvil & Volesky, 1998)

Los modelos convencionales de isothermas son usados con éxito para replicar curvas de isothermas de biosorción. Los modelos son sencillos, bien establecidos, tienen significado físico y son fácilmente interpretables.

En la literatura, los modelos que son más aceptados y por tanto han sido usados con más frecuencia para describir el proceso de biosorción son el Langmuir y Freundlich, siendo ambos modelos de dos parámetros y aplicados a pH constante. (Dhankhar & Hooda, 2011)

El modelo de Langmuir se basa en la suposición de la formación de una monocapa de adsorbato sobre los sitios de adsorción del adsorbente, y tiene la siguiente forma:

$$Q = \frac{Q_{max}b_L C_f}{(1 + b_L C_f)} \quad (\text{ecuación 1})$$

Dónde Q es la capacidad de sorción en el equilibrio, Q_{max} es la capacidad máxima de sorción, b_L representa la afinidad que presenta la biomasa por el contaminante o fuerza de unión biomasa–contaminante y C_f es la concentración de adsorbato en el equilibrio.

El modelo de Freundlich no se limita a la formación de la monocapa de adsorbato, sin embargo se aplica unicamente a soluciones de bajas concentraciones. Este modelo tiene la siguiente forma:

$$Q = K_f C_f^{1/n} \quad (\text{ecuación 2})$$

Dónde Q es la capacidad de sorción en el equilibrio, K_f es la constante de proporcionalidad, C_f es la concentración del adsorbato en el equilibrio y n representa la afinidad que representa la biomasa por el contaminante.

Cada uno de estos modelos cuenta con una ecuacion linearizada, las cuales son utilizadas para verificar el ajuste de los datos experimentales.

1.3 Antecedentes

Ghaly et al. (2014) investigaron la composición típica de efluente de industrias textiles de distintos países, y obtuvieron que este tipo de agua residual generalmente presenta una mezcla de diferentes contaminantes, entre éstos se encuentran los metales como hierro, zinc, cobre, níquel y mercurio y los colorantes que dan coloración al agua residual desde 50 hasta 2500, expresada en la escala Pt-Co.

La decoloración de residuos acuosos conteniendo colorantes por biomasa de hongos ha sido ampliamente revisada por Kaushik y Malik (2009), y Singh (2006). Existe poca información sobre las interacciones entre la biomasa muerta de hongos y una variedad de colorantes con estructuras moleculares complejas. Fu y Viraraghavan (2001) reportan la remoción de una amplia gama de colorantes azo por varios géneros de hongos en su forma activa e inactiva. Por ejemplo, el hongo filamentoso *Aspergillus niger* que se ha utilizado para decolorar y/o biosorber diversos colorantes. Estos mismos autores estudiaron la biosorción de colorantes como Azul Básico 9, rojo Congo y rojo disperso 1 utilizando hongos.

Se ha confirmado la capacidad de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pichia* sp., *Penicillium* sp. y *Candida tropicalis* para decolorar azo colorantes por adsorción y/o degradación (Kalmis, et al., 2008; Qu, et al., 2010; Gou, et al., 2009; Tan, et al., 2013). Además de eso, algunos hongos pueden incluso mineralizar parcialmente o completamente azo colorantes (Miranda, et al., 2013; Qu, et al., 2012; Tan, et al., 2013). Algunas cepas que pertenecen a

los hongos tales como *Thamnidium elegans* fueron confirmados como eficaces degradantes de compuestos aromáticos fenólicos.

En la Tabla 1 se muestran algunos estudios recientes realizados para la remoción de metales o colorantes.

Tabla 1. Algunos estudios realizados para remoción de metales y colorantes con hongos. (a)=Biomasa activa, (i)=Biomasa inactiva.

Hongo	Adsorbato	C ₀ adsorbato (mg/L)	pH	T (°C)	Biomasa	Capacidad remoción (mg/g)	Tiempo (h)	Referencia
<i>Rhizopus nigricans</i>	Cr(VI)	100	2	45	0.5% (w/v) (i)	47	0.5	(Sudha Bai & Abraham, 2001)
<i>Mucor indicus</i> (inmovilizado)	Pb	10	6	-	66.7% biomass 33.3% polysulfone (i)	6.09	-	(Yan & Viraragavan, 2001)
	Cd	10		-		1.88	-	
	Ni	10		-		0.54	-	
	Zn	10		-		5.64	-	
<i>Aspergillus niger</i>	Cr(VI)	250	2	30	0.75(g/L) (a)	101	0.5	(Goyal, et al., 2003)
<i>Aspergillus niger</i>	Cu	105	4	25	1.0 (g/L) (a)	3.2	24	(Baik, et al., 2002)
	Pb	344				15.3		
	Cd	108				4.1		
	Ni	187				15.7		
	Zn	97				2.6		
<i>Aspergillus niger</i>	Cu	105	4	25	1.0 (g/L) (i)	1.8	24	(Baik, et al., 2002)
	Pb	344				6.2		
	Cd	108				2.6		
	Ni	187				7.9		
	Zn	97				3.2		
<i>Aspergillus lentulus</i>	Cr(VI)	100	6.5	30	10 ⁴ esporas/mL (a)	26.06	120	(Mishra & Malik, 2014a)
	Cu					18.19	120	
	Acid Blue 161					20.94	42	
	Orange 34					27.78	42	
<i>Aspergillus terreus</i>	Cr(VI)	100	6.5	30	10 ⁴ esporas/	45.87	96	(Mishra & Malik,
	Cu					50.20	120	

	Acid blue 161				mL (a)	32.24	30	2014a)
	Orange 34					28.99	30	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Cr(VI)	100	6.5	30	10 ⁴ esporas/mL (a)	45.03	168	(Mishra & Malik, 2014a)
	Cu					22.76	168	
	Acid blue 161					27.26	60	
	Orange 34					68.75	24	

Es conocido que mezclas de contaminantes presentan una toxicidad más alta que contaminantes individuales. Eso se refleja en la disminución de la capacidad de los hongos para la remoción de contaminantes (Mishra & Malik, 2013). Por ejemplo, Mishra y Malik (2014a) demostraron que el hongo *A. lentulus*, cuando fue evaluado en solución de Cr(VI), logró remover 99% del contaminante, mientras que en mezcla de metales (Cr y Cu) la remoción fue de 81.1% y en mezcla de metales con colorantes la remoción fue de 75%.

Estos resultados evidencian la razón por la cuál es tan importante desarrollar estudios acerca de la remoción simultánea de contaminantes.

Por lo anterior, este proyecto plantea la aplicación de hongos autóctonos aislados de México para la remoción simultánea de metales y colorantes utilizando los cultivos individuales, para lo cual se proponen los hongos *Aspergillus ustus*, *Penicillium janthinelum* y *Trichoderma longibrachiatum* que no han sido reportados para este tipo de aplicación.

1.4 Análisis crítico de la literatura

Con base en la revisión de la literatura se puede observar que se han utilizado hongos filamentosos como material para remoción de metales o colorantes. Los principales factores que se han estudiado son el pH, la concentración de biomasa, concentración del contaminante, temperatura. Han presentado diferentes capacidades para remoción del contaminante, sin embargo, se enfocan únicamente a uno de los contaminantes. Con relación a la remoción simultánea de metales y colorantes la bibliografía es muy limitada. De estas, los realizados con hongos son en aún menor cantidad.

Como estos dos contaminantes son muy característicos de industrias textiles y generalmente son encontrados juntos, una vez que los metales son usados como mordientes, sería de gran interés obtener un método eficiente para removerlos simultáneamente. Además, esta combinación puede ocurrir a partir de la confluencia de aguas que llevan cada uno de los contaminantes separadamente.

En este trabajo se propone determinar la capacidad de tres hongos autóctonos de México para remover metales y colorantes de manera individual y simultánea en medios acuosos.

1.5 Hipótesis

Los hongos filamentosos *Aspergillus ustus*, *Penicillium janthinelum* y *Trichoderma longibrachiatum* aislados de México remueven colorantes (Verde malaquita) y metales (zinc) de manera individual y simultánea a través de diferentes mecanismos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de biomasa de los hongos filamentosos *Aspergillus ustus*, *Penicillium janthinelum* y *Trichoderma longibrachiatum* para la remoción de metal (zinc) y colorante (verde malaquita) en una solución acuosa, así como elucidar el mecanismo por el cual lo realizan.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Caracterizar la biomasa y los contaminantes.

- a) Obtención de la biomasa
- b) Caracterización de la biomasa
- c) Caracterización del metal
- d) Caracterización del colorante

2.2.2 Realizar las pruebas de remoción con biomasa seca de cada uno de los tres hongos de estudio

- a) Cinética de remoción de Zn(II)
- b) Cinética de Remoción de Verde de Malaquita
- c) Isotermas de adsorción de Zn(II)
- d) Isotermas de adsorción de Verde de Malaquita
- e) Evaluación la desorción de Zn(II)
- f) Determinación del posible mecanismo de remoción de los contaminantes

2.2.3 Realizar las pruebas de remoción en medio de cultivo de cada uno de los tres hongos de estudio:

- a) Optimizar la remoción simultánea de los contaminantes
- b) Determinar el posible mecanismo de remoción de los contaminantes

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA DE TRABAJO

3.1 Caracterización de la biomasa y de los contaminantes

3.1.1 Hongos utilizados

Los hongos utilizados en este trabajo fueron aislados e identificados en una investigación anterior (García Hernández M.A., Tesis de doctorado) como *Aspergillus ustus*-UANL, *Penicillium janthinelum*-UANL y *Trichoderma longibrachiatum*-UANL. A partir de este punto estas tres cepas serán referidas como *A. ustus*, *P. janthinelum* y *T. longibrachiatum*, respectivamente.

3.1.2 Obtención de la biomasa

Las cepas son sembradas en cajas Petri con agar Sabouraud-dextrosa e incubadas a 28°C por 7 días. Las esporas obtenidas son raspadas con aza de platino y transferidas a un vial de vidrio conteniendo una solución de cloruro de sodio al 0.9%.

La suspensión de esporas obtenida es sembrada en matraces con caldo patata-dextrosa e incubadas a 28°C en agitación a 150rpm por 5 días. Tras filtración, la biomasa es transferida a viales de vidrio estériles y refrigeradas o liofilizadas, de acuerdo con la aplicación deseada.

La biomasa destinada a pruebas de adsorción es liofilizada, y tras este procedimiento esta es procesada y tamizada para la obtención de partículas con tamaño entre 190 y 460 μm .

3.1.3 Caracterización de la biomasa fúngica

Las biomasas fueron caracterizadas a través de la determinación de su potencial de carga cero y de la obtención de sus espectros de infrarrojo.

El potencial de carga cero fue obtenido por titulación en la cual diferentes volúmenes de ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH), ambos 0.1N, fueron agregados a diferentes tubos BD Falcon de 50mL, aforados a 25mL con una solución de cloruro de sodio (NaCl) 0.1N preparada previamente con agua desionizada. Posteriormente, se agregó 0.1g de biomasa fúngica liofilizada y procesada. Tras 24h de agitación a 150 rpm y

28°C, la suspensión resultante fue centrifugada a 3000rpm (centrífuga DSC-1512 SD-1) y el pH de cada solución fue cuantificado (potenciómetro Orion 710A). Para cada experimento se realizó un blanco para cada experimento en condiciones similares, pero sin adición de biomasa. Los volúmenes de HCl y NaOH agregados se presentan en la tabla 2.

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

Tabla 2. Volúmenes de HCL y NaOH utilizados en la determinación del potencial de carga cero de las biomosas.

Experimento	HCl 0.1N (mL)	Experimento	NaOH 0.1N (mL)
Control	0	Control	0
1	0.2	10	8.0
2	0.4	11	6.0
3	0.8	12	4.0
4	1.2	13	2.0
5	1.6	14	1.6
6	2.0	15	1.2
7	4.0	16	0.8
8	6.0	17	0.4
9	8.0	18	0.2

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

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

Donde:

IL = Número de iones liberados, mEq g⁻¹

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

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

m = Cantidad de biomasa, g

Cabe mencionar que los cambios de pH se representan en función del volumen de NaOH 0.1 N empleado, en donde los volúmenes utilizados de HCl 0.1 N son interpretados como valores negativos de NaOH 0.1 N. Se realiza la comparación de la muestra y el blanco, de tal forma que cuando se añada una misma cantidad de NaOH 0.1 N, estos presentaran un diferente valor de pH, hasta obtener un pH común para ambos en el que se requiere una misma cantidad de NaOH 0.1 N agregada, representando así el pH_{PCC} para la biomasa de cada hongo en estudio.

Para obtener los espectros de infrarrojo se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (Spectrum One, Perkin Elmer) con un intervalo de medición de 650 – 4000 cm⁻¹.

3.1.4 Caracterización del colorante

El colorante verde malaquita fue caracterizado por la obtención de su pK y de la longitud de onda de máxima absorción en el espectro de UV Visible, la cual fue obtenida en un espectrómetro Varian Cary 50 utilizando una

solución a 5 mg L^{-1} de verde malaquita y un barrido en el rango de longitud de onda de 400 a 700 nm.

