



Original

## Desarrollo de un bioadsorbente laminar con *Phanerochaete chrysosporium* hipertolerante al cadmio, al níquel y al plomo para el tratamiento de aguas

Diana Morales-Fonseca<sup>a</sup>, Katherine Ruiz-Tovar<sup>a</sup>, María Mercedes Martínez-Salgado<sup>b</sup>, Ana Bertha Soto-Guzmán<sup>c</sup>, Ciro Falcony-Guajardo<sup>c</sup>, Refugio Rodríguez Vázquez<sup>d</sup> y Aura Marina Pedroza-Rodríguez<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

<sup>b</sup> Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

<sup>c</sup> Departamento de Física, Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, D. F., México

<sup>d</sup> Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, D. F., México

<sup>e</sup> Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 9 de junio de 2009

Aceptado el 15 de enero de 2010

On-line el 24 de marzo de 2010

#### Palabras clave:

Bioadsorción

*Phanerochaete chrysosporium*

Cadmio

Plomo

Níquel

### RESUMEN

**Antecedentes:** El uso de basidiomicetos para la remoción de metales es una alternativa con respecto a los métodos tradicionales, básicamente porque la biomasa actúa como un intercambiador natural al remover metales en solución.

**Objetivo:** Desarrollar un bioadsorbente laminar empleando el hongo basidiomicete con mayor resistencia al cadmio (Cd), al níquel (Ni) y al plomo (Pb).

**Métodos:** Se valoró la tolerancia de *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* frente a concentraciones ascendentes de sulfato de cadmio, acetato de plomo y cloruro de níquel. Se desarrolló un bioadsorbente a base de láminas de polietileno con biomasa fúngica, que se evaluó en columnas de burbujeo empleando agua residual sintética con los 3 metales con una concentración final de 300 mg/l. Finalmente, con un experimento complementario en matraces Erlenmeyer, se valoró el efecto de mayor cantidad de biomasa sobre la eficiencia de remoción.

**Resultados:** El hongo *P. chrysosporium* fue la cepa más tolerante a  $C_4H_6O_4Pb$  (10.000 mg/l), a  $Cl_2Ni$  (300 mg/l) y  $CdSO_4 \cdot 8H_2O$  (1.500 mg/l). En el reactor y bajo condiciones no ligninolíticas, el hongo removió el 69% de la demanda química de oxígeno, produjo enzimas como lignino peroxidasa (0,01 U/l) y manganeso peroxidasa (0,6 U/l) y se observó la acumulación de los metales en la pared. Al incrementar la biomasa a 1,6 (p/v) se favoreció la bioadsorción de los metales en la mezcla (el 57% para el Pb, el 74% para el Cd y el 98% para el Ni) y por separado (el 95% para el Pb, el 60% para el Cd y el 56% para el Ni). Se observó una competencia entre el Ni y el Pb por los ligandos de la pared.

**Conclusión:** Se desarrolló un novedoso sistema laminar a base de biomasa viable de *P. chrysosporium* que posee gran área superficial y tolera elevadas concentraciones de Cd, Ni y Pb, como alternativa para la remoción de metales en aguas.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Development of a laminar bioadsorbent with hypertolerant *Phanerochaete chrysosporium* to Cd, Ni and Pb for wastewater treatment

### ABSTRACT

#### Keywords:

Biosorption

*Phanerochaete chrysosporium*

Cadmium

Lead

Nickel

**Background:** The use of basidiomycetes for metal removal is an alternative to traditional methods. In this, the biomass acts as a natural ionic exchanger removing metals from solution.

**Objective:** To develop a laminar biosorbent using a basidiomycete fungus resistant to high Cd, Ni and Pb concentrations.

**Methods:** The tolerance of *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* was evaluated using increasing concentrations of the heavy metal salts, cadmium sulphate, lead acetate and nickel chloride. A biosorbent system was developed based on polyethylene sheets with a fungal biomass. It was evaluated in bubble columns using synthetic wastewater with the 3 metal salts at a rate of 300 mg/l. Finally, in a complementary experiment using shake flasks, the effect of a higher amount of biomass related to the metal removal efficiency was evaluated.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aurapedroza@yahoo.com (A.M. Pedroza-Rodríguez).

**Results:** *P. chrysosporium* strain was more tolerant to  $C_4H_6O_4Pb$  (10,000 mg/l),  $Cl_2Ni$  (300 mg/l) and  $CdSO_4 \cdot 8H_2O$  (1,500 mg/l). In a reactor, under non-ligninolytic conditions, the fungus removed 69% of the chemical oxygen demand and produced enzymes such as LiP (0.01 U/l) and MnP (0.6 U/l.). An accumulation of metals in the wall was observed. By increasing the biomass to 1.6 (w/v), the metal biosorption was favored in the mixture (57% Pb, 74% Cd, and 98% Ni) and separately (95% Pb, 60% Cd, and 56% Ni). Competition between Ni and Pb by ligands of the wall was observed.

**Conclusion:** A novel laminar system based on *P. chrysosporium* viable biomass was developed. It has a large surface area and tolerance to high concentrations of Cd, Ni and Pb. It seems to be an alternative for the removal of metals from water.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

A partir de actividades industriales, como electroplateado, pinturas, galvanoplastia, baterías, curtidos, textiles, entre otras, se generan aguas residuales con elevada concentración de metales pesados, sustancias persistentes con tendencia a la acumulación y a la magnificación en diferentes niveles tróficos<sup>8</sup>. Para su remoción se han utilizado diversos adsorbentes naturales a base de subproductos agroindustriales y microorganismos como bacterias, algas y hongos<sup>30</sup>, y han sido de especial interés los hongos de la podredumbre blanca por tener mayor capacidad de remoción, de acuerdo con sus características fisiológicas: a) su pared celular contiene subunidades del aminoazúcar N-acetilglucosamina unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$  1–4, que pueden remover los metales al formar uniones con ciertos grupos funcionales, como carboxilo y amino<sup>13,23</sup>; b) su crecimiento in vitro se puede controlar para favorecer la producción de biomasa en forma de una extensa red micelial con elevada área superficial, y actúa como un intercambiador natural<sup>12</sup>; c) toleran y transforman una amplia variedad de compuestos recalcitrantes, por la producción de enzimas ligninolíticas como lacasa (E.C. 1.10.3.2), manganeso peroxidasa (MnP) (E.C. 1.11.1.13), lignino peroxidasa (LiP) (E.C. 1.11.1.14) y versátil peroxidasa (E.C. 1.11.1.16). Estas enzimas pueden oxidar la lignina y los anillos aromáticos con similitud estructural, y se inducen por parte de concentraciones variables de metales<sup>21,22</sup>. Por esta razón, también podrían estar implicadas en la tolerancia a metales, ya que participan en la producción de sustancias orgánicas, como melaninas que se han relacionado con la remoción de éstos<sup>6</sup>.

