

## Remoción de Cromo Hexavalente por el Hongo *Paecilomyces* sp. Aislado del Medio Ambiente

Juan F. Cárdenas-González e Ismael Acosta-Rodríguez

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Centro de Investigación y de Estudios de Posgrado, Laboratorio de Micología Experimental. Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, 78320 San Luis Potosí, S.L.P. México (e-mail: iacosta@uaslp.mx)

Recibido Ene. 26, 2010; Aceptado Mar. 17, 2010; Versión Final recibida May. 31, 2010

---

### Resumen

Se aisló un hongo resistente y capaz de remover cromo hexavalente a partir del medio ambiente de una zona cercana a la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de San Luis Potosí en México. La cepa fue identificada como *Paecilomyces* sp, en base a sus características macro y microscópicas. La biomasa fúngica remueve eficientemente Cromo (VI) en solución y puede utilizarse para descontaminar nichos acuáticos contaminados, ya que 1 g de biomasa fúngica remueve 100 y 1000 mg/100 mL del metal a una y tres horas de incubación, y elimina totalmente 297 mg Cr(VI)/g de tierra contaminada.

*Palabras clave: resistencia fúngica, bioadsorción de cromo, biomasa fúngica, biorremediación*

## Hexavalent Chromium Removal by a *Paecilomyces* sp Fungal Strain Isolated from Environment

### Abstract

A fungal strain resistant to Cr (VI) and capable of removing the oxyanion from the medium was isolated from the environment near the Chemical Science Faculty, University San Luis Potosí in Mexico. The strain was identified as *Paecilomyces* sp, by macro and microscopic characteristics. It was concluded that this fungal biomass can be used for the removal of Cr (VI) in aqueous solutions, since 1 g of fungal biomass removes 100 y 1000 mg/100 mL of this metal after one and three hours of incubation, and removes 297 mg Cr (VI) from contaminated soil.

*Keywords: fungal resistance, chromium biosorption, fungal biomass, bioremediation*

## INTRODUCCIÓN

Debido a las actividades industriales, como la producción de acero, minería, cemento y curtido de pieles, ciertas zonas de la República Mexicana, tienen altos niveles de cromo en suelo y agua (Armienta-Hernández y Rodríguez, 1995). El uso de lodos de aguas negras o de fertilizantes con diferentes concentraciones del catión, en algunas prácticas agronómicas, son otros de los factores contribuyentes a la contaminación ambiental por el metal. El cromo se encuentra presente en agua y suelo principalmente en dos estados de oxidación: Cr (III) o Cr (VI), aunque también puede encontrarse como óxido de cromo, sulfato de cromo, trióxido de cromo, ácido crómico y dicromato (Zouboulis et al., 1995). En presencia de la materia orgánica, el Cr (VI) presente en aguas y suelos es reducido a Cr (III); sin embargo, las altas concentraciones del ión en estado hexavalente pueden sobrepasar esta capacidad de reducción, lo que impediría su adecuada eliminación (Cervantes et al., 2001). Pese a que el cromo es un elemento esencial para hombres y animales, niveles elevados de este metal (15 µg en agua de ríos y 0.10 mg /L en agua potable) resultan tóxicos en estos seres vivos. En las aguas residuales, el Cr (VI), se encuentra en solución como  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Cotton y Wilkinson, 1980), puede removerse por reducción, por precipitación química, por adsorción y por intercambio iónico (Cervantes et al., 2001). Actualmente, el proceso más utilizado es la adición de un agente reductor que convierta el Cr (VI) a Cr (III) y posteriormente se le precipita con soluciones básicas a  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  (Campos et al., 1995).

