

## Biosorción y tolerancia de Pb, Cr y Cd por la biomasa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm

María de la Luz Angélica Vallejo Aguilar<sup>1</sup>

Marco Antonio Marín Castro<sup>2</sup>

María Elena Ramos Cassellis<sup>3</sup>

Sonia Emilia Silva Gómez<sup>1</sup>

Diego Ibarra Cantún<sup>1</sup>

José Víctor Tamariz Flores<sup>2§</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Ambientales-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. CU Edificio IC6, Puebla, México. CP. 72570. (maria.vallejo@viep.com.mx; sonia.silvagomez@viep.buap.mx; diego.ibarrac@alumno.buap.mx). Tel. 222 2295500, ext. 7356. <sup>2</sup>Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas-Instituto de Ciencias-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. CU Edificio IC1, Laboratorio de Biotecnología 10314 sur 6301. Tel. 222 2295500, ext. 7356. (marco.marin@correo.buap.mx). <sup>3</sup>Facultad de Ingeniería Química-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Avenida San Claudio y 18 Sur, Puebla, México. Tel. 222 2295500, ext. 7356. CP. 72570. (elena.ramos@correo.buap.mx).

§Autor para correspondencia: jose.tamariz@correo.buap.mx.

### Resumen

A nivel mundial, el uso indiscriminado de productos metálicos vertidos en agua utilizada en la agricultura ha generado una grave contaminación, por lo tanto, es importante establecer una metodología para su descontaminación a través de procesos biológicos, con hongos basidiomicetos ya que se ha demostrado que pueden degradar una serie de contaminantes orgánicos persistentes utilizando enzimas extracelulares, además de eliminar metales disueltos del agua mediante biosorción, actuando, como un intercambiador natural. Los objetivos de este trabajo fueron determinar entre tres metales (Pb, Cr y Cd) cuál fue removido más eficientemente de la solución acuosa por el micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*, así como evaluar su tolerancia y describir los efectos causados por cada uno sobre su estructura celular. La adsorción de metales por el micelio en medio líquido se evaluó utilizando medio Kirk modificado, se cuantificaron las concentraciones retenidas durante 8 días en solución de 20 mg L<sup>-1</sup> de cada elemento, los resultados indicaron que la adsorción de Pb (75%) fue la más eficiente, seguida de Cr (42%) y Cd (2.25%). En los resultados en medio de cultivo sólido (PDA) ninguna concentración de Pb y Cr inhibió el crecimiento del micelio, sin embargo, con Cd se inhibió a partir de 60 mg L<sup>-1</sup>; no obstante, los tres elementos causaron en el micelio alteraciones a nivel estructural. En conclusión, la cepa de *P. ostreatus* presentó tolerancia y biosorción significativa ( $p \leq 0.05$ ) para Pb y Cr, por lo que podría ser un biomaterial de biorremediación específica para Pb y Cr.

**Palabras clave:** *Pleurotus ostreatus*, biomasa, biosorción, metales pesados.

Recibido: enero de 2021

Aceptado: marzo de 2021

## Introducción

El uso indiscriminado de productos químicos y el incremento de actividades industriales han generado contaminación de las aguas residuales con elevadas concentraciones de metales pesados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que la máxima concentración de estos iones en el agua debe estar en un rango de 0.01-1 ppm (Tejada, 2015). Los metales pesados son sustancias persistentes con tendencia a la acumulación y a la magnificación en diferentes niveles tróficos (Deng, 2005; Singh *et al.*, 2008), lo cual ocasiona severos daños en la salud como debilitamiento del sistema inmune, daño al hígado, riñones y cáncer porque dificultan diferentes procesos celulares.

Por ello el aumento de alternativas para su remoción en aguas contaminadas (Morales *et al.*, 2010). En México, 85% de las aguas residuales son vertidas sin tratamiento previo a los ríos y mares (Sánchez, 2017). Según la Environmental Protection Agency (EPA), varios metales pesados figuran en lista de contaminantes por ser un riesgo para la salud pública. El plomo, cobre y cadmio provienen de numerosas actividades, por encima de los límites permisibles, ocasionan efectos adversos y desórdenes en seres humanos al acumularse en tejidos vivos (Ramos, 2018).

El plomo se encuentra en las baterías, plomerías, pinturas, aceites (Pawar *et al.*, 2016). El cromo proviene de la fabricación de productos químicos, preservación de madera, pesticidas entre otros (Awual *et al.*, 2013). El cadmio se encuentra en colorantes, plantas nucleares, galvanoplastia, baterías de níquel-cadmio, pinturas etc. (Ismadji *et al.*, 2015).

La biosorción es un fenómeno físico-químico que se sustenta en la capacidad de los denominados materiales biológicos (biomasa) vivos o muertos, para acumular metales pesados principalmente de aguas residuales, involucrando al metabolismo microbiano, resaltando los procesos fisicoquímicos de adsorción, desorción o absorción de dichos elementos metálicos (Bou *et al.*, 2018). Factores ambientales como la temperatura, el pH y la presencia de nutrientes afectan el proceso de biosorción (Prakash, 2017).

El potencial de la biomasa fúngica como biosorbente ha sido aceptado para la eliminación de metales pesados de las aguas contaminadas debido a sus excelentes propiedades de unión y tolerancia a metales y ambientes adversos, como diversas condiciones de pH y temperatura (Qazilbash, 2004; Anand *et al.*, 2006; Yazdani *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2014). Se ha estudiado que los hongos tienen la capacidad de modificar o afectar la biodisponibilidad de los metales (Prakash, 2017), por lo tanto, la biorremediación es una opción ya que utiliza biomasa a través de procesos de biodegradación, bioacumulación y bioconversión que operan de diferentes maneras (Kulhreshtha *et al.*, 2014; Mosa *et al.*, 2016).

Estudios realizados por Vaseem *et al.* (2017) sugieren que *Pleurotus ostreatus* se puede utilizar como una alternativa prometedora para la eliminación de metales pesados de efluentes, dado que se ha observado la eficiencia para su remediación y ha sido la más alta hasta de 50% de efluentes diluidos. Se ha revelado que esta especie de hongo tiene una variedad de mecanismos de respuesta a la presencia de metales pesados en solución, puede tolerar y eliminarlos del agua (Yang *et al.*, 2017).

En consecuencia, lograr valorar el potencial de adsorción específica para Pb, Cr y Cd por su micelio en medio líquido, determinar las concentraciones metálicas inhibitorias de su crecimiento en medio sólido y conocer el efecto causado en su morfología celular puede permitir diseñar la metodología adecuada para la propuesta de un modelo de biorremediación de aguas residuales contaminadas con metales pesados específicos.