Diferentes autores han reportado el uso de la biomasa fúngica libre, inmovilizada, viable e inactiva para la adsorción y la detoxificación de metales. El hongo *Trametes versicolor* se inmovilizó en perlas de carboximetilcelulosa para la adsorción de cadmio (Cd), y se observó que después de 1 h se removieron 153 mg/l a 25 °C<sup>31</sup>. El efecto de la mezcla de metales sobre la capacidad adsorptiva y la competencia por los grupos funcionales también se estudió empleando la biomasa viva y muerta de *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizada en alginato de sodio. Se demostró que tiene diferente afinidad por el Cd y el mercurio (Hg), ya que al emplear la biomasa viable se removieron 70 mg/l de Cd y 75 mg/l de Hg, mientras que la biomasa inactiva perdió sitios de unión al adsorber solamente 40 mg/l y 50 mg/l para el Cd y el Hg, respectivamente<sup>14</sup>. Un fenómeno similar se describió para el mismo hongo, pero empleando pellets de biomasa para la bioadsorción de Cd y plomo (Pb) en mezcla: se presentó una competencia entre los iones por los sitios de adsorción<sup>26</sup>. La remoción combinada entre biomasa y soporte también se demostró en un estudio con *T. versicolor* inmovilizado en perlas de carboximetilcelulosa para la remoción de cobre (Cu), Pb y zinc. De acuerdo con los resultados, el soporte y la biomasa actuaron de forma complementaria, y permitieron mayores niveles de remoción con células muertas inmovilizadas (1,84 mg/l de Cu, 1,11 mg/l de Pb y 1,67 mg/l de zinc)<sup>4</sup>.

En Colombia, la legislación que regula la calidad de las aguas residuales exige como límites de vertimiento en aguas residuales

industriales concentraciones de 0,2 mg/l, 0,003 mg/l y 0,1 mg/l para el níquel (Ni), el Cd y el Pb, respectivamente, pero en muchos casos, los estándares no se cumplen y se realiza el vertido al alcantarillado o a cuerpos receptores con concentraciones elevadas, lo que se convierte en un grave problema ambiental y se asocia con la magnificación a través de las cadenas tróficas. Por esto, es interesante evaluar microorganismos con características fisiológicas especiales para el tratamiento de este tipo de residuos<sup>7</sup>. En estudios previos, se ha demostrado que la biomasa viable de *P. chrysosporium* inmovilizada en espuma de poliuretano removió 1.537 mg/l del cromo total presente en el agua residual de curtido de pieles, y se la catalogó como una cepa tolerante al sulfato de cromo, ya que soportó concentraciones de 85.000 mg/l<sup>12</sup>.

Por esta razón, en el presente estudio se utilizó *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* y *T. versicolor*, y se los enfrentó a diferentes concentraciones de Cd, Pb y Ni con el fin de seleccionar la cepa más tolerante y desarrollar un sistema híbrido laminar como alternativa no convencional para el tratamiento de aguas residuales industriales con elevadas concentraciones de los 3 metales.

## Materiales y métodos

### Microorganismos

Los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* (Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia) y *P. chrysosporium* (Laboratorio de Compuestos Xenobióticos, Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, D. F., México) se reactivaron en cultivos de 8 días a 30 °C en agar extracto de salvado con la siguiente composición (en g/l): glucosa, 10; peptona, 5; extracto de levadura, 2;  $KH_2PO_4$ , 0,1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,05;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,076; agar, 15; extracto líquido de salvado de trigo, 175<sup>25</sup>.

### Concentración máxima tolerada para $C_4H_6O_4Pb$ , $Cl_2Ni$ y $CdSO_4 \cdot 8H_2O$

La tolerancia de las 3 cepas a diferentes concentraciones de Cd, Ni y Pb se realizó por medio de 2 experimentos identificados como prueba de tolerancia a bajas concentraciones (PTBC) y prueba de tolerancia a elevadas concentraciones (PTEC). En las PTBC se evaluó un rango de concentraciones entre 0,02 y 1,5 mg/l midiendo el crecimiento en mm a los 10 días de incubación a 30 °C. Por el contrario, en las PTEC se cuantificó diariamente el crecimiento radial durante el mismo tiempo y las concentraciones evaluadas oscilaron entre 15 y 11.000 mg/l. El montaje se realizó empleando cajas de Petri de 50 mm de diámetro que contenían 10 ml de agar Radha, cuya composición fue glucosa de 2,5 g/l,  $KH_2PO_4$  de 2,0 g/l,  $NH_4Cl$  de 0,050 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  de 0,5 g/l,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  de 0,01 g/l, tiamina de 100 µg/l y agar de 15 g/l. A este medio se añadieron 10 ml de una solución de elementos traza y el pH final fue de 6,8<sup>27</sup>. Al finalizar el proceso de esterilización, se

añadieron en concentraciones ascendentes las sales de cloruro de Ni ( $\text{NiCl}_3$ ), sulfato de Cd ( $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) y acetato de Pb ( $\text{CH}_3\text{COOPb}$ ). La inoculación se realizó al colocar un disco de agar, con los hongos previamente reactivados, en cada una de las cajas y al incubarlas a 30 °C durante 10 días. Como control negativo se utilizó el medio Radha libre de metales. La concentración máxima tolerada (CMT) se definió como el valor más alto de cada metal con el que se observó el crecimiento de los hongos; la concentración mínima inhibitoria se definió como la concentración más baja que inhibía el crecimiento fúngico.

#### Producción de biomasa para la inmovilización del soporte

Se tomaron 10 discos de agar colonizados con micelio, se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de caldo de extracto de salvado de trigo, y se incubaron durante 8 días a 30 °C y a 120 rpm. Al finalizar la propagación en el líquido, la biomasa se recuperó por filtración y se disgregó en un molino eléctrico durante 5 min a 1.000 rpm. El homogeneizado se resuspendió en agua destilada estéril hasta completar un volumen de 50 ml y se almacenó refrigerado a 4 °C para emplearlo como inóculo en la elaboración de los bioadsorbentes laminares.

