

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

Especialidad en Ciencia y Tecnología de Granos

Síntesis y Estudio Toxicológico de Biocompositos de Quitosano-Alginato-*Rhodotorula mucilaginosa* con Aplicación Potencial Para Bioeliminar Cobre en Aguas

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

Muñoz Espinoza Carlos Ignacio

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Síntesis y Estudio Toxicológico de Biocompositos de Quitosano-Alginato-Rhodotorula mucilaginosa con Aplicación Potencial Para Bioeliminar Cobre en Aguas

Q.A. Carlos Ignacio Muñoz Espinoza

Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia
Director de tesis

Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Co-Directora de tesis

Dr. Mario Onofre Cortez Rocha
Miembro del comité de tesis

Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo
Miembro del comité de tesis

DERECHOS DE AUTOR

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

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

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

Atentamente

Q.A. Carlos Ignacio Muñoz Espinoza

Dr. Francisco Rodríguez Félix
Coordinador del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2019

RESUMEN

La acumulación de metales pesados como Pb, Cu, Ni, Cd, Hg, As, y Cr en aguas de la red, crudas y/o subterráneas aledañas a las zonas industriales, ha propiciado la contaminación de las aguas utilizadas para las actividades agropecuarias y consumo humano. Al respecto, la implementación de tecnologías novedosas como la biorremediación, constituye una alternativa ecológica en países en vías de desarrollo. La biorremediación involucra procesos de biosorción utilizando diferentes materiales biológicos para atrapar y concentrar iones metálicos, siendo el quitosano un polímero y el alginato un biopolímero capaz de atrapar o quelar iones metálicos. La combinación de estos materiales poliméricos con biomasa de microorganismos metalotolerantes representa una alternativa prometedora para potenciar la eficacia de los sistemas para bioeliminar metales en aguas, impactando positivamente en la utilización económica de las fuentes de agua no convencionales. En este estudio se aisló un hongo levaduriforme a partir de efluentes superficiales y sedimentos obtenidos en el cause del Río San Pedro, Cananea, Sonora, y se llevaron a cabo las pruebas de tolerancias de Cu^{2+} y a quitosanos de diferente peso molecular. Asimismo, se elaboró un biocomposito a partir de una mezcla de quitosano, alginato y biomasa inactivada de *Rhodotorula mucilaginosa* (QAB), el cual no presentó toxicidad aguda en ensayos con *Artemia salina*; sin embargo, este material mostró una baja toxicidad en ensayos de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y semillas de chile (*Capsicum annuum*). Al evaluar la eficacia del biocomposito de QAB para remover cobre se encontró una eficiencia de remoción del metal de $> 95\%$ a las 24 h, lo que representa una remoción de 17.23 ± 0.00 mg Cu^{+2} por cada gramo de perlas liofilizadas de biocomposito. Estos resultados sugieren que el material desarrollado constituye una alternativa prometedora para aplicaciones en la biorremediación de metales pesados como cobre en aguas contaminadas.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| DERECHOS DE AUTOR..... | 3 |
| INTRODUCCIÓN..... | 13 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| Contaminación por metales | 15 |
| Principales fuentes de contaminación por metales | 16 |
| Daños a la salud | 17 |
| Impacto ambiental asociado a la contaminación por metales..... | 17 |
| En sedimentos o suelos | 18 |
| En plantas | 22 |
| En aguas y Alimentos | 23 |
| En alimentos | 24 |
| Cobre..... | 26 |
| Importancia | 26 |
| Aplicaciones | 26 |
| Peligros potenciales..... | 27 |
| Aspectos toxicológicos..... | 28 |
| Toxicidad aguda | 28 |
| Toxicidad crónica..... | 29 |
| Contaminación por cobre..... | 29 |
| En organismos vivos..... | 30 |
| En plantas..... | 31 |
| En alimentos | 32 |
| Métodos de remoción de metales | 32 |
| Técnicas convencionales | 34 |
| Filtración por membrana | 34 |
| Electrodialisis | 34 |
| Nanofiltración..... | 34 |
| Adsorción (Convencional)..... | 35 |
| Ósmosis inversa | 35 |

| | |
|---|----|
| Ultrafiltración | 35 |
| Intercambio iónico | 35 |
| Coagulación-floculación..... | 36 |
| Precipitación química..... | 36 |
| Nanotubos de carbono | 36 |
| Carbón activado..... | 36 |
| Electrofloculación y electrocoagulación | 37 |
| Fotocatálisis..... | 37 |
| Flotación | 37 |
| Técnicas No Convencionales..... | 38 |
| Ceniza volante | 38 |
| Biopolímeros | 38 |
| Hidrogeles..... | 38 |
| Adsorción de metales por materiales naturales agrícolas e industriales..... | 38 |
| Fitorremediación | 39 |
| Adsorbentes de bajo costo y nuevos adsorbentes | 39 |
| Biorremediación | 40 |
| Generalidades..... | 40 |
| Tipos de contaminantes que se remueven..... | 40 |
| Ventajas y limitaciones | 41 |
| Factores que afectan la biorremediación..... | 41 |
| Propiedades del contaminante (biodegradabilidad) | 41 |
| Disponibilidad del contaminante | 42 |
| Microorganismos..... | 42 |
| Condiciones del medio contaminado..... | 43 |
| Bioestimulación y bioaumentación | 43 |
| Biosorción..... | 44 |
| Tipo de biosorbentes..... | 46 |
| Polímeros biosorbentes | 46 |
| Quitosano | 47 |
| Alginato..... | 52 |
| Compositos de quitosano/alginato en procesos de biorremoción de metales | 55 |

| | |
|--|----|
| Levaduras metalotolerantes | 55 |
| Principales especies involucradas en remoción de metales | 57 |
| Biosorción de Metales Pesados utilizando Biomasa | 58 |
| Mecanismos de tolerancia a metales en plantas | 58 |
| Mecanismos externos | 60 |
| Mecanismos internos | 61 |
| Mecanismos de tolerancia a metales en microorganismos | 62 |
| HIPÓTESIS | 67 |
| OBJETIVOS | 68 |
| Objetivo general | 68 |
| Objetivos específicos | 68 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 69 |
| Aislamiento y cultivo de levadura metalotolerante | 69 |
| Soluciones de polímeros | 70 |
| Solución de quitosano | 70 |
| Solución de alginato | 70 |
| Producción de biomasa microbiana | 70 |
| Pruebas de Tolerancia | 71 |
| Tolerancia a cobre | 71 |
| Tolerancia al quitosano | 71 |
| Síntesis de las Perlas Biopoliméricas | 72 |
| Perlas de quitosano | 72 |
| Perlas de alginato | 72 |
| Perlas de biocomposito quitosano-alginato (Q-A)..... | 72 |
| Perlas del biocomposito quitosano-alginato-biomasa (Q-A-B) | 73 |
| Caracterización fisicoquímica de los biocompositos | 73 |
| Morfología | 73 |
| Análisis de Infrarrojo (FT-IR)..... | 73 |
| Análisis toxicológicos de los biocompositos | 74 |
| Toxicidad aguda utilizando nauplios de <i>Artemia salina</i> | 74 |
| Fitotoxicidad utilizando semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)..... | 75 |
| Toxicidad <i>in vivo</i> utilizando plántulas de chile (<i>capsicum annuum</i>)..... | 75 |

| | |
|---|-----|
| Eficiencia de remoción de cobre | 76 |
| Análisis estadístico | 77 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 78 |
| Aislamiento e Identificación de la levadura metalotolerante | 78 |
| Producción de biomasa de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 80 |
| Tolerancia a Cobre | 81 |
| Tolerancia a Quitosano | 82 |
| Elaboración de los Materiales Biopoliméricos | 83 |
| Perlas de quitosano | 83 |
| Perlas de alginato | 84 |
| Biocompositos quitosano-alginato | 85 |
| Biocompositos de quitosano-alginato con biomasa de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 86 |
| Caracterización de los Materiales Poliméricos | 87 |
| Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) | 87 |
| Análisis Toxicológico | 91 |
| Toxicidad aguda utilizando <i>Artemia salina</i> | 91 |
| Fitotoxicidad utilizando semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) | 93 |
| Toxicidad <i>in vivo</i> utilizando plántulas de chile (<i>Capsicum annuum</i>) | 97 |
| Índice de toxicidad de los materiales biopoliméricos sobre <i>Lactuca sativa</i> y <i>Capsicum annuum</i> | 99 |
| CONCLUSIONES | 105 |
| RECOMENDACIONES | 106 |
| REFERENCIAS | 107 |

LISTA DE ILUSTRACIONES

| | |
|--|----|
| Ilustración 1. Fuentes de contaminación por metales pesados en aire, suelo, agua y planta. ... | 25 |
| Ilustración 2. Esquema del ciclo biogeoquímico de los metales pesados en el sistema agrario (Adriano 2001; Micó, 2005). | 30 |
| Ilustración 3. Efecto del cobre en plantas. | 31 |
| Ilustración 4. Proceso de descarga-cero de ciclo sorción-desorción. (L. F. Sala, et al, 2010) ... | 45 |
| Ilustración 5. (a) Estructura química del alginato; (b) Mecanismo de interacción iónica entre el alginato y cationes divalentes. Fuente: Sun y Tan (2013). | 53 |
| Ilustración 6. Estructura “caja de huevo” del alginato. Fuente: Avedaño et al. (2016). | 54 |
| Ilustración 7. Mecanismos propuestos para llevar a cabo el proceso de biosorción de metales utilizando biomasa microbiana (Sud et a., 2008; He y Chen, 2014). | 64 |
| Ilustración 8. Esquema general de unión de metales por grupos funcionales presentes en la pared celular de la biomasa de bacterias, mohos, levaduras, virus y/o parásitos (Vijavaraghavan y Yun, 2008). | 64 |
| Ilustración 9. Tinción con azul de algodón lactofenol, a 40X, de las levaduras aisladas a partir de sedimentos. Se observan células (blastoconidios) de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , ovales y elongadas. | 78 |
| Ilustración 10. Colonias de la levadura aislada, desarrolladas en agar Saboraud dextrosa + extracto de levadura al 5%, a las 72 h de incubación a 28 °C. | 79 |
| Ilustración 11. Crecimiento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio Czapeck enriquecido con extracto de levadura al 5%, adicionado a diferentes concentraciones de Cu^{2+} | 81 |
| Ilustración 12. Crecimiento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio Czapeck enriquecido con extracto de levadura al 5%, adicionado con diferentes concentraciones de quitosanos comerciales de bajo, medio y alto peso molecular. | 82 |
| Ilustración 13. Perlas de quitosano de medio peso molecular, sintetizadas utilizando la técnica reportada por Wang et al. (2001), con modificaciones. | 84 |
| Ilustración 14. Perlas de alginato sintetizadas utilizando la técnica reportada por Sillerová et al. 2015. | 85 |
| Ilustración 15. Perlas del biocomposito de quitosano-alginato, obtenido mediante precipitación con tripolifosfato. | 86 |
| Ilustración 16. Biocomposito de quitosano-alginato con biomasa inactivada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 87 |

| | |
|---|-----|
| Ilustración 17. Espectro de perlas elaboradas a partir de quitosano de medio peso molecular. | 88 |
| Ilustración 18. Espectro de perlas elaboradas a partir de alginato de sodio. | 89 |
| Ilustración 19. Espectro de perlas elaboradas a partir de una mezcla de quitosano y alginato en proporción 75-25%. | 89 |
| Ilustración 20. Espectro de la biomasa <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , desarrollada en medio de cultivo adicionado con y sin 50 ppm de cobre. | 90 |
| Ilustración 21. Espectros de biocompositos de perlas elaboradas a partir de la mezcla de quitosano-alginato-biomasa de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (QAB). | 90 |
| Ilustración 22. Porcentaje de supervivencia de nauplios de <i>Artemia salina</i> expuestos a las perlas de alginato, perlas de quitosano, perlas de quitosano-alginato con biomasa y el control de agua a las 24 horas. | 92 |
| Ilustración 23. Porcentaje de semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) germinadas durante el contacto directo con los materiales elaborados: perlas de alginato, quitosano y quitosano-alginato-biomasa de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 94 |
| Ilustración 24. Semillas no germinadas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) inoculadas sobre perlas de quitosano de bajo peso molecular, incubadas a 25 °C por 24 h. | 94 |
| Ilustración 25. Semillas germinadas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) inoculadas sobre perlas de alginato, incubadas a 25 °C a las 24 h. | 95 |
| Ilustración 26. Semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) inoculadas sobre perlas de biocomposito de quitosano-alginato-biomasa <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (inactivada), incubadas a 25 °C a las 24 h. | 95 |
| Ilustración 27. Semillas germinadas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) inoculadas con agua destilada (control), incubadas a 25 °C a las 24 h. | 96 |
| Ilustración 28. Semillas de chile (<i>Capsicum annuum</i>) inoculados sobre perlas de quitosano (QMPM), incubadas a 22 °C, a las dos semanas de germinación. | 98 |
| Ilustración 29. Porcentaje de semillas de chile (<i>Capsicum annuum</i>) germinadas durante el contacto directo con los materiales elaborados: control con agua destilada, perlas de alginato, perlas de quitosano y biocomposito de quitosano-alginato-biomasa <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (inactivada) | 98 |
| Ilustración 30. Semillas de chile (<i>Capsicum annuum</i>) inoculadas sobre perlas de alginato, incubadas a 22 °C a un periodo de 2 semanas. | 100 |
| Ilustración 31. Índice del porcentaje de germinación residual normalizado para los materiales sintetizados, en semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>). | 101 |

| | |
|---|-----|
| Ilustración 32. Elongación radical residual normalizado para los materiales sintetizados, en semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)..... | 101 |
| Ilustración 33. Índice del porcentaje de germinación residual normalizado para los materiales sintetizados, en semillas de chile (<i>Capsicum annuum</i>). | 102 |
| Ilustración 34. Elongación radical residual normalizado para los materiales sintetizados, en semillas de chile (<i>Capsicum annuum</i>)..... | 102 |
| Ilustración 35. Remoción de Cu^{2+} por el biocomposito de quitosano-alginato-biomasa de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , a pH de 5.5. | 104 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Principales actividades industriales generadores de metales pesados. (Domenech y Peral, 2008). | 33 |
| Tabla 2. Ventajas y desventajas asociadas al uso de biomasa inerte y células vivas como material para biosorción de metales. (Macaskie, 1990) | 48 |
| Tabla 3. Aplicaciones del quitosano en la industria (Rodríguez, 2016). | 51 |
| Tabla 4. Biomasa microbiana generada como subproducto de procesos industriales, con uso potencial como biosorbente de metales (Atkinson et al., 1998). | 57 |
| Tabla 5. Mecanismos externos de tolerancia a metales en hongos de la rizósfera (HM). | 60 |
| Tabla 6. Número de nauplios de Artemia salina vivos después de 24 h de exposición a los materiales elaborados. | 92 |
| Tabla 7. Diferencias en el tamaño de la raíz y del tallo de Lactuca sativa. Comparación de medias con Tukey ($p < 0.05$). | 97 |
| Tabla 8. Diferencias en el tamaño de la raíz y del tallo de Capsicum annum. Comparación de medias con Tukey ($p < 0.05$). | 99 |
| Tabla 9. Eficiencia de remoción de Cu^{+2} del biocomposito formulado a base de quitosano-alginato-biomasa de Rhodotorula mucilaginosa a pH 5.5, a 30 °C. | 103 |