3.1.5 Caracterización del metal

El zinc fue caracterizado a través de la obtención de sus diagramas de especiación para cada concentración utilizada en los experimentos. Para la construcción de los diagramas fue utilizado el software MEDUSA.

3.1.6 Determinación de las concentraciones de los contaminantes

La concentración de zinc es determinada por espectrometría de absorción atómica (*Atomic Absorption Spectroscopy - AAS*) en un espectrómetro GBC 932 AA. Una curva de calibración es utilizada para medir en el rango de concentración 0.4 a 1.5 mg L^{-1} . Los estándares de la curva fueron preparados a partir de diluciones en agua desionizada de un estándar de la marca Ricca (*1000ppm Zinc AA Standard – Zinc metal in 3% nitric acid*).

La concentración de verde malaquita es determinada a través de la construcción de una curva de calibración en el intervalo 1 - 11 mg L^{-1} en su longitud de máxima absorción en el espectro de UV Visible, utilizando un espectrómetro Spectronic 20 Genesys.

3.2 Pruebas de remoción utilizando biomasa seca

Las pruebas de remoción con biomasa seca son llevadas a cabo en tubos Falcon con capacidad para 15mL, en los cuales se agregó 0.01 g de biomasa seca, procesada y tamizada es puesta en contacto con una solución de contaminante de concentración conocida y pH 5.5. Tras centrifugación, la concentración de los contaminantes en el sobrenadante es determinada para conocer la cantidad adsorbida en cada caso.

3.2.1 Cinéticas de adsorción

Para determinación de los tiempos de equilibrio, tubos Falcon conteniendo 0.01 g de biomasa liofilizada, procesada y tamizada y 5 mL de solución de contaminante a pH 5.5 son preparados e dejados en agitación a 150 rpm y 28°C. En tiempos pre determinados, los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos en centrifuga Thermo IEC Centra CL3R, el sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorf y ultracentrifugado a 10 000 rpm por 5 minutos (centrífuga Eppendorf 5415 D). Tras las centrifugaciones, los sobrenadantes fueron analizados para cuantificar la concentración de contaminantes restante.

3.2.2 Isotermas de adsorción

Para construcción de las isotermas, tubos Falcon conteniendo 0.01 g de biomasa liofilizada, procesada y tamizada y 5 mL de solución de contaminante a pH 5.5 son preparados e dejados en agitación a 150 rpm y 28°C por 48 h. Los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos en

centrifuga Thermo IEC Centra CL3R, el sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorf y ultracentrifugado a 10 000 rpm por 5 minutos (centrífuga Eppendorf 5415 D). Tras las centrifugaciones, los sobrenadantes fueron analizados para cuantificar la concentración de contaminantes restante.

El valor de Q (capacidad de adsorción de contaminante por unidad de masa de biomasa) fue calculado por la ecuación 4.

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{m} \quad (\text{ecuación 4})$$

Donde:

Q = capacidad de adsorción, mg g^{-1}

C_i = concentración inicial de la solución de contaminante, mg L^{-1}

C_f = concentración final de la solución de contaminante, mg L^{-1}

V = volumen en el tubo, (L)

m = masa de biomasa utilizada en la prueba, (g)

3.2.3 Evaluación de la desorción

Para evaluar la recuperación del metal, se realiza una desorción en la cual la biomasa saturada es liofilizada, pesada y puesta en contacto con una solución de HCl 0.1N y dejada en agitación por el período de una hora. El volumen de solución de ácido es agregado de tal manera que la relación biomasa/solución sea 6 mg/mL . La concentración de metal en el sobrenadante es determinada al final del período.

3.3 Pruebas de remoción en medio de cultivo

3.3.1 Optimización de la remoción simultánea

Para lograr la optimización de la remoción en medio de cultivo se realizó un diseño Box-Behnken con 3 repeticiones en el punto central. Los factores optimizados fueron pH, tiempo y medio de cultivo.

La tabla 3 presenta los factores y sus niveles evaluados en esta etapa.

Tabla 3. Factores y niveles utilizados en la optimización de la remoción en medio de cultivo.

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
pH	2	4	6
Tiempo	24h	48h	72h
Medio de cultivo	1: PDB	1.5: Mezcla (50% PDB/ 50% Lee)	2: Lee

Las pruebas de remoción en medio de cultivo se realizan en matraces con capacidad para 250mL, conteniendo 40 mL de medio agregado con 10 mg L⁻¹ de zinc y 5 mg L⁻¹ de verde malaquita. La mezcla se dejó en agitación a 150rpm/28°C. El sobrenadante fue recolectado y filtrado en filtro 0.45um antes del análisis de color concentración de zinc.

La composición del medio Lee (Lee, et al., 1975) está representado en la tabla 2.

Tabla 4. Composición del medio Lee utilizado.

Compuesto	Concentración
Nitrato de potasio	1.0 g/L
Sulfato de magnesio	1.0 g/L
Fosfato de potasio	0.5 g/L
Cloruro de sodio	0.1 g/L
Dextrosa	5.0 g/L

El medio *potato dextrose broth* (PDB) fue preparado a 6 g L⁻¹, de tal manera que la concentración final de los componentes sea el presentado en la tabla 5.

Tabla 5. Composición del medio PDB utilizado en este trabajo.

Componente	Concentración
Almidón de papa	1.0 g/L
Dextrosa	5.0 g/L

3.3.2 Determinación del mecanismo de remoción de los contaminantes en medio de cultivo

Utilizando imágenes de microscopía óptica fueron buscadas evidencias de bioacumulación de los contaminantes por las células.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la biomasa y de los contaminantes

4.1.1 Biomasa fúngica

Para comprender el mecanismo de adsorción, es necesario determinar el potencial de carga cero (pH_{PPC}) del material adsorbente, o sea, el valor de pH en el cual la superficie sólida presenta una carga neta cero (neutra). (Srivastava & Hasan, 2011) Esto es un índice conveniente de una superficie cuando la carga superficial se vuelve positiva o negativa en función del pH del medio. La adsorción de cationes es favorecida a valores de pH más altos que pH_{ZPC} , mientras la adsorción de aniones lo es a valores de pH más bajos que pH_{ZPC} .

Los valores de pH_{PZC} fueron determinados para las tres biomásas utilizadas. Los valores determinados se encuentran en la tabla 6. La figura 2 presenta la curva de titulación para la cepa de *P. janthinelum*.

Tabla 6. Valores de potencial de carga cero para las tres cepas estudiadas.

Cepa	pH _{PZC}
<i>A. ustus</i>	5.2
<i>P. janthinelum</i>	5.4
<i>T. longibrachiatum</i>	4.8

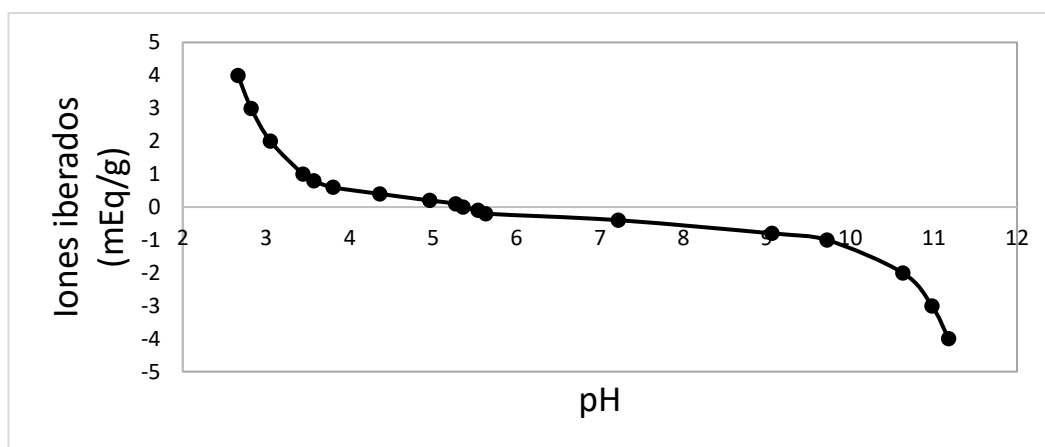


Figura 2. Curva de titulación para la cepa de *P. janthinelum* estudiada.

Observase una similitud entre los valores de pH_{PCC} de las cepas de *A. ustus* y *P. janthinelum*. Sin embargo, el valor atribuido a la cepa de *T. longibrachiatum* es más bajo. Trabajando a valores de pH más altos que los pH_{PCC} nos garantiza la predominancia de cargas negativas en la superficie de la biomasa, y el valor de pH_{PCC} más bajo para la cepa de *T. longibrachiatum* significa que esta biomasa deberá presentar una mayor capacidad de adsorción que las otras, a un mismo valor de pH de trabajo.

Además de los potenciales de carga cero, también fueron obtenidos los espectros de FTIR de las tres cepas (figura 3).

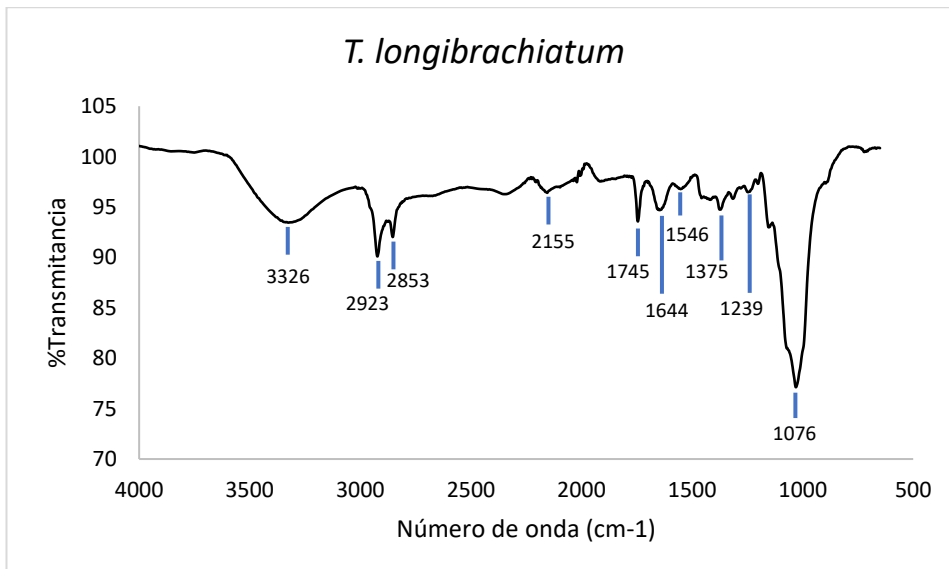
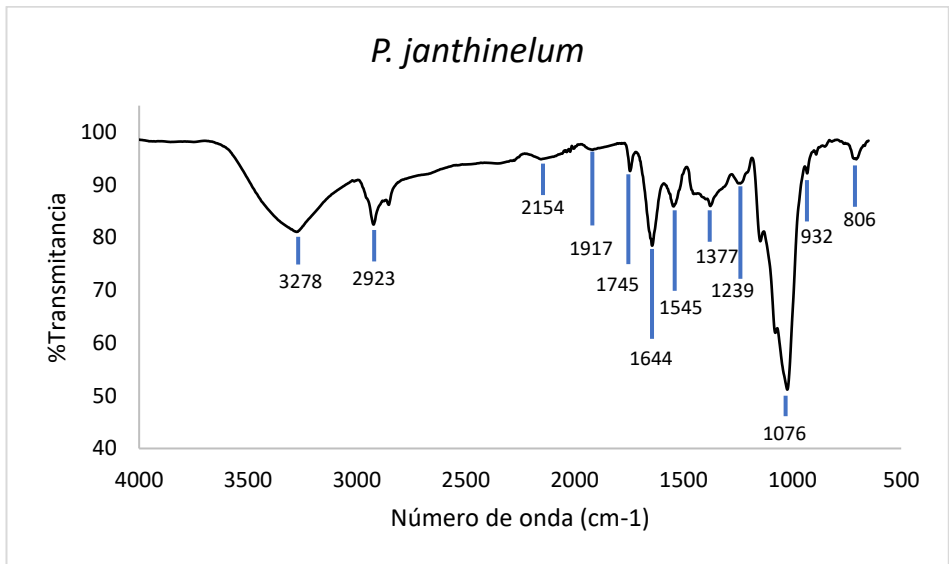
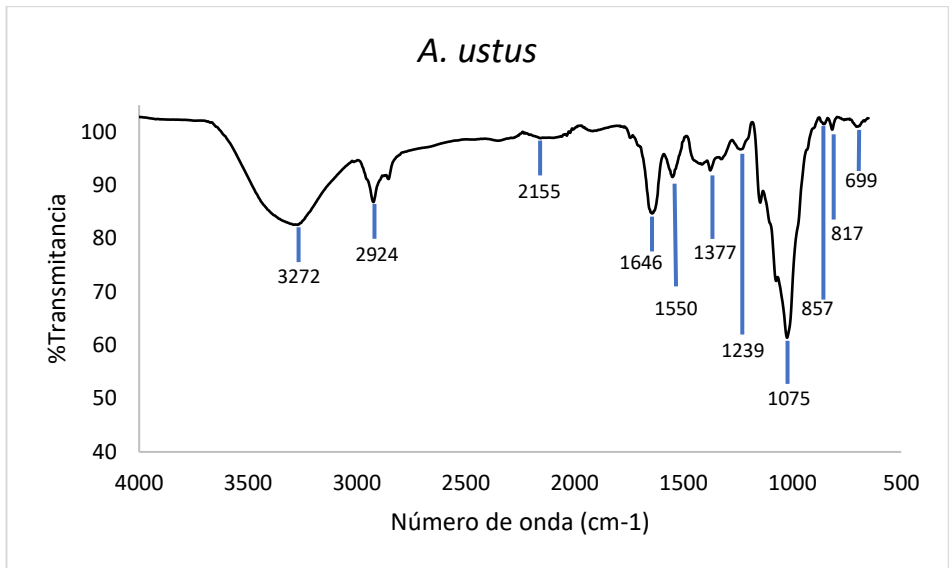


Figura 3. Espectros de IR obtenidos para las tres cepas fúngicas estudiadas.