#### Efecto del tamaño del poro del soporte y el tiempo de colonización sobre la cantidad de biomasa inmovilizada

Para evaluar el efecto del tiempo de colonización y el diámetro del poro de las mallas sobre la cantidad de biomasa fúngica inmovilizada, se realizó un diseño experimental 2<sup>2</sup> (tabla 1)<sup>19</sup>. Como variable de respuesta, se evaluaron los mg/cm<sup>2</sup> de biomasa inmovilizada sobre las láminas. El análisis de datos se realizó usando los programas SAS 9.0® y Desing Expert 6.0®, y los resultados se trataron con un modelo empírico que relaciona las respuestas cuantificadas con los factores evaluados y sus respectivos niveles. Para un diseño de 2 factores, el modelo de primer orden fue el siguiente:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Donde  $y$  correspondió a la variable dependiente,  $b_0$  fue el intercepto,  $b_1$  y  $b_2$  fueron los coeficientes lineales, y  $x_1$  y  $x_2$  fueron los factores o variables independientes.

#### Elaboración del bioadsorbente laminar para el diseño factorial y los reactores de 750 ml

En el diseño experimental se utilizaron mallas de 5 × 5 cm colocadas sobre cajas de Petri de 9 cm que contenían 15 ml de agar extracto de salvado de trigo. Se inocularon con 1,5 ml de la suspensión de biomasa fúngica y se incubaron a 30 °C durante 36 y 72 h.

La producción del bioadsorbente para los reactores se realizó de manera similar que la de las mallas pequeñas. Sin embargo, se realizó una modificación que consistió en utilizar mallas de 20 × 30 cm colocadas sobre bandejas de aluminio de 35 × 25 cm que contenían 150 ml del mismo agar. Posteriormente, se inocularon con 50 ml de la suspensión de biomasa y se incubaron a 30 °C durante 72 h. El peso seco de la biomasa final en cada bioadsorbente se realizó por medio del secado de las mallas con la biomasa a 80 °C durante 12 h y por medio del cálculo de los mg/cm<sup>2</sup> según la diferencia de pesos, teniendo en cuenta el peso inicial de las mallas.

#### Curvas de remoción para $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb}$ , $\text{Cl}_2\text{Ni}$ y $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ a 300 mg/l en la columna de burbujeo

Se utilizaron columnas de vidrio de 50 cm de largo y 5 cm de diámetro interno. Cada columna se inoculó con 2 mallas de 20 × 30 cm colonizadas con biomasa fúngica y 525 ml de medio Radha suplementado con la mezcla de metales a 300 mg/l (agua residual sintética). La temperatura y la aireación se mantuvieron constantes a 30 °C y a 1 l/min. Los muestreros se realizaron cada 24 h para determinar el pH, los azúcares reductores<sup>18</sup>, la actividad enzimática tipo MnP<sup>17</sup> y LiP<sup>29</sup>, la demanda química de oxígeno (DQO)<sup>10</sup> y el recuento de bacterias heterótrofas totales<sup>9</sup>. Las mallas colonizadas se secaron para calcular el peso seco final y realizar su estudio en el microscopio electrónico de barrido; se empleó un equipo JEOL JSM-6.300® adaptado a un detector de rayos X por dispersión de energía Noral Voyager II software 1100/1110® para llevar a cabo el microanálisis de los metales en porcentaje atómico por la técnica de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX).

Además, para demostrar si la biomasa fúngica libre tenía mayor afinidad por alguno de los metales, se realizó un experimento complementario empleando matraces Erlenmeyer de 500 ml, que contenían 170 ml de agua residual sintética, y metales por separado y en mezcla a una concentración final de 300 mg/l. Cada uno de éstos se inoculó con 1,6 (p/v) de biomasa y se incubaron durante 2 días a 30 °C y a 120 rpm. Se evaluaron los niveles de los metales pesados por absorción atómica<sup>10</sup>, pH, azúcares y microscopía electrónica acoplada a EDX.

## Resultados

En las PTBC, los 3 hongos soportaron todas las concentraciones de  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COOPb}$ ; asimismo, se observó un crecimiento radial de 50 mm a los 10 días de incubación, sin alteración ni en la morfología macroscópica, ni en la microscópica, ni en la presencia de melaninas difusibles en agar Radha. Los resultados de las PTEC mostraron que la tolerancia variaba de acuerdo con el tipo de metal y la concentración; el  $\text{NiCl}_3$  fue el más tóxico para los 3 microorganismos con una CMT de 30, 300 y 500 mg/l para *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *T. versicolor*,

**Tabla 1**

Efecto del diámetro del poro y el tiempo de colonización sobre la cantidad de biomasa inmovilizada por medio de un diseño factorial 2<sup>2</sup>

Tratamiento	Factor X <sub>1</sub> : diámetro del poro, mm	Factor X <sub>2</sub> : tiempo, d	Biomasa inmovilizada, mg/cm <sup>2</sup>
1	-1	-1	153 ± 2,8
2	+1	-1	155 ± 4
3	-1	+1	157 ± 1,9
4	+1	+1	137 ± 3,5
Factor X <sub>1</sub>	Nivel alto (+)	5 mm	
	Nivel bajo (-1)	2 mm	
Factor X <sub>2</sub>	Nivel alto (+)	3 d	
	Nivel bajo (-1)	1,5 d	

respectivamente. Con respecto al  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , las concentraciones fueron de 250, 1.500 y 1.500 mg/l para *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *T. versicolor*, respectivamente (fig. 1). El metal más tolerado fue el  $\text{CH}_3\text{COOPb}$ , con valores de 2.000, 10.000 y 5.000 mg/l para el mismo orden de microorganismos. De acuerdo con el análisis estadístico, los hongos *P. chrysosporium* y *T. versicolor* fueron significativamente más tolerantes a los 3 metales ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, al comparar el tiempo de crecimiento en presencia del metal, se determinó que *P. chrysosporium* presentó el mejor crecimiento, en un menor tiempo que *T. versicolor* ( $p < 0,0001$ ), y alcanzó valores de 10, 9 y 12 mm a los 5 y 2 días de incubación para el Ni, el Cd y el Pb, respectivamente. Por el contrario, el crecimiento máximo de *T. versicolor* fue de 5, 6 y 7 mm a los 8, 4 y 10 días, respectivamente.

#### Efecto del tamaño del poro del soporte y el tiempo de colonización sobre la cantidad de biomasa inmovilizada. Diseño factorial $2^2$

Los resultados del análisis de la variancia demostraron que el diámetro del poro de las mallas ( $X_1$ ) y el tiempo de colonización ( $X_2$ ) no tuvieron efecto significativo alguno ni por separado ni en conjunto sobre la cantidad de biomasa inmovilizada ( $p > 0,0001$ ), lo que determinó que el bioadsorbente laminar se podía elaborar tanto en las mallas de 5 mm como en las de 2 mm, en 36 o 72 h. No obstante, se seleccionó el tratamiento 3 por ser en el que retuvo la mayor cantidad de biomasa (157 mg/cm<sup>2</sup>, tabla 1).