Recientemente, se ha estudiado el aislamiento de microorganismos resistentes y estudio de la capacidad de remoción y/o reducción de Cr (VI), a partir de sitios contaminados con el mismo metal, como la bacterias *Corynebacterium hoagii* (Viti et al., 2003) y *Staphylococcus saprophyticus* (Ilhan et al., 2004), las levaduras *Candida* sp (Guillen-Jiménez et al., 2008), *Candida maltosa* (Ramírez-Ramírez et al., 2004), y los hongos filamentosos *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp (Acevedo-Aguilar et al., 2008, Fukuda et al., 2008), *Trichoderma inhamatum* (Morales-Barrera y Cristiani-Urbina, 2008) y *Aspergillus niger* (Khambhaty et. al., 2009).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue estudiar la resistencia y capacidad de remoción de Cr (VI) en solución acuosa por el hongo contaminante ambiental *Paecilomyces* sp para su utilización en la descontaminación o biodegradación de dicho metal en nichos acuáticos contaminados.

## METODOLOGÍA

### *Aislamiento, pruebas de resistencia y obtención de la biomasa celular*

Se prepararon cajas de Petri con medio mínimo de sales adicionado de 500 mg/L de Cr (VI) y se colocaron destapadas durante 10 minutos en una zona cercana a la Facultad de Ciencias Químicas, de la UASLP, San Luis Potosí, México (temperatura media anual de 18.6°C y 1860 metros sobre el nivel del mar) y se trasladaron al laboratorio, donde se incubaron a 28°C durante 7 días. Las colonias resultantes se purificaron por resiembras sucesivas en AEM-Cr y AEM. Los cultivos puros del hongo se identificaron por sus características macro y microscópicas en Agar Papa Dextrosa (López Martínez et al., 2004). La resistencia del hongo se analizó inoculando el hongo en medio mínimo de Lee et al., (1975), conteniendo de 200-2000 mg/L de Cr (VI), incubando durante 7 días a 28°C y 100 rpm, determinando el peso seco del hongo, comparándolo con un control sin metal. La biomasa celular fue obtenida mediante el crecimiento del hongo en caldo tioglicolato (8 g/L), a 28°C con agitación constante (100 rpm). 4 días después de la incubación, se obtuvo la biomasa por filtración en papel Whatman No. 2. Posteriormente se centrifugó (3000 rpm, 5 min), se lavó 3 veces con agua tridesionizada, se secó (80°C, 12 h) en estufa bacteriológica, se molió en mortero y se guardó en frascos de vidrio ámbar a temperatura ambiente hasta su utilización.

### *Soluciones de Cr (VI)*

Se trabajó con 100 mL de una solución de 100 mg/L de concentración de Cr (VI) obtenida por dilución a partir de una solución patrón de 1000 mg /L. Se ajustó a 1.0 +/- 0.2 el pH de la dilución a analizar con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M, antes de adicionar a la biomasa celular.

### Estudios de remoción

1 g de la biomasa celular se mezcló con 100 mL de una solución de 100 y 1000 mg/L de concentración de metal (pH 1.0 +/- 0.2, a 28°C y 50°C) y se incubaron con agitación constante (100 rpm) durante 10 h, tomando cada hora y en condiciones estériles, alícuotas de 5 mL cada una, las cuales se centrifugaron a 3000 rpm (5 min), y al sobrenadante respectivo se le determinó la concentración de Cr (VI), utilizando el método colorimétrico de la difenilcarbazida (desarrollo de coloración rosa violeta). A las muestras (5 mL), que contenían de 0 a 7.2 mg /L de Cr (VI) se les añadió 0.5 mL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 (v/v), 0.1 mL de ácido fosfórico al 85% (v/v) y 1.0 de difenilcarbazida al 0.2% (p/v) en etanol absoluto, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se les leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm (Greenberg et al., 1992). Todos los experimentos se realizaron 3 veces y por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras del medio ambiente, se obtuvo una cepa fúngica capaz de crecer a 500 mg/L de Cr (VI), lo que indica que el hongo desarrolló la resistencia y tal vez el mecanismo de reducción del metal en un medio ambiente contaminado con el mismo, lo cual coincide con una gran variedad de estudios, pues a partir de efluentes de tenerías, se han aislado diferentes microorganismos con la capacidad de resistencia y reducción de Cr (VI) (Ilhan et al., 2004; Guillen-Jiménez et al., 2008; Ramírez-Ramírez et al., 2004; Acevedo-Aguilar et al., 2008, Fukuda et al., 2008; Morales-Barrera y Cristiani-Urbina, 2008). Las colonias del hongo aislado, crecieron rápidamente en AEM, con un diámetro de 7 a 8 cm a los 7 días de incubación, con la superficie blanco-crema y algunos tonos naranja, oscureciéndose con el tiempo. Las colonias son de textura algodonosa, densa, con borde lobulado y pigmento extracelular amarillo oscuro, con esclerocios que dan lugar a una apariencia flocosa y color café uniforme, con las hifas y los conidioforos verde claro, éstos son largos, con ramificaciones espaciadas, perpendiculares y con una única fialide terminal. Los conidios son citriformes y finamente equinulados. Con diferentes concentraciones de Cr (VI), se encuentran alteraciones en ambas morfologías, observándose menor crecimiento colonial y una menor conidiación (Figura 1) (López Martínez et al., 2004).