Observase una similitud muy alta entre las cepas, lo que evidencia que los grupos funcionales disponibles para adsorción son prácticamente los mismos.

Las atribuciones de las bandas se encuentran en la tabla 7 (Huleihela, et al., 2018).

Tabla 7. Bandas presentes en los espectros de IR de las biomásas y sus atribuciones.

Número de onda (cm⁻¹)	Grupo funcional atribuido
3700-2996	O-H y N-H (quitina)
2996-2800	Lípidos
1800-1485	Amida (grupo acetamido)
1485-1185	Proteínas y lípidos
1185-900	Polisacáridos

4.1.2 Zinc

El diagrama de especiación del metal zinc en la presencia de nitrato y sulfato fue obtenido para distintas concentraciones de metal utilizando el software MEDUSA. La presencia de nitrato se debe al hecho que el estándar de AAS se encuentra en ácido nítrico, y la del sulfato se debe a que las pruebas de remoción en medio de cultivo son preparadas con la sal de zinc para evitar cambio en el pH del medio debido a la agregación del reactivo.

Las figuras 4 y 5 presentan el diagrama para la concentración de Zn^{2+} al 300 mg/L, pues se considera que esta será la más alta concentración con la cual se realizarán experimentos.

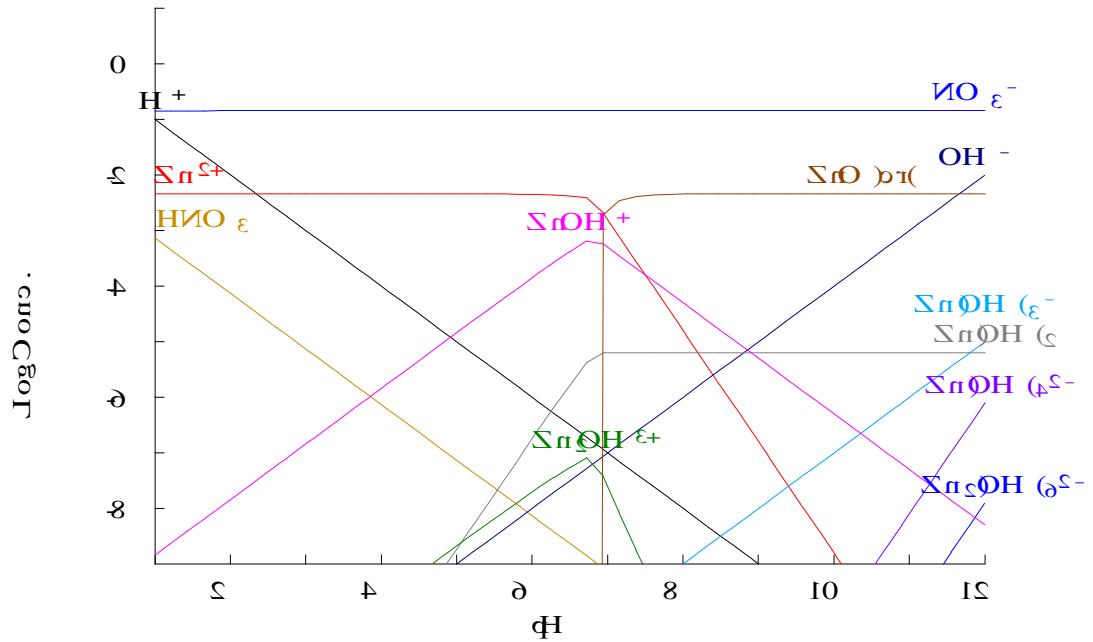


Figura 4. Diagrama de especiación del zinc en presencia de nitrato.

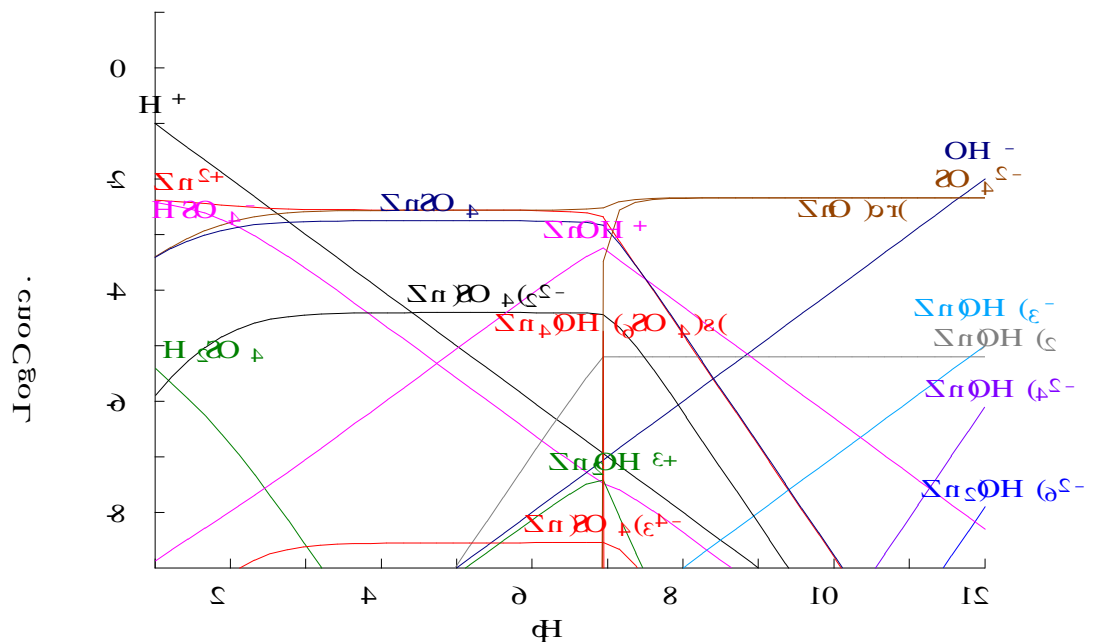


Figura 5. Diagrama de especiación del zinc en presencia de sulfato.

Observando los diagramas es posible concluir que la precipitación del zinc en forma de óxido ocurre a pH 6.9 en ambos casos. Por lo tanto, es necesario trabajar a valores de pH más bajos que este, para evitar la precipitación del metal y medir adecuadamente la adsorción y la remoción activa.

4.1.3 Verde malaquita

La caracterización del colorante verde malaquita es llevada a cabo a través de la obtención de su pK, o sea, el valor de pH en el cual la forma iónica de la molécula de colorante cambia.

Este dato (figura 6) fue obtenido de la bibliografía (Cuong, et al., 2012).

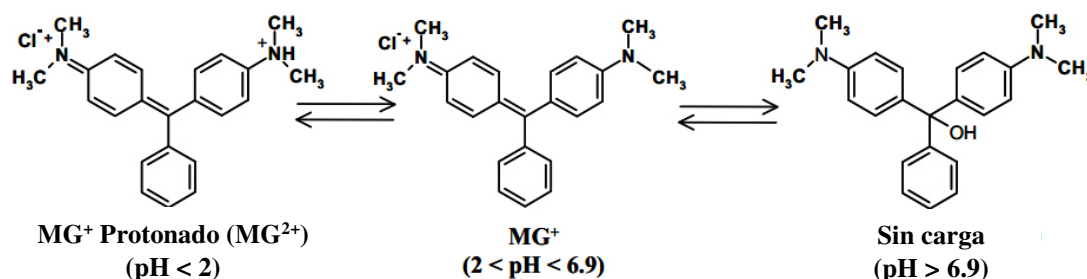


Figura 6. Formas moleculares del verde malaquita (MG) de acuerdo al pH del medio. (Cuong, et. al. 2012)

Las estructuras que presenta el colorante en valores de pH más bajos que 6.9 tienen carga positiva. Considerando que el objetivo de este trabajo es evaluar la remoción simultánea de este colorante con el metal zinc, es interesante que ambos adsorbatos presenten la misma carga, positiva. De

esta manera, se elige trabajar a pH más bajo que 6.9, también debido al pK del colorante.

La selección del pH de trabajo se hace de manera a optimizar la presencia de cargas negativas en la superficie de la biomasa y, a la vez, evitar la precipitación del zinc y la pérdida de la carga positiva en la molécula de verde malaquita. Buscando todo esto con base en los resultados de la caracterización de la biomasa y los contaminantes, se elige 5.5 como pH de trabajo.

El espectro de UV visible fue obtenido y la longitud de onda de máxima absorción determinado fue de 618 nm. (Figura 7)

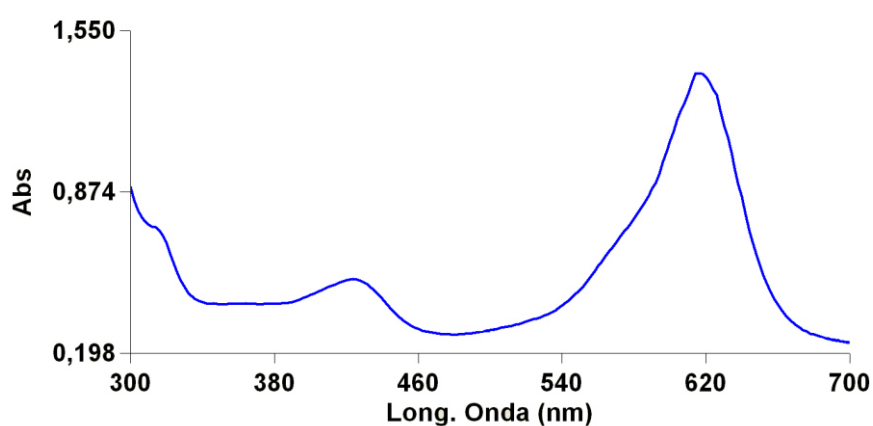


Figura 7. Espectro de UV-Vis obtenido para el colorante verde malaquita.

4.2 Pruebas de remoción con biomasa seca

4.2.1 Cinéticas de adsorción

La Figura 8 presenta los resultados de las cinéticas de verde malaquita y zinc para las tres cepas estudiadas.

Observase que, para la remoción de colorante, las tres cepas alcanzaron un equilibrio a las dos horas, mientras para la remoción de metal el equilibrio fue alcanzado a los 10 minutos. Es posible notar también que, de acuerdo con lo esperado debido a los potenciales de carga cero, en valor de q para el *T. longibrachiatum* es más alto en ambos casos (colorante y metal).

La adsorción es un proceso rápido. En la literatura esto se observa tanto en procesos con colorantes como con metales. Dursun (2006) estudió la remoción de cobre y plomo por *A. niger* y reportó que la mayor parte del metal fue removida en los primeros 10 minutos de contacto. Das *et al.* (2007) reportaron una remoción de mercurio por *A. versicolor* en los primeros 50 minutos; Fan *et al.* (2008) observaron una remoción de cadmio, zinc y plomo por *P. simplicissimum* en las primeras dos horas, así como la remoción de cadmio por *Trichoderma sp.* reportada por Bazrafshan *et al.* (2015).

Cuando hablamos de remoción de contaminantes, dos tipos de modelos cinéticos son generalmente utilizados y comparados: pseudo-primer orden y pseudo-segundo orden.

En la literatura, el modelo cinético de primer orden es generalmente usado en la forma propuesta por Ho y McKay.

$$\ln[q_e - q(t)] = \ln q_e - k_1 t$$

En la cual q es la cantidad adsorbida de soluto, q_e es la cantidad adsorbida en el equilibrio, k_1 es la constante de velocidad de primer-orden y t es el tiempo.