#### Curvas de remoción de cadmio, níquel y plomo en la columna de burbujeo

Con respecto a la remoción de la DQO, el agua residual sintética tenía 1.700 mg/l de DQO, y en su mayoría la aportó la fuente de carbono, nitrógeno y bacterias heterótrofas ( $25 \times 10^2$  UFC/ml). Bajo estas condiciones, el bioadsorbente removió un 68% a las 48 h; posteriormente, se presentó una disminución del porcentaje equivalente a un 15%, que pudo haberse asociado con el incremento de los heterótrofos ( $30 \times 10^8$  UFC/ml) a medida que la biomasa fúngica absorbía los metales, lo que generó condiciones más favorables para las bacterias. Además, se presentó una correlación negativa significativa ( $p=0,0006$ ) entre el porcentaje de remoción de la DQO y la glucosa residual hasta el segundo día, lo que demostró que la fuente de carbono se utilizó para mantener

el metabolismo primario y favoreció la remoción de la materia orgánica representada en la disminución de la DQO. De la misma forma, la fuente de nitrógeno también se pudo asimilar e inmovilizar para la síntesis de compuestos como quitina, ADN, ARN y proteínas, entre otros. De acuerdo con estos resultados, el hongo inmovilizado fue más eficiente que el soporte solo, ya que en el control libre de biomasa la remoción no superó el 10% al quinto día. El consumo de glucosa se mantuvo constante hasta el cuarto día, en el que se presentó un descenso que pudo haber estado relacionado con el incremento de las bacterias heterótroficas ( $95 \times 10^3$  UFC/ml). En el control absoluto (agua residual sin adición de microorganismos), no se presentó remoción de la DQO, la glucosa osciló entre 3,4 y 3,7 g/l, y las poblaciones se mantuvieron durante todo el experimento en  $10 \times 10^2$  UFC/ml.

En la figura 2 se observa el comportamiento de las enzimas MnP y LiP en función del tiempo; las 2 se produjeron desde el comienzo del proceso, y alcanzaron la actividad más alta a los 2 días con 0,6 y 0,01 U/l (MnP y LiP, respectivamente). Se observó una correlación positiva altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) con la remoción de DQO, posiblemente porque la presencia de los metales generó una inducción al estimular la síntesis de melaninas, que pudieron participar de manera complementaria en la remoción y como mecanismo de protección para el hongo. Otro factor que afectó la actividad enzimática, especialmente en los últimos días, fue el cambio en el pH, ya que al iniciar la cinética se encontraba en 4,0 y gradualmente se fue incrementando hasta alcanzar un valor de 6,8.

#### Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de energía de rayos X

En la figura 3A se observan las características microscópicas del soporte empleado para la inmovilización. Éste correspondía a un material delgado con densidad baja y elevada área superficial, estructuralmente formado por hilos plásticos entrecruzados para formar una malla con diámetro de 2 mm. En la microfotografía del bioadsorbente laminar se observó una colonización total, y se destacaron la presencia de hifas delgadas y septadas, y la presencia de esporas sobre la superficie (fig. 3B). En el microanálisis de EDX se presentaron picos de carbono, oxígeno y nitrógeno que correspondieron a elementos constitutivos de la biomasa fúngica.

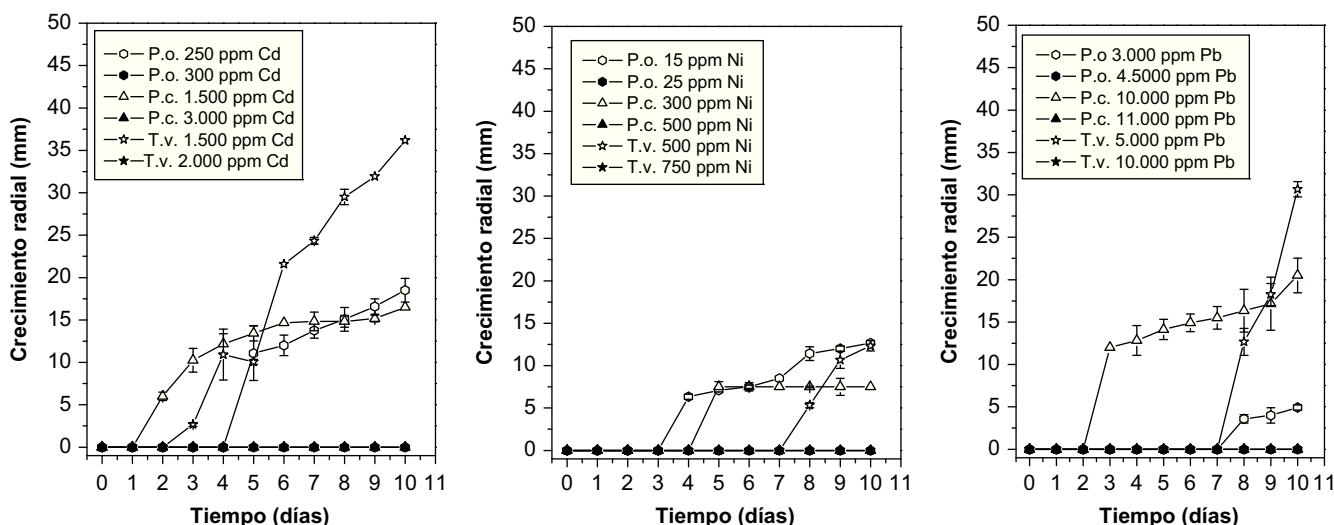


Figura 1. Determinación de la concentración máxima tolerada para  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{Cl}_2\text{Ni}$  y  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb}$  sobre agar Radha para los hongos de podredumbre blanca. Las viñetas oscuras corresponden a las concentraciones máximas toleradas y las claras a los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias. Incubación durante 10 días a 30°C. Cd: sulfato de cadmio; Ni: cloruro de níquel; Pb: acetato de plomo; P.o.: Pleurotus ostreatus; P.c.: Phanerochaete chrysosporium; T.v.: Trametes versicolor.

Respecto a la mezcla de los 3 metales, con la microscopía electrónica se observó que los 3 se adsorbió sobre la pared formando agregados de diferente tamaño (fig. 4). Esta disposición pudo determinar una posible competición por los grupos funcionales con capacidad de unión para los metales, situación que se corroboró con el microanálisis de EDX, en el que los porcentajes atómicos para cada metal fueron de 0,19, 0,64 y 5,1% para el  $\text{NiCl}_3$ , el  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  y el  $\text{CH}_3\text{COOPb}$  en el bioadsorbente, y de 0,09, 0,08 y 0,1% en la malla sin biomasa. La adsorción era 2, 8 y 50 veces más alta cuando la biomasa recubría la malla. La menor

adsorción de  $\text{NiCl}_3$  se correlacionó con las pruebas de tolerancia, ya que fue el metal más tóxico con una CMT de 300 mg/l.