## **Materiales y métodos**

### **Material biológico**

Cepa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm (Fungi: Agaricomycetes: Pleurotaceae) obtenida del cepario del laboratorio de micología del Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas (DICA).

### **Reactivos**

Micelio vegetativo, micelio activado y biomasa de *P. ostreatus*, medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA) BD Bioxon<sup>®</sup>, soluciones estándar de nitrato de plomo [Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] CAT. 7731 Accustandard Inc lote: A8035019, estándar de nitrato de cromo [Cr (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>•9H<sub>2</sub>O] CAT. 7731 Hycel de México, SA de CV lote: 298404 y estándar de nitrato de cadmio [Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O] CAT. 7801 Hycel de México SA de CV lote: 298399. Las metodologías utilizadas se enmarcan en los procesos de biorremediación propuestos por Beyer (2005); Noble (2005); Stamets (2005).

### **Obtención del micelio vegetativo**

Se utilizaron las metodologías propuestas por Flegg *et al.* (1985); Smith *et al.* (1994); Chang *et al.* (2013), modificadas de acuerdo con las condiciones de equipo y presupuesto de la institución. En placas de Petri con medio de cultivo agar papa-dextrosa, se inoculó tejido vegetativo de basidiocarpos frescos de *P. ostreatus*, se incubaron a 25 °C durante 7 días (Stamets, 1983; Mumpuni *et al.*, 2017).

### **Preparación del micelio activado**

Con base en la metodología propuesta por Chalmers (1993); Stamets *et al.* (1983). Se colocó en un biorreactor con capacidad de 1 L, 1 kg de semilla de sorgo (*Sorghum* sp.), previamente hidratada al 40% (p/v) se esterilizó a 121 °C y 15 psi por 1 h (Sánchez y Roice 2004), posteriormente la semilla se inoculó con 3 círculos de 1 cm de diámetro de agar con micelio vegetativo de *P. ostreatus* (0.01 mg en peso seco) y se incubó a una temperatura de 25 °C ±2 por 5 días (Stamets, 1983).

### **Obtención de biomasa (adsorbente) en medio líquido**

La metodología empleada fue la propuesta por Chalmers (1993). Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 psi por 15 min, 12 matraces Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de medio Kirk modificado a pH 5.5 con 1 g de fibra natural de salvado de trigo y 0.01 g de CuSO<sub>4</sub>, se inocularon 3 discos de micelio de 1 cm de diámetro de agar con micelio de *P. ostreatus* (0.01 mg en peso seco), se incubaron durante 10 días a 25 °C ±2 (Díaz *et al.*, 2013).

### **Soluciones para evaluar la adsorción de metales en medio líquido (adsorbato)**

Los metales pesados se determinaron en un EAA (espectrofotómetro de absorción atómica, Varian 55B), utilizando las metodologías propuestas por la EPA (2002), la APHA (2018), así como las recomendaciones de la CONAGUA (2018) en sus estadísticas y el Atlas del agua en México, utilizando la NOM-003- SEMARNAT-1997. A partir de soluciones patrón AccuStandard Inc. de 1 000 mg L<sup>-1</sup>, se prepararon 4 repeticiones de soluciones metálicas a concentraciones de 20 mg L<sup>-1</sup> de Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cr (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>•9H<sub>2</sub>O, y Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O, que se colocaron en biorreactores de 500 ml, se les agregó 1 g de glucosa, se ajustó el pH a 5.5 y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos 15 psi.

Posteriormente se depositó la biomasa adsorbente generada en el medio líquido y se incubaron por 10 días a 25 °C. Se extrajeron alícuotas de 2 ml cada 24 h durante 10 días para analizar la concentración metálica de cada solución en un espectrofotómetro de adsorción atómica modelo VARIAN 55B, longitud de onda para Pb 217.0 nm, Cr 425.4 nm y Cd 228.8 nm (Kumar *et al.*, 2011; Fleites, 2015).

### **Medio de cultivo para evaluar la tolerancia e inhibición del crecimiento miceliar**

A partir de soluciones estándares de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>•9H<sub>2</sub>O, y Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O se prepararon diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, y 100 mg L<sup>-1</sup>) de soluciones para usarlas en la preparación de PDA (agar papa dextrosa), se ajustó el pH a 5.5, se esterilizo 121°C por 15 min, 15 psi, se vertió en cajas Petri (Fleites, 2015) en cada una se inoculó el micelio activado, se incubó a 25 °C ±2 y se cuantificó diariamente el crecimiento radial en milímetros durante 8 días (Morales *et al.*, 2010).

### **Descripción del efecto de las concentraciones metálicas sobre el micelio de *P. ostreatus* por microscopía electrónica de barrido (SEM)**

El análisis por microscopía electrónica de barrido se realizó en un microscopio JECL modelo JSM-6610LV, complementado con un equipo de microanálisis EDX Inca Energy-350, Oxford Instruments, con detector de rayos X modelo X-Max 50, de 50 mm<sup>2</sup>, con resolución teórica de 127 eV a la energía del pico K del Mn. Cada muestra se deshidrató y se cubrió con polvo de oro en un equipo de recubrimiento marca Balzers modelo SCD 004 (Lozano *et al.*, 2014). Conjuntamente se realizó el análisis de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) al micelio de *P. ostreatus*, para describir la presencia de metales en su interior celular.

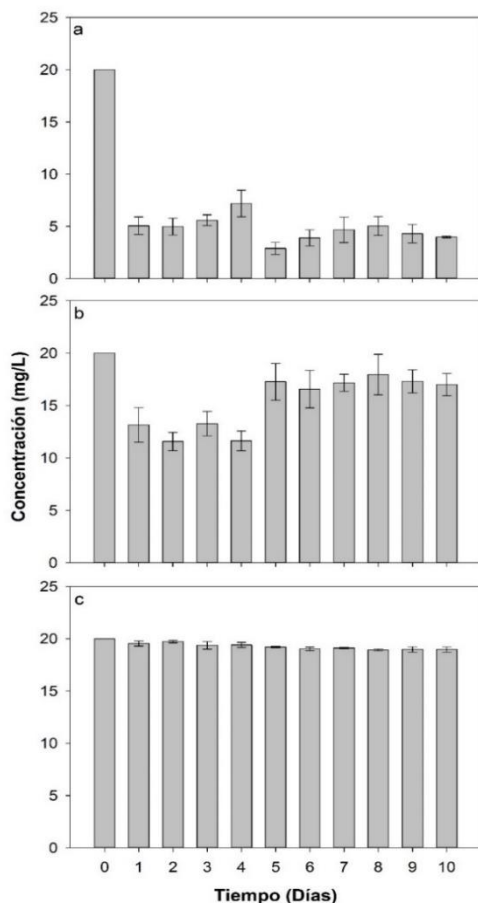
### **Análisis estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones para evaluar el efecto de las variables independientes: concentración de los metales Pb, Cr y Cd, y los días de crecimiento del micelio sobre las variables de respuesta: porcentaje de retención o adsorción. El conjunto de datos experimentales se analizó a través de una prueba de varianza (Anova) de dos vías (los factores fueron los metales experimentales y los días de contacto con el micelio para evaluar su retención o adsorción) y una prueba de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ) con el software R-commander (Fox, 2005).