La ecuación del modelo cinético de pseudo-segundo orden es normalmente usada también en la forma propuesta por Ho y McKay.

$$\frac{t}{q(t)} = \frac{t}{q_e} + \frac{1}{k_2 q_e^2} \quad (\text{ecuación 4})$$

En la cual k_2 es la constante de segundo-orden.

Además de permitir el análisis de la velocidad de reacción, lo que es esencial en la aplicación práctica de la biosorción, los modelos cinéticos también llevan a una comprensión del comportamiento del sistema de adsorción.

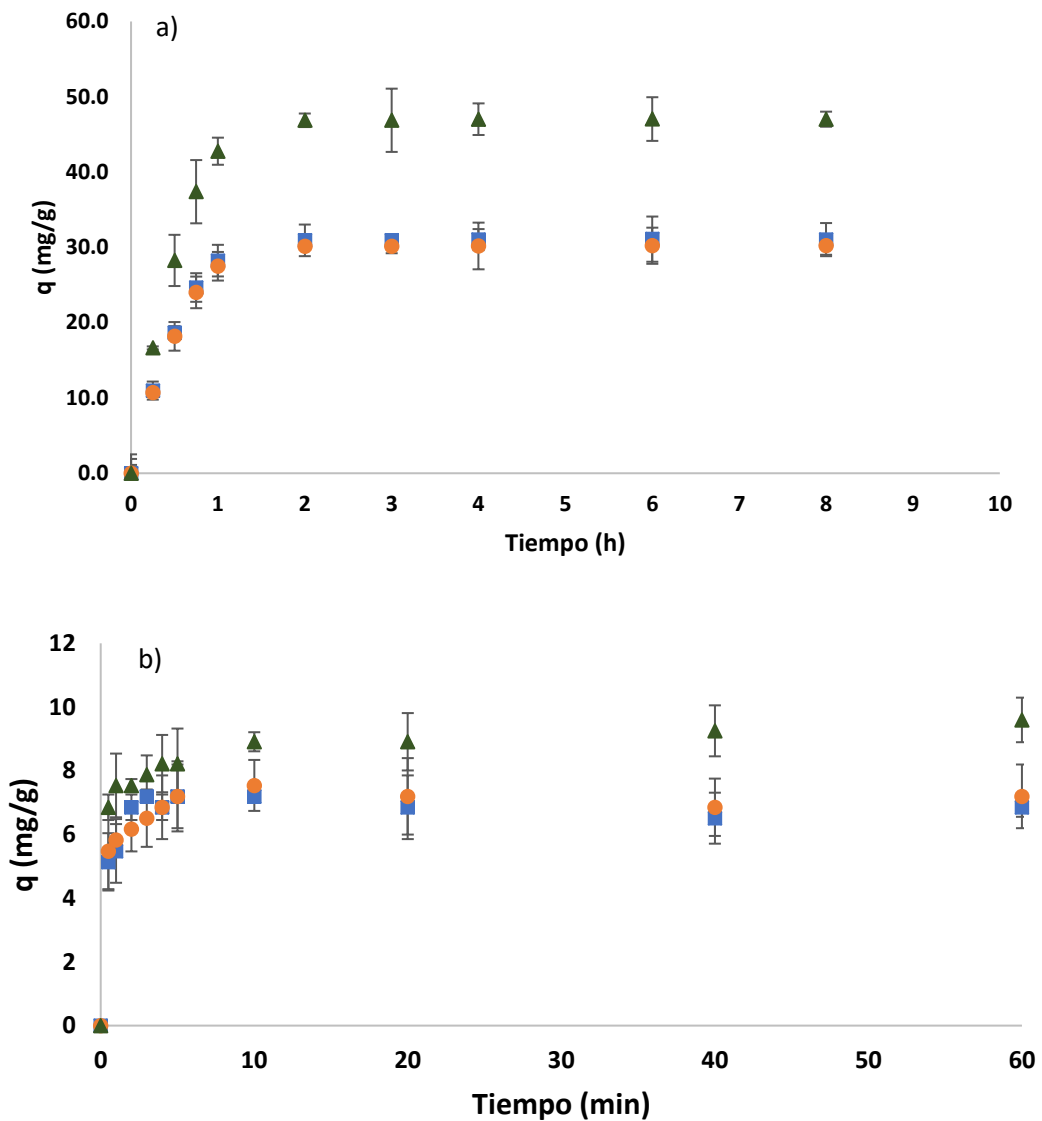


Figura 8. Cinéticas de adsorción de a) Verde malaquita y b) Zinc para las tres cepas. ■ = *A. ustus* ● = *P. janthinelum* ▲ = *T. longibrachiatum* .

Las cinéticas de primer-orden muchas veces son referidas como fisiosorción, pues la etapa limitante es la difusión de los solutos de la fase líquida hasta la superficie del material adsorbente. En las cinéticas de segundo orden, el proceso de adsorción de las moléculas por los grupos funcionales de la superficie aparenta ser significativa en la velocidad. Por eso, muchas veces las adsorciones de segundo orden son referidas como quimiosorciones.

El análisis detallado de los datos experimentales se da por el ajuste de los resultados a las ecuaciones (3) y (4) y comparación de los coeficientes de determinación (R^2). En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 8. Valores de R^2 para las cinéticas de remoción inactiva. VM = verde malaquita.

Modelo cinético	<i>A. ustus</i>		<i>P. janthinelum</i>		<i>T. longibrachiatum</i>	
	VM	Zn	VM	Zn	VM	Zn
Primer-orden	0.99	0.05	0.99	0.02	0.99	0
Segundo-orden	0.94	0.99	0.94	0.99	0.93	0.99

Por los valores obtenidos se puede observar que la cinética de primer-orden describe mejor los datos experimentales con el colorante verde malaquita, mientras la de segundo-orden se adecua mejor a los experimentos con el metal zinc.

Esta diferencia en el comportamiento se puede deber a la presencia de un sistema pi en la molécula de colorante lo que permite el efecto conocido por *aromatic stacking* (apilamiento aromático), llevando a la formación de capas de colorante sobre la superficie del adsorbente (Hunter & Sanders, 1990). Esto significa que la adsorción no se detiene al momento en que se agotan los sitios disponibles en la superficie del material, sino que sigue con la adsorción sobre moléculas ya adsorbidas, resultando en un modelo cinético diferente del que se aplica al metal.

Se espera, por tanto, que la etapa limitante en la adsorción del verde malaquita sea la migración de las moléculas del medio acuoso a la superficie

de la biomasa, ya que la posibilidad de que esta se adsorba a una capa ya formada de moléculas permite una adsorción sin tantos obstáculos como la del metal, pues el átomo de metal presenta la necesidad de alcanzar un sitio disponible en la superficie del material para que se lleve a cabo la adsorción.

4.2.2 Isotermas de adsorción

Con el objetivo de comprender mejor el sistema de remoción, fueron realizadas isotermas de adsorción para el colorante y para el metal, separadamente.

Las isotermas se encuentra representadas en la figura 8 para el verde malaquita y en la figura 9 para el zinc.

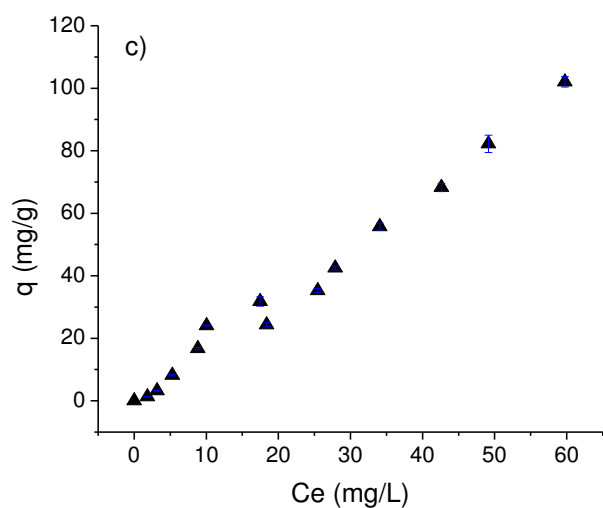
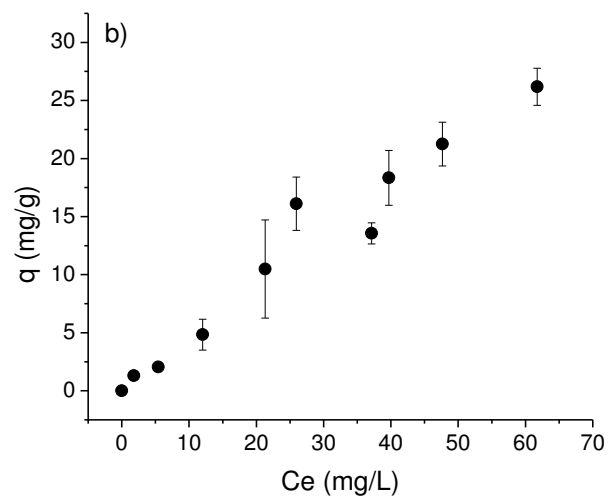
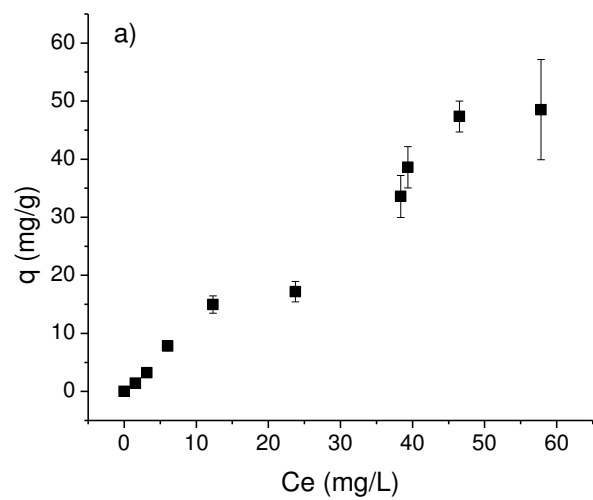


Figura 9. Isotermas obtenidas para el verde malaquita. a) *A. ustus* b) *P. janthinelum* c) *T. longbrachiatum*

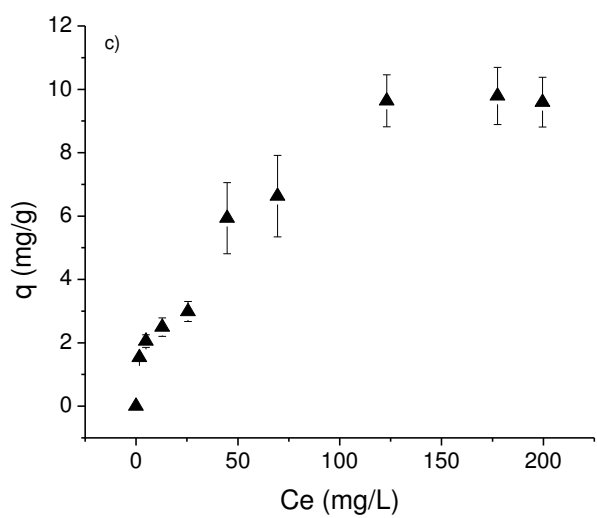
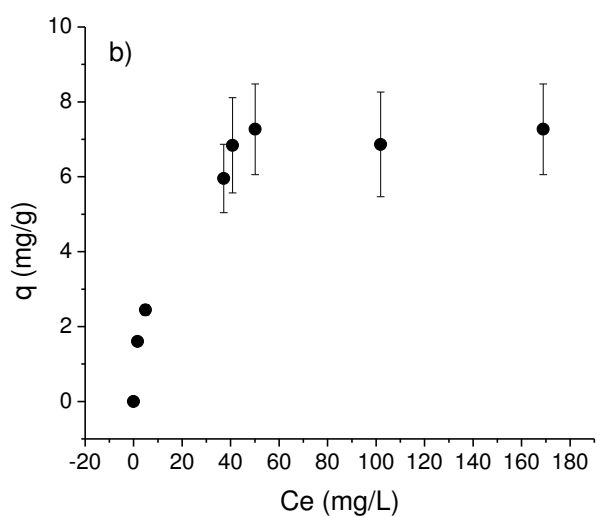
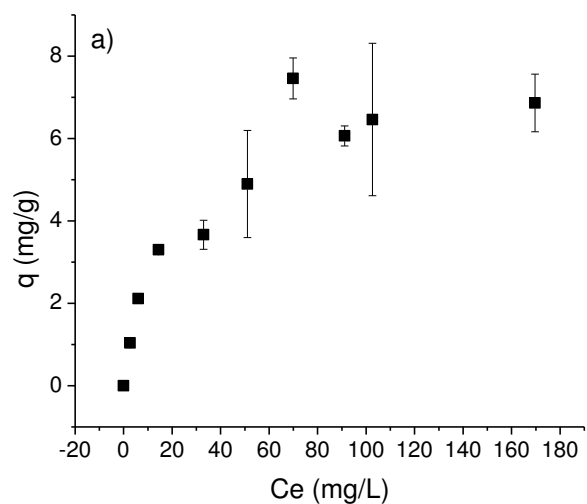


Figura 10. Isothermas obtenidas para el zinc. a) *A. ustus* b) *P. janthinelum* c) *T. longbrachiatum*

Tras la realización de las isothermas, la siguiente etapa es llevar a cabo un ajuste de los modelos mencionados en 1.2. La tabla 9 presenta los valores de los coeficientes de determinación para los ajustes realizados.