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de industrias como la minera, la de recubrimientos metálicos, las fundidoras, entre otras, ha provocado una importante contaminación debido a la descarga de metales pesados, los cuales ocasionan graves daños al medioambiente al entrar en contacto con aguas superficiales o subterráneas aledañas a las zonas industriales.

Existen tres fuentes principales de contaminación de los recursos hídricos a) las aguas residuales o bien los lixiviados de los basureros consistentes en líquidos que se producen por la descomposición de la basura y que se filtran al suelo contaminando los acuíferos y b) las aguas resultantes de las actividades productivas, principalmente la industria, la agricultura y la actividad minera (Greenpeace, 2016). Indudablemente la actividad minera produce prosperidad en las zonas donde se lleva a cabo, no obstante, tiene un importante impacto ambiental, ocasionando la contaminación de grandes cantidades de agua (Castro, 2013).

La contaminación de los cuerpos de agua afecta directamente a las comunidades que viven cerca de los ríos, lagos y otros afluentes, ya que provoca daños a la salud y a las fuentes de alimentos (Greenpeace, 2016). Además, representa un alto costo para la sociedad en su conjunto ya que entre más agua se contamine en los efluentes, mayor es el costo para potabilizarla, llevarla a las ciudades y atender los impactos ocasionados en las comunidades y en el medio ambiente que fueron afectados (Castro, 2013).

De los contaminantes existentes, los metales pesados se ubican entre los más importantes, ya que están involucrados directamente en gran parte de las actividades humanas, especialmente en los sectores industriales, agrícolas, minero y urbano. Actualmente, dichas actividades se están acrecentando aceleradamente, aumentando al mismo tiempo sus residuos líquidos y sólidos, multiplicando la concentración de iones metálicos en los sistemas bióticos terrestres, acuáticos y aéreos. Esto constituye uno de los principales problemas ambientales a nivel nacional y mundial, debido a que su acumulación afecta la cadena trófica en los ecosistemas (Díaz *et al.*, 2013).

Entre las alternativas existentes para reducir estos contaminantes, destacan las tecnologías biológicas basadas en la biosorción, que puede ser definida como una

tecnología de remoción de metales y metaloides de efluentes utilizando materiales biológicos. Grandes cantidades de metales pueden acumularse en estos materiales biológicos a través de una amplia variedad de procesos, ya sea dependientes o independientes del metabolismo (Plaza, 2012). Al respecto se han identificado algunos biopolímeros como agentes bioadsorbentes efectivos debido principalmente a la variedad de los grupos funcionales que contienen. Estos biopolímeros forman parte de las membranas celulares de los microorganismos, plantas y algas, y permiten a las biomásas adsorber diversas especies metálicas.

Con base a lo anterior, las innovaciones de tecnologías que sean asequibles tales como la biorremediación, que involucra procesos de biosorción, constituye una alternativa ecológica en países en vías de desarrollo. Siendo el quitosano un polímero capaz de atrapar o quelar y concentrar iones metálicos, el desarrollo de compositos biopoliméricos de quitosano y alginato con biomasa de hongo levaduriforme metalotolerante constituye un método biológico prometedor para eliminar metales en aguas superficiales utilizadas para el riego, impactando positivamente en la utilización económica de las fuentes de agua no convencionales y ampliando el suministro de agua.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Contaminación por metales

La contaminación ambiental se posiciona como uno de los problemas más importantes que afectan a la sociedad del siglo XXI. La pérdida de calidad del aire, del recurso hídrico y de los suelos disponibles para actividades agrícolas y ganaderas se ha incrementado exponencialmente (Singh *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Tan sólo la tasa de contaminación del agua se puede estimar en 2000 millones de metros cúbicos diarios, lo que hace evidente una crisis de este recurso para los próximos años. Lo anterior podría comprometer el cumplimiento de uno de los objetivos de Desarrollo del Milenio de la Organización de Naciones Unidas (ONU-DAES, 2005-2015). El año 2015 fue crítico para la agenda en materia de agua y saneamiento de la ONU, por lo que, en septiembre del mismo año, la Asamblea General de la ONU acordó como objetivo el asegurar la disponibilidad y la gestión sostenible de agua y saneamiento para todos, otorgándole a este recurso un carácter prioritario para todos los países miembros.

Específicamente, la contaminación del agua por metales ocasionada por vía antrópica y natural está afectando drásticamente la seguridad alimentaria y salud pública (Efsa, 2015; Huang *et al.*, 2014). Estudios recientes reportan la presencia de metales pesados y metaloides tales como mercurio (Hg), arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), zinc (Zn), níquel (Ni) y cromo (Cr) en hortalizas como lechuga, repollo, calabaza, brócoli y papa (Singh *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Esta contaminación proviene, entre otros causales, del uso para riego de aguas afectadas (Singh *et al.*, 2010; Fransisca *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). De igual manera se han encontrado metales en diferentes concentraciones en peces, carnes y leche, resultado de la bioacumulación y movilidad desde el ambiente a las fuentes hídricas (Singh *et al.*, 2010; Li ket al., 2015). Algunas especies tales como ostras, mariscos y moluscos acumulan el cadmio proveniente del agua en forma de péptidos ligadores, hasta alcanzar valores de concentración entre 100 y 1000 $\mu\text{g} / \text{Kg}$.

En la carne, el pescado y frutas se han reportado valores de concentración entre 1 y 50 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ y en algunos granos entre 10 y 150 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ (Bayona, 2009).

Por su elevada toxicidad, resulta alarmante el impacto causado en salud por exposición prolongada o por la bioacumulación de diversos metales. Dependiendo del tipo de metal o metaloide se producen afecciones que van desde daños en órganos vitales, hasta desarrollo de procesos cancerígenos (Combariza, 2009; Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011).

Los metales son componentes naturales de la corteza de la tierra. Como elementos traza, algunos metales como cobre (Cu), selenio (Se) y Zn son esenciales para mantener un correcto metabolismo en los seres vivos y en particular del cuerpo humano. Sin embargo, en concentraciones más altas pueden conducir al envenenamiento, el cual puede resultar, por ejemplo, de la contaminación del agua potable (tuberías de plomo), de las altas concentraciones en el aire cerca de las fuentes de emisión, o bien a través de la cadena alimenticia. En los sistemas biológicos, la peligrosidad de los metales se asocia a su tendencia a bioacumularse (Kabata-Pendias, 2000).

Principales fuentes de contaminación por metales

Las actividades industriales y mineras arrojan al ambiente una importante cantidad de metales como Pb, Hg, Cd, As y Cr, que son extremadamente dañinos para la salud humana y para la mayoría de formas de vida. Además, los metales originados en las fuentes de emisión generadas por el hombre (antropogénicas), incluyendo la combustión de gasolina con plomo, se encuentran presentes en la atmósfera junto con material o partículas suspendidas en el aire que respiramos. Por otro lado, las aguas residuales no tratadas provenientes de minas y fábricas llegan a los ríos, mientras que los residuos industriales contaminan las aguas subterráneas, alcanzan el suelo y se acumulan en las plantas y los tejidos orgánicos (Kabata-Pendias, 2000).

Daños a la salud

Si bien es cierto, algunos elementos metálicos son de gran importancia debido a que son esenciales para las células, no obstante, a altas concentraciones pueden resultar tóxicos para los seres vivos, organismos del suelo, plantas, animales y desde luego el hombre (Spain et al., 2003). La exposición a elementos metálicos se relaciona con problemas de salud como retrasos en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en el riñón e incluso la muerte. La relación con niveles elevados de mercurio, oro y plomo se ha asociado al desarrollo de la autoinmunidad, haciendo que el sistema inmunológico ataque a sus propias células tomándolas por invasoras. La autoinmunidad puede derivar en el desarrollo de dolencias en las articulaciones y el riñón, tales como la artritis reumática y enfermedades de los sistemas circulatorio o nervioso central (Spain et al., 2003).

La peligrosidad de los metales es mayor al no ser química ni biológicamente degradables, por lo que pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años una vez emitidos. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros organismos, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación (Spain et al., 2003).

Impacto ambiental asociado a la contaminación por metales

El término de metal refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una alta densidad relativa y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas. Ejemplos de metales o algunos metaloides incluyen al Hg, Cd, As, Cr, Pb, talio (Tl), entre otros (Lucho et al., 2005a). Estos elementos se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino et al., 2002).

Los metales son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes cultivos, lo que significa un aumento en la concentración de un producto químico o contaminante en un organismo vivo dentro de un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración en la

que se encuentra dicho producto químico en el ambiente (Angelova et al., 2004). En concentraciones bajas los metales se pueden incorporar a organismos vivos (plantas y animales) por vía de la ingesta de los alimentos, lo que puede ocurrir a través del agua y del aire como medios de traslocación, dependiendo de la movilidad del elemento en dichos medios (Lucho et al., 2005a).

Al igual que otros contaminantes, los elementos metálicos pueden incorporarse a los sistemas de abastecimiento de agua por medio de los residuos industriales que son vertidos, sin previo tratamiento, a diversos cuerpos de agua, propiciando con ello que posteriormente se depositen en los lagos, ríos y en distintos sistemas acuíferos (García et al., 2005).

Por lo general, la absorción de metales por los tejidos vegetales constituye el primer paso para la entrada de éstos en la cadena alimenticia. La absorción y posterior bioacumulación dependen en primera instancia del movimiento (movilidad de las especies) de los metales desde la solución contenida en el suelo hasta la raíz de la planta. En plantas, el concepto de bioacumulación se refiere a la agregación de los contaminantes, algunos de los cuales pueden resultar más susceptibles de ser fitodisponibles que otros (Kabata-Pendias, 2000).

En sedimentos o suelos

Los metales están presentes en el suelo como componentes naturales del mismo o como consecuencia de las actividades antropogénicas. Se pueden encontrar formando parte de los minerales propios, como son silicio (Si), aluminio (Al), hierro (Fe), calcio (Ca), sodio (Na), potasio (K) y magnesio (Mg). También puede encontrarse manganeso (Mn), que generalmente se presenta en el suelo como óxido y/o hidróxido, formando concreciones junto con otros elementos metálicos. Algunos de estos metales son esenciales en la nutrición de las plantas; un ejemplo es el Mn, imprescindible en el fotosistema y en la activación de algunas enzimas involucradas en el metabolismo vegetal (Mahler, 2003; Domenech & Peral, 2008).

En la corteza terrestre existe una similitud entre la distribución de Ni, Fe y cobalto (Co). En los horizontes superficiales del suelo (capa arable de la tierra), el Ni se encuentra

ligado a formas orgánicas, parte de las cuales pueden encontrarse formando quelatos fácilmente solubles (Corinne et al., 2006). El Ni es también un elemento esencial para el metabolismo de las plantas, aún cuando éstas requieren cantidades menores de 0.001 mg/kg de peso seco del elemento (Mahler, 2003). También de forma natural puede encontrarse el Zn en los suelos y es un nutriente requerido por las plantas para su desarrollo (Mahler, 2003).

Las actividades geológicas naturales tales como los desgastes de cerros y volcanes constituyen una fuente importante de aportaciones de metales pesados al suelo. Asimismo, dentro de las actividades antropogénicas, la industria minera está catalogada como una de las actividades industriales más generadoras de contaminantes metálicos. En general, en el suelo, los metales pesados pueden estar presentes en forma de iones libres o disponibles, de compuestos de sales metálicas solubles o bien, de compuestos insolubles o parcialmente solubilizables tales como óxidos, carbonatos e hidróxidos, (Pineda, 2004).