La Figura 2 muestra la influencia de diferentes concentraciones de Cr (VI) sobre el crecimiento del hongo como peso seco, observando que a medida que se aumenta la concentración del metal disminuye el crecimiento del hongo, pues el control presenta un crecimiento de 183 mg y de 16 mg con 2 000 mg/L del metal, lo que confirma que el hongo desarrolló resistencia, la cual es mayor a la reportada (100 mg/L) para la bacteria *C. hoagii* (176 mg/L) (Viti et al., 2003), las levaduras *Candida* sp (640 mg/L) (Guillen-Jiménez et al., 2008), *C. maltosa* (100 µg/mL) (Ramírez-Ramírez et al., 2004), y el hongo filamentoso *T. inhamatum* (680 mg/L) (Morales-Barrera y Cristiani-Urbina, 2008).

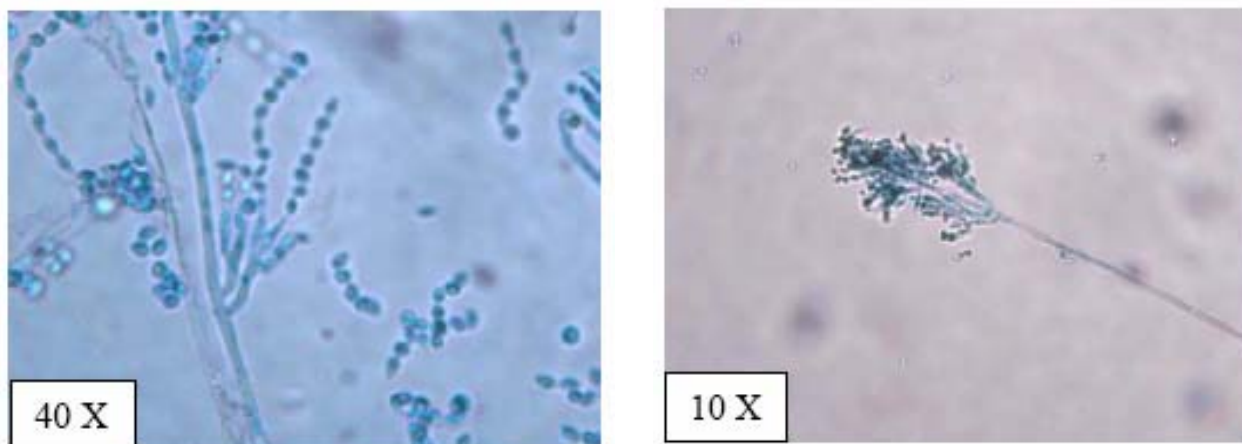


Fig. 1: Morfología microscópica del hongo *Paecilomyces* sp. en ausencia y presencia de 500 mg/L, de Cr (VI), respectivamente.