Tabla 9. Valores de R² para los ajustes de los modelos de isothermas.

Modelo	<i>A. ustus</i>		<i>P. janthinelum</i>		<i>T. longibrachiatum</i>	
	<i>VM</i>	<i>Zn</i>	<i>VM</i>	<i>Zn</i>	<i>VM</i>	<i>Zn</i>
<i>Langmuir</i>	0.17	0.96	0.03	0.99	0.17	0.92
<i>Freundlich</i>	0.95	0.23	0.92	0.92	0.93	0.90

De manera general, el modelo de Langmuir explica mejor las isothermas con el metal, mientras el modelo de Freundlich se ajusta a las isothermas con el colorante con una R² mayor.

Como fue explicado anteriormente, el modelo de Freundlich no presenta entre sus suposiciones la limitación de la formación de una monocapa de adsorbato. Para el colorante verde malaquita – una molécula con sistema pi de orbitales moleculares – puede ocurrir la formación del efecto *pi stacking* (o apilamiento pi) en el cual sucede la adsorción de moléculas sobre otras moléculas de colorante (Chen, 2009). Este modelo, por definición, no permite el cálculo de una q_{max} teórica.

Por otro lado, para las isothermas con el zinc se nota un mejor ajuste del modelo de Langmuir, lo que tiene coherencia con el hecho de que este

modelo supone la formación de una monocapa de adsorbato. Debido a su naturaleza, es posible calcular un valor de q_{\max} , y compararla con el valor de q_{\max} obtenido experimentalmente. Ambos valores se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de q_{\max} de Zn(II) para las biomásas estudiadas.

Cepa	q_{\max} calculada (mgZn/g biomasa)	q_{\max} experimental (mgZn/g biomasa)	Error
<i>A. ustus</i>	8.0	6.4	0.20
<i>P. janthinelum</i>	7.3	6.9	0.06
<i>T. longibrachiatum</i>	11.9	9.7	0.18

El error generado en la diferencia entre la q_{\max} calculada por el modelo de Langmuir y la q_{\max} experimental encuentra su justificación en dos factores. El primero se debe al valor de la R^2 , que no es 1, lo que significa que el ajuste del modelo no es perfecto. El segundo se explica por el hecho de que una de las suposiciones del modelo de Langmuir es que la energía de adsorción es constante. (Kapoor & Viraraghavan, 1995) Esto implicaría en la ausencia de interacción entre las especies adsorbidas y las especies en solución. En la práctica, puede ocurrir una interacción entre ellas, y la presencia de muchos átomos de zinc adsorbidos alrededor de un determinado sitio de adsorción disponible puede repeler un átomo en solución e impedir su acceso a este

sitio. Esto hace con que el valor real de q_{\max} sea menor que el valor calculado por el modelo.

La tabla 11 presenta algunas capacidades máximas de adsorción Zn(II) registradas en la literatura, así como los valores obtenidos en este trabajo, para comparación. Cabe resaltar que el variado rango de valores se debe a muchos factores, como concentración inicial de contaminante, tamaño de partícula de biomasa, pH de trabajo, temperatura y pretratamiento de la biomasa.

Tabla 11. Valores de capacidad máxima de adsorción utilizando biomasa de diferentes hongos.

Biomasa	Adsorbato	q_{\max} (mg/g)	Referencia
<i>Aspergillus oryzae</i>	Zn(II)	18	(Volesky, 1994)
<i>Aspergillus niger</i>	Zn(II)	3.8	(Vale, et al., 2016)
<i>Mucor rouxii</i>	Zn(II)	7.8	(Yan & Viraraghavan, 2003)
<i>Claviceps paspali</i>	Zn(II)	1.0	(Luef, et al., 1991)
<i>Aspergillus ustus</i>	Zn(II)	6.4	Este trabajo
<i>Penicillium janthinelum</i>	Zn(II)	6.9	Este trabajo
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Zn(II)	9.7	Este trabajo

4.2.3 Recuperación del metal adsorbido

La fracción de zinc recuperada en cada caso está presentada en la tabla 12.

Tabla 12. Recuperación de Zn(II) en la desorción ácida.

Cepa	Zinc recuperado (%)
<i>A. ustus</i>	72 ± 11
<i>P. janthinelum</i>	74 ± 21
<i>T. longibrachiatum</i>	70 ± 19

Obtener buenos valores de recuperación del metal es atractivo, además de que significa que la capacidad de regeneración de la biomasa permite su uso más de una vez, mejorando así la relación costo/beneficio del método.

La tabla 13 presenta los valores de recuperación de algunos biomateriales en la literatura.

Tabla 13. Recuperación de Zn(II) adsorbidos para distintas biomazas fúngicas.

Material	Adsorbato	% Recuperación	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	Zn(II)	70	(Mali, et al., 2014)
<i>Aspergillus flavus</i>	Zn(II)	81.3	(Aftab, et al., 2017)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Zn(II)	71.3	(Aftab, et al., 2017)
<i>Paecilomyces formosus</i>	Zn(II)	70.1	(Aftab, et al., 2017)

Es posible observar que los valores de recuperación de zinc reportados por otros investigadores son muy similares a los obtenidos en este estudio.

4.2.4 Elucidación del mecanismo de remoción con biomasa seca

Los modelos de cinética obtenidos presentan evidencias de que para el colorante ocurre una fisiosorción, mientras que para el metal ocurre una quimiosorción.

Sin embargo, el hecho de que la desorción fue posible para la recuperación de los iones de Zn(II) es una evidencia de que la remoción se basa en la atracción de cargas, y no en la formación de enlaces químicos. La interacción adsorbato-adsorbente en los sistemas estudiados en este trabajo se basan en la carga positiva de los contaminantes y la carga negativa de la superficie de los hongos, producto del pH del medio, que se encuentra a valores más altos que los potenciales de carga cero de las biomásas. Esto es reforzado por el hecho de que se logró una desorción satisfactoria del metal con una solución ácida, lo que se debe a que el pH ácido del medio cambia la distribución de cargas en la superficie de la biomasa, donde pasan a existir grupos cargados positivamente, repeliendo los átomos de Zn(II).

De igual manera, las isotermas de Freundlich (verde malaquita) y Langmuir (Zinc) se basan en una adsorción reversible, consecuencia de una interacción de cargas débil.

Por estas razones, es probable que la remoción del metal en medio acuoso se dé por atracción de cargas opuestas y formación de enlaces débiles (van der Waals).

4.3 Pruebas de remoción de Zn (II) y Verde de Malaquita en medio de cultivo

4.3.1 Resultados para *A. ustus* y *P. janthinelum*

Las cepas de *A. ustus* y *P. janthinelum*, en pruebas preliminares, no demostraron la habilidad de remover simultáneamente ambos contaminantes.

Por esta razón, la cepa de *T. longibrachiatum* fue seleccionada para seguir con las pruebas de remoción y optimización.

4.3.1 Resultados para *T. longibrachiatum*

La tabla 14 presenta los experimentos realizados en el diseño Box-Behnken y sus respectivos resultados para *T. longibrachiatum*.

Tabla 14. Experimentos realizados en el diseño Box-Behnken y resultados para *T. longibrachiatum*.

<i>Run</i>	pH	Tiempo (h)	Medio	Remoción color (%)	Remocion Zn(II) (%)
1	2	24	50%/50%	15	12
2	6	24	50%/50%	98	2
3	2	72	50%/50%	12	0
4	6	72	50%/50%	98	51
5	2	48	PDB	4	1
6	6	48	PDB	97	99
7	2	48	Lee	6	0
8	6	48	Lee	99	15

9	4	24	PDB	94	58
10	4	72	PDB	99	100
11	4	24	Lee	96	4
12	4	72	Lee	99	31
13	4	48	50%/50%	99	19
14	4	48	50%/50%	98	16
15	4	48	50%/50%	99	20

El análisis de la superficie de respuesta fue realizado en el *software* Design Expert. El ANOVA de los modelos para remoción de color y de Zn(II) están representados en las figuras 11 y 12.

ANOVA for Response Surface Quadratic Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	23162.55	9	2573.62	240.78	< 0.0001
A-pH	15854.36	1	15854.36	1483.26	< 0.0001
B-Tiempo	1.55	1	1.55	0.15	0.7188
C-Medio	4.51	1	4.51	0.42	0.5446
AB	0.62	1	0.62	0.058	0.8192
AC	8.120E-004	1	8.120E-004	7.597E-005	0.9934
BC	1.25	1	1.25	0.12	0.7463
A ²	7221.02	1	7221.02	675.56	< 0.0001
B ²	5.47	1	5.47	0.51	0.5065
C ²	34.50	1	34.50	3.23	0.1323
Residual	53.44	5	10.69		
Lack of Fit	52.92	3	17.64	67.77	0.0146
Pure Error	0.52	2	0.26		
Cor Total	23215.99	14			

Figura 11. ANOVA del modelo obtenido para remoción de color.

Analizando los resultados a un nivel de confianza del 95% se observa que el valor de probabilidad (p) para ambos modelos es menor que 0.05, lo que significa que el modelo obtenido es significativo y describe satisfactoriamente los puntos experimentales. De igual manera observarse que el *lack of fit* (falta de ajuste) también es significativo. Sin embargo, la falta de ajuste es apenas uno de los muchos factores que uno puede utilizar para evaluar si el modelo es apropiado. Un factor importante es el comportamiento de los residuales.

ANOVA for Response Surface Quadratic Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	14941.61	9	1660.18	8.39	0.0153
A-pH	2969.76	1	2969.76	15.00	0.0117
B-Tiempo	1375.29	1	1375.29	6.95	0.0462
C-Medio	5418.71	1	5418.71	27.38	0.0034
AB	930.36	1	930.36	4.70	0.0823
AC	1730.94	1	1730.94	8.74	0.0316
BC	48.95	1	48.95	0.25	0.6401
A ²	432.77	1	432.77	2.19	0.1993
B ²	265.48	1	265.48	1.34	0.2991
C ²	1667.50	1	1667.50	8.42	0.0337
Residual	989.69	5	197.94		
Lack of Fit	978.85	3	326.28	60.15	0.0164
Pure Error	10.85	2	5.42		
Cor Total	15931.30	14			

Figura 12. ANOVA del modelo obtenido para remoción de Zn(II).

Una de las suposiciones del análisis clásico de regresión dice que los residuales deben distribuirse de manera normal para que la regresión realizada sea considerada válida. Las figuras 13 y 14 presentan los

residuales para los modelos obtenidos. Se puede notar que los residuales presentan comportamiento normal. Esto es una evidencia de que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales.

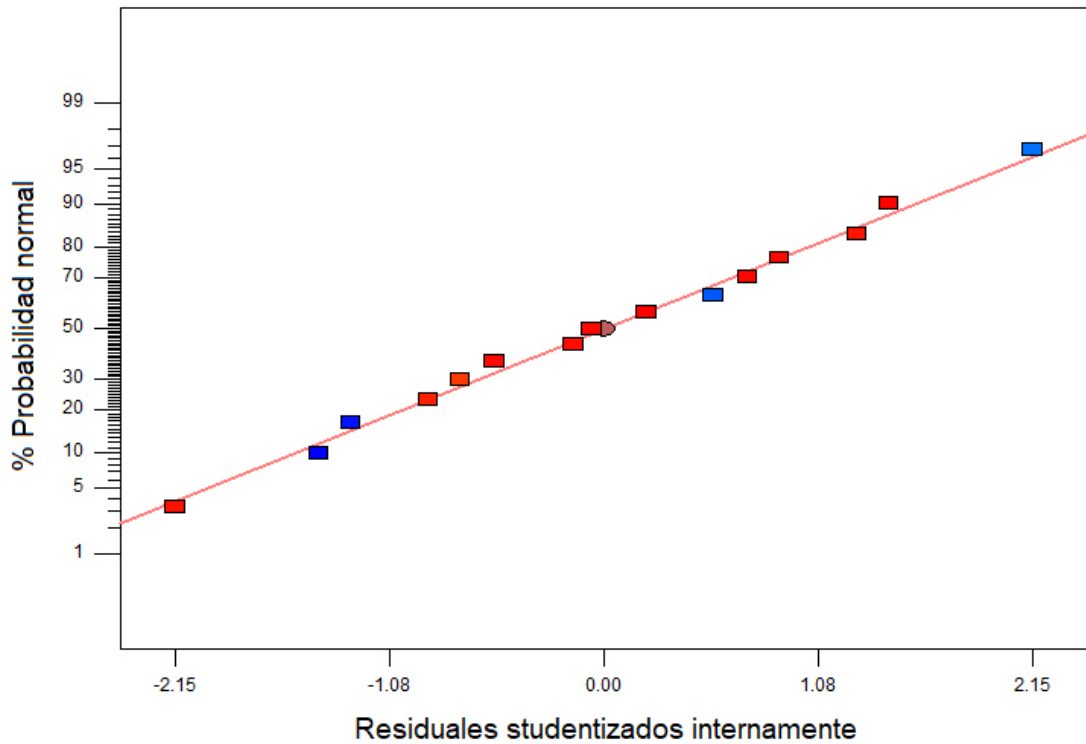


Figura 13. Gráfica de los residuales normalizados para el modelo de remoción de color.