De los metales, los denominados oligoelementos pueden servir como micronutrientes para los cultivos en pequeñas cantidades y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital, volviéndose tóxicos pasado cierto umbral como por ejemplo boro (B), Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Fe, Se, Zn y el metaloide As. Algunos metales como Cd, Hg, Pb, Tl, antimonio (Sb), bismuto (Bi) y estaño (Sn) no tienen una función biológica conocida y su presencia en determinadas cantidades se asocia a disfunciones en el funcionamiento de los seres vivos, debido a que se bioacumulan en los tejidos (García y Dorronsoro, 2005).

Cuando el contenido de metales en el suelo alcanza niveles que rebasan los límites máximos permitidos, los efectos negativos inmediatos se relacionan con la inhibición del crecimiento normal y desarrollo de las plantas y disturbios funcionales en otros componentes del ambiente, así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo, lo que se conoce como “polución de suelos” (Martín, 2000).

En el suelo, los metales que se encuentran en forma de iones libres pueden tener una acción directa sobre los seres vivos, lo que ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, específicamente la inactivación enzimática debido a la formación de enlaces

entre el metal y los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos (Wang et al., 1992).

La contaminación de suelos por metales comúnmente se asocia a la irrigación con aguas procedentes de desechos de minas, aguas residuales contaminadas de parques industriales o municipales y filtraciones de los jales de presas. Una vez en el suelo, estos contaminantes pueden quedar retenidos en el mismo aunque también se pueden movilizar en la solución del suelo mediante diferentes mecanismos biológicos y químicos (Pagnanelli et al., 2004). De este modo se pueden redistribuir y repartir lentamente entre los componentes de la fase sólida del suelo, lo cual se caracteriza por una rápida retención inicial y posteriores reacciones lentas, dependiendo de la especie metálica, las propiedades del suelo, el nivel de introducción y el tiempo (Wang et al., 1992; Han et al., 2003).

Los factores que influyen en la movilización de metales en el suelo se relacionan con las características propias del suelo tales como pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de intercambio (catiónico y/o aniónico), contenido de carbonatos, materia orgánica, arcillas, textura, entre otras (Sauve et al., 2000). Asimismo, la naturaleza de la contaminación y el origen de los elementos contaminantes aunado a las formas de deposición y a las condiciones medio ambientales, en conjunto pueden producir acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad en los suelos (Sauquillo et al., 2003).

En general, los metales que se incorporan al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías: la primera, quedar retenidos en el suelo ya sea disueltos en la fase acuosa del suelo o bien ocupando sitios de intercambio; segunda, ser adsorbidos específicamente sobre constituyentes inorgánicos del suelo; tercera, ser asociados con la materia orgánica del suelo y cuarta, ser precipitados como sólidos puros o mixtos. En adición, pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas; pueden pasar a la atmósfera por volatilización y pueden ser movilizados a las aguas superficiales o subterráneas (García y Dorronsoro, 2005).

Para elucidar el comportamiento de los metales en los suelos y prevenir riesgos tóxicos potenciales se requiere evaluar la disponibilidad y movilidad de los mismos (Banat et al., 2005), ya que la toxicidad depende no sólo depende de la concentración del elemento,

sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema (Abollino et al., 2002).

El Pb, por ejemplo, es un contaminante ambiental altamente tóxico cuya presencia en el ambiente se debe principalmente a las actividades antropogénicas como la industria, la minería y la fundición. En los suelos contaminados con Pb se suele encontrar también Cd y Zn (Hettiarchchi y Pierzynski, 2002) por la analogía entre sus propiedades y por las características metálicas, algo similar a lo que ocurre para la triada de Fe-Ni-Co. En estos casos, la barrera suelo-planta limita la traslocación de Pb a la cadena alimenticia, ya sea por procesos de inmovilización química en el suelo (Laperche et al., 1997) o limitando el crecimiento de la planta antes de que el Pb absorbido alcance valores que puedan ser dañinos al ser humano. El Pb presente en suelos contaminados puede llegar a inhibirse mediante la aplicación de fósforo y óxidos de magnesio; sin embargo, estos tratamientos pueden llegar a afectar la biodisponibilidad de otros metales esenciales como el Zn (Hettiarchchi y Pierzynski, 2002).

Por otra parte, en lugares donde se han utilizado aguas residuales para uso agrícola, se ha reportado una tendencia creciente en las concentraciones de metales en los suelos debido al tiempo (años) de uso de este tipo de aguas, mostrando una mayor tasa de acumulación en Ni y Pb (Lucho et al., 2005a, b).

De acuerdo a Stevens et al. (2003), la siembra de lechugas en suelos con diferentes pH y contenidos de arcilla y materia orgánica, contaminados intencionalmente con Pb y Zn, permitió disminuir la concentración de estos metales debido a una mejora en la capacidad de la absorción en cada tipo de suelo. Lo anterior permite evidenciar el riesgo potencial a la salud asociado al uso de estos suelos contaminados para actividades agrícolas, debido a que las plantas pueden absorber metales (Stevens, et al., 2003).

El uso de fertilizantes es un factor que ha agravado la contaminación al ocasionar un incremento de algunos compuestos en los suelos, llegando incluso a modificar las características de los suelos. Algunos fertilizantes como los nitrogenados, que incluyen nitrato de amonio (NH_4NO_3), nitrato de sodio (NaNO_3), urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), polifosfatos amónicos, entre otros, aportan al suelo los nutrientes básicos para el desarrollo de las plantas (Baur, 2004), permitiendo que aumenten la disponibilidad de los mismos al ser productos solubles en agua. No obstante, presentan

algunos inconvenientes para los suelos, como por ejemplo la presencia de residuos de metales como impurezas, que pueden quedar igualmente disponibles para las plantas y provocar daños en las mismas.

En plantas

Actualmente, la fitorremediación es un proceso que ha coadyuvado a resolver problemas de contaminación de suelos por diversos metales. Este proceso se basa en el uso de plantas que tienen la propiedad de acumular metales, permitiendo la remoción, transferencia, estabilización y/o degradación y neutralización de compuestos orgánicos, inorgánicos y radioactivos que resultan tóxicos en suelos y agua; por ejemplo, Rodríguez-Ortíz et al. (2006) reportaron el potencial de las plantas de tabaco para la extracción de Cd y Pb.

La tecnología de la fitorremediación tiene como objetivo degradar y/o asimilar los metales pesados presentes en el suelo, lo cual tiene diversas ventajas con respecto a los métodos convencionales; en primer lugar, es una tecnología de bajo costo, en segundo lugar, posee un impacto regenerativo en lugares en donde se aplica y en tercer lugar, su capacidad extractiva se mantiene debido al crecimiento vegetal (Harvey et al., 2002).

Para cuantificar la absorción de Cu en tejidos vegetales, suelos europeos con diferentes características fisicoquímicas y enmendados con CuCl_2 fueron cultivados con cebada y tomate, evaluando el alargamiento de la raíz (en cebada) y el crecimiento general (en tomate). Los resultados demostraron que el Cu inhibió el alargamiento de la raíz y el crecimiento global de las plantas de cebada y tomate, respectivamente. Asimismo, los suelos más calcáreos presentaron una mayor retención del metal, lo que demuestra la influencia directa del tipo de suelo en la capacidad de retención de contaminantes (Rooney, et al., 2006; Zhao et al., 2006).

En el aspecto negativo, la fitorremediación no es un proceso que se puede aplicar en todos los suelos contaminados. Para que esta tecnología sea técnicamente eficiente y económicamente viable, hay algunas limitaciones que necesitan ser superadas; por ejemplo, es recomendable esclarecer los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos involucrados. Sin embargo, a pesar de esto, existen un gran número de

plantas definidas como hiperacumuladoras que aún no se han identificado apropiadamente (Freitas et al., 2004).

Con base a lo anterior, el uso de especies vegetales tolerantes a altos niveles de metales es una alternativa para la restauración de terrenos, con un menor impacto ambiental, más invasivas y con efectos secundarios adversos comparado con otras técnicas tradicionales. Las enmiendas orgánicas pueden utilizarse igualmente para la remediación de suelos contaminados. La unión entre la materia orgánica y los metales (formación de moléculas complejas de elevada estabilidad), puede disminuir la capacidad de fitoextracción, disminuyendo así la fitotoxicidad y permitiendo que se pueda reestablecer la vegetación en los sitios contaminados (Robinson et al., 1997).

En aguas y Alimentos

La contaminación del agua por metales pesados ocasionada por vía antrópica y natural, está afectando drásticamente la seguridad alimentaria y salud pública (efsa, 2015; Huang et. al, 2014). Estudios recientes reportan la presencia de metales pesados y metaloides tales como Hg, As, Pb, Cd, Zn, Ni y Cr en hortalizas tales como la lechuga, repollo, calabaza, brócoli y papa (Singh et. al, 2010; Chen et. al, 2013). Esta contaminación, proviene, entre otros causales, del uso para riego de aguas afectadas (Singh et. al, 2010; Fransisca et. al, 2015; Li et. al, 2015). De igual manera, se han encontrado metales en diferentes concentraciones en peces, carnes y leche resultado de la bio-acumulación y movilidad desde el ambiente a las fuentes hídricas (Singh et al, 2010; Li et al, 2015). Algunas especies tales como ostras, mariscos y moluscos acumulan el Cd proveniente del agua en forma de péptidos ligadores hasta alcanzar valores de concentración entre 100 y 1000 $\mu\text{g} / \text{kg}$. En la carne, el pescado y frutas se han reportado valores de concentración entre 1 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y en algunos granos entre 10 y 150 $\mu\text{g} / \text{kg}$ (Bayona, 2009). Por su elevada toxicidad, resulta alarmante el impacto causado en salud por exposición prolongada o por bioacumulación de metales pesados. Dependiendo del tipo de metal o metaloide, se producen afecciones que van desde daños en órganos vitales hasta desarrollos cancerígenos (Combariza, 2009; Nava-Ruíz & Méndez-Armenta 2011).

En alimentos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y algunas autoridades ambientales, han establecido niveles de riesgo en función de la concentración de metales en aguas de consumo humano y alimentos. Los mapas realizados en algunas regiones del mundo muestran un importante incremento en la concentración por encima de los límites establecidos, que las clasifica como de alto riesgo (Arnous et al. 2015; Yuang et.al, 2014). La inhalación y la ingesta de alimentos, son dos de las causas más sobresalientes de contaminación. Los efectos tóxicos dependen del tipo de metal, de la concentración y en algunos casos de la edad de la población expuesta. Algunos estudios que evalúan la contaminación de metales pesados en alimentos, carne y leche, han encontrado que el Cd, Cu, Hg, Pb y As, son cinco de los elementos que por su impacto en la salud y concentración deben ser cuidadosamente evaluados y monitoreados. La fuente de contaminación y la incorporación de metales en la cadena alimenticia se ilustra en la gráfica de la figura 1.

La exposición aguda por ingestión del sulfato de cobre puede producir necrosis hepática y muerte. La exposición crónica de alimentos conservados en recipientes de Cu genera lesiones hepáticas en niños (Ramakritinan et al., 2012). Uno de los efectos de la intoxicación es la hemólisis letal en vacas lecheras, a dosis de 38 mg / kg PV. El ganado ovino es la especie más sensible a la intoxicación, al tolerar apenas 25 mg / kg PV. Tanto en los casos agudos como en crónicos, la mortalidad se acerca al 100%. En bovinos, consumos de 220 a 880 mg del metal / kg de peso corporal pueden causar la muerte (International Cadmium Association, 2011).

Altas concentraciones de sales solubles de cobre conllevan a coagulación proteica e inflamación severa de mucosa digestiva; si el animal sobrevive, desarrollará hemólisis intravascular. Las muertes rápidas se deben a la insuficiencia hepática, mientras que los decesos tardíos se producen por insuficiencia renal. No existe evidencia de efectos cancerígenos del Cu o sus compuestos por ninguna vía de exposición (Bilandzic et al., 2014). Además, puede generar diversas alteraciones como anemia hipocrómica, disminución de la tasa de crecimiento, diarrea, cambios de coloración del pelo o de lana,

ataxia neonatal, alteración del crecimiento, infertilidad temporal e insuficiencia cardiaca (Dhir et al., 2012).



Ilustración 1. Fuentes de contaminación por metales pesados en aire, suelo, agua y planta.

Cobre

El cobre, de símbolo Cu, era conocido en la prehistoria y fue probablemente el primer metal utilizado para fabricar útiles y objetos decorativos. Su número atómico es 29 y se encuentra en el grupo 11 de la tabla periódica, ocupando el lugar 25 en abundancia en la corteza terrestre. En forma libre se encuentra en cantidades económicamente importantes en Menas cerca del Lago Superior en Michigan, EUA, y también se encuentra mezclado con otros metales como oro (Au), plata (Ag), Bi y Pb, en forma de sulfuros, sulfatos, carbonatos y óxidos minerales (Dhir et al., 2012). Este elemento es esencial en el metabolismo humano.

Importancia

El Cu se encuentra principalmente en forma de compuestos minerales, en donde los ^{63}Cu y ^{65}Cu constituyen el 69.1 y 30.9% del elemento, respectivamente. Aunque se han descubierto algunos depósitos naturales de Cu metálico, generalmente se extrae en forma de sulfuros como por ejemplo la covelita (CuS), calcocita (Cu_2S), calcopirita (CuFeS_2) y bornita (Cu_3FeS_3), o bien en forma de óxidos como la malaquita ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$), crisocola ($\text{CuSiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y calcantita ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Debido a sus propiedades eléctricas, más del 75% del Cu que se extrae se utiliza en la industria eléctrica, para la fabricación de cañerías, material para techumbres, baterías de cocina, equipos químicos y farmacéuticos y producción de aleaciones de cobre. El Cu metálico también se utiliza como pigmento y como precipitante del selenio (Bayona, 2009).