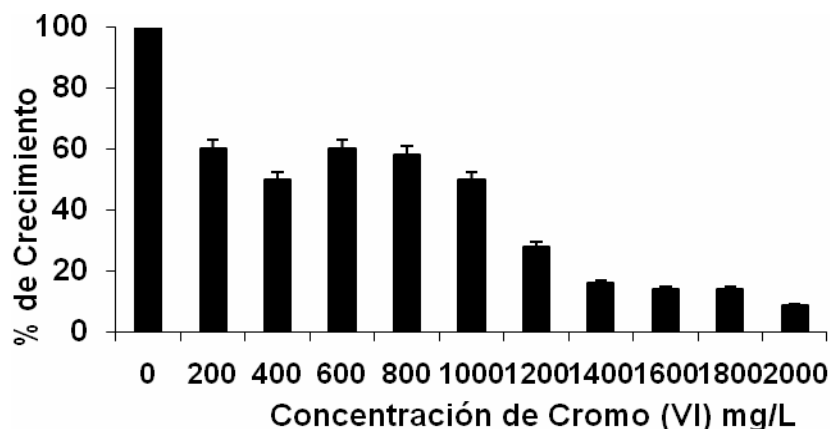


Fig. 2: Crecimiento en peso seco de *Paecilomyces* sp en presencia de diferentes concentraciones de Cr (VI).  $1 \times 10^6$  esporas/mL, 28°C, 7 días de incubación. 100 rpm.

En lo que tiene que ver con la remoción del metal, se observó una mayor eficiencia a 50°C (Figura 3), pues a 1 y 3 h se remueve el 100% de Cr (VI) (100 y 1000 mg/L, respectivamente), mientras que a 28°C, se elimina el metal hasta las 9 h; resultados que son coincidentes con los de Park et al. (2005), quienes observaron que a 45°C y 24 h, ocurre la adsorción del mismo metal para *Aspergillus niger*, pero difieren de los 35°C y 24 h reportados por Sag y Aktay (2002) para *Rhizopus arrhizus*. El incremento en la temperatura, aumenta la velocidad de remoción de Cr (VI) y disminuye el tiempo de contacto requerido para la completa remoción del metal, por incrementar la velocidad de reacción redox (Wittbrodt y Palmer, 1996). También se observa que con 100 mg/L de Cr (VI), la biomasa estudiada, mostró las mejores respuestas de remoción, adsorbiendo el 100% a la hora, mientras que a una concentración de 1 000 mg/L, la remoción ocurre hasta las 3 h (Figura 3). Algunos autores (Tewari et. al., 2005; Bai y Abraham, 2001), sostienen que la cantidad de metal eliminado por las biomazas de diferentes microorganismos, tales como *Mucor hiemalis* y *Rhizopus nigricans* aumenta en proporción directa con el incremento de la concentración del ión metálico en solución. De nuevo se encuentran discrepancias con los resultados de este trabajo, debido a que la biomasa utilizada en el estudio mostró la mayor capacidad de remoción a bajas concentraciones (100 mg/L).

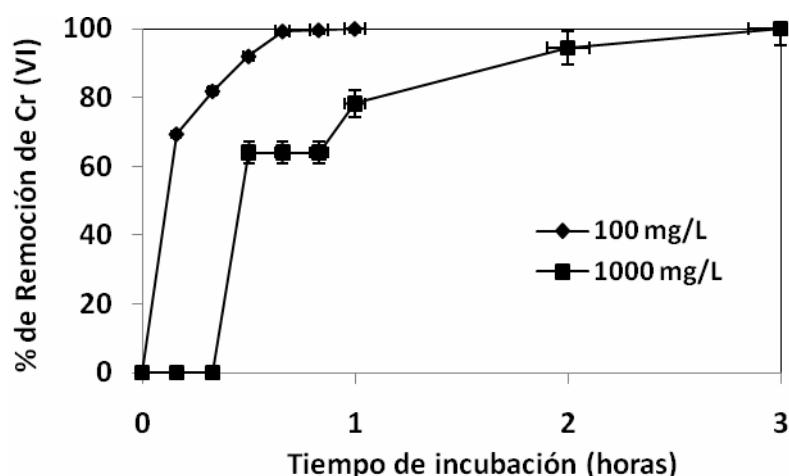


Fig. 3: Porcentaje de remoción de Cromo (VI) en solución. 100 y 1 000 mg/100mL/1 g de biomasa, 50°C, con agitación constante (100 rpm).