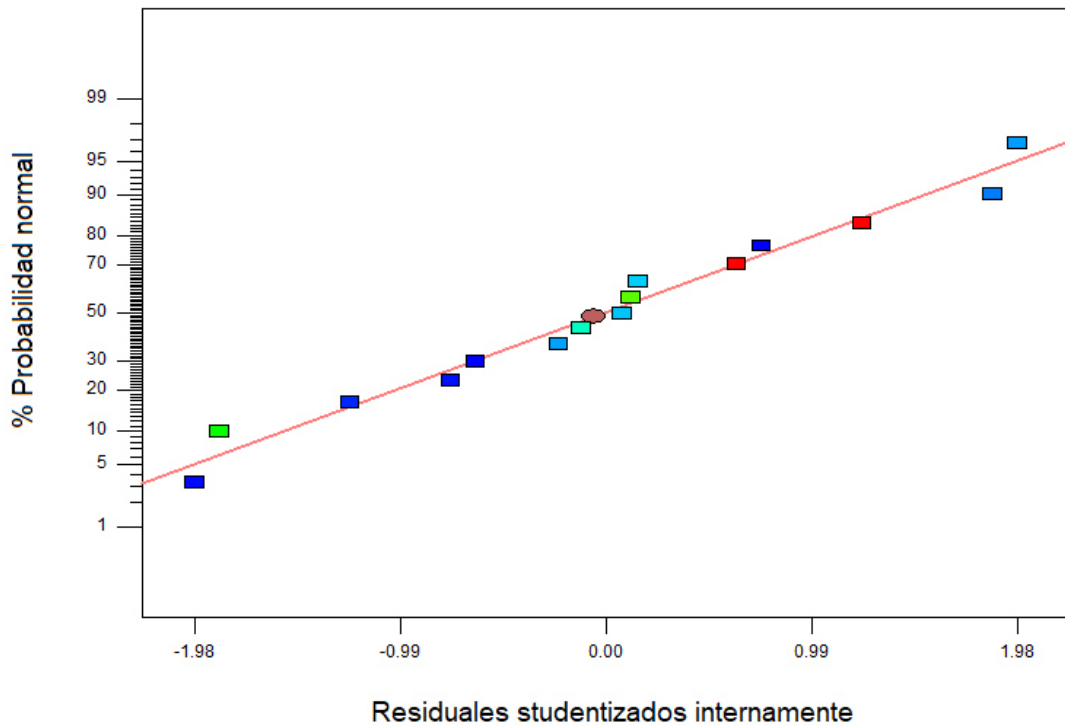


Figura 14. Gráfica de los residuales normalizados para el modelo de remoción de Zn(II).

Validado el modelo, es posible utilizarlo para hacer predicciones y evaluar la influencia de los factores.

Para la remoción de color, el ANOVA demuestra que solamente el pH tiene influencia significativa en la remoción ($p < 0.05$). De manera gráfica, esto se puede observar en las figuras 15 a 17. Los valores más altos de remoción son obtenidos en pH entre 4 y 6, independiente del medio y del tiempo. Es posible concluir también que a partir de las 24 horas ya se tiene la remoción de color estabilizada.

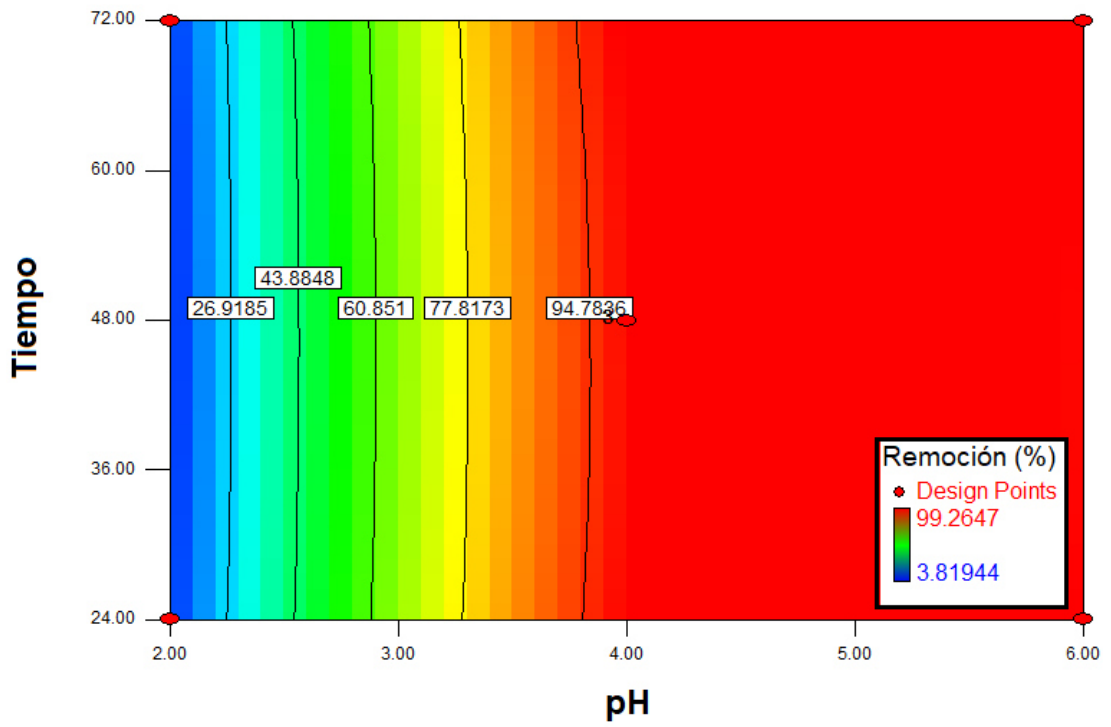


Figura 15. Análisis de pH x Tiempo para remoción de color.

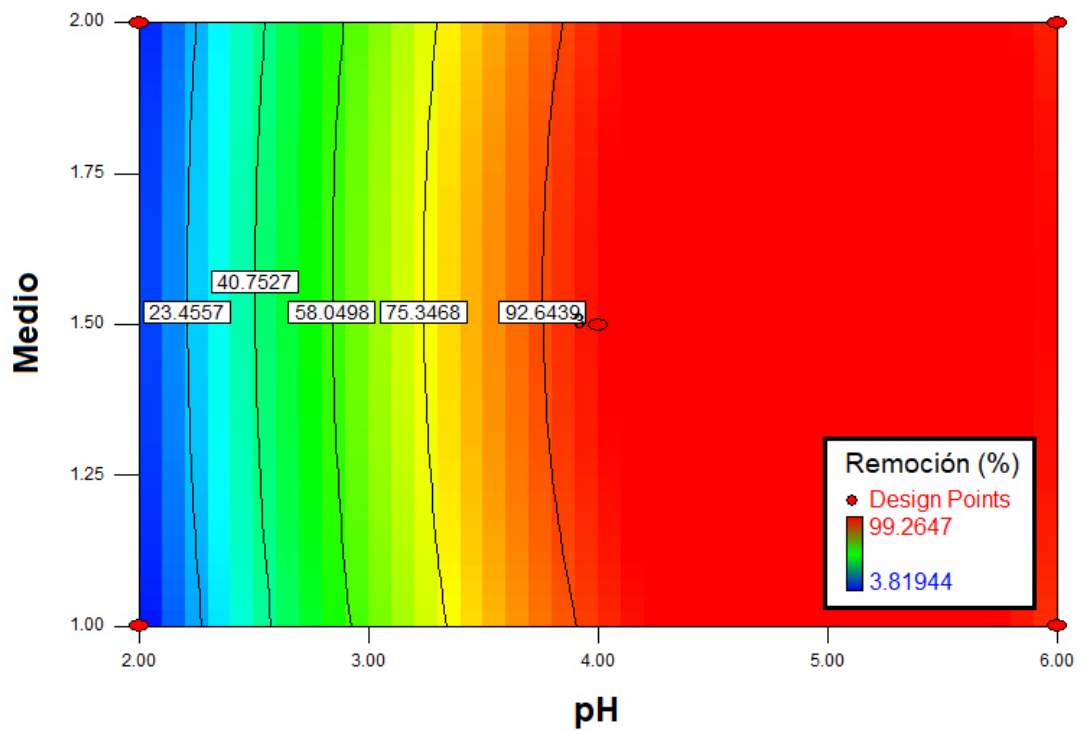


Figura 16. Análisis de pH x Medio para remoción de color.

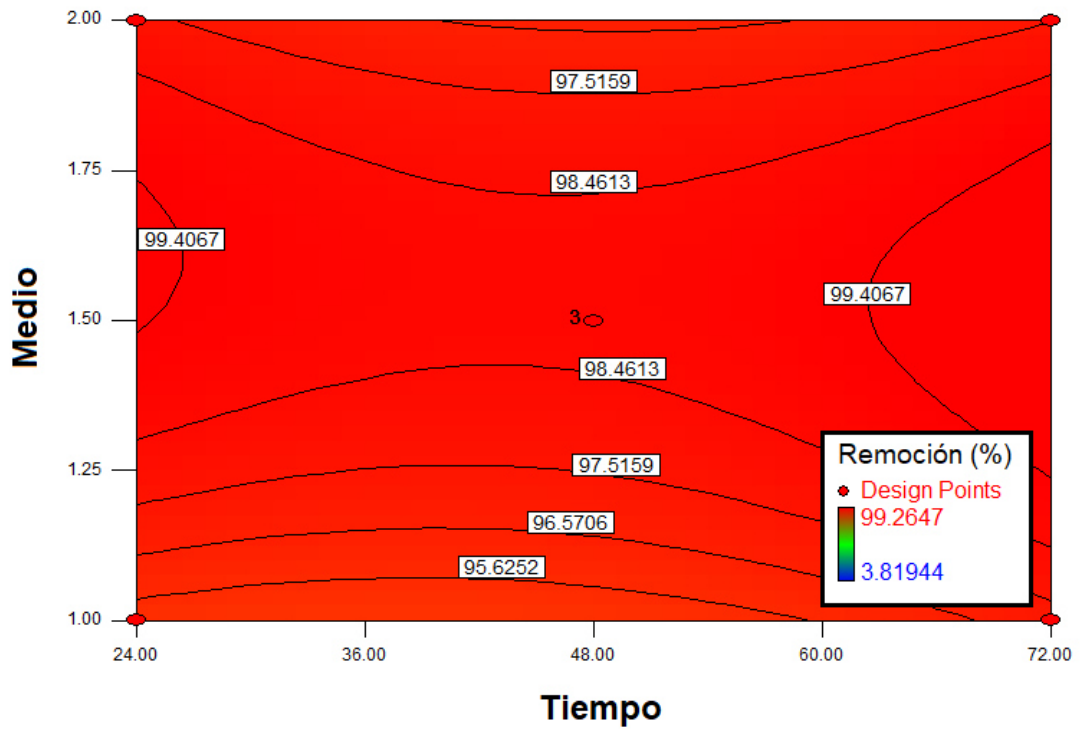


Figura 17. Análisis de Tiempo x Medio para remoción de color.

Para la remoción de Zn(II), el ANOVA presenta que los tres factores analizados afectan la remoción ($p < 0.05$). Se observa que los mejores valores de remoción (mayores que 99%) pueden ser obtenidos a pH 6, tiempo de 72h y medio PDB. Las superficies obtenidas se encuentran representadas en las figuras 18 a 20.