Aplicaciones

Las aleaciones no ferrosas del Cu tienen diversas aplicaciones y las que se utilizan con mayor frecuencia son las de Cu y Zn (latón), Sn (bronce), Ni, Al, Au, Pb, Cd, Cr, berilio (Be), silicona o fósforo (P). El sulfato de cobre se utiliza como algicida y molusquicida en el agua, y mezclado con cal se emplea como fungicida vegetal; se le usa también como mordente en galvanoplastia, como agente espumante para la separación por flotación

del mineral de sulfuro de zinc y como agente para curtir cuero y conservar pieles. El sulfato de cobre neutralizado con cal hidratada, conocido como mezcla de Burdeos, se utiliza para la prevención de la enfermedad fúngica conocida como “mildiu” en viñedos, mientras que el óxido cúprico se ha utilizado como componente de las pinturas para los fondos de las embarcaciones y como pigmento para vidrio, cerámica, esmaltes, vitrificado de porcelanas y gemas artificiales. Se utiliza además en la fabricación de rayón y otros compuestos de Cu, como agente para el pulido de cristales ópticos y como disolvente para los minerales de Cr y Fe. El óxido cúprico se utiliza como componente del fundente en la metalurgia del Cu, en los compuestos pirotécnicos, en los fundentes para soldadura del bronce y en productos agrícolas, como insecticidas y fungicidas; el óxido cúprico negro se utiliza para corregir las deficiencias de Cu en el suelo y como complemento de piensos. Los cromatos de cobre son pigmentos catalizadores para la hidrogenación en fase líquida y fungicidas para las papas. El hidróxido cúprico se utiliza en la fabricación de los electrodos de baterías, para el tratamiento y la coloración del papel, como pigmento, aditivo para piensos, mordente para teñir textiles y como componente de fungicidas e insecticidas. Las soluciones de hidróxido cúprico con un exceso de amoníaco se utilizan como disolvente de la celulosa en la fabricación del rayón (Bilandzic et al., 2014).

Peligros potenciales

Los complejos aminados de clorato cúprico, ditionato cúprico, azida cúprica y acetílicos cuprosos son explosivos, aunque no son importantes desde el punto de vista industrial o sanitario. El acetiluro de cobre ha sido causa de explosiones en fábricas de acetileno, por lo que se ha eliminado el uso del cobre en la construcción de dichas plantas. Fragmentos de Cu metálico o de sus aleaciones pueden alojarse en ojos, produciendo lo que se conoce como chalcosis, que puede dar lugar a uveítis, abscesos y pérdida de los ojos. Los trabajadores que fumigan los viñedos con la mezcla de Burdeos pueden padecer lesiones pulmonares conocidas como “Pulmón de fumigador de viñedos”, además de granulomas hepáticos cargados de Cu (Bilandzic et al., 2014). La ingestión accidental de sales solubles de este metal generalmente es inocua ya que la inducción

del vómito libera al paciente de gran parte del Cu. Sin embargo, existe un riesgo de toxicidad inducida por cobre en las siguientes situaciones (Valdés, 1999):

- La administración oral de sales de Cu que se utiliza en ocasiones con fines terapéuticos, especialmente en la India.
- La exposición al Cu disuelto procedente del filamento de ciertos dispositivos intrauterinos, ya que se absorbe sistémicamente.
- Una fracción apreciable del Cu disuelto a partir de las conexiones utilizadas normalmente en los equipos de hemodiálisis puede ser retenida por los pacientes y producir aumentos significativos del metal en el hígado.
- El Cu añadido frecuentemente al pienso del ganado y las aves de corral se concentra en el hígado de estos animales y puede incrementar considerablemente la ingesta de este elemento al ingerir este órgano. También se añade Cu en grandes cantidades, en comparación con la ingesta humana normal a través de la dieta, a diversos alimentos para animales domésticos que en ocasiones son consumidos por algunas personas.

Aspectos toxicológicos

Toxicidad aguda

De acuerdo a la literatura, las sales de Cu pueden resultar tóxicas cuando las disoluciones se utilizan de forma incontrolada, con fines suicidas o como tratamiento tópico de áreas o tejidos con quemaduras graves. Cuando se ingiere sulfato de cobre, también conocido como piedra azul o azul de vitriolo, en cantidades de gramos, se producen náuseas, vómitos, diarrea, sudoración, hemólisis intravascular y posible fallo renal; en raras ocasiones se observan también convulsiones, coma y muerte (Sax, 1989). La concentración que produce toxicidad aguda (DL₅₀) oral en ratas es 472 mg / kg (peso corporal).

Toxicidad crónica

La mayor parte de la alimentación diaria que consume el hombre contiene de 2 a 5 mg de Cu, el cual prácticamente no se retiene en el organismo; asimismo, el contenido corporal de este metal en una persona adulta es de 100 a 150 mg y es casi constante. Los efectos tóxicos crónicos atribuibles al Cu sólo parecen existir en personas que han heredado una pareja específica de genes recesivos autosómicos y que, como consecuencia, desarrollan una degeneración hepatolenticular (enfermedad de Wilson). En individuos normales (sin enfermedad de Wilson), casi todo el Cu está presente como parte integral y funcional de una docena de proteínas, así como parte de sistemas enzimáticos tales como la citocromo oxidasa, la dopa-oxidasa y la ceruloplasmina sérica, una exposición crónica o dosis menores de 0.1 mg/L de sulfato de cobre produce ultraestructuración de branquias y estrés proteico (Abener, 1993).

Contaminación por cobre

La presencia de metales pesados en los suelos es común, debido a la presencia de éstos de manera natural en el material originario, y necesaria, ya que muchos de ellos son micronutrientes esenciales para otros organismos. Sin embargo, los aportes externos de origen antrópico aumentan significativamente esas concentraciones, desequilibrando las relaciones internas del suelo y generando así problemas de contaminación. Los ecosistemas agrarios/suelos agrícolas son especialmente relevantes en este sentido ya que elevadas concentraciones de ciertos metales pesados pueden dar lugar a problemas en el uso de estos suelos. Un aumento de la concentración de metales pesados incrementa la biodisponibilidad de éstos, lo cual facilita su incorporación a la planta. Dicha incorporación o asimilación puede generar problemas de toxicidad, entendida como los posibles efectos tóxicos sobre la planta y los efectos derivados sobre la producción, y de acumulación de metales, lo cual conlleva un problema de sanidad ambiental a través de la entrada de estos elementos en la cadena trófica. La figura 2 esquematiza el ciclo biogeoquímico de los metales pesados en los sistemas agrarios.

En organismos vivos

El Cu es un metal común en el medio ambiente, normalmente las personas se encuentran en contacto en todas partes, como, por ejemplo, al respirar aire, tomar agua, comer alimentos o cuando la piel entra en contacto con tierra, agua u otras sustancias que lo puedan contener. La mayoría de los compuestos de cobre que se encuentran en el aire, agua, sedimento, suelo y las rocas están fuertemente adheridos al polvo u otras partículas o están incrustados en minerales.

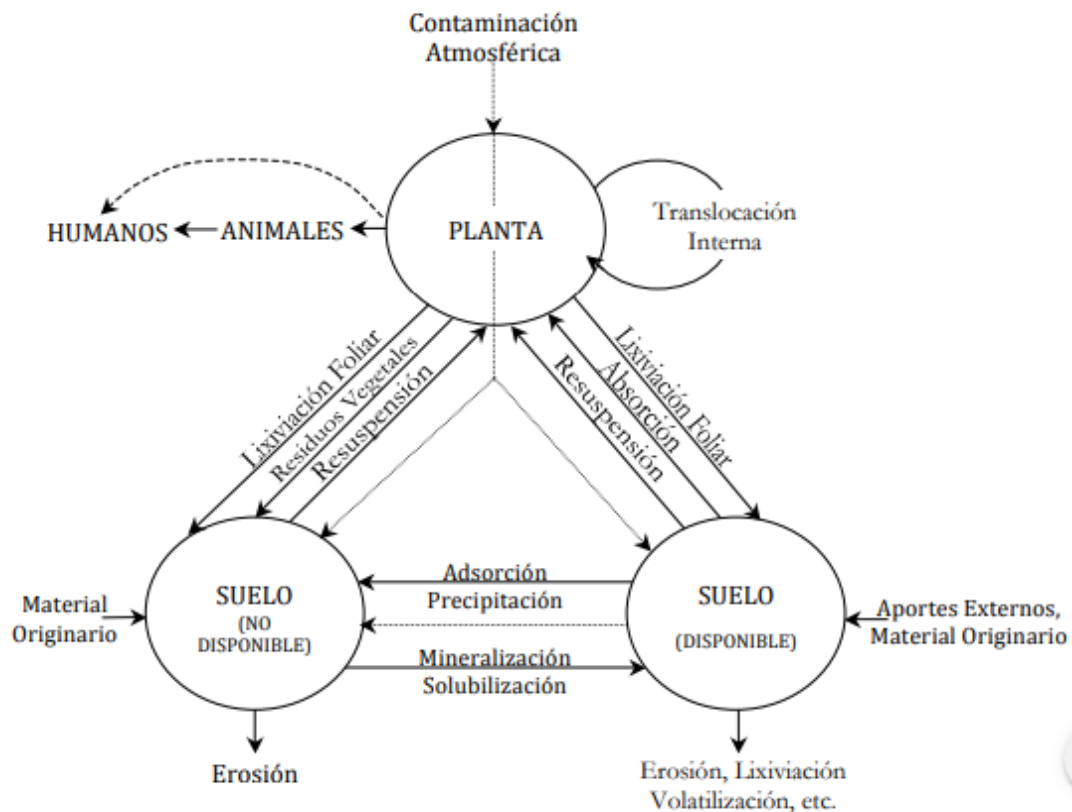


Ilustración 2 Esquema del ciclo biogeoquímico de los metales pesados en el sistema agrario (Adriano 2001; Micó, 2005).

Para la población general, los compuestos de cobre solubles en agua, usados principalmente en agricultura, representan un riesgo mayor para la salud. Cuando se liberan compuestos de cobre en lagos o ríos, las partículas se adhieren

aproximadamente en un día. El Cu puede entrar al cuerpo al momento de ingerir alimento o agua, tierra u otras sustancias que lo contengan. El cobre también puede estar presente en el aire; al momento de ingerirlo éste entra rápidamente al torrente sanguíneo, depositarse en el tracto gastrointestinal y pulmones (ATSDR, 2004).

En plantas

El exceso de Cu en el sustrato puede afectar el desarrollo de la raíz; este quemadura sus puntas provocándole un crecimiento lateral excesivo. En la planta, los altos niveles de Cu pueden competir con la absorción de Fe y, en ocasiones, de Mo o Zn. Respecto a los nuevos cultivos, al principio pueden tornarse más verdes de lo normal, después presentarán los síntomas de deficiencia de Fe o quizá de otros micronutrientes (Figura 3). Si no es corregida, la amenaza de toxicidad por cobre puede reducir la ramificación y finalmente provocar el deterioro de la planta (PROMIX, 2018).



Ilustración 3. Efecto del cobre en plantas.

Como ocurre con la mayoría de los micronutrientes, la disponibilidad del Cu es mayor cuando el pH del sustrato es bajo: si se detectan síntomas de toxicidad por el metal, es preciso analizar el pH del sustrato de cultivo. Por otra parte, ciertos fungicidas contienen este elemento como ingrediente activo, por lo que resulta esencial enjuagar el follaje antes de examinar el tejido. Las plantas más sensibles a la toxicidad por Cu suelen ser las hortalizas (PROMIX, 2018).

En alimentos

A nivel global, se han reportado casos que dan cuenta de las afecciones en la salud por causa del consumo de alimentos contaminados por metales pesados. Un caso relevante ocurrió en Japón en la década de los cincuenta, en donde la población ubicada en las riberas del río Jintsu, aguas abajo de una zona minera de Zn, Pb y Cu, se vio afectada por el consumo de arroz proveniente de cultivos contaminados con Cd procedente de los vertimientos de las minas. Esta ingesta produjo una enfermedad conocida como Itai-Itai o osteoartritis la cual afecta principalmente el tejido óseo (Sánchez et. al., 2010). De otra parte, en la población infantil de Torreón, Coahuila ubicada en Norte-centro de México se han reportado casos por envenenamiento principalmente por Pb proveniente de actividades industriales que incorporan este metal a la cadena alimenticia y al agua (Valdés, 1999).

Métodos de remoción de metales

Diversos procesos industriales han propiciado que grandes concentraciones de metales potencialmente tóxicos sean emitidas a la atmósfera y vertidas en los ambientes acuáticos y terrestres (Fu & wang, 2011; O'Connell *et al*, 2008). En el medio hidrosférico se han vertido cantidades cercanas a 109 Kg / año de metales traza, siendo las principales fuentes de emisión las aguas residuales de origen doméstico, las plantas térmicas, las fundiciones y las acerías (Tabla 1). La técnica de remoción de metales en aguas residuales se clasifica en habituales y no convencionales, aquellas que corresponden a procesos innovadores para la eliminación de metales en aguas residuales generalmente de origen industrial.