#### Remoción de níquel, cadmio y plomo con biomasa viable sin inmovilizar

Para verificar el efecto de una mayor cantidad de biomasa y la posible competición entre metales por los ligandos de la pared se realizó un ensayo complementario en matraces Erlenmeyer, y se

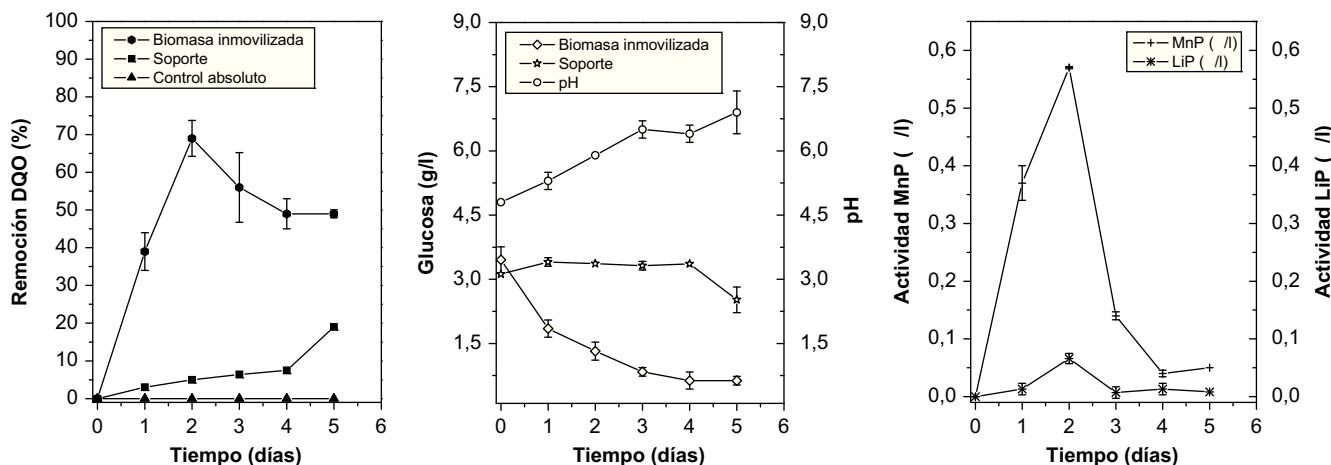


Figura 2. Curvas de remoción en la columna de burbujeo. Incubación durante 5 días a 30 °C y aireación a 1 l/min. DQO: demanda química de oxígeno; LiP: lignino peroxidasa; MnP: manganeso peroxidasa.

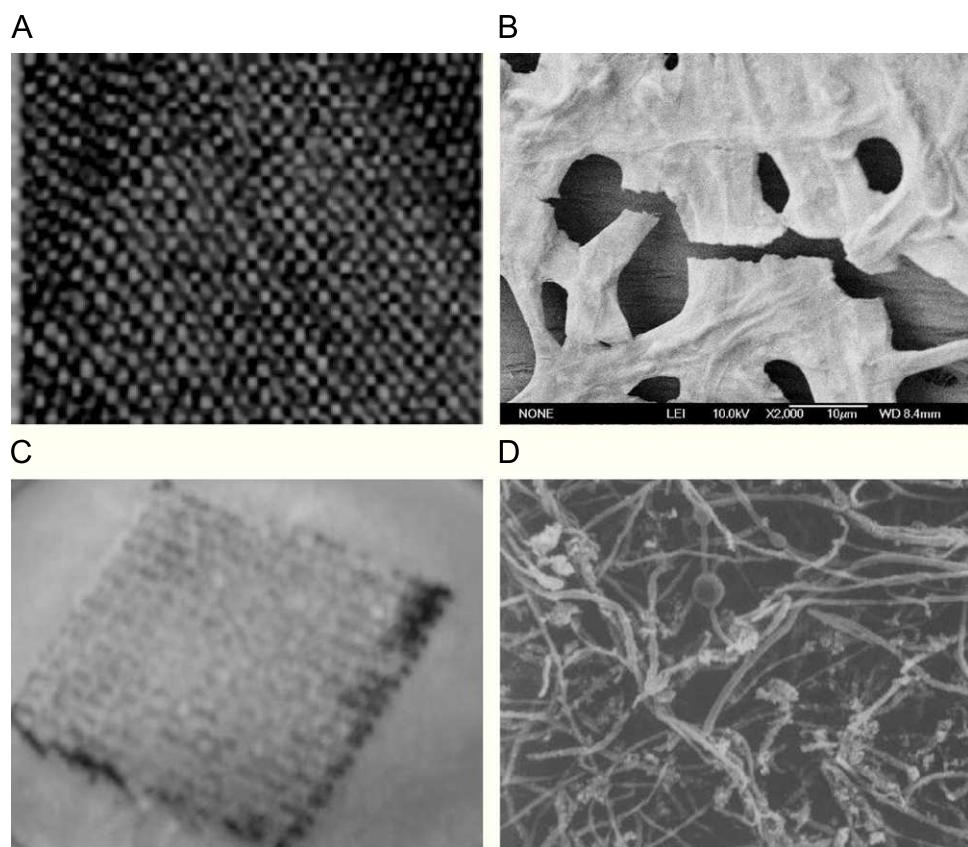
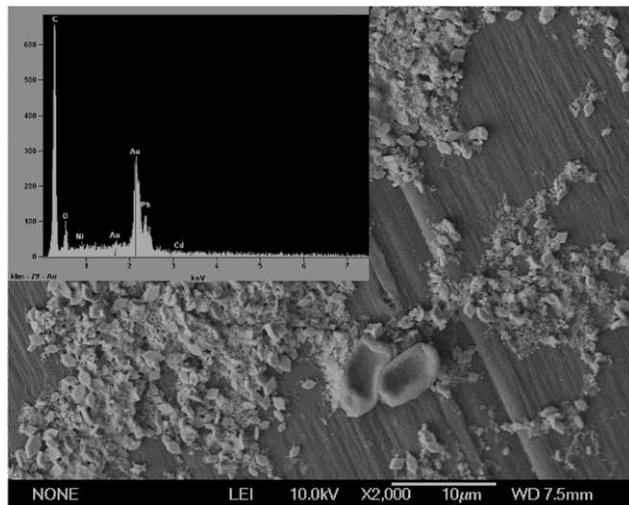