También, se realizó un estudio de biorremediación en el cual 5 g de la biomasa fúngica, se incubaron con 20 g de tierra no estéril, contaminada con aproximadamente 297 mg Cr (VI)/g de tierra, obtenida de una tina de lavado de una cromadora de Celaya, Gto, México, aforando a 100 mL con agua tridesionizada e incubando a 28°C y 100 rpm, observando que a los 5 días de incubación la remoción del metal es total (Figura 4). En comparación con otras biomásas estudiadas, como carbón activado de grano de maíz (35.2 mg de del metal/g de biomasa/4 días, El Nemr, 2009); levadura de pan (40 mg/L/6 horas, Menezes et. al., 1998), y por *Staphylococcus saprophyticus* (5.16 mg/L/3 horas, Ilhan et. al., 2004) fue la más eficiente. Finalmente la Tabla 1 muestra la eficiencia de adsorción de Cr (VI) por diferentes biomásas de microorganismos donde se muestra que la biomasa de *Paecilomyces* sp reportada en este estudio es la más eficiente en la remoción del metal.

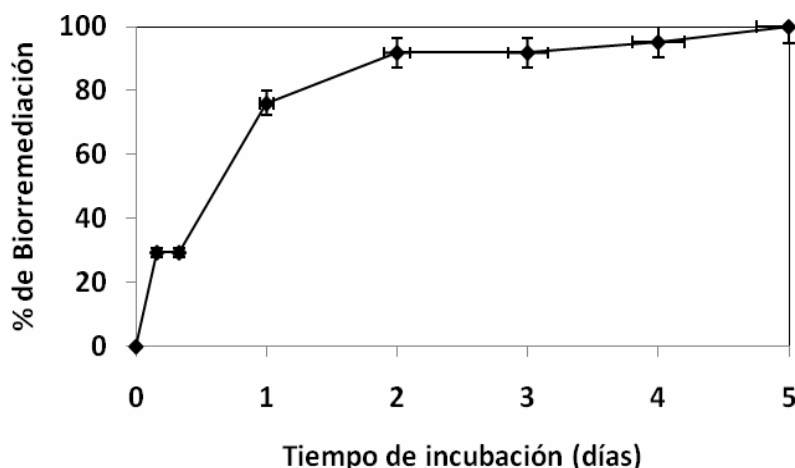


Fig. 4: Biorremediación de Cr (VI) a partir de tierra contaminada (297 mg Cr (VI)/g tierra) por la biomasa de *Paecilomyces* sp. 28°C, 100 rpm.

Tabla 1: Capacidad de adsorción de algunas biomásas microbianas para remover Cr (VI) en solución acuosa.

| Biosorbente                 | Capacidad de adsorción (mg/g) | Referencias                 |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>Aspergillus foetidus</i> | 2                             | Prasanjit y Sumathi (2005)  |
| <i>Aspergillus niger</i>    | 117.33                        | Khambhaty et al. (2009)     |
| <i>Aspergillus sydoni</i>   | 1.76                          | Kumar et al. (2008)         |
| <i>Rhizopus nigricans</i>   | 47                            | Bai y Abraham (2001)        |
| <i>Rhizopus oligosporus</i> | 126                           | Ariff et al. (1999)         |
| <i>Rhizopus arrhizus</i>    | 11                            | Bai y Abraham (1998)        |
| <i>Rhizopus arrhizus</i>    | 78                            | Aksu y Balibek (2007)       |
| <i>Rhizopus</i> sp.         | 4.33                          | Zafar et al. (2007)         |
| <i>Mucor hiemalis</i>       | 53.5                          | Tewari et al. (2005)        |
| <i>Paecilomyces</i> sp      | 1000                          | (presente estudio)          |
| <i>Bacillus coagulans</i>   | 39.9                          | Srinath et al. (2002)       |
| <i>Bacillus megaterium</i>  | 30.7                          | Srinath et al. (2002)       |
| <i>Zoogloea ramigera</i>    | 2                             | Nourbakhsh et al. (1994)    |
| <i>Streptomyces noursei</i> | 1.2                           | Mattuschka y Straube (1993) |
| <i>Chlorella vulgaris</i>   | 3.5                           | Nourbakhsh et al. (1994)    |
| <i>Cladophora crispate</i>  | 3                             | Nourbakhsh et al. (1994)    |
| <i>Dunaliella</i> sp.       | 58.3                          | Donmez y Aksu (2002)        |
| <i>Pachymeniopsis</i> sp.   | 225                           | Lee et al. (2000)           |