Tabla 1. *Principales actividades industriales generadores de metales pesados.*
(Domenech y Peral, 2008).

| Industria | Metales | Contaminación derivada |
|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| Minería de metales ferrosos | Cd, Cu, Ni, Cr, Co, Zn | Derrames ácidos de minas, relaves, escombreras |
| Extracción de minerales | As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn | Presencia en las menas y en los subproductos |
| Fundición | As, Cd, Pb, Ti | Procesado del mineral para obtención de metales |
| Metalúrgica | Cr, Cu, Mn, Pb, Sb, Zn | Procesado térmico de metales |
| Aleaciones y aceros | Pb, Mo, Ni, Cu, Cd, As, Te, U, Zn | Fabricación, eliminación y reciclaje de metales. Relaves y escoriales |
| Gestión de residuos | Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr, Hg, Mn | Incineración de residuos o en lixiviados |
| Corrosión metálica | Fe, Cr, Pb, Ni, Co, Zn | Inestabilidad de los metales expuestos al medio ambiente |
| Glavanoplastia | Cr, Ni, Zn, Cu | Efluentes líquidos de procesos de recubrimiento |
| Pinturas y pigmentos | Pb, Cr, As, Ti, Ba, Zn | Residuos acuosos procedentes de la fabricación y el deterioro de pintura vieja |
| Baterías | Pb, Sb, Zn, Cd, Ni, Hg | Fluido de la pila de residuos, contaminación del suelo y de aguas subterráneas |
| Electrónica | Pb, Cd, Hg, Pt, Au, Cr, As, Ni, Mn | Residuos metálicos acuosos y sólidos del proceso de fabricación y reciclaje |
| Agricultura y ganadería | Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn, As, Mn, Cu | Contaminación de escorrentía, aguas superficiales y subterráneas; biocomulación en plantas |

Técnicas convencionales

Filtración por membrana

Esta tecnología presenta alta eficiencia, requiere poco espacio, no es selectiva y es de fácil operación, aunque genera una gran cantidad de lodos que contienen metales. Se emplea para tratar agua potable y aguas residuales domésticas. Las membranas pueden clasificarse de acuerdo al peso molecular de corte, tipo de material (sintético o elaborado con polímeros naturales modificados, acoplados y estructurados), permeabilidad y solubilidad del soluto y el solvente en la película, superficie y espesor activo de la película, así como la carga de su superficie (Taylor y Wiesner, 2002).

La separación por membrana se emplea comúnmente para tratar y recuperar sales metálicas de residuos generados en procesos galvanoplásticos, en el reciclaje de aceites, en la producción de alimentos y bebidas y en la explotación y producción de hidrocarburos (Nemerow y Dasgupta, 1998; Ji, 2015).

Electrodialisis

Técnica de descontaminación que puede remover componentes iónicos de soluciones acuosas empleando membranas permeables selectivas en un campo eléctrico constante (Guastalli, et al; 2004). Permite remover iones contaminantes cargados de hasta 0.0001 μm , mediante hojas o láminas porosas de resinas de intercambio iónico con una baja permeabilidad relativa para el agua (Taylor y Wiesner, 2002).

Nanofiltración

Técnica de tratamiento de agua relativamente reciente que utiliza membranas con poros muy pequeños (<1 nm) y requiere presiones de funcionamiento en el rango de 10-50 bar. Esto le permite retener especies neutras con peso molecular 200-300 g/mol y también rechazar iones inorgánicos por un mecanismo de exclusión por tamaño en combinación con las interacciones electrostáticas entre los iones y la membrana cargada, con un mayor rechazo de iones divalentes y menor rechazo de iones monovalentes. Funciona a

presión más baja, mayor flujo y menor consumo de energía en comparación con la ósmosis inversa (González, et al; 2006).

Adsorción (Convencional)

La técnica permite la remoción de una amplia variedad de contaminantes, presenta una alta capacidad, cinética rápida y puede ser selectiva dependiendo del adsorbente, lo que a su vez influye en el rendimiento, básicamente por la estructura física del mismo (Liu y Lee, 2014). El carbón activado, arcillas, biopolímeros, zeolitas, perlas de sílice y residuos de plantas o desechos lignocelulósicos son ejemplos de materiales adsorbentes (Wan Ngh et al, 2011) y comúnmente se han utilizado para remover colorantes iónicos, metales, materiales radioactivos, entre otros contaminantes (Osei Boamah et al, 2015).

Ósmosis inversa

Proceso de permeación a través de membrana para la separación por difusión controlada o cribado, con capacidad para seleccionar elementos de tan sólo 0.0001 mm; esto le otorga un amplio abanico de capacidades de tratamiento (Nemerow & Dasgupta, 1998).

Ultrafiltración

Proceso de fraccionamiento selectivo utilizando presiones de hasta 145 psi (10 bares), de amplio uso en el fraccionamiento de leche, suero, proteínas. Concentra sólidos en suspensión y solutos de peso molecular mayor a 1000 umas. El permeado contiene solutos orgánicos de bajo peso molecular y sales (Alka, et al; 2012).

Intercambio iónico

Proceso a través del cual los iones en solución se transfieren a una matriz sólida, que a su vez liberan iones de un tipo diferente, aunque de la misma carga. Permite la separación física en la que los iones intercambiados no se modifiquen químicamente.

Las principales ventajas son la recuperación del metal, la selectividad, menor volumen de lodos producidos (Zewail y Yousef, 2015).

Coagulación-floculación

Es el método mediante el cual se logra desestabilizar el coloide y aglomerarlo posteriormente. En la primera etapa, la coagulación elimina la doble capa eléctrica que caracteriza a los coloides y en la floculación se aglomeran los coloides mediante la atracción de partículas con el aglutinamiento de los floculantes. Los factores más importantes que se deben tener en cuenta para esta técnica son la dosis química apropiada, el efecto energético de la mezcla y el tiempo de la mezcla. Los coagulantes químicos que se utilizan comúnmente en el tratamiento de aguas residuales incluyen alumbre ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (Ismail et al, 2012).

Precipitación química

Es la técnica más utilizada en los procesos industriales ya que es relativamente sencilla de operar, económica y selectiva, aunque su mantenimiento es costoso debido a la alta generación de lodos. La precipitación se puede llevar a cabo con hidróxidos, seguido de eliminación por floculación y sedimentación (Huisman, *et al*; 2006). Igualmente se pueden emplear sulfuros y sustancias quelantes (Chen, *et al*; 2009).

Nanotubos de carbono

Han despertado una amplia atención como un nuevo tipo de adsorbente debido a su capacidad excepcional para la eliminación de diversos contaminantes orgánicos e inorgánicos y radionucleótidos, a partir de grandes volúmenes de aguas residuales (Ren, *et al*; 2011).

Carbón activado

Ha demostrado ser un adsorbente eficiente para la eliminación de una amplia variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en el medio ambiente acuático. Tiene una área superficial porosa que va desde 500 hasta 1.5 m² / g, así como un amplio espectro de superficie funcional que la hace accesible a diferentes reactivos (Karnib, et al; 2014).

Electrofloculación y electrocoagulación

La electrofloculación es un proceso químico con adición electrolítica de iones metálicos, cuya eficiencia para remover contaminantes se debe a que son arrastrados por las burbujas de gas (H₂ y O₂) que se producen en el sistema por lo que salen a flote en la superficie. Por su parte, la electrocoagulación es un proceso que aplica los principios de la coagulación-floculación en un reactor electrolítico; requiere de una fuente de corriente y varios electrodos encargados de aportar los iones desestabilizadores de partículas coloidales que reemplazan las funciones de los compuestos químicos utilizados en el tratamiento convencional, induciendo la corriente eléctrica en el aguas a través de placas metálicas paralelas de Fe o Al (Morante, 2002).

Fotocatálisis

El uso de la fotocatalisis para la degradación de metales se basa en la transferencia de carga a través de la interfaz entre el semiconductor y la solución acuosa contaminada. La conductividad aumenta con la temperatura y se genera un par de electrón vacío, ocurriendo la adsorción de los fotones y la distribución de diferentes estados electrónicos en la superficie; esto permite la degradación de moléculas orgánicas, colorantes y metales (Paez y Taborda, 2006).

Flotación

Se basa en impartir las especies iónicas de metal en las aguas residuales hidrófobas mediante el uso de agentes activos de superficie (tensoactivos) y la posterior eliminación de estas especies hidrófobas por burbujas de aire (Polat y Erdogan, 2007).

Técnicas No Convencionales

Ceniza volante

Las cenizas volantes, generadas durante la combustión de carbón para la producción de energía, es un subproducto industrial reconocido como un contaminante ambiental debido a su riqueza en elementos traza potencialmente tóxicos, que se condensan del gas de combustión. Este material se ha reutilizado como un adsorbente de bajo costo para eliminar compuestos orgánicos, gases de combustión y metales (Visa y Chelaru, 2014), luego de aumentar su capacidad de adsorción mediante la activación química y física (Ahmaruzzaman, 2010).

Biopolímeros

Son industrialmente atractivos porque son capaces de reducir las concentraciones de iones metálicos de transición a concentraciones de partes por billón. Son ampliamente disponibles, ambientalmente seguros y poseen diferentes grupos funcionales (hidroxilos, aminas) que aumentan la eficiencia de la absorción de iones metálicos (Barakat, 2011).

Hidrogeles

Son polímeros hidrófilos reticulados capaces de ampliar sus volúmenes debido a su alta expansión en el agua. Por consiguiente, son ampliamente utilizados en la purificación de aguas residuales (Barakat, 2011; Hua, et al; 2014).

Adsorción de metales por materiales naturales agrícolas e industriales

Los procesos de adsorción están siendo ampliamente utilizados en varias investigaciones para la eliminación de metales. La acumulación de residuos y el carbón activado se han usado con frecuencia como adsorbentes; sin embargo, el carbón activado es un material costoso a pesar de su amplio uso en las industrias de tratamiento de agua y aguas residuales. Por lo anterior, existe una urgente necesidad de buscar

posibles fuentes de materiales adsorbentes que sean de bajo costo, tales como los desechos de la agroindustria y residuos minerales (Ahmed, 2013).

Fitorremediación

Consiste en el uso de plantas y microorganismos del suelo para reducir las concentraciones o los efectos tóxicos de los contaminantes en el ambiente. Es un método relativamente reciente, se percibe como rentable, eficiente, respetuoso del medio ambiente y la tecnología impulsada por energía solar tiene buena aceptación del público (Ali et al, 2013). La fitorremediación ofrece numerosas ventajas en relación con los métodos fisicoquímicos actuales, por ejemplo, su amplia aplicabilidad y bajo costo (Delgadillo et al, 2011).

Adsorbentes de bajo costo y nuevos adsorbentes

La adsorción es un proceso de transferencia de masa por el cual una sustancia se transfiere desde la fase líquida a la superficie de un sólido. El proceso de sorción describe en realidad un grupo de procesos, que incluyen la adsorción y las reacciones de precipitación. Recientemente, la adsorción se ha convertido en uno de las técnicas alternativas de tratamiento para las aguas residuales cargadas con metales (Wan Ngah, et al; 2011), en donde se emplean diversos materiales biológicos; especialmente la biomasa de bacterias, algas, levaduras y hongos han recibido una atención creciente para eliminar y recuperar metales, debido a su buen rendimiento, bajo costo y grandes cantidades disponibles (Wan y Chen, 2009; Anastopoulos y Kyzas, 2015).

Biorremediación

Generalidades

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos, fundamentalmente bacterias aunque también hongos y levaduras, para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples que sean poco o nada contaminantes. De este modo, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas (Glazer y Nikaido, 1995). Su ámbito de aplicabilidad es amplio, pudiendo aplicarse en los estados de la materia (Atlas y Unterman, 1999):

- Sólido: con aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, etc.
- Líquido: aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales.
- Gases: emisiones industriales, así como productos derivados del tratamiento de aguas o suelos.

Tipos de contaminantes que se remueven

Entre los contaminantes que se pueden remover mediante fitorremediación, se enlistan los hidrocarburos de todo tipo [alifáticos, aromáticos, benceno, tolueno etilbenceno y xileno (BTEX), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), policlorobifenilos (PCBs), tricloroetileno (TCE), petróleo crudo equivalente (PCE), pesticidas, herbicidas], compuestos nitroaromáticos como el trinitrotolueno (TNT), metales y otros contaminantes tales como compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, entre otros. Los metales no se metabolizan por los microorganismos de manera apreciable, aunque pueden ser inmovilizados o precipitados (Alexander, 1999; Ewis *et al.* 1999).

Ventajas y limitaciones

La biorremediación tiene un amplio ámbito de aplicabilidad en cuanto a los compuestos orgánicos que se pueden remover, además poseen las siguientes ventajas:

- Mientras que los tratamientos físicos y buena parte de los químicos están basados en transferir la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido, en la biorremediación se transfiere una baja contaminación de un medio a otro.
- Es una tecnología poco intrusiva en el medio ambiente y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos específicos.
- Comparativamente, el proceso es económico y, al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública.

Algunas de las limitaciones o inconveniente de la biorremediación es que la biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida. Por otra parte, algunos compuestos son resistentes o inhiben la biorremediación. El tiempo requerido para un tratamiento adecuado puede ser difícil de predecir y el seguimiento y control de la velocidad y/o extensión del proceso es laborioso.

Factores que afectan la biorremediación

Las aplicaciones de la biorremediación depende de varios factores, tales como las propiedades y disponibilidad del contaminante, el microorganismo involucrado y las condiciones del medio ambiente, como se describe a continuación.