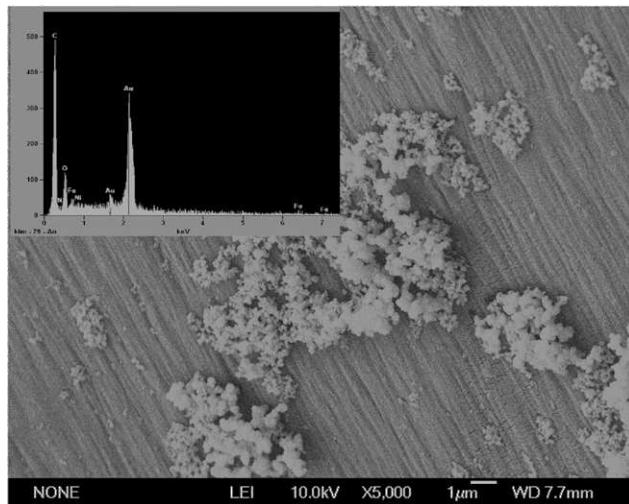
Figura 3. A) Malla de polietileno ( $40 \times$ ) de 2 mm de diámetro de poro sin colonizar. B) MEB de la malla de polietileno de 2 mm a  $2.000 \times$ . C) Malla colonizada ( $10 \times$ ) con *Phanerochaete chrysosporium* tras 2 días de incubación a 30 °C. D) Microscopía electrónica de barrido de las hifas y las esporas de *P. chrysosporium* que recubre la malla (1000x).

colocó 4 veces más biomasa en forma de *pellets* que en las columnas de burbujeo. Con respecto al comportamiento de la mezcla, se obtuvieron remociones del 74, 57 y 98% para el  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , el  $\text{CH}_3\text{COOPb}$  y el  $\text{NiCl}_3$ , respectivamente, con una posible competencia por los sitios de unión por los metales, especialmente entre el Pb y el Ni, ya que al realizar los experimentos con las mismas concentraciones de metal, pero de manera independiente, la remoción de Pb aumentó a un 95% y la de Ni disminuyó al 56%. Asimismo, este resultado demuestra que la biomasa de *P. chrysosporium* tuvo mayor afinidad por el Pb seguido, del Cd (60%) y el Ni —valores que concuerdan con los resultados de EDX que se presentan más adelante— (figs. 5–7).

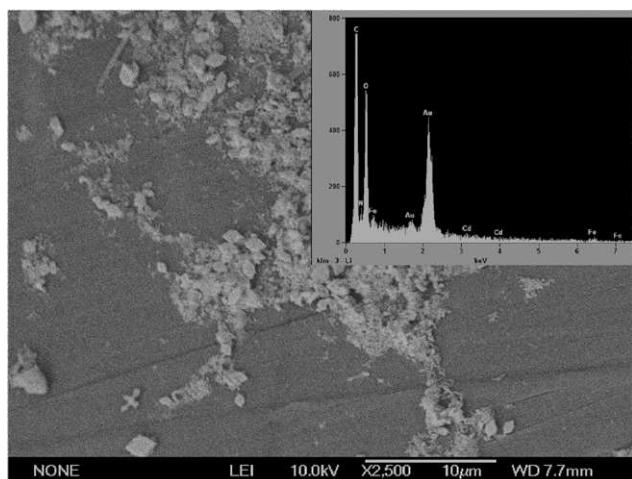
En las imágenes por microscopio electrónico en presencia de Ni se observaron algunas características de la pared, como la homogeneidad de la estructura asociada con la organización de las subunidades de N-acetilglucosamina unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$  1–4. En el microanálisis de EDX se confirmó nuevamente que el Ni fue el metal que más afectó a la biomasa, al acumular un porcentaje atómico del 0,13% (fig. 5). En lo referente



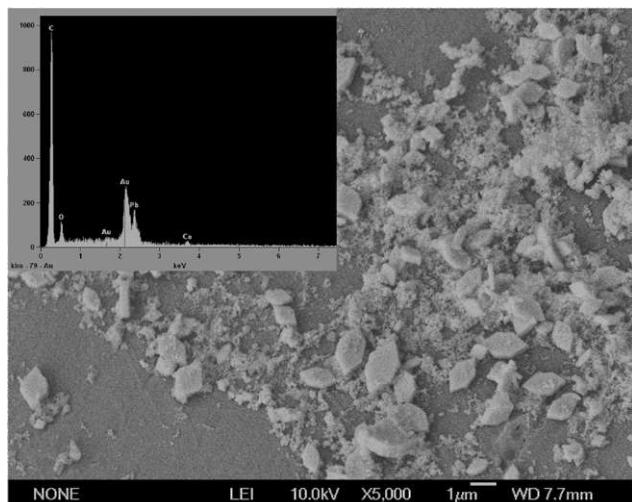
**Figura 4.** Microscopia electrónica de barrido (2.000×) y energía de rayos X para la biomasa de *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizada en contacto con la mezcla de  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{Cl}_2\text{Ni}$  y  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb}$  a 300 mg/l en el reactor de 750 ml. Incubación durante 5 días a 30 °C y aireación a 1 l/min.



**Figura 5.** Microscopia electrónica de barrido (5.000×) y energía de rayos X para la biomasa de *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizada en contacto con  $\text{Cl}_2\text{Ni}$  a 300 mg/l en Erlenmeyer. Incubación durante 2 días a 30 °C y a 120 rpm.



**Figura 6.** Microscopia electrónica de barrido (2.500×) y energía de rayos X para la biomasa de *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizada en contacto con  $\text{CdSO}_4$  a 300 mg/l en Erlenmeyer. Incubación durante 2 días a 30 °C y a 120 rpm.



**Figura 7.** Microscopia electrónica de barrido (5.000×) y energía de rayos X para la biomasa de *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizada en contacto con  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb}$  a 300 mg/l en matraz Erlenmeyer. Incubación durante 2 días a 30 °C y a 120 rpm.

al Cd, se pudieron evidenciar los agregados del metal, y con la EDX se estableció que fue el segundo con respecto a la afinidad (0,43%). Por último, en el ensayo con Pb se demostró que este fue el metal por el que la biomasa tuvo mayor afinidad, con un porcentaje del 8,1% (valor más alto que el obtenido en la mezcla). Los datos se correlacionan con la prueba de tolerancia, ya que la cepa soportó hasta 10.000 mg/l de Pb (fig. 7).