## Resultados y discusión

### Evaluación de la adsorción de metales en medio líquido

En la Figura 1 se describe el comportamiento de los metales Pb, Cr y Cd en solución a una concentración de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  en función del tiempo de contacto con la biomasa de *P. ostreatus*.



**Figura 1. Cuantificación de las concentraciones retenidas por la biomasa de *P. ostreatus* en contacto con soluciones de: a) plomo; b) cromo; y c) cadmio en función del tiempo a una concentración de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ .**

Los resultados en la Figura 1, indicaron que la adsorción de Pb (75%) fue la más eficiente, seguida de Cr (42%) y Cd (2.25%). Con ello se demuestra que el micelio de *P. ostreatus* tiene la capacidad de retención de Pb y Cr, de acuerdo a las evaluaciones desde el primer día (Figura 1a) el Pb registró disminución drástica de la concentración inicial de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  a  $5.065 \text{ mg L}^{-1}$ , siendo el día 5 la de mayor adsorción de dicho metal (75%), los demás días se observaron procesos de desorción y adsorción con diferencia significativa respecto al tiempo cero (Cuadro 1), algo semejante ocurre en los trabajos de Marín *et al.* (2015), quienes describen un proceso de adsorción de 57.9% en las primeras 48 h, con una concentración inicial de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Cuadro 1. Efecto del tiempo sobre la absorción de metales pesados en un medio líquido.**

Día	Testigo (mg L <sup>-1</sup> )	Pb (mg L <sup>-1</sup> )	Cr (mg L <sup>-1</sup> )	Cd (mg L <sup>-1</sup> )
0	0.02 ± 0.027 a	20 ± 0 a	20 ± 0 a	20 ± 0 a
1	0.017 ± 0.009 a	5.065 ± 0.84 c	13.15 ± 1.643 c	19.545 ± 0.247 abc
2	0.02 ± 0.016 a	4.987 ± 0.798 c	11.565 ± 0.867 c	19.717 ± 0.12 ab
3	0.017 ± 0.017 a	5.592 ± 0.519 bc	13.265 ± 1.173 c	19.365 ± 0.365 bcd
4	0.022 ± 0.018 a	7.197 ± 1.271 b	11.632 ± 0.938 c	19.4 ± 0.249 bcd
5	0.015 ± 0.012 a	2.897 ± 0.589 d	17.267 ± 1.751 ab	19.202 ± 0.077 cd
6	0.04 ± 0.008 a	3.9 ± 0.787 cd	16.562 ± 1.778 b	19.025 ± 0.17 d
7	0.02 ± 0.008 a	4.68 ± 1.213 cd	17.167 ± 0.805 ab	19.1 ± 0.081 cd
8	0.057 ± 0.026 a	5.047 ± 0.903 c	17.945 ± 1.925 ab	18.925 ± 0.095 d
9	0.037 ± 0.026 a	4.297 ± 0.878 cd	17.292 ± 1.104 ab	18.975 ± 0.25 d
10	0.027 ± 0.009 a	4 ± 0.081 cd	17 ± 1.061 ab	18.972 ± 0.251 d
DMS	0.0614	1.9841	3.178	0.492

±= desviación estándar. La diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey es ( $p \geq 0.05$ ).

De igual modo, Yang *et al.* (2017) observaron la eliminación de Pb de 99.9 -100% y que se transportaba a la pared celular fúngica en relación de 68.2 al 91.2%. Esto indica que el metal además de ser adsorbido en la superficie de la biomasa miceliar, ingresó al interior de las células interfiriendo con el metabolismo causando alteraciones en la estructura y morfología, este proceso fue favorecido por la variación del pH inicial de 5.5 a pH de 3.5, ya que de acuerdo a Javaid *et al.* (2011); Eliescu *et al.* (2020); Huang *et al.* (2009), este cambio propicio la disociación química tanto de grupos funcionales carboxílicos, amino, metilo, fosfato e hidróxidos constituyentes de la pared celular y de los metales en solución, aumentando su solubilidad y favoreciendo la disponibilidad de biosorción en la biomasa y la bioacumulación intracelular.

El comportamiento del Cr en solución se aprecia en la Figura 1b, la concentración inicial (20 mg L<sup>-1</sup>) disminuyó a 13.15 mg L<sup>-1</sup> (34.2%) a pH de 5.5, la bioadsorción no mostró diferencia significativa hasta el día 4 registrando 11.6 mg L<sup>-1</sup> (41.9%) lo que correspondió al máximo de retención, los siguientes días se observaron desorciones del metal sin registrar mayor bioadsorción a pH final de 6.6. Al respecto, Marín *et al.* (2015) observaron que el Cr en una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> tuvo una adsorción ascendente a partir del cuarto día de muestreo de 33.9 mg L<sup>-1</sup>, hasta 59.8 mg L<sup>-1</sup> a los 10 días a pH 5.2, además en los trabajos de Da Rocha *et al.* (2019) al utilizar solución de Cr (VI) 25 mg L<sup>-1</sup> la adsorción en 15 días alcanzó 100%.

Esto permite considerar que la retención de Cr ocurrió en los primeros días de contacto y posteriormente el pH influyó en la desorción del metal haciéndolo insoluble para la retención por el micelio. En contraste, Prasenjit *et al.* (2005) indican que trabajando con *Aspergillus foetidus* con concentración inicial de 5 mg L<sup>-1</sup> de cromo, a pH 7.0 en 92 h de contacto registraron retenciones metálicas de 97%. Nasser *et al.* (2002) reportan que experimentando con *Aspergillus oryzae*, en concentración inicial de 240 mg L<sup>-1</sup>, a pH de 5 en 36 h de contacto, registraron 97% de retención de cromo y Bai y Abraham (2005) indican que trabajando con *Rhizopus nigricans*, en concentraciones iniciales de 100 mg L<sup>-1</sup> de cromo, a pH de 2, en 4 h de contacto, evaluaron 80% de retención del metal.