## CONCLUSIONES

Se aisló un hongo contaminante ambiental, resistente hasta 2 000 mg/L de Cr (VI), identificado como *Paecilomyces* sp. La biomasa fúngica analizada remueve eficientemente Cr (VI) en solución (100 mg y 1000 mg/100mL/1 g de biomasa a los 60 y 180 min, 50°C, pH 1.0, 100 rpm). Además también es muy eficiente en la biorremediación de tierra contaminada con el metal, por lo que el hongo puede utilizarse para eliminar el Cr (VI) presente en aguas residuales industriales, pues presenta mayor capacidad a otras biomásas reportadas en la literatura. La aplicación de la bioadsorción en la purificación de aguas residuales presenta un gran potencial, pues las biomásas fúngicas son naturales, se pueden obtener en grandes cantidades, son económicas y pueden remover selectivamente diferentes iones metálicos de soluciones acuosas.

## REFERENCIAS

- Acevedo-Aguilar, F., A. y otros 7 autores, *Analytical speciation of chromium in in-vitro cultures of chromate-resistant filamentous fungi*, Analytical and Bioanalytical Chemistry: 392, 269-276 (2008).
- Ariff, A.B., M. Mel., M.A. Hasan, y M.I.A. Karim, *The kinetics and mechanism of lead (II) biosorption by powdered Rhizopus oligosporus*, World Journal of Microbiology Biotechnology: 15, 291-298 (1999).
- Aksu, Z. y E. Balibek, *Chromium (VI) biosorption by dried Rhizopus arrhizus: effect of salt (NaCl) concentration on equilibrium and kinetic parameters*, Journal of Hazardous Materials: 145, 210-220 (2007).
- Armienta-Hernández, M. y R. Rodríguez Castillo, *Environmental exposure to Chromium compounds in the valley of León, México*, Environmental Health Perspectives: 103, 47- 51 (1995).
- Bai, R.S. y T.E. Abraham, *Studies on biosorption of chromium (VI) by dead fungal biomass*, Journal of Scientific & Industrial Research; 57, 821-824 (1998).
- Bai, R.S. y T.E. Abraham, *Biosorption of Cr (VI) from aqueous solution by Rhizopus nigricans*, Bioresource Technology: 79, 73-81 (2001).
- Campos, J., M. Martínez-Pacheco y C. Cervantes, *Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant Bacillus sp strain*, Antoine van Leeuwenhoek: 68, 203-208 (1995).
- Cervantes, C., J. y otros 6 autores, *Interactions of chromium with microorganisms and plants*, FEMS Microbiology Review 25, 333-347 (2001).
- Cotton, F.A. y G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, 4<sup>a</sup> Ed. Chichester, Uk; John Wiley&Sons, 376-379 (1980).
- Donmez, G.C. y Z. Aksu, *Removal of chromium (VI) from saline wastewaters by Dunaliella species*, Process Biochemistry; 38, 751-762 (2002).
- El Nemr, A. *Potential of pomegranate husk carbon for Cr (VI) removal from wastewater: Kinetic and isotherm studies*, Journal of Hazardous Materials: 161, 132-141 (2009).
- Fukuda, T. y otros 4 autores, *Cr(VI) reduction from contaminated soils by Aspergillus sp. N2 and Penicillium sp. N3 isolated from chromium deposits*, Journal of General Applied Microbiology: 54, 295-303 (2008).
- Greenberg, A.E., L.S. Clesceri y A.D. Eaton, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 18<sup>a</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 3, 58-3.60 (1992).