Las actividades enzimáticas LiP y MnP se presentaron en todos los tratamientos, con valores de LiP de 0,028, 0,029, 0,024 y 0,02 U/l en el Ni, el Cd, el Pb y la mezcla. Con respecto a la enzima MnP, las actividades fueron de 0,2, 0,17, 0,13 y 0,016 U/l en la misma secuencia. Los valores bajos podrían relacionarse con la condición no ligninolítica del agua residual en asociación con la presencia de los metales, siendo inducidas para estimular la producción de melaninas como proteínas de protección contra los metales. A diferencia de las curvas de remoción en el reactor, en este ensayo en matraces Erlenmeyer y con mayor cantidad de biomasa se presentó una acidificación del medio en todos los tratamientos, con valores iniciales de pH de 5,2, y que finalizó con

valores de 3,4, 4,1, 3,6 y 4,7 para el Ni, el Cd, el Pb y la mezcla. Este cambio en el pH se pudo deber a la mayor cantidad de biomasa. Esta biomasa utilizó eficientemente la glucosa como fuente de carbono, ya que en todos los tratamientos se presentó un consumo al finalizar el experimento.

## Discusión

La elevada tolerancia de *P. chrysosporium* pudo haber aparecido como respuesta a la exposición prolongada y ascendente de los 3 metales, lo que determina que posiblemente se hayan activado mecanismos como el engrosamiento de la pared, la síntesis de melaninas y la producción de ácidos orgánicos<sup>2</sup>. Estos hongos producen una pared celular compuesta principalmente por polisacáridos ( $\beta$  1–3 y  $\beta$  1–6 glucanos), que atrapan los iones metálicos y ofrecen una barrera primaria contra el metal<sup>3</sup>. Otro tipo de ligandos son las melaninas, compuestos de alto peso molecular formados por la oxidación y la polimerización de compuestos fenólicos (dihidroxinaftaleno y tirosinasa). Estos compuestos pueden existir como radicales libres que actúan como receptores o donadores de protones, ya que contienen grupos carboxilo, amino, fenólico e hidroxilo, que se reducen por parte de iones metálicos y oxidados por peróxido<sup>6</sup>.

Es factible que los 2 primeros mecanismos se hayan presentado en este microorganismo, ya que al observar la parte anterior de las cajas era evidente una pigmentación en la gama del café y el amarillo, que se acentuó especialmente con el Cd. Por otro lado, cuando se realizaron las observaciones microscópicas con bajo aumento (40x), las hifas no tomaron uniformemente el colorante azul de lactofenol, lo que demuestra que a medida que se fue incrementando la concentración de metales, se generó un complejo entre éstos y los grupos oxídrilo o hidroxilo de los monómeros de N-acetilglucosamina, y se ocasionó la disminución en los sitios de unión para el colorante. Un fenómeno similar se reportó para *Neurospora crassa* expuesta a sulfito de cadmio; los autores evidenciaron la formación de un complejo metálico con ciertos grupos funcionales de la quitina<sup>5</sup>.

Con respecto a los resultados del diseño experimental, la colonización eficiente del soporte se atribuyó a 2 mecanismos: la capacidad invasiva de las hifas de *P. chrysosporium* y la producción de conidios. Cuando este microorganismo se cultiva *in vitro* empleando medios que simulan condiciones ligninolíticas (relación carbono/nitrógeno 150–300), crece formando abundante micelio. Por esta razón, la colonización fue eficiente, ya que para acceder a la fuente de carbono, nitrógeno y nutrientes, las hifas se fueron desarrollando apicalmente y fueron atravesando los poros de la malla, lo que originó que se formara una fina capa sobre los soportes de  $3 \pm 1$  mm de espesor. De manera complementaria, los conidios, al ser más pequeños que las hifas ( $30 \pm 2$   $\mu\text{m}$ ), pudieron atravesar con mayor facilidad los poros de 2 mm y se convirtieron en unidades germinativas que colonizaron la parte posterior del material. El desarrollo de este novedoso bioadsorbente laminar tiene ventajas con respecto a otras geometrías presentadas en la literatura médica, ya que, al ser delgado, presenta una mayor área superficial con capacidad de adsorción por ambas caras y su flexibilidad facilita su uso<sup>14,15</sup>.

Además, al tener un espesor de 3 mm, la transferencia de oxígeno se ve favorecida al no generarse zonas anaerobias o microaerófilas que afecten el metabolismo aerobio del hongo. Se ha observado que en soportes muy gruesos, la colonización en el interior es deficiente y puede estar relacionada con gradientes de oxígeno<sup>12,25</sup>.

En las curvas de remoción en la columna de burbujeo, la carga inicial de la DQO fue alta y se puede atribuir a la fuente de carbono y nitrógeno, y a las poblaciones acompañantes, ya que el

experimento se realizó sin control de esterilidad. Bajo estas condiciones, la remoción de la DQO se atribuyó a la utilización de la glucosa a través de rutas como la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos<sup>20</sup>, que no se vieron inhibidas por la presencia de los 3 metales (al final de las curvas el peso de la biomasa fue superior). Se confirmó la viabilidad del hongo al sembrar un fragmento de la malla en agar salvado, y se observó el crecimiento característico a los 8 días de incubación (datos no mostrados). Además, se pudieron formar ácidos orgánicos, como el ácido oxálico, que funcionaría como agente quelante para remover los iones metálicos en solución. El efecto sinérgico de la biomasa y el soporte quedó demostrado al comparar los resultados con la remoción de la DQO con el soporte solo. Los posibles mecanismos implicados en la producción de las enzimas se podrían explicar por 2 teorías. Según la primera, las enzimas se pueden inducir por la presencia de metales pesados, mecanismo que se lleva a cabo a nivel transcripcional y genera un incremento en los niveles de ARNm. Los estudios han documentado ampliamente para manganeso, Cu, Cd, Hg y cobalto<sup>11,16,24</sup>, aunque el mecanismo no está completamente dilucidado, ya que son muy pocas las investigaciones que se reportan en las que se realice la cuantificación de la actividad enzimática asociada con la remoción de metales pesados. La segunda teoría está relacionada con la producción de melaninas como mecanismo de protección contra los metales, ya que en la síntesis de estos compuestos intervienen peroxidases y polifenol oxidadas. Por lo tanto, al sintetizarse las melaninas, las enzimas ligninolíticas incrementarían su actividad para participar en su producción sin sustraer electrones en el compuesto metálico<sup>6,12</sup>.