Esto indica que el pH del medio y el tiempo de contacto son factores importantes para la retención del metal y también indica que la naturaleza de la cepa puede ser determinante en los resultados obtenidos. La adsorción de Cd (Figura 1c) fue de  $0.46 \text{ mg L}^{-1}$  (2.25%) del primer día de contacto a pH de 5.5, hasta el día 7 de incubación.

En el Cuadro 1 se presenta el análisis estadístico del efecto del tiempo sobre la absorción de metales pesados en el medio líquido experimental, en el caso de cadmio en los días 9 y 10 la retención del metal alcanzó  $1.08 \text{ mg L}^{-1}$  (5.5%), a pH 2.8, conjuntamente con inhibición del crecimiento miceliar, posiblemente debido a las características tóxicas propias del metal y el cambio drástico del pH inicial de 5.5 a 2.8, esta tendencia de retención coincide con la descrita en los trabajos de Yang *et al.* (2017) quienes observaron disminución del 45.9-61.1% de una concentración inicial de  $40 \text{ mg L}^{-1}$  a pH de 4.5.

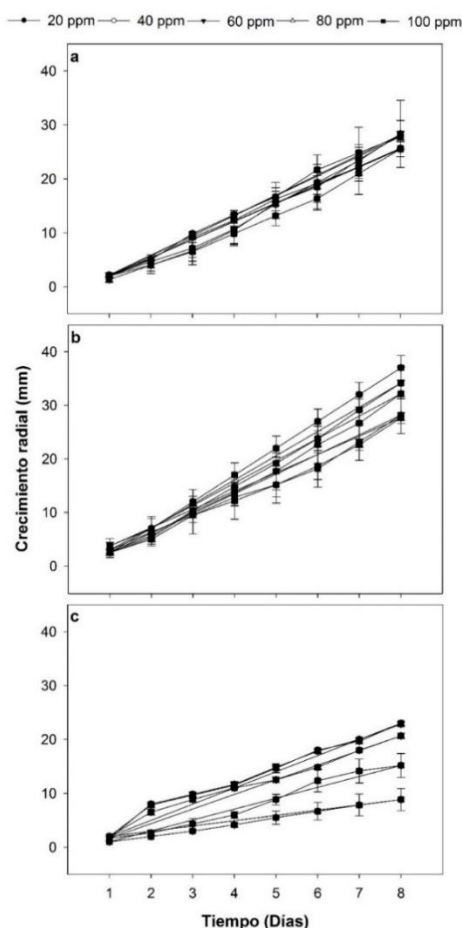
De acuerdo con Frutos *et al.* (2016); Deng *et al.* (2009), los valores de pH de una solución deben considerarse como un factor importante que influye en el proceso de biosorción, también influye en la toxicidad y la química de la solución de los metales, así como en las propiedades de hidrólisis y complejación al provocar cambios en la forma iónica.

Por lo tanto, la carga iónica de los grupos funcionales y la especiación del metal a diferentes valores de pH pueden afectar la biosorción. Otro aspecto importante es la especie del hongo utilizada debido a que de acuerdo con Javaid *et al.* (2011); Ogbo y Okhuoya (2011) en cada especie la biosorción puede variar con el tipo de metal, su concentración y composición del medio de cultivo o sustrato, y el comportamiento de un elemento depende de las especies particulares en la que está presente debido a que la mayor reactividad de una especie no siempre coincidirá con la mayor concentración inicial del metal en esa forma química. Por lo tanto, el comportamiento de un elemento en el ambiente (biodisponibilidad, toxicidad, distribución, etc.) no puede predecirse basándose en su concentración.

En este análisis se puede apreciar en la columna de cada metal las diferencias significativas entre el tiempo cero y el tiempo de mayor retención metálica por parte de la biomasa de *P. ostreatus*, en caso de plomo es el día 5, con cromo es el día 4 y con cadmio es el día 7. También es importante observar que existe diferencia significativa entre la retención de los metales por la biomasa, independientemente de los días señalados anteriormente, la diferencia se manifiesta entre el Pb y Cr y entre el Pb y Cd.

### **Evaluación de concentraciones metálicas inhibitorias del crecimiento miceliar**

El crecimiento radial del micelio de *P. ostreatus* se presenta en la Figura 2, en mm por día a diferentes concentraciones metálicas (20, 40, 60, 80 y  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) de Pb, Cr y Cd. En la Figura 2, se describe como el micelio de *P. ostreatus*, con ninguna concentración de plomo y cromo presento inhibición de su crecimiento, sin embargo, cadmio si logro inhibirlo a partir de la concentración de  $60 \text{ mg L}^{-1}$ . Los resultados indican que el micelio de *P. ostreatus* presenta tolerancia a ciertas soluciones metálicas, lo que se sustenta mediante el análisis de la Figura 2a, donde se observa el desarrollo continuo del micelio en las 5 concentraciones sin presentar inhibición, ni diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en los días 1 y 2, en cambio, muestra diferencia a partir del día 3.



**Figura 2.** Crecimiento radial del micelio del hongo *P. ostreatus* en mm por día en cinco concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100 mg L<sup>-1</sup>) de: a) plomo; b) cromo; y c) cadmio.

Asimismo, se puede observar que el día 8 alcanza el más alto crecimiento a la concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>, resultado que coincide con el trabajo de Yang *et al.* (2017) quienes observaron el mismo fenómeno de resistencia. De igual modo Morales-Fonseca *et al.* (2010). Cuantificaron el crecimiento radial, a concentraciones bajas entre 0.02-1.5 mg L<sup>-1</sup> y altas entre 15-11 000 mg L<sup>-1</sup>, de acetato de Pb y observaron un crecimiento de micelio de *P. ostreatus* de 50 mm a los 10 días de incubación sin alteración en la morfología macroscópica y microscópica, con las concentraciones altas las alteraciones se presentaron, pero la tolerancia hacia el plomo se registró entre 200 y 500 mg L<sup>-1</sup>, se debe mencionar además que Marín *et al.* (2015).