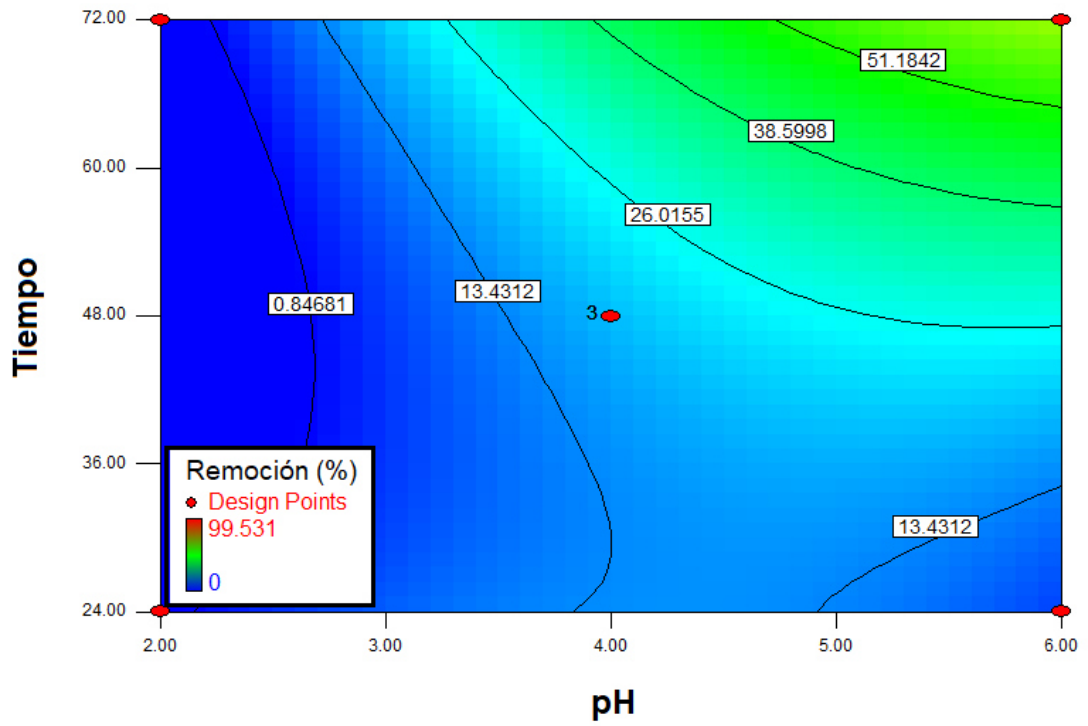


Figura 18. Análisis de pH x Tiempo para remoción de Zn(II).

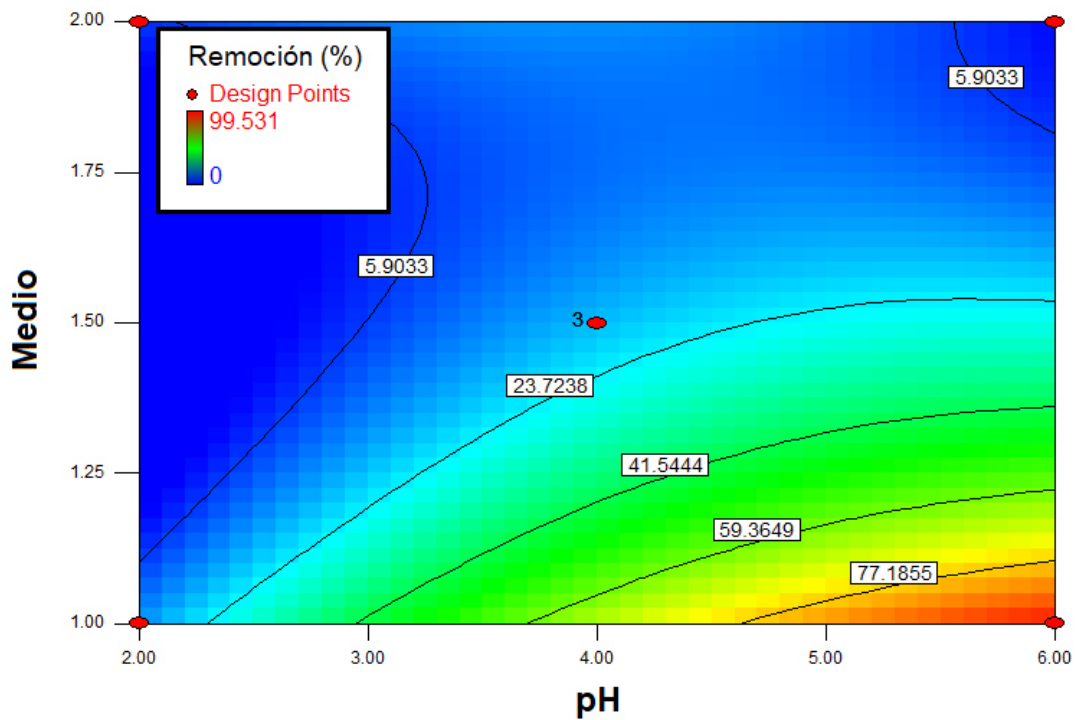


Figura 19. Análisis de pH x Medio para remoción de Zn(II).

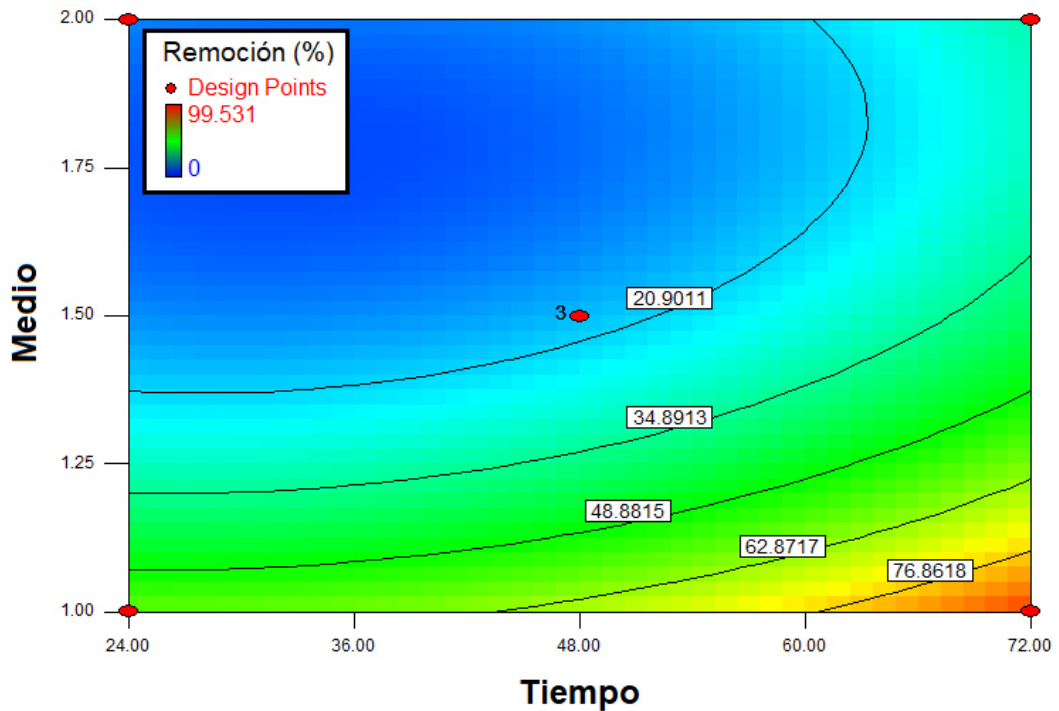


Figura 20. Análisis de Tiempo x Medio para remoción de Zn(II).

4.3.1.1 Prueba de remoción en las condiciones óptimas

Utilizando el software Design Expert, se obtuvo distintas soluciones con deseabilidad de 1, lo que significa que la remoción de ambos contaminantes se encuentra en su punto máximo.

La solución elegida para comprobación fue de pH 6, 68 horas y medio PDB. Los resultados esperados y obtenidos para esa prueba se encuentran representados en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados esperados y obtenidos en el punto óptimo del modelo.

Factor	Nivel	Remoción Zn		Remoción Color	
		<i>Esperado</i>	<i>Obtenido</i>	<i>Esperado</i>	<i>Obtenido</i>
pH	6	100%	98.6%	99.5%	99.6%
Tiempo	68				
Medio	PDB				

4.4 Elucidación del mecanismo de remoción en medio de cultivo

4.4.1 Mecanismo de *T. longibrachiatum*

La figura 21 presenta imágenes obtenidas con microscopio óptico de campo claro con 100x de aumento de las células de la cepa de *T. longibrachiatum* antes y después de la remoción activa de una mezcla de zinc y verde malaquita.

En las células que crecieron en medio de cultivo sin contaminante presentan estructura normal, con la pared celular y el núcleo de las células visibles en la imagen (A). Las células que tuvieron su crecimiento en el medio adicionado con los contaminantes evidencian el surgimiento de estructuras circulares en el espacio citoplasmático.

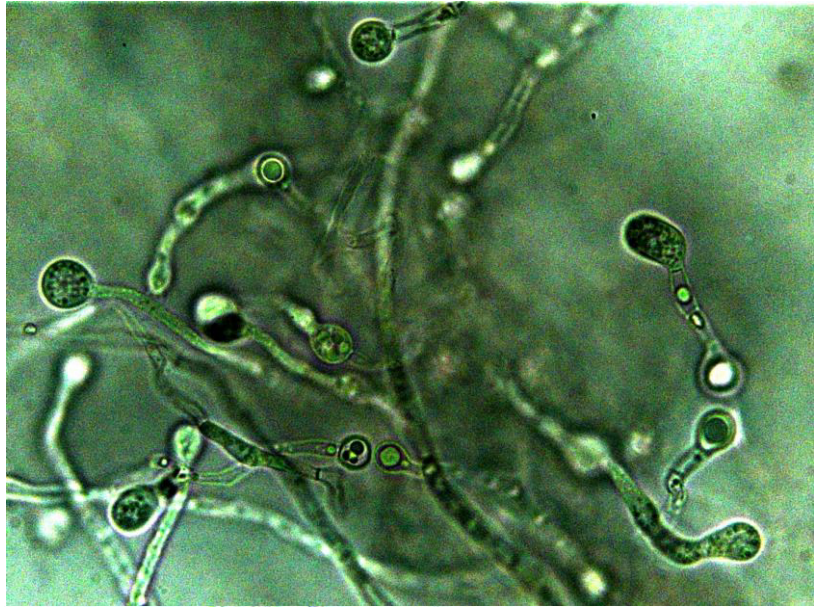
El citoplasma es importante para que las células activas interactúen con iones metálicos. Tras su entrada en la célula, los iones metálicos son compartimentalizados en diferentes organelas subcelulares (e.g. mitocondria, vacuolas etc). (Wang & Chen, 2009) Las estrategias de acumulación del metal pueden ser diferentes para metales esenciales y no

esenciales. Para metales esenciales, limitar su absorción o la excreción activa, almacenamiento en una forma inactiva o excreción del metal almacenado son las principales vías. (Vijver, et al., 2004).

El zinc es un micronutriente, sin embargo, en exceso es tóxico para las células fúngicas. Ramsay y Gadd (1997) demostraron que cepas fúngicas que no presentaban vacuolas expresaban una sensibilidad mucho más grande y tenían significativamente reducida su capacidad de asimilación de Zn, Mn, Co y Ni.

Además de eso, Ghosh et al. (2017) observaron bioacumulación del colorante acid black 52 por *Aspergillus tamarii*.

(A)



(B)

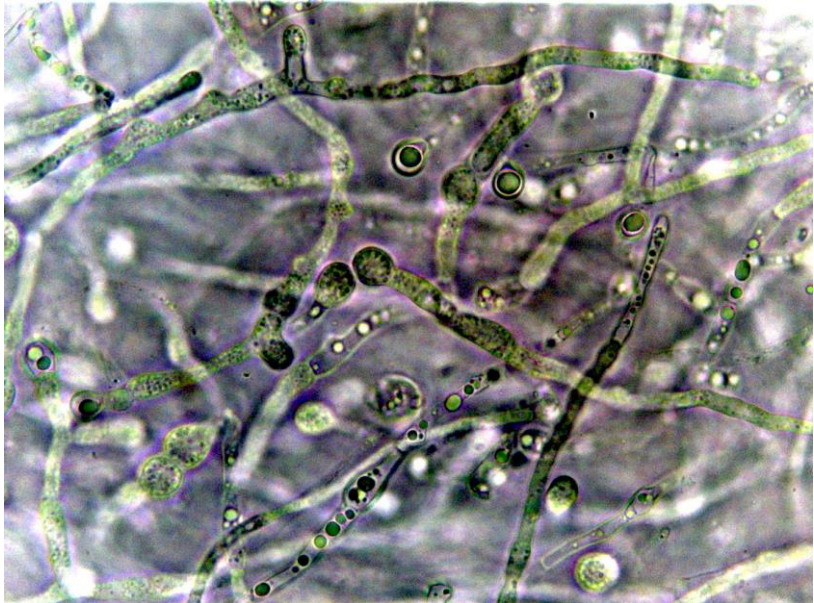


Figura 21. Células de *T. longibrachiatum* tras crecimiento en medio sin y con contaminantes (A y B respectivamente).

Por tanto, las diferencias estructurales muy probablemente se deben a la bioacumulación de los contaminantes, sin embargo, no se descarta que esté ocurriendo un mecanismo combinado de biosorción y bioacumulación, se requiere de hacer otros estudios para comprobarlo.

Capítulo 5

Conclusiones

Las biomasas, el colorante verde malaquita y el metal Zn(II) fueron caracterizados con el objetivo de conocerlos y definir un pH de trabajo para las pruebas con biomasa seca.