Con respecto a los resultados de la EDX y a la cuantificación de los metales por espectrofotometría de absorción atómica, los resultados indican que posiblemente la biomasa libre tenga sitios de unión, como los grupos sulfidrilo, amino, carboxilo, fosfato, entre otros, por medio de los que los iones metálicos se pudieron capturar y llevarse a cabo el proceso de adsorción. Además, se observó un comportamiento similar al colocar el hongo en cada tipo de metal y en la mezcla de éstos. No obstante, se presentó mayor afinidad por el Pb, y es evidente que en la mezcla se generó un proceso de competencia entre el Pb y el Ni por los ligandos de la pared. Este mismo resultado se reportó para *P. chrysosporium* al ser expuesto a Cd, a Pb y a Cu. De acuerdo con los resultados de acumulación, el orden de afinidad en la mezcla fue Cu (I) > Pb (II) > Cd (II), secuencia que se mantuvo al evaluar de manera independiente cada uno de éstos<sup>28</sup>. La disminución de los porcentajes de remoción se ha asociado con el fenómeno de competencia de los cationes<sup>1</sup>. Otro factor que favoreció la remoción en el experimento en matraz fue la acidificación del medio, ya que se permitió la solubilización de los metales y una unión más eficaz a los ligandos aniónicos como grupos fosfóricos, carbonilos, sulfidrilos e hidróxidos, que se activan en presencia de los metales.

Finalmente, los resultados de este trabajo permitieron desarrollar un novedoso sistema laminar con capacidad de adsorción a base de la biomasa viable de *P. chrysosporium*, con una gran área superficial y tolerancia a concentraciones elevadas de Cd, Ni y Pb. Además, actividades enzimáticas como la MnP y la LiP podrían estar relacionadas con ciertos mecanismos de tolerancia e inducción.

## Financiación

El presente estudio forma parte del proyecto N.º 00002769, financiado por la Oficina de Fomento a la Investigación de la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

## Bibliografía

1. Ansari M, Malik L. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresour Technol.* 2007;98:3149–53.
2. Arango R, Lebow P, Green F. Correlation between oxalic acid production and tolerance of *Tyromyces palustris* strain TYP-6137 to N,N-naphthaloylhydroxamate. *International Biodegradation & Biodegradation.* 2009;63:46–51.
3. Baldrian P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol.* 2002;32:78–91.
4. Bayramoglu G, Denizli A, Arica M. Entrapment of *Lentinus sajor-caju* into Ca-alginate gel beads for removal of Cd(II) ions from aqueous solution: Preparation and biosorption kinetics analysis. *Microchem J.* 2002;72:63–76.
5. Bhanoori M, Venkateswarlo G. In vivo chitin cadmmion complexation in cell wall of *Neurospora crassa*. *Bichim Biophys Acta.* 2000;1523:21–8.
6. Buszman E, Pilawa B, Zdybel M, Wilczyn'ski S, Gondzik A, Witoszyn'ska T, et al. EPR examination of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> binding by pigmented soil fungi *Cladosporium cladosporioides*. *Sci Total Environ.* 2006;363:195–205.
7. Norma 1074. Estándares ambientales en términos de vertimientos. Bogotá, Colombia: Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente (DAMA); 1997.
8. Deng S, Ting Y. Characterization of prj modified biomass as biosorption of Cu (II), Pb (II) and Ni(II). *Water Res.* 2005;39:2167–77.
9. Doyle M. Fundamentos y fronteras En: *Microbiología de los Alimentos* (Ed.), Acribia. España, 1997: 312–320.
10. Eaton A, Clesceri L, Rice E, Greenberg A. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. Washington: American Public Health Association; 2005.
11. Fogarty R, Tobin J. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme. Microb Technol.* 1996;19:311–7.
12. Gómez S, Amaya D, Maldonado C, Martínez MM, Quevedo B, Soto A, et al. Evaluación de *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. *Rev Int Contam Ambient.* 2008;24:93–106.
13. Iqbal M, Asma S. Production of an immobilized hibryd biosorbent for the sorption of Ni (II) from aqueous solution. *Process Biochem.* 2007;42:148–57.
14. Kacar Y, Cigdem A, Sema T, Adil D, Omer G, Arica MY. Biosorption of Hg (II) and Cd (II) from aquous solutions: Comparison of biosortive capacity of alginate and immobilized. Live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochem.* 2002;37:601–10.
15. Lai YL, Annadurai G, Huang FCH, Lee J. Biosorption of Zn(II) on the different Ca-alginate beads from aqueous solution. *Bioresour Technol.* 2008;99:6480–7.
16. Ma B, Mayfield M, Godfrey B, Gold M. Novel promoter sequence required for manganese regulation of manganese peroxidase isozyme 1 gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *Bichim Biophys Acta.* 1995;1251:205–9.
17. Michel F, Balachandra S, Grulke E, Adinarayana C. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Appl Environ Microbiol.* 1991;157:2368–75.
18. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Ann Chem.* 1959;31:426–8.
19. Montgomery DC. Factorial and fractional factorial experiments. In: Montgomery DC (Ed). *Introduction to Statistical Quality Control*. New Jersey, US, 2005:547–67.
20. Moore E. Fundamental of the fungi, 4 ed. New Jersey. United States: Ed, Prentice Hall Edition; 1996.
21. Moreno-Sandoval N, Ospina-Velandia X, Puentes-Cárdenas J, Pedroza-Rodríguez AM. Optimización de inductores metalicos y co-sustratos en la remoción de negreo reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. Memorias Congreso Internacional: "Gestión sostenible del agua: reutilización, tratamiento y evaluación de la calidad". 2009; Medellín, Colombia.
22. Murugesan K, Ankur D, In-Hyun N, Young-Mo K, Yoon-Seok CH. Decolourization of reactive black 5 by laccase: Optimization by response surface methodology. *Dyes and Pigments.* 2007;75:176–84.
23. Navarro A, Ramos K, Campos K, Maldonado H. Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: cationes divalentes y superficies activas. *Rev Iberoam Polím.* 2006;7:113–26.
24. Palmieri G, Cennamob G, Faraco V, Amoresanob A, Sannia G, Giardina P. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microb Technol.* 2003;33:220–30.
25. Pedroza AM, Mosqueda R, Alonso-Vante N, Rodríguez-Vázquez R. Secuencial treatment via *T. versicolor* and UV/TiO<sub>2</sub>/Ruxsey to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. *Chemosphere.* 2007;67:793–801.
26. Qingbiao L, Songtao W, Gang L, Xinkai L, Xu D, Daohua S, et al. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Sep Purif Technol.* 2004;34:135–42.
27. Radha KV, Regupathi I, Arunagiri A, Murugesan T. Decolorization of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochem.* 2005;40:3337–45.
28. Say R, Denizli A, Arica M. Biosorption of cadmium (III), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresour Technol.* 2001;76:67–70.
29. Tien M, Kirk T. Lignin degradation enzyme from the hymenomycete. *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science.* 1983;221:661–3.
30. Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol Adv.* 2009;27:195–226.
31. Yalcinkaya Y. Biosorption of cadmium from aquatic systems by carboxymethylcellulose and immobilized *Trametes versicolor*. *Hydrometallurgy.* 2001;63:31–40.