Al examinar el crecimiento miceliar de *P. ostreatus* en concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> de solución de Pb observaron que no fue inhibido, permaneciendo viable después de 20 días de exposición en medio sólido. Se puede suponer que *P. ostreatus* tiene una gran capacidad para tolerar y eliminar Pb; a través, de procesos consecutivos de adsorción y bioacumulación debido a que este metal puede fijarse en los grupos funcionales aminas (NH<sub>2</sub>) e hidroxilos (OH) de la estructura química de la pared celular, logrando penetrar hasta la célula depositándose en el citosol de la estructura celular del micelio (Huang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2019; Eliescu *et al.*, 2020).



El crecimiento radial del micelio del hongo *P. ostreatus* en mm por día a diferentes concentraciones de soluciones de Cr (20, 40, 60, 80, y 100 mg L<sup>-1</sup>), se representa en la Figura 2b, su desarrollo fue continuo, sin presentar inhibición en las cinco concentraciones de Cr, sin diferencia significativa. Asimismo, en los días 7 y 8 se observó 86.03% de desarrollo a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>, este resultado es semejante al obtenido por Yang *et al.* (2017) quienes trabajaron con soluciones de Cr en concentraciones de 50-300 mg L<sup>-1</sup> y observaron que el micelio crecía bien hasta 150 mg L<sup>-1</sup>, pero a partir de 200 mg L<sup>-1</sup> presentaba una inhibición parcial y una total en 300 mg L<sup>-1</sup>.

El mismo comportamiento lo registraron da Rocha Ferreira *et al.* (2019) quienes midieron el incremento radial del micelio de *P. ostreatus* en el rango de (10-150 mg L<sup>-1</sup>) de Cr (VI) durante 10 días de incubación, sin inhibición de crecimiento, lo que implica que altas concentraciones de soluciones metálicas de Cr inhiben el crecimiento del hongo por el posible daño a la membrana celular, la inducción de la peroxidación lipídica, la formación de especies reactivas de oxígeno, así como daño a las estructuras de ADN y proteínas (Huang *et al.*, 2009; Sazanova *et al.*, 2015; Eliescu *et al.*, 2020).

En la Figura 2c se observa el crecimiento radial del micelio de *P. ostreatus* en mm por día a diferentes concentraciones de soluciones de Cd, se presenta inhibición a partir de la concentración de 60 mg/L, pero se aprecia crecimiento hasta el día 8 en una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> alcanzando el mayor crecimiento y no se registró avance miceliar posterior.

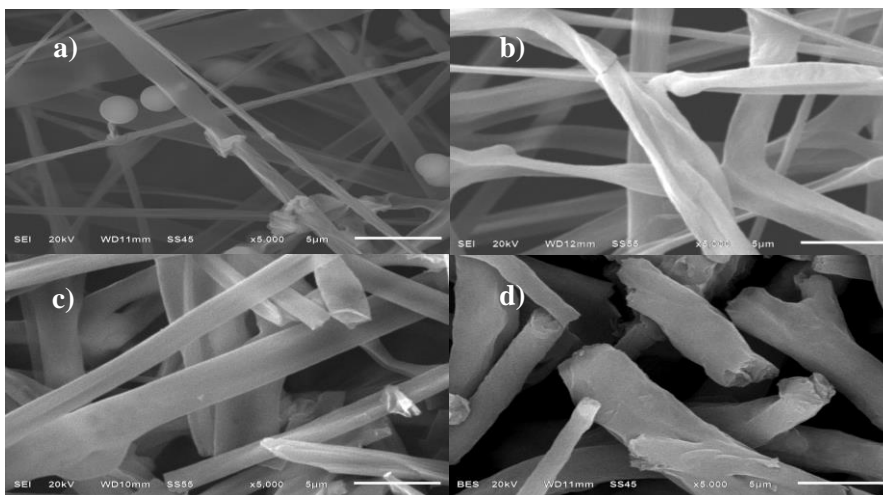
Este comportamiento coincide con lo reportado por Yang *et al.* (2017) quienes trabajaron con concentraciones de Cd de 10-50 mg L<sup>-1</sup> y reportaron inhibición del crecimiento miceliar en *P. ostreatus* a partir de la concentración de 40 mg L<sup>-1</sup>, paralelamente, Miaomiao *et al.* (2018) descubrieron dos cepas de *P. ostreatus* JINONG21 y SUYIN6 tolerantes al Cd, observando una inhibición de crecimiento a partir del día 7 de inoculación a 40 mg L<sup>-1</sup> de concentración, en este caso se puede considerar como en los metales anteriores que el comportamiento y el efecto de Cd sobre el crecimiento y la viabilidad del micelio de *P. ostreatus*, varían de acuerdo a las concentraciones y el tipo de elemento de acuerdo con Yang *et al.* (2017); Baldrian (2003).

### **Descripción del efecto de la concentración metálica en la morfología de estructuras miceliales por microscopia electrónica de barrido (SEM).**

En la Figura 3 se muestra la morfología microscópica estructural interna del micelio de *P. ostreatus* antes y después de hacer contacto con las diferentes concentraciones metálicas experimentales de Pb, Cr, y Cd, las estructuras fueron analizadas por microscopia electrónica de barrido y espectrometría de rayos X.

En esta figura se observa el daño sobre la estructura miceliar debido a la acción de los metales experimentales indicando estas imágenes que el metal además de ser adsorbido en la superficie del micelio, logró ingresar al interior de las células interfiriendo con su metabolismo causando alteraciones en la estructura y morfología celular.

En la Figura 3a se aprecian las estructuras de reproducción del micelio de *P. ostreatus*, las cuales se presentan desarrolladas en el medio sólido libre de metales (control) y se aprecian hifas alargadas, hialinas, hidratadas, cilíndricas, septadas, y las estructuras esféricas o blastoconidios turgentes igual como lo indican Bowman *et al.* (2006).