Propiedades del contaminante (biodegradabilidad)

En general, los hidrocarburos alifáticos se degradan rápidamente y las estructuras ramificadas son más difíciles de degradar que las cadenas lineales, debido a la generación de impedimentos estéricos. Las cadenas ramificadas de sulfonatos de alquilo

o arilo a menudo se degradan muy lentamente, mientras que los dobles enlaces y la presencia de un mayor número de anillos bencénicos hacen la molécula más resistente. Asimismo, las sustituciones químicas (ácidos dicarboxílicos, nitrilos, metilaciones, halogenaciones, etc.) propician que las moléculas sean más resistentes. Por otra parte, la biodegradación de compuestos que contienen nitrógeno ó azufre está ligada frecuentemente a su utilización como nutrientes (Liu et al., 2004).

Disponibilidad del contaminante

Es un factor crítico, más importante que la presencia de comunidades microbianas. Para que la degradación de un contaminante ocurra, es necesario que interactúe con la célula en medio acuoso. Inicialmente esto se lleva a cabo en la parte exterior de la pared, para posteriormente ser transportado al interior de la misma. La forma más común de transporte es la complejación con enzimas extracelulares producidos por los microorganismos. Los contaminantes orgánicos como los derivados del petróleo, PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, pireno, fluoreno), solventes halogenados, etc., son hidrofóbicos y tienden a adsorberse en el suelo, concretamente a la fracción orgánica compuesta por ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y humina. Esta es una de las causas de la persistencia de diversos pesticidas. La producción de surfactantes cuyo uso ha logrado incrementar la biodisponibilidad del plaguicida mediante su solubilización, por lo que son esenciales para el proceso de biodegradación. Esto confirma el hecho de que algunos microorganismos posean la capacidad de sintetizar este tipo de compuestos, los cuales son denominados biosurfactantes (Liu et al., 2004).

Microorganismos

La presencia de comunidades microbianas adecuadas con la capacidad enzimática para metabolizar los compuestos contaminantes es un factor importante que puede afectar la biorremediación. Los microorganismos pueden degradar los contaminantes en forma de cultivos puros, mixtos o consorcios que generalmente resultan más eficientes que un cultivo puro. En los consorcios se establecen interacciones complejas entre las especies

microbianas, por ejemplo, en una mezcla de poblaciones microbianas, los consumidores primarios inician el proceso de degradación y los consumidores secundarios utilizan los productos metabólicos de los primeros para degradarlos, además pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (como factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante cometabolismo. La adaptación o aclimatación de una comunidad microbiana a un contaminante dado, determina la rapidez con la que el compuesto puede ser transformado y mineralizado (Alexander, 1994; LaGrega et al., 2001).

Condiciones del medio contaminado

En conjunto, las características del medio ambiente (composición química, pH, humedad, temperatura, presencia de sales, fuentes de carbono, nitrógeno y otros nutrientes, etc.) son capaces de favorecer o limitar el crecimiento microbiano y el metabolismo del compuesto contaminante. En ocasiones es necesario modificar las condiciones, por ejemplo, añadiendo nutrientes o aireando el medio, lo que se conoce como bioestimulación (Alexander, 1999).

Bioestimulación y bioaumentación

La bioestimulación consiste en la introducción de modificaciones en el medio mediante el aporte de nutrientes, aireación y otros procesos. En ocasiones es suficiente añadir oxígeno mediante aireación, aunque en otros se puede requerir la adición de nutrientes o ajuste de pH. Estas aproximaciones son válidas siempre y cuando los microorganismos autóctonos sean capaces de degradar el contaminante tras un proceso de aclimatación previa; cuando se adicionan nutrientes se requiere que estos entren en contacto con el área contaminada y que su concentración sea suficiente para soportar el crecimiento máximo previsto de la población degradadora durante el transcurso de las operaciones de biorremediación. Con relación a la bioaumentación, consiste en la introducción de microorganismos aclimatados o incluso modificados genéticamente en el medio, con el fin de mejorar la biodegradación (Walter, 1997; Atlas y Unterman, 1999); esta técnica

funciona en condiciones de laboratorio o en biorreactor, aunque la implantación en ambientes externos (suelo, agua) puede variar dependiendo de una serie de factores tales como variaciones de temperatura, pH, humedad, potencial redox, entre otros (Alexander, 1999).

Biosorción

La biosorción es un término utilizado para describir la eliminación de metales debido a su unión pasiva a biomasa no viva a partir de soluciones acuosas del metal; el mecanismo de remoción no está controlado por el metabolismo del organismo. Por el contrario, cuando los metales son eliminados debido a la actividad metabólica de un organismo vivo, el proceso activo de remoción o eliminación del metal se denomina bioacumulación (Davis *et al.*, 2003). Los estudios de los mecanismos de biosorción se intensificaron por la necesidad de eliminar metales provenientes de efluentes industriales, como los que derivan de la minería, electroplatinado, o bien para recuperar metales preciosos a partir de soluciones en procesos industriales (Wang *et al.*, 2008 y Schiewer *et al.*, 2000).

La biosorción tiene una mayor preferencia en relación a procesos más eficientes de eliminación de metales en aguas de desecho, tales como precipitación química, ósmosis reversa, intercambio iónico, debido a que estos resultan onerosos para la industria. En cambio, la biosorción es de bajo costo ya que emplea biomateriales sin uso industrial, los cuales pueden actuar en tiempos cortos de contacto y generar efluentes de alta calidad, con la posibilidad de operar en un amplio rango de condiciones (Sharma *et al.* 2007; Vilar *et al.* 2018).

Los biosorbentes completamente saturados pueden concentrar metales pesados en un orden que supera por miles de veces el valor de su concentración en la fase líquida. Se considera que la superficie es capaz de adsorber solamente una monocapa de adsorbato. Asimismo, la carga de la biomasa usada como biosorbente se puede revertir para desorber el metal (Figura 4), varios estudios han demostrado que la elución con soluciones acuosas ácidas llega a ser altamente efectiva (Sharma *et al.* 2007; Vilar *et al.* 2018). Este proceso es adecuado como técnica de refinamiento en aguas residuales con

metales cuyas concentraciones fluctuen en un rango de 1 a 100 ppm. Estos niveles se logran disminuir hasta valores permitidos en el agua potable. Después de la biosorción, la biomasa suele ser pre-tratada por lavado con ácidos y/o bases, secada y molida (Park *et al.*, 2008; Baran *et al.*, 2006).

Previo a su uso, el corte y/o pulverización y granulación de la biomasa seca puede dar lugar a partículas estables (Kratochvil *et al.*, 1997); sin embargo, algunos tipos de biomasa se deben inmovilizar en una matriz polimérica y/o injertar en un soporte inorgánico (Greene *et al.*, 1990) para obtener partículas con las propiedades mecánicas requeridas (Yang, 2008). Las partículas pueden empaquetarse en columnas que operan en diferentes ciclos de carga, regeneración y lavado, siendo más efectivas para la eliminación en continuo de contaminantes metálicos. La operación comienza con la carga del material sorbente, luego se hace pasar el efluente y el metal es captado por el biosorbente. Cuando la capacidad de sorción del biosorbente se agota, la columna se retira y su relleno es regenerado con soluciones de ácidos o de bases (Vargas, 2010).

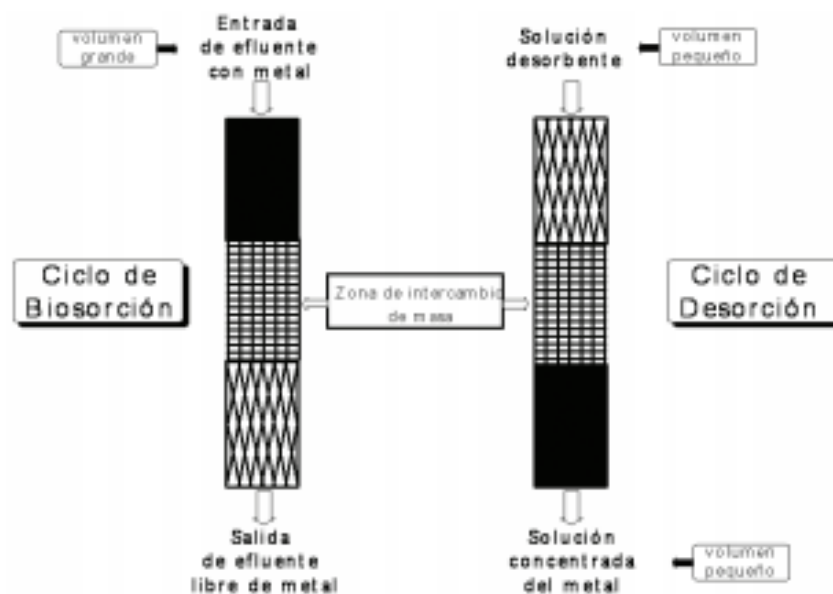


Ilustración 4. Proceso de descarga-cero de ciclo sorción-desorción. (L. F. Sala, et al, 2010)

Un proceso iterativo de sorción-desorción permite reducir el volumen de desecho y generar un volumen pequeño de sólido; se regenera el biosorbente y se obtiene una solución concentrada del metal, que se puede tratar por co-precipitación o floculación, minimizando el volumen de sedimento químico y/o biológico a ser desechado. Lo anterior permite una alta eficiencia en la detoxificación de efluentes muy diluidos y no se requieren micronutrientes. Estas ventajas han incentivado el desarrollo a gran escala de procesos de biosorción para limpiar cuerpos acuíferos contaminados con metales (Bansal *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008).

Tipo de biosorbentes

Entre los materiales sólidos que se han utilizado como biosorbentes se encuentran los desechos agrícolas tales como las cáscaras de arroz, naranja, plátano, limón y toronja, las cortezas y hojas de coníferas, nuez, cacahuete, nopal, huesos de aceituna, mazorcas de maíz, salvado de soja y arroz, algas con pobre poder gelificante no utilizadas en procesos industriales, biomasa de bacterias, hongos y levaduras, entre otros (Annadurai *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2009).

Las paredes celulares de estos materiales contienen polisacáridos, proteínas y lípidos, y, por tanto, numerosos grupos funcionales capaces de enlazar metales en la superficie de estos. Entre los grupos funcionales se encuentran los grupos amino, carboxílico, hidroxílico, fosfato, tiol, entre otros, que difieren en cuanto a su afinidad y especificidad para unirse a los diferentes iones metálicos (Ghimire *et al.*, 2003).

Polímeros biosorbentes

La necesidad de métodos económicos y efectivos para eliminar metales ha tenido como resultado el desarrollo de nuevas tecnologías de separación. En este sentido, actualmente se investigan diversos procesos con el fin de retirar metales de residuos líquidos, entre los que destaca la precipitación extracelular, la biosorción y la captación a través de biopolímeros purificados, además de otras moléculas especializadas o metabolitos producidos por células microbianas. Entre estos procesos, los dos últimos

se basan en la capacidad del material biológico para unirse a los metales a través de distintos mecanismos (Pagnanelli *et al.*, 2005). En los últimos años se ha diversificado el uso de biomasa muerta o productos derivados de ella, ya que además de eliminar el problema de la toxicidad, presenta ventajas económicas tanto de mantenimiento como evitando el uso de suplementos o nutrientes Sin embargo, las células vivas pueden llevar a cabo una amplia variedad de mecanismos para la captación o acumulación de diversos metales (Tabla 2) (Cañizares y Villanueva, 2000).

Quitosano

La quitina parcial o totalmente desacetilada se conoce como quitosano, un polímero constituido fundamentalmente por unidades de glucosamina y en menor cantidad, de N-acetil glucosamina. Este compuesto natural, biodegradable y con baja o nula toxicidad tiene un amplio potencial industrial en la cosmetología, alimentos, biotecnología, agricultura, entre otros (Hernández-Lauzardo y Bautista-Baños, 2005).

Fuentes de obtención

La quitina es el segundo polímero natural más abundante en la biósfera después de la celulosa. Se encuentra presente en la cutícula de crustáceos, exoesqueleto de artrópodos y paredes celulares de algunos hongos, asociada con sales inorgánicas, proteínas, pigmentos y lípidos. El proceso convencional de extracción por método químico incluye desproteización con álcalis, desmineralización con ácidos diluidos, blanqueo y eliminación de lípidos utilizando solventes orgánicos, aunque los dos últimos pasos son opcionales (Matsumoto *et al.*, 1996). La quitina se desacetila mediante tratamiento con álcalis concentrados a alta temperatura.