- Guillen-Jiménez y otro 4 autores, *Modulation of tolerance to Cr(VI) and Cr(VI) reduction by sulfate ion in a Candida yeast strain isolated from tannery wastewater*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology: 35, 1277-1287 (2008).
- Ilham, S., M. N. Nourbakhsh, S. Kilicarslan y H. Ozdag, *Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by Staphylococcus saprophyticus*, Turkish Electronic Journal of Biotechnology: 2, 50-57 (2004).
- Khambhaty, Y., K. Mody, S. Basha y B. Jha, *Kinetics equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of hexavalent chromium by dead fungal biomass of marine Aspergillus niger*, Chemical Engineering Journal: 145, 489-495 (2009).
- Kratochvil, D. y B. Volesky, *Advances in the biosorption of heavy metals*, Trends in Biotechnology: 16, 291-300 (1998).
- Lee, D.C., Park, C.J., Yung, J.E., Jeong, e Y.H., *Screening of hexavalent chromium biosorbent from marine algae*, Applied Microbiology and Biotechnology: 54, 445-448 (2000).
- López Martínez, R. y otros tres autores, *Hongos contaminantes comunes en el Laboratorio. En Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de Laboratorio*, 2ª. Ed. Trillas. pp 137-148. México (2004).
- Mattuschka, B. y G. Straube, *Biosorption of metals by waste biomass*, Journal of Chemical Technology Biotechnology: 58, 57-63 (1993).
- Menezes, L.B., V.V. Braz y C.A. Cordeiro, *Chromium uptake from aqueous effluents by immobilized baker's yeast*, Revista Brasileira de Microbiologia: 29 (4), 1-5 (1998).
- Morales-Barrera, L. y E. Cristiani-Urbina, *Hexavalent Chromium Removal by a Trichoderma inhatum Fungal Strain Isolated from Tannery Effluent*, Water Air Soil Pollution: 187, 327-336 (2008).
- Nourbakhsh, M. y otros cinco autores, *A comparative study of various biosorbents for removal of chromium (VI) ions from industrial wastewater*, Process Biochemistry: 29, 1-5 (1994).
- Park, D., Y. Yun, J. Jo y J.M., Park, *Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of Aspergillus niger*, Water Research: 39, 533-540 (2005).
- Prasanjit, B. y S. Sumathi, *Uptake of chromium by Aspergillus foetidus*, Journal of Material Cycles and Waste Management: 7, 88-92 (2005).
- Ramírez-Ramírez, R. y otros siete autores, *Cr (VI) reduction in a Chromate-resistant strain of Candida maltose isolated from the leather industry*, Antonie van Leeuwenhoek: 85, 63-68 (2004).
- Sag, Y. e Y. Aktay, *Kinetic studies on sorption of Cr (VI) and Cu (II) ions by chitin, chitosan and Rhizopus arrhizus*. Biochemical Engineering Journal: 12, 143-153 (2002).
- Sarin, V. y K.K. Pant, *Removal of chromium from industrial waste by using eucalyptus bark*, Bioresource Technology: 97, 15-20 (2006).
- Srinath, T., T. Verma, P.W. Ramteke y S.K. Garg, *Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria*, Chemosphere: 48, 427-435 (2002).
- Tewari, N., P. Vasudevan, y B. Guha, *Study on biosorption of Cr(VI) by Mucor hiemalis*, Biochemical Engineering Journal: 23, 185-192 (2005).

Vitti, C., A. Pace y L. Giovannetti, *Characterization of Cr(VI) Resistant Bacteria isolated from Chromium-Contaminated Soil by Tannery Activity*, *Current Microbiology*: 46, 1-5 (2003).

Wittbrodt, P.R. y C.D. Palmer, *Effect of temperature, ion strength, background electrolytes, and Fe(III) on the reduction of hexavalent chromium by soil humic substances*, *Environmental Science Technology*: 30 (8), 2470-2477 (1996).

Zafar, S., F. Aqil, e I. Ahmad, *Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil*, *Bioresource Technology*: 98, 2557-2561 (2007).

Zouboulis, A.I., K.A. Kydros y K.A. Matis, *Removal of hexavalent Chromium anions from solutions by pyrite fines*, *Water Research*: 29 (7), 1755-1760 (1995).