**Figura 3. Estructuras microscópicas del micelio de *P. ostreatus* del control (a) y del micelio con soluciones metálicas de plomo (b), cromo (c) y cadmio (d) respectivamente.**

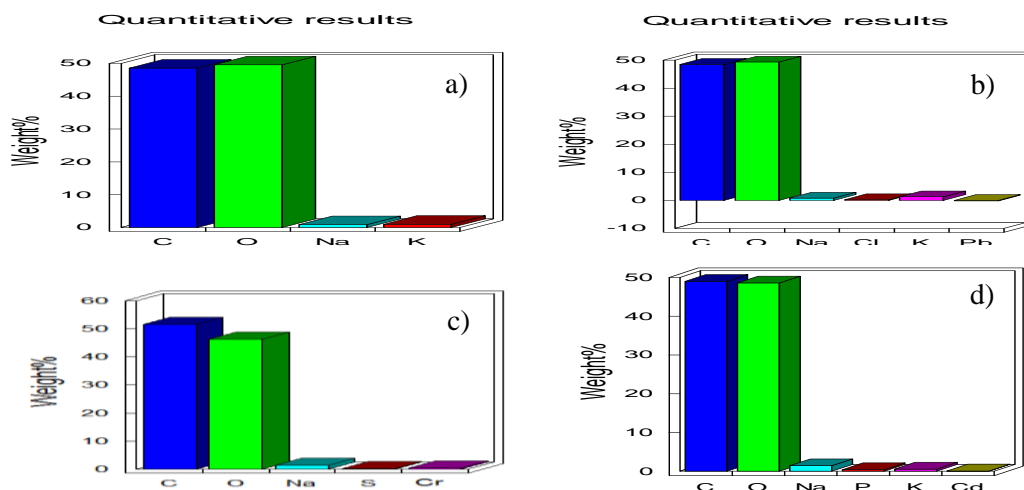
En la Figura 3b se presentan los cambios ocurridos en la morfología del micelio por el efecto de la solución metálica de Pb, se observan las hifas deformadas, deshidratadas, aplanadas y rotas, no se advierten estructuras de reproducción, esto indica que el metal además de ser adsorbido en la superficie de la biomasa miceliar ingreso al interior de las células interfiriendo con el metabolismo causando alteraciones en la estructura y morfología celular.

La Figura 3c presenta al micelio que estuvo en contacto con solución metálica de Cr, se observan las estructuras sin turgencia, con ruptura de hifas y ausencia de los blastoconidios, esto es indicativo de la interacción del Cr con grupos funcionales OH-, -NH, pertenecientes a hidratos de carbono y proteínas de la pared celular, pero los daños celulares estructurales pueden estar relacionados con la interacción del cromo con grupos -CH<sub>3</sub> y =CH<sub>2</sub> de ácidos grasos asociados a fosfolípidos constituyentes de la membrana celular, esto implica la interacción del metal con el metabolismo celular y su bioacumulación en el interior del micelio como lo mencionan Corona *et al.* (2010); Cervantes *et al.* (2006).

La Figura 3d muestra el micelio desarrollado en medio sólido con Cd, el cual muestra mayor deshidratación y deformación de las hifas, mayor ruptura y mínima presencia de estructuras conidiales. En las secciones b, c, y d de la Figura 3 también se aprecia el aumento del tamaño o engrosamiento de las estructuras dañadas, lo cual puede ser debido a la elevada tolerancia del micelio a ciertos metales, por lo que se inicia la activación de mecanismos de defensa como el engrosamiento de la pared, la síntesis de melaninas y la producción de ácidos orgánicos (Arango *et al.*, 2009), ya que de acuerdo con Banerjee y Nayak (2007); Javaid *et al.* (2011) estos hongos de podredumbre blanca y en particular *P. ostreatus* tienen una pared celular compuesta por  $\beta$  1-3 y  $\beta$  1-6 glucanos de grupos carboxílicos, amino, tiol, fosfato e hidróxido en la pared celular que ayudan en la biosorción de iones metálicos y ofrecen una barrera primaria contra el metal.

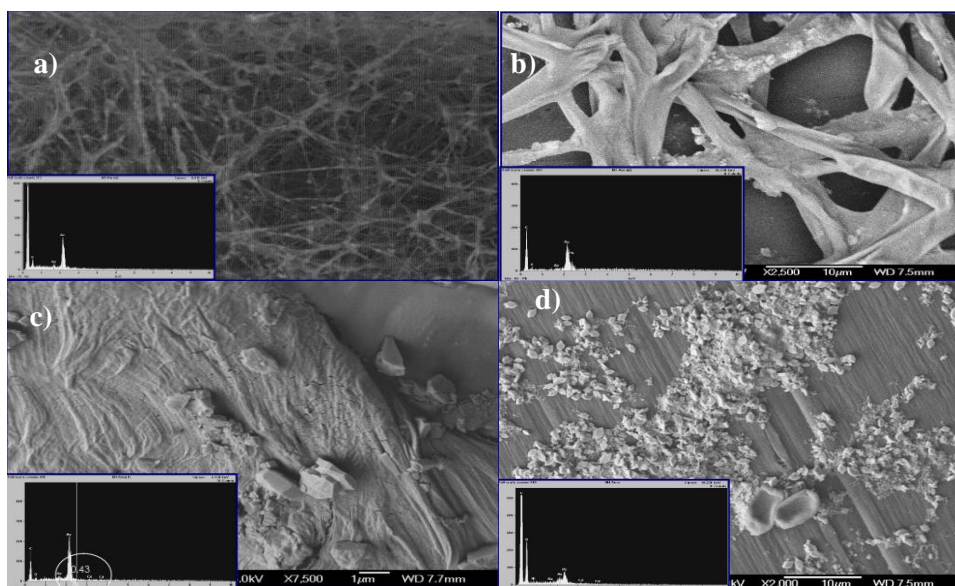
La Figura 4 muestra el análisis de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) al micelio de *P. ostreatus*, donde el Pb alcanza mayor retención en el interior del micelio. En la figura 4a se presenta el análisis EDX a la muestra testigo del micelio de *P. ostreatus*, en la Figura 4b se

puede apreciar la presencia de Pb en el micelio, esto corrobora que hubo bioacumulación en el interior de las células y la pared celular igual como lo refieren Morales-Fonseca *et al.* (2010) y en las Figuras 4c y 4d se puede observar la presencia de Cr y Cd respectivamente en la prueba de microanálisis de energía de rayos X de las muestras de micelio de *P. ostreatus*.



**Figura 4.** Microanálisis de energía de rayos X de las muestras de micelio de *P. ostreatus*, muestra control (a) donde se observa el contenido cuantitativo del micelio presencia de Pb (b) en el tejido fúngico Cr (c) y Cd (d).

En la Figura 5, se presentan las alteraciones causadas por plomo y cadmio en la biomasa miceliar de otras especies de hongos.



**Figura 5.** Microscopía electrónica de barrido en biomasa miceliar de *Phanerochaete chrysosporium*, a) micelio sin contacto con los metales; b) efecto de solución de Pb a 300 mg L<sup>-1</sup>; c) efecto de la solución de Cadmio; y d) micelio de *P. chrysosporium* en contacto con Pb y Cd (Morales *et al.*, 2008).