Tabla 2. *Ventajas y desventajas asociadas al uso de biomasa inerte y células vivas como material para biosorción de metales. (Macaskie, 1990)*

| Ventajas | Desventajas |
|---|--|
| <i>Biomasa inerte</i> | |
| Independiente del crecimiento, no sujeta a limitaciones por toxicidad. No necesita nutrientes adicionales, no hay productos metabólicos | Rápida saturación. Cuando los sitios de interacción con el metal están ocupados, es necesario remover el metal antes de utilizarse nuevamente, sin importar su valor |
| Los procesos no están gobernados por limitaciones biológicas | La adsorción es sensible al pH |
| La selección de la técnica de inmovilización no está gobernada por limitaciones de toxicidad o inactivación térmica | El estado de valencia del metal no se altera biológicamente, por ejemplo, para dar formas menos solubles |
| La remoción del metal es muy rápida y eficiente. La biomasa se comporta como un intercambiador de iones | Las especies organometálicas no son susceptibles de degradación |
| Los metales se pueden liberar y recuperar fácilmente | El mejoramiento del proceso es limitado ya que las células no desempeñan un metabolismo. La producción del adsorbente ocurre durante la etapa de crecimiento. |
| <i>Biomasa viva</i> | |
| Aunque cada célula se puede saturar, el sistema se autorestablece debido al crecimiento | Sólo se pueden tratar metales a bajas concentraciones debido a la toxicidad. Conveniente utilizar cepas resistentes |
| El metal se deposita en un estado químico alterado y menos sensible a la desorción espontánea | Necesario alimentar los flujos bajo condiciones fisiológicamente permisibles |
| La actividad metabólica puede ser la única forma económica para cambiar el estado de valencia o degradar compuestos organometálicos. Se pueden utilizar sistemas multienzimáticos | Se necesitan nutrientes para el crecimiento del microorganismo |
| Se pueden mejorar las cepas por medio de cepas mutantes o manipuladas genéticamente | Deposición en el medio de los productos metabólicos y los nutrientes no consumidos |
| Se pueden emplear dos o más organismos de una manera sinérgica | Los productos metabólicos pueden formar complejos con el metal, impidiendo la precipitación |
| | La recuperación del metal por desorción es limitada debido a que se pueden formar uniones intracelulares |
| | El modelado de un sistema no definido representa grandes dificultades matemáticas |

El producto desacetilado, el quitosano, es un biopolímero constituido fundamentalmente por unidades de glucosamina. Este biopolímero se comporta como un polielectrolito lineal a pH ácido, posee una alta densidad de cargas positivas cuando se encuentra en medio ácido diluido, tiene la capacidad de quelar iones metálicos (Fe, Cu, Zn, entre otros) y de adherirse fácilmente e interactuar con superficies cargadas negativamente. La alta densidad de cargas positivas le confieren propiedades biológicas y fisiológicas únicas (Sandford, 1989).

Estructura química

Químicamente, el quitosano es un heteropolisacárido policatiónico lineal de alto peso molecular conformado por dos monosacáridos, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y D-glucosamina (GlcN), unidos entre sí por enlaces glicosídicos β -(1→4). La cantidad relativa de ambos monosacáridos puede variar, dando muestras de diferentes grados de desacetilación (75-95%), pesos moleculares (50-2000 kDa), viscosidades, valores de pKa, etc. (Raafat y Georg, 2006). Tanto la quitina como el quitosano son copolímeros lineales de residuos de D-GlcN y D-GlcNAc distribuidos al azar, que producen una estructura rígida no ramificada. Hasta ahora no existe una nomenclatura oficial para diferenciar a la quitina del quitosano, aunque algunos autores establecen la diferencia en función del porcentaje de grupos acetilados en la molécula (grado de acetilación, DA) (Terbojevich et al., 1988; Domard, 1989).

Propiedades fisicoquímicas

El peso molecular es una de las propiedades más características de los polímeros quitinosos, ya que esta propiedad vuelve a la quitina insoluble en solventes acuosos como el agua, álcalis diluidos y concentrados, alcohol y ciertos disolventes orgánicos, lo que interfiere para su procesamiento y aplicaciones (Nieto y Orellana, 2011). Esta propiedad afecta al quitosano cuando se aplica como espesante, regulador de la viscosidad, antifúngico, agente ligante de color, grasa y agua, entre otras aplicaciones (Argüelles et al., 2004).

Las propiedades físicas del quitosano dependen de varios parámetros, siendo los principales el peso molecular (aproximadamente 1×10^4 a 1×10^6 Da), grado de desacetilación (rango de 50 - 95%), secuencia de grupos amino y acetamido y, grado de pureza (Pillaei et al., 2009). En la actualidad, el quitosano se considera como un biopolímero versátil debido a sus propiedades de gelificación, reticulación rápida y solubilidad en soluciones ácidas, obteniendo soluciones de diferente grado de viscosidad que generalmente se asocia al peso molecular del polímero. Los quitosanos de peso molecular medio varían de cientos a $> 1 \times 10^6$ Da, con una masa molecular media de hasta 1 MDa que corresponde a una longitud de cadena de aproximadamente 5000 U (Rhoades y Roller, 2000). Los polímeros de bajo peso molecular tienen masas moleculares en un rango de 5.0×10^4 a 1.9×10^5 Da (Davoodbasha et al., 2018).

En cuanto a la carga electrostática, en soluciones polares funciona como un polielectrolito catiónico con una alta densidad de carga. Estas soluciones acuosas se forman en presencia de ácidos fuertes como el HCl, que se disocia totalmente en iones H_3O^+ y Cl^- ; asimismo, las soluciones pueden darse fácilmente en ácidos débiles como el ácido acético, en donde se ionizan los grupos amino del quitosano con los grupos H_3O^+ disponibles en la disolución. Si la solución resultante se titula con una base fuerte como el NaOH, cuyos iones Na^+ y OH^- están totalmente disociados, estos últimos reaccionan primero con el exceso de H_3O^+ , ocurriendo la desprotonación de los grupos amino (Giraldo, 2013).

Aplicaciones

El quitosano tiene aplicaciones en diversas áreas (Tabla 3). Su uso se recomienda sobre el de los subproductos y/o materiales de desecho agroindustriales, ya que el biopolímero se puede ser emplear para la estabilización o remediación *in situ* de suelos y aguas contaminadas. Tiene propiedades antimicrobianas, es biodegradable, bioquelante y biocompatible con el medio ambiente, lo que lo convierte en un material atractivo para la sorción de iones metálicos (Alsharari et al., 2018).

Tabla 3. *Aplicaciones del quitosano en la industria (Rodríguez, 2016).*

| Industria | Aplicaciones |
|------------------------------|--|
| Biomedicina | Actividad inmunológica y antitumoral, materiales de curación (vendas, apósitos) |
| Agricultura | Activador de mecanismos de defensa en plantas, estimulación de crecimiento en plantas, liberación de agroquímicos y nutrientes en suelo, protección de semillas contra congelamiento, mejora la germinación de semillas, protección contra daño microbiano |
| Separaciones cromatográficas | Separación de enzimas, cromatografía de gases y columna |
| Papelera y textil | Resistencia al quebrado de papel, resistencia al deterioro microbiano o enzimático |
| Cosmética | Cuidado dental, lentes de contacto |
| Tratamiento de aguas | Remoción de iones metálicos y residuos orgánicos, reducción de olores |

La gran mayoría de los iones metálicos se adsorben a la superficie del polímero a través de diferentes interacciones, que incluyen: a) atracción electrostática, b) unión química (complejación y quelación), c) intercambio de iones, y d) fuerzas de Van der Waals (Zhang *et al.*, 2016). Estudios previos han demostrado que el biopolímero es capaz de adsorber iones tales como Fe, Cu, Zn, Hg y Pb. La capacidad de adsorción depende del pH de la solución y la máxima capacidad de adsorción ocurre por lo general a pH 6, siguiendo la secuencia Hg > Cu > Zn > As (Álvarez, 2007; Benavente, 2008; citado por Matus *et al.*, 2011).

Diversos factores pueden determinar la capacidad del quitosano para absorber metales, incluidos el pH, concentración de iones, temperatura, tiempo de interacción, grado de desacetilación y longitud de la cadena polimérica, entre otros. Los cationes metálicos se unen a los grupos aminos, mientras que los electrones del nitrógeno de los grupos amino y N-acetilamino pueden establecer enlaces con iones de metales de transición. Algunos

grupos hidroxilo en la cadena del biopolímero pueden funcionar como donantes y participar en la coordinación con iones metálicos (Rodríguez, 2016).

Alginato

El alginato, junto con el quitosano y la celulosa, es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza. Este compuesto presenta un amplio intervalo de polimerización, entre 100 y 3000 monómeros, lo que da lugar a pesos moleculares comprendidos entre 2×10^4 y 6×10^5 Da (Santacruz *et al.*, 2005).

Fuentes de obtención

Se extrae comúnmente de tres especies de algas marrones, *Laminarina hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*, y en su estado natural, el alginato puede presentarse como una mezcla de sales de los cationes que comúnmente se encuentran en el agua de mar, tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ (Gallegos, 2015).

Las algas marinas contienen sustancias bioactivas como polisacáridos, proteínas, lípidos y polifenoles, que les confieren varias propiedades como la actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica y quelante, entre otras. En la pared contienen otros elementos abundantes, una matriz de polisacáridos formada por azúcares neutros y ácidos orgánicos similares a los encontrados en plantas terrestres. Sin embargo, en estas últimas, los carbohidratos no están sulfatados y son estos grupos los que permiten la formación de moléculas con diferentes estructuras, confiriéndoles propiedades beneficiosas (Castro *et al.*, 2006; citado por Peso *et al.*, 2012).

Estructura química

El alginato es un copolímero lineal formado por residuos de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), ordenados en una secuencia no regular de bloques homopoliméricos y bloques heteropoliméricos a lo largo de la cadena (Figura 5). Estos

componentes se encuentran formando complejos con metales ligeros como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} y otros polisacáridos sulfatados (sulfonatos) (Avedaño *et al.*, 2016).

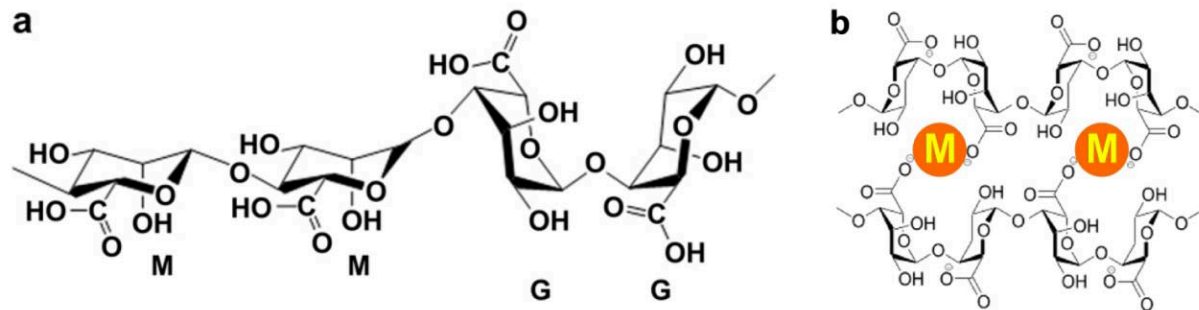


Ilustración 5. (a) Estructura química del alginato; (b) Mecanismo de interacción iónica entre el alginato y cationes divalentes. Fuente: Sun y Tan (2013).

Las sales del ácido algínico están formadas tres bloques, M, G y MG. Cuando dos cadenas de bloque G se alinean, se forman los llamados sitios de coordinación. Sin embargo, debido a la forma de bucles que poseen las cadenas, existen varias cavidades entre ellas las cuales tienen el tamaño adecuado para acomodar al ión Ca^{2+} ; además, las cavidades están revestidas con grupos carboxílicos y átomos de oxígeno electronegativos. Después de la adición de los iones Ca^{2+} , el alginato sufre cambios conformacionales dando lugar a la llamada “caja de huevo”, siendo este un modelo de gelificación del alginato (Figura 6) (Avedaño *et al.*, 2016).

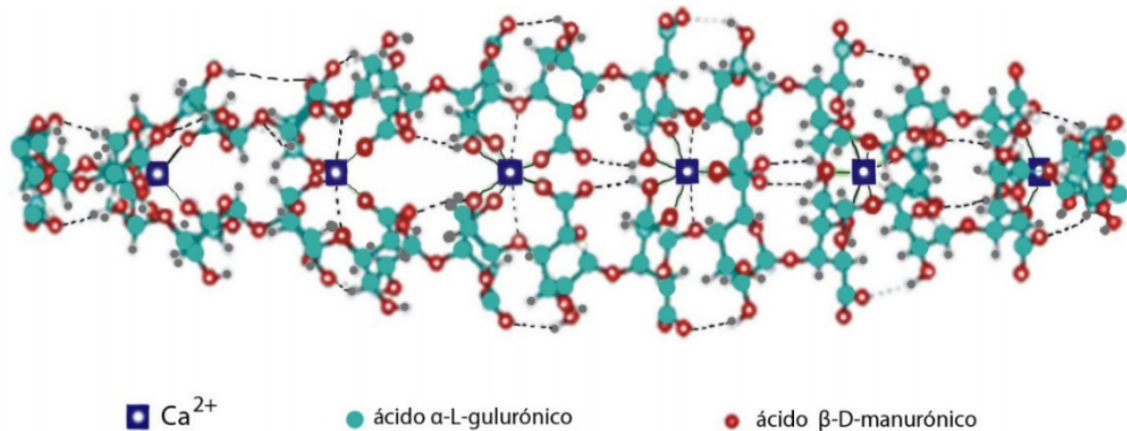


Ilustración 6. Estructura “caja de huevo” del alginato. Fuente: Avedaño et al. (2016).

Propiedades fisicoquímicas

Debido a su capacidad de formar geles al entrar en contacto con cationes metálicos y a sus propiedades coloidales, el alginato de sodio ha sido ampliamente utilizado en la industria, en especial la de alimentos. Otra propiedad es la de formar películas, que se basa en la reacción del alginato con cationes divalentes y trivalentes como Ca²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, entre otros (Domínguez y Jiménez, 2012).

Este polisacárido es conocido y utilizado por sus propiedades gelificantes en soluciones acuosas, la cual se relaciona con las interacciones entre los grupos carboxílicos y los cationes divalentes como Ca²⁺, Pb²⁺ y Cu²⁺. Estas interacciones han servido de base para explicar las propiedades de adsorción del biopolímero con diversos metales (Mallaupoma *et al.*, 2011).