Las cepas de *Aspergillus ustus*, *Penicillium janthinelum* y *Trichoderma longibrachiatum* estudiadas en este trabajo presentaron la capacidad de remover el colorante verde malaquita y el metal zinc en medio acuoso y en medio de cultivo.

En medio acuoso fue posible determinar los modelos cinéticos y de isothermas que mejor describen los resultados experimentales. La adsorción del colorante es mejor descrita por un modelo cinético de 1^{er} orden e isoterma de Freundlich, mientras que la del metal es mejor descrita por un modelo cinético de 2^a orden e isoterma de Langmuir.

Se obtuvo evidencias de que el mecanismo de remoción de los contaminantes individuales en medio acuoso es adsorción por atracción de cargas y formación de enlaces de van der Waals.

Fue posible optimizar la remoción simultánea de colorante y metal para *T. longibrachiatum* en medio de cultivo utilizando un diseño Box-Behnken. Los factores optimizados fueron pH, tiempo y medio de cultivo. El modelo obtenido es significativo e indica que las mejores condiciones para la remoción de colorante son pH mayores que 4, independiente del medio, y que a partir de las 24h ya se estabiliza la remoción de color. Las mejores condiciones para la remoción de Zn(II) son pH 6, 72h y medio PDB.

La prueba realizada para comprobación del punto óptimo del modelo obtuvo resultados muy similares a los calculados por la solución utilizada, con error de 1.4% para la remoción de zinc y 0.1% para la remoción de color.

Las imágenes de microscopía óptica obtenidas presentan evidencias de que en medio de cultivo las células de *T. longibrachiatum* están bioacumulando los contaminantes. Sin embargo, puede estar pasando la adsorción junto con la bioacumulación.

Capítulo 6

Referencias bibliográficas

Aftab, K. et al., 2017. Fungal strains isolation, identification and application for the recovery of Zn (II) ions. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, Volume 175 , p. 282–290.

Anon., s.d. *Redefining Medicinal Mushrooms: A new scientific screening program for active compounds*. [Online]

Available at: <http://www.nammex.com/redefining-medicinal-mushrooms>

[Acesso em 24 09 2016].

Asgher, M. et al., 2008b. Laccase mediated decolorization of vat dyes by *Coriolus versicolor* IBL-04. *Int Biodetr Biodegr*, Volume 62, pp. 465-470.

Asgher, M., Bhatti, H., Ashraf, M. & Legge, R., 2008a. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, Volume 19, pp. 771-783.

Awasthi, M. et al., 2014. Evaluation of thermophilic fungal consortium for organic municipal solid waste composting. *Bioresour Technol*, Volume 168, p. 214–221.

Baik, W., Bae, J., Cho, K. & Hartmeier, W., 2002. Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof.. *Bioresour Technol.*, Volume 81, p. 167–170.

Bazrafshan, E., Zarei, A. & Mostafapour, F., 2015. Biosorption of cadmium from aqueous solutions by *Trichoderma fungus*: kinetic, thermodynamic, and equilibrium study, Desalination and Water Treatment. *Desalination and Water Treatment*, DOI: 10.1080/19443994.2015.1065764.

Brady, D. & Duncan, J., 1993. *Biohydrometallurgical Technologies*. WY: The Minerals, Metals and Materials Society.

Chen, Z. & L. A. & R. S.-M. C. & W. F., 2009. Self-assembled pi-stacks of functional dyes in solution: Structural and thermodynamic features. *Chemical Society reviews*, Volume 38, pp. 564-584.

- Cuong, N., Ishizaka, S. & Kitamura, N., 2012. Donnan electric potential dependence of intraparticle diffusion of malachite Green in single cation Exchange resin particles: a laser trapping-microspectroscopy study.. *Amer J of Anal Chem*, Volume 3, pp. 188-194.
- Das, S., Das, A. & Guha, A., 2007. A Study on the Adsorption Mechanism of Mercury on *Aspergillus versicolor* Biomass. *Environ. Sci. Technol.*, 41(24), pp. 8281-8287.
- De Gisi, S., Lofrano, G., Grassi, M. & Notarnicola, M., 2016. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: a review. *Sustain Mater & Technol*, Volume 9, pp. 10-40.
- De Rome, L. & Gadd, G., 1987. Copper adsorption by *Rhizopus arrhizus*, *Ladosporium resinae* and *Penicillium italicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Volume 26, p. 84–90.
- Dhankhar, R. & Hooda, A., 2011. Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environm Technol*, Volume 32:5, pp. 467-491.
- Duddridge, J. & Wainwright, M., 1980. Heavy metal accumulation by aquatic fungi and reduction in viability of *Gammarus pulex* fed Cd²⁺ contaminated mycelium. *Water Research*, 14(11), pp. 1605-1611.
- Dursun, A., 2006. A comparative study on determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of biosorption of copper (II) and lead (II) ions onto pretreated *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 28(2), pp. 187-195.
- Esposito, A., Pagnanelli, F. & Vegliò, F., 2002. pH-related equilibria models for biosorption in single metal systems. *Chem. Eng. Sci.*, Issue 57, p. 307–313.
- Fan, T. et al., 2008. Biosorption of cadmium (II), zinc (II) and lead (II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 160(2-3), pp. 655-661.
- Fu, Y. & Viraraghavan, T., 2001. Removal of Acid Blue 29 from an aqueous solution by *Aspergillus niger*. *Am. Assoc. Text. Chem. Color. Rev.* 1, pp. 36-40.
- Fu, Y. & Viraraghavan, T., 2002. Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. *Adv. Environ. Res.* 7, pp. 239-247.
- Galun, M. et al., 1984. Recovery of uranium(VI) from the solution using fungi II. Release from uranium loaded *Penicillium* biomass. *Water Air Soil Pollut*, Volume 21, p. 411–414.
- Ghaly, A., Anathashankar, R., Alhattab, M. & Ramakrishnan, V., 2014. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. *J Chem Eng Process Technol*, Volume 5:182.
- Ghosh, A., Dastidar, M. & Sreekrishnan, T., 2017. Response surface optimization of bioremediation of Acid black 52 (Cr complex dye) using *Aspergillus tamarii*. *Environm Technol*, 38(3), pp. 326-336.
- Gomi, N. et al., 2011. Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products. *Biodegradation*, Volume 22, pp. 1239-1245.

- Gou, M. et al., 2009. Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures. *J. Hazard. Mater.*, Volume 170, pp. 314-319.
- Goyal, N., Jain, S. & Banerjee, U., 2003. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Adv. Environ. Res.* 7, p. 311–319.
- Güzel, F., Shaygılı, H., Saygılı, G. & Koyuncu, F., 2015. New low-cost nanoporous carbonaceous adsorbent developed from carob (*Ceratonia siliqua*) processing industry waste for the adsorption of anionic textile dye: characterization, equilibrium and kinetic modeling. *J. Mol. Liq.*, Volume 206, pp. 244-255.
- Huleihela, M. et al., 2018. Differentiation of mixed soil-borne fungi in the genus level using infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Photochemistry & Photobiology*, Volume 180, pp. 155-165.
- Hunter, C. & Sanders, J., 1990. The nature of π - π interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 112(14), p. 5525–5534.
- Husain, M. & Husain, Q., 2007. Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review. *Crit Rev Env Sci Technol*, Volume 38, pp. 1-42.
- Kalmis, E., Azbar, N. & Kalyoncu, F., 2008. Evaluation of two wild types of *P. ostreatus* (MCC07 and MCC20) isolated from nature for their ability to decolorize Benazol Black ZN textile dye in comparison to some commercial types of white rot fungi: *P. ostreatus*, *P. djamor*, and *P. citrinopileatus*. *Can. J. Microbiol.*, Volume 54, pp. 366-370.
- Kapoor, A. & Viraraghavan, T., 1995. Fungal biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. *Biores Technol*, Volume 53, pp. 195-206.
- Kaushik, P. & Malik, A., 2009. Fungal dye decolorization: recent advances and future potential. *Environ. Int.*, Volume 35, pp. 127-141.
- Kratochvil, D. & Volesky, B., 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, 16(7), pp. 291-300.
- Lee, K., Buckley, H. & Campbell, C., 1975. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida Albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 13(2), pp. 148-153.
- Lodeiro, P., Barriada, J., Herrero, R. & De Vicente, M., 2006. The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium(II) and lead(II) removal: Kinetic and equilibrium studies. *Environ. Pollut.*, Volume 142, p. 264–273.
- Luef, E., Prey, T. & Kubicek, C., 1991. Biosorption of zinc by fungal mycelial wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*, Volume 34, p. 688–692.
- Mahapatra, D., Chanakya, H. & Ramachandra, T., 2014. Bioremediation and lipid synthesis through mixotrophic algal consortia in municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* , Volume 168, p. 142–150.
- Mali, A., Pandit, V. & Majumder, D., 2014. Biosorption and desorption of zinc and nickel from wastewater by using dead fungal biomass of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Technical Research and Applications*, 2(6), pp. 42-46.

- Meenambigai, P. et al., 2016. Biodegradation of heavy metals - A review. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 5(4), pp. 375-383.
- Miranda, R. et al., 2013. Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. *Bioresour. Technol.*, Volume 142, pp. 361-367.
- Mishra, A. & Malik, A., 2013. Recent advances in microbial metal bioaccumulation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, Volume 43, p. 1162–1222.
- Mishra, A. & Malik, A., 2014a. Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. *Bioresour Technol*, Volume 171, pp. 217-226.
- Mishra, A. & Malik, A., 2014b. Metal and dye removal using fungal consortium from mixed waste stream: optimization and validation. *Ecol. Eng.*, Volume 69, p. 226–231.
- Ozdemir, S. et al., 2013. Treatment of azo dye containing synthetic textile dye effluent using sulfidogenic anaerobic baffled reactor. *Bioresour. Technol.*, Volume 146, pp. 135-143.
- Puranik, P. & Paknikar, K., 1997. Biosorption of lead and zinc from solutions using *Streptovercillium cinnamomeum* waste biomass. *J. Biotechnol.*, Volume 55, p. 113–124.
- Qu, Y. et al., 2012. Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp. *TCL. J. Hazard. Mater.*, Volume 223-224, pp. 31-38.
- Qu, Y., Shi, S., Ma, F. & Yan, B., 2010. Decolorization of reactive dark blue K-R by the synergism of fungus and bacterium using response surface methodology. *Bioresour Technol* , Volume 101, pp. 8016-8023.
- Ramsay, L. & Gadd, G., 1997. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett*, Volume 152, p. 293–8.
- Ruta, L. et al., 2010. Removing heavy metals from synthetic effluents using “kamikaze” *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, Volume 85, p. 763–771.
- Sen, S., Raut, S., Bandyopadhyay, P. & Raut, S., 2016. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. *British Mycol Soc*, Volume 30, pp. 112-133.
- Shumete II, S. & Strandberg, G., 1985. Accumulation of metals by microbial cells. *Comprehensive Biotechnol.*, Volume 13, pp. 235-247.
- Siegel, S. et al., 1986. Biosorption of Pb and Cr by *Penicillium* preparations. *Water Air Soil Pollut.*, Volume 27, p. 69–75.
- Singh, H., 2006. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. NJ: John Wiley and Sons Inc..
- Srivastava, P. & Hasan, S., 2011. Biomass of *Mucor heimalis* for the biosorption of cadmium from aqueous solutions: equilibrium and kinetic studies. *BioResources*, 6(4), pp. 3656-3675.
- Sudha Bai, R. & Abraham, T., 2001. Biosorption of Chromium (IV) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*. *Biores Technol*, Volume 79, pp. 73-81.

- Tan, L., Ning, S., Zhang, X. & Shi, S., 2013. Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. *Bioresour. Technol.*, Volume 138, pp. 307-313.
- Vale, M., Nascimento, R., Leitão, R. & Santaella, S., 2016. Cr and Zn biosorption by *Aspergillus niger*. *Environ Earth Sci*, Volume 75, p. 462.
- Vázquez-Sauceda, M., Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J. & Pérez-Castañeda, R., 2011. Cadmium, lead and zinc concentrations in water, sediment and oyster (*Crassostrea virginica*) of San Andres Lagoon, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*, Volume 86, pp. 410-414.
- Vijver, M. et al., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environ Sci Technol*, Volume 38, pp. 4705-12.
- Volesky, B., 1994. Advances in biosorption of metals: selection of biomass types.. *FEMS Microbiol Rev*, 14(4), p. 291–302.
- Volesky, B. & Tsezos, M., 1981. Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnol. Bioeng.*, Volume 23, p. 583–604.
- Wang, J. & Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, Volume 27, p. 195–226.
- Yadav, A. et al., 2010. Removal of chromium and nickel from aqueous solution in constructed wetland: mass balance, adsorption–desorption and FTIR study. *Chem. Eng. J.*, Volume 160, p. 122–128.
- Yan, G. & Viraraghavan, T., 2001. Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *Mucor rouxii* biomass.. *Biores Technol*, Volume 78, pp. 243-249.
- Yan, G. & Viraraghavan, T., 2003. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Res*, Volume 37, p. 4486–4496.