Comparando las imágenes de las Figuras 3 y 5 se puede observar que las alteraciones a la morfología celular del micelio son diferentes esto seguramente está relacionado con las concentraciones metálicas y los tiempos de contacto que en este caso fueron de 72 h de acuerdo con Morales *et al.* (2008).

## Conclusiones

De acuerdo con el análisis de resultados se concluye que *P. ostreatus* tiene una gran capacidad para tolerar y eliminar los (metales experimentales Pb, Cr y Cd). En relación con los efectos causados por cada metal en la estructura del micelio de *P. ostreatus* se puede concluir que mediante el análisis por microscopía electrónica que Pb y Cr causaron daños estructurales a las células del micelio.

En general, el hongo tuvo una capacidad sobresaliente de biosorción de Pb y Cr. Por lo tanto, se puede proponer la utilización del micelio de esta cepa de *P. ostreatus* para generar un modelo de biorremediación específico para aguas residuales contaminadas con Pb. Teniendo en cuenta los aspectos económicos, es necesario producir adsorbentes de bajo costo, efectivos y reciclables para su uso generalizado.

El potencial de biosorción de diferentes especies debe evaluarse de forma comparativa. Observando los resultados obtenidos por la cepa de *P. ostreatus*, puede considerarse que la especie tiene potencial para ser utilizada como biosorbente de metales pesados sin perder de vista que el grado de tolerancia es diferente para cada especie y para diferentes metales pesados.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que proporcionó para el estudio en el posgrado de Ciencias Ambientales de la BUAP (ICUAP), al Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología VIEP-BUAP (CUVYT).

## Literatura citada

- Abbas, S. H.; Ismail, I. M.; Mostafa, T. M. and Sulaymon, A. H. 2014. Biosorption of heavy metals a review. *J. Chemical Sci. Technol.* 3(4):74-102.
- Anand, P.; Isar, J.; Saran, S. and Saxena, R. K. 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bio. Technol.* 97(8):1018-1025.
- APHA. 2018. Standard methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA), (American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF), Washington, DC. EUA. 1 100 p.
- Arango, R. A.; Lebow, P. K. and Green, F. 2009. Correlation between oxalic acid production and tolerance of *Tyromyces palustris* strain TYP-6137 to N', N-naphthaloylhydroxamine. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 63(1):46-51.
- Awual, M. R.; Ismael, M.; Yaita, T.; El-Safty, S. A.; Shiwaku, H.; Okamoto, Y. and Suzuki, S. 2013. Trace copper (II) ions detection and removal from water using novel ligand modified composite adsorbent. *Chem. Eng. J.* 222:67-76. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.042>.

- Bai, S. R. and Abraham, T. E. 2005. Continuous adsorption and recovery of Cr (VI) in different types of reactors. *Biotechnology Progress*. 21(6):1692-1699.
- Banerjee, A. and Nayak, D. 2007. Biosorption of no-carrier-added radionuclides by calcium alginate beads using 'tracer packet' technique. *Bio. Technol.* 98(14):2771-2774.
- Beyer, D. 2005. Spent mushroom substrate (SMS) research in the US. *American Medical Group Association Journal*, Summer Issue. 31-32 pp.
- Bou, L. P.; Bernal, I. S.; Duarte, C. L.; Sardiñas, A. M.; Arias, M. E. C. and Valdés, M. E. C. 2018. Biosorción microbiana de metales pesados: características del proceso/Biosorption of heavy metals: characteristics of the process. *Rev. Cubana de Cienc. Biol.* 6(1):1-13.
- Bowman, S. M. and Free, S. J. 2006. La estructura y síntesis de la pared celular fúngica. *Bioensayos*. 28(8):799-808.
- Cervantes, C.; Espino-Saldaña, A. E.; Acevedo-Aguilar, F.; León-Rodríguez, I. L.; Rivera-Cano, M. E.; Avila-Rodríguez, M. and Moreno-Sánchez, R. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48(2):203-210.
- Chalmers, W. 1993. Specialty mushrooms: mushroom tissue culture. *Mushroom World*. (September) 14-18 pp.
- Chang, S. T. and Hayes, W. A. 2013. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic press. Inc., New York & London. (Ed.). 819 p.
- CONAGUA. 2018. Comisión Nacional del Agua. B Atlas del agua en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. [www.conagua.gob.mx](http://www.conagua.gob.mx).
- Da-Rocha, F. G. L.; Vendruscolo, F. and Antoniosi-Filho, N. R. 2019. Biosorption of hexavalent chromium by *Pleurotus ostreatus*. *Heliyon*. 5(3):01450.
- Deng, L.; Zhang, Y.; Qin, J.; Wang, X. and Zhu, X. 2009. Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by nonliving green algae *Cladophora albida*. *Minerals Engineering*. 22(4):372-377.
- Deng, S. and Ting, Y. P. 2005. Characterization of PEI-modified biomass and biosorption of Cu (II), Pb (II) and Ni (II). *Water Res.* 39(10):2167-2177.
- Díaz, R.; Téllez-Téllez, M.; Sánchez, C.; Bibbins-Martínez, M. D.; Díaz-Godínez, G. and Soriano-Santos, J. 2013. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronic J. Biotechnol.* 16(4):6-6.
- Eliescu, A.; Georgescu, A. A.; Nicolescu, C. M.; Bumbac, M.; Cioateră, N.; Mureșeanu, M. and Buruleanu, L. C. 2020. Biosorption of Pb (II) from aqueous solution using Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) biomass and spent mushroom substrate. *Analytical Letters*. 1-28 pp.
- EPA. 2002. *Methods for chemical analysis of water and wastes*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/4-79/020 (NTIS PB84128677).
- Flegg, P. B.; Spencer, D. M. and Wood, D. A. 1985. *Biology and technology of the cultivated mushroom*. Wiley.
- Fleites, L. and Calderón, A. 2015. Adsorption of Cu and Cd by the mycelial biomass of three strains of *Pleurotus white rot fungus*. *Rev. Latinoam. Amb. Cienc.* 6(14):20-34
- Fox, J. 2005. Getting started with the R commander: a basic-statistics graphical user interface to R. *J Stat Softw.* 14(9):1-42.
- Frutos, I.; García-Delgado, C.; Gárate, A and Eymar, E. 2016. Biosorción de metales pesados por carbono orgánico de sustratos de hongos usados y sus materias primas. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13(11):2713-2720. Doi: 10.1007/s13762-016-1100-6.