Estudios previos demostrado que las algas marinas fácilmente pueden llevar a cabo la adsorción de Cd, Cr, Pb y Cu, siendo quizás de los pocos adsorbentes cuya capacidad de adsorción se deba exclusivamente a los alginatos en más de un 90%. Por ejemplo, la biomasa del alga parda *Sargassum filipéndula* es capaz de adsorber eficientemente Cd y Zn (Cuizano y Navarro, 2008). De acuerdo con Huang *et al.* (2018), la unión entre alginato y cobre ocurre debido a que la carga positiva del ión Cu²⁺ en solución interacciona con la carga negativa del grupo carboxilo del alginato; además, esta

interacción se puede dar con mayor eficiencia a un pH de 3.0, obteniendo una máxima capacidad de adsorción de hasta 106 mg / g.

Compositos de quitosano/alginate en procesos de biorremoción de metales

En la actualidad se han realizado estudios de biosorción de elementos contaminantes utilizando diversos materiales elaborados a partir de base biológica. Un ejemplo son los materiales de quitosano/alginate (Q/A), cuya capacidad para biosorber metales se ha llevado a cabo mediante la inmersión total de las cápsulas de Q/A en soluciones acuosas con concentración conocida de plomo y cadmio, evaluando el efecto de parámetros como el pH, masa del adsorbente y tiempo de contacto adsorbente/solución del metal (Mallupoma *et al.*, 2011). Utilizando 0.5 g del sorbente Q/A, los autores reportaron una máxima capacidad de sorción de 29.8 y 12.3 mg de Pb y Cd por gramo de sorbente, respectivamente, en soluciones con concentración entre 7 y 100 ppm para cada metal, a pH 4 y a un tiempo de agitación de 180 y 300 min para Pb y Cd, respectivamente. Las cápsulas de Q/A han mostrado una mejor adsorción de Pb comparada con Cd, lo cual se atribuye al carácter básico de los grupos amino (NH₂) del quitosano y los grupos carboxilato (CCO⁻) del alginate. Ambos grupos son bases duras y permiten mejor la retención de ácidos duros. En este caso, el Pb es un ácido intermedio y el Cd un ácido débil, lo cual favorece la remoción de Pb (Mallupoma *et al.*, 2011).

En un estudio similar se reportó que los biocompositos de quitosano-alginate formulados con glutaraldehído son efectivos para eliminar iones de Cr, encontrando una absorción máxima de 65%, a las 5 h (Gokila *et al.*, 2017).

Levaduras metalotolerantes

El fuerte aumento del nivel de contaminación del medio ambiente por metales ha ocasionado un gran interés en el estudio de microorganismos resistentes a estos contaminantes. Al respecto, algunos estudios en la literatura muestran un especial

interés en las levaduras. Por ejemplo, Norris y Kelley (1979) estudiaron el grado y selectividad de captación de metal por especies vivas de varias levaduras, encontrando que *Rhodotorula mucilaginosa* es capaz de acumular un nivel relativamente alto de Cu^{2+} (0.225 mmol Cu^{2+} / g células), seguida de *Candida utilis* (0.18 mmol Cu^{2+} / g células) y tres especies de *Saccharomyces* que acumularon el metal en el mismo rango que *S. cerevisiae* (0.163 mmol Cu^{2+} / g células).

El Cd se ha reportado como uno de los tres metales más tóxicos y algunos reportes indican que *Saccharomyces uvarum* y *Candida utilis* son capaces de acumular aproximadamente 0.13 y 0.16 mmol Cd/g de biomasa de *S. cerevisiae* y *C. utilis*, respectivamente (Volesky *et al.*, 1993); sin embargo, estos valores son menores a los reportados para el hongo *Rhizopus arrhizus* (Tobin *et al.* 1984).

Las investigaciones acerca de levaduras con potencial de tolerancia y remoción de metales son aún escasas, lo que dificulta la aplicación de técnicas de biorremediación. Esto propicia la necesidad de evaluar la resistencia a estrés por metales de levaduras con uso potencial para la remoción de estos contaminantes.

Dentro de su capacidad evolutiva, las levaduras presentan una amplia distribución en el medioambiente y son capaces de colonizar diversos sustratos naturales y artificiales, además de adaptarse a ambientes extremos como glaciares y zonas ácidas (Libkind, 2007). Algunas especies han desarrollado estrategias para disminuir el daño producido por la radiación solar, a través de mecanismos de fotoprotección que involucran la síntesis de compuestos antioxidantes y de absorción UV, como los pigmentos carotenoides (Buzzini *et al.*, 2007) y las micosporinas, respectivamente (Bandaranayake, 1998; Libkind, 2004).

En este contexto, el desarrollo de técnicas de biorremediación de aguas contaminadas con metales utilizando biomasa de levaduras es una prioridad a nivel mundial debido al crecimiento de las industrias que generan o descargan inapropiadamente efluentes con estos contaminantes, sin recibir un tratamiento adecuado (Howard, 2000).

Principales especies involucradas en remoción de metales

Los hongos, incluyendo las levaduras, han recibido especial atención con relación a la biosorción de metales, particularmente porque la biomasa fúngica se origina como un subproducto de diferentes fermentaciones industriales (Ehrlich *et al.*, 1990; Tsezos *et al.*, 1981a; Volesky, 1990) (Tabla 4). Se ha sugerido que la acumulación de elementos actínidos por biomasa íntegra se lleva a cabo por biosorción independiente del metabolismo, siendo la pared celular el principal sitio de acumulación (Tsezos *et al.*, 1981b; Volesky, 1990). Asimismo, se ha reportado que células impermeabilizadas con carbonato o detergente pueden aumentar su captación y acumular metales como gránulos o depósitos intracelulares (Gadd *et al.*, 1989). Algunas partículas que contienen metales, por ejemplo, polvo de zinc, magnetita y sulfuros metálicos, se pueden remover de las soluciones por biomasa de *Aspergillus niger* debido a una combinación de procesos de biosorción y atrapamiento. Esta biomasa se genera como un residuo de la fermentación microbiana para producir ácido cítrico (Gadd *et al.*, 1989).

Tabla 4. *Biomasa microbiana generada como subproducto de procesos industriales, con uso potencial como biosorbente de metales (Atkinson et al., 1998).*

| Microorganismo | Aplicaciones en la industria |
|--|---|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura) | Industria alimentaria |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> (moho) | Industria de antibióticos |
| <i>Rhizopus arrhizus</i> (moho) | Industria alimentaria |
| <i>Aspergillus niger</i> (moho) | Industria de ácido cítrico y enzimas |
| <i>Bacillus spp.</i> (bacteria) | Industria de antibióticos y aminoácidos |
| <i>Streptomyces nursei</i> (bacteria) | Industria farmacéutica |
| Lodos activados | |
| Lodos diferidos anaeróbicamente | |
| <i>Sargassum fluitans</i> (alga) | |

Biosorción de Metales Pesados utilizando Biomasa

Entre las desventajas del uso de biomasa microbiana en suspensión se incluyen el pequeño tamaño de partícula, baja resistencia mecánica y dificultad para separar la biomasa del efluente. Sin embargo, el uso de biomasa microbiana inmovilizada en reactores de cama empacada o fluidizada, disminuye estas desventajas (Macaskie *et al.*, 1989; White y Gadd 1990). La biomasa viva inmovilizada tiene primero que tomar la forma de biopelícula sobre soportes preparados a partir de una variedad de materiales inertes (Gadd y White, 1989), la cual puede ser utilizada en diferentes tipos de biorreactores. Asimismo, la biomasa viva o muerta de diversos grupos microbianos se ha inmovilizado por encapsulación o entrecruzamiento con otros materiales o soportes (De Rome, 1991; Gadd, 1988; Macaskie, 1990). Los soportes que se han utilizado para la inmovilización de biomasa microbiana incluyen agar, celulosa, alginato, poliacrilamida, sílica gel y glutaraldehído (Gadd y White, 1993). La biomasa generalmente se mezcla con los agentes de inmovilización en densidades de 4 a 6% de biomasa por 1% del soporte (p/p), reduciéndose por lo tanto la cantidad requerida del agente empleado como soporte (Lu y Suflita, 1995).

La biomasa microbiana puede ser utilizada en su estado natural o modificada. Por ejemplo, un tratamiento alcalino permite mejorar la eficiencia de biosorción (Brierley, 1990a; Brierley, 1990b; Gadd, 1988). La biomasa de *Bacillus* sp., generada como desecho de fermentaciones industriales, se trata con álcali para mejorar la captación de metales, se entrecruza químicamente, se peletiza por extrusión o se muele y se deseca, para proveer de un material que tiene una vida de anaquel indefinida biosorción (Brierley, 1990a; Brierley, 1990b; Gadd, 1988).

Mecanismos de tolerancia a metales en plantas

El ambiente terrestre se encuentra en constante cambio y esto contribuye a que las fuerzas naturales de selección produzcan modificaciones en los organismos. En el caso de las plantas, estas modificaciones les permiten adaptarse a las nuevas condiciones

ambientales a través de cambios genéticos en las poblaciones durante un periodo de tiempo gobernado por la selección natural (Pollard, 2000).

El proceso evolutivo puede ser analizado en dos niveles, la microevolución y la macroevolución. La primera consiste en cambios evolutivos producidos en las especies en periodos de tiempo relativamente cortos debido a la fuerza de la selección natural, mientras que la segunda involucra cambios evolutivos entre especies y se presenta generalmente después de largos periodos de tiempo. Un ejemplo de microevolución en plantas es el desarrollo de tolerancia a metales, proceso en el cual las actividades antropogénicas actúan como la fuerza de selección que genera cambios evolutivos en los organismos (Bondada y Ma, 2002).

La tolerancia a elementos potencialmente tóxicos, como metales esenciales y no esenciales, en las plantas se define como el resultado de un proceso evolutivo que confiere a distintas especies la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de elementos potencialmente tóxicos (Linhart y Grant 1996; Hall 2002). Esto se debe al desarrollo de mecanismos eficientes y específicos (procesos adaptativos) que permiten asimilar elementos esenciales dentro de intervalos fisiológicos permisibles, además de ayudar a inactivar metabólicamente los elementos esenciales y no esenciales cuando estos representan un riesgo para la integridad celular (Linhart y Grant, 1996; Cai y Ma 2002).

La tolerancia múltiple ha permitido que las plantas desarrollen tres estrategias básicas para establecerse en suelos con niveles tóxicos de metales (Baker, 1981; Baker y Walker, 1990; Vogel-Mikuš *et al.*, 2006):

- 1) Exclusión: consiste en una limitada acumulación de metales en las partes aéreas de las plantas e involucra una acumulación preferente en el sistema radical;
- 2) Indicador: se caracteriza porque las plantas acumulan metales en sus tejidos que generalmente reflejan los niveles de metales presentes en el suelo;
- 3) Hiperacumulación: se caracteriza por la capacidad de la planta de bioacumular altas concentraciones de metales en sus tejidos, principalmente en las partes aéreas.

Considerando el criterio de la tolerancia múltiple en plantas, los mecanismos de tolerancia se pueden dividir en externos e internos (Hall, 2002).

Mecanismos externos

Este mecanismo se asocia a los hongos micorrizógenos. En las plantas, el proceso de adsorción de metales puede estar influenciado por microorganismos que están íntimamente asociados con la raíz (Tabla 5). Entre estos, los hongos micorrizógenos (HM) constituyen uno de los componentes más importantes de la rizósfera ya que forman asociaciones mutualistas (micorrizas) con diversas especies de plantas.

Tabla 5. *Mecanismos externos de tolerancia a metales en hongos de la rizósfera (HM).*

| HM arbusculares | HM ectomicorrízicos |
|---|--|
| Inmovilización extracelular de los metales por ácidos orgánicos. | Movilidad del metal en el apoplasto, en donde es retenido por la red de Hartig evitando la entrada a la raíz. |
| Reducción de la transferencia de iones del sistema radical al tallo, por precipitación intracelular del metal por PO^{4-} . | Reducción de la movilidad del metal en el apoplasto como resultado de la hidrofobicidad del hongo. |
| Adsorción de los iones metálicos en la pared celular de diferentes estructuras del hongo (hifa, esporas, micelio extraradical) y retención del metal en la micorrizósfera por la producción de proteínas específicas como la glomalina. | Secreción de sustancias quelantes como ácidos orgánicos y otras sustancias producidas por el HM ectomicorrízico. |
| | Retención de los metales en el micelio externo del hongo. |

Fuente: Jentschke y Godbold, 2000; Adriaensen et al., 2004; Zhu et al., 2001; Tullio et al., 2003; González-Chávez et al., 2004.

De acuerdo con el tipo de colonización de la planta hospedadora, los HM se clasifican en arbusculares y ectomicorrízicos; los primeros se caracterizan por colonizar intracelularmente el sistema radical de 80% de las especies vegetales, mientras que los últimos se caracterizan por colonizar la raíz extracelularmente de 3% de las especies vegetales (Shilev et al., 2001; Harrison, 2005).

La especie de planta y de hongo, el tipo de metal y su disponibilidad, las condiciones edáficas, las condiciones de cultivo de la planta y la densidad del sistema radical, son factores que afectan la tolerancia a metales durante la asociación HM-Planta (Guo et al., 1996; del Val et al., 1999; Joner y Leyval, 2000).

Mecanismos internos

Los mecanismos internos de tolerancia a metales pueden estar asociados a los siguientes procesos: a