- Huang, H.; Cheng, G.; Chen, L.; Zhu, X. and Xu, H. 2009. Lead (II) removal from aqueous solution by spent *Agaricus bisporus*: determination of optimum process condition using Taguchi method. *Water Air Soil Pollution*. 203(1-4):53-63.
- Ismadji, S.; Soetaredjo, F. E. and Ayucitra, A. 2015. Clay materials for environmental remediation 25:1-124. Berlin: Springer.
- Javaid, A.; Bajwa, R.; Shafique, U. and Anwar, J. 2011. Removal of heavy metals by adsorption on *Pleurotus ostreatus*. *Bio. Bioen.* 35(5):1675-1682.
- Kulshreshtha, S.; Mathur, N. and Bhatnagar, P. 2014. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express*. 4(1):29-36.
- Kumar-Ramasamy, R.; Congeevaram, S. and Thamaraiselvi, K. 2011. Evaluation of isolated fungal strain from e-waste recycling facility for effective sorption of toxic heavy metal Pb (II) ions and fungal protein molecular characterization a mycoremediation approach. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 2:342-347.
- Lozano, V.; Yañez, M. J. y Morales, A. 2014. Principios y práctica de la microscopía electrónica. México: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Miaomiao, C. H. E. N.; Zheng, X; Liang, C. H. E. N. and Xiaofang, L. I. 2018. Cadmium-resistant oyster mushrooms from North China for mycoremediation. *Pedosphere*. 28(6):848-855.
- Morales-Fonseca, D. M. and Ruiz-Tovar, K. J. 2008. Determinación de la capacidad de remoción de cadmio, plomo y níquel por hongos de la podredumbre blanca inmovilizados.
- Morales-Fonseca, D.; Ruiz-Tovar, K.; Martínez-Salgado, M. M.; Soto-Guzmán, A. B.; Falcony-Guajardo, C.; Vázquez, R. R. and Pedroza-Rodríguez, A. M. 2010. Desarrollo de un bioadsorbente laminar con *Phanerochaete chrysosporium* hipertolerante al cadmio, al níquel y al plomo para el tratamiento de aguas. *Rev. Iberoam. Micol.* 27(3):111-118.
- Mosa, K. A.; Saadoun, I.; Kumar, K.; Helmy, M. and Dhankher, O. P. 2016. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Frontiers Plant Sci.* 7:303-311.
- Mumpuni, A.; Ekowati, N.; Purnomowati, P. and Purwati, E. S. 2017. Growth and protein content establishment of *pleurotus ostreatus* on liquid and solid medium. *Biosaintifika. J. Biology & Biology Education*. 9(3):572.578.
- Nasseri, S.; Mazaheri, A. M.; Noori, S. M.; Rostami, K. H.; Shariat, M. and Nadafi, K. 2002. Chromium removal from tanning effluent using biomass of *Aspergillus oryzae*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 5(10):1056-1059.
- Noble, R. 2005. Spent mushroom substrate-an alternative use. *AMGA J. Summer*. 33-35 pp.
- Ogbo, E. M. and Okhuoya, J. A. 2011. Bio-absorption of some heavy metals by *Pleurotus tuberregium* Fr. Singer (an edible mushroom) from crude oil polluted soils amended with fertilizers and cellulosic wastes. *Inter. J. Soil Sci.* 6(1):34-40.
- Pawar, R. R.; Bajaj, H. C. and Lee, S. M. 2016. Activated bentonite as a low-cost adsorbent for the removal of Cu (II) and Pb (II) from aqueous solutions: Batch and column studies. *J. Ind. Eng. Chem.* 34:213-223.
- Prakash, V. 2017. Mycoremediation of environmental pollutants. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 10(3):149-155.
- Prasenjit, B. y Sumathi, S. 2005. Captación de cromo por *Aspergillus foetidus*. *Revista de Ciclos de Materiales y Gestión de Residuos*. 7(2):88-92.
- Qazilbash, A. A. 2004. Isolation and characterization of heavy metal tolerant biota from industrially polluted soils and their role in bioremediation. Doctoral dissertation, Quaid-i-Azam University Islamabad, Pakistan. 210-256 pp.

- Ramos, D. C. 2018. Adsorción de cadmio, cobre y plomo en bentonita, caolín y zeolita naturales y modificadas: una revisión de los parámetros de operación, isoterma y cinética. *Ingeniería*. 23(3):252-273.
- Sánchez, A. 2017. Saneamiento descentralizado y reutilización sustentable de las aguas residuales municipales en México. *Sociedad y Ambiente*. 14:119-143.
- Sazanova, K.; Osmolovskaya, N.; Schiparev, S.; Yakkonen, K.; Kuchaeva, L. and Vlasov, D. 2015. Organic acids induce tolerance to zinc-and copper-exposed fungi under various growth conditions. *Current Microbiol.* 70(4):520-527.
- SEMARNAT. 1997. NOM-003-SEMARNAT-1997.
- Singh, J.; Kant, K.; Sharma, H. B. and Rana, K. S. 2008. Bioaccumulation of cadmium in tissues of *Cirrihna mrigala* and *Catla catla*. *Asian J. Exp. Sci.* 22:411-414.
- Smith, D. and Onions, A. H. 1994. The preservation and maintenance of living fungi (Ed). 2. CAB international.
- Stamets, P. and Chilton, J. S. 1983. The mushroom cultivator. First Washington.
- Tejada-Tovar, C.; Villabona-Ortiz, Á. and Garcés-Jaraba, L. 2015. Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecnológicas*. 18(34):109-123.
- Wang, Y.; Yi, B.; Sun, X.; Yu, L.; Wu, L.; Liu, W. and Li, X. 2019. Removal and tolerance mechanism of Pb by a filamentous fungus: a case study. *Chemosphere*. 225:200-208.
- Yang, S.; Sun, X.; Shen, Y.; Chang, C.; Guo, E.; La, G. and Li, X. 2017. Tolerance and removal mechanisms of heavy metals by fungus *Pleurotus ostreatus* Haas. *Water, Air & Soil Pollution*. 228(4):130-137.
- Yazdani, M.; Yap, C. K.; Abdullah, F. and Tan, S. G. 2010. An *in vitro* study on the adsorption, absorption and uptake capacity of Zn by the bioremediator *Trichoderma atroviride*. *Environ. Asia*. 3(1):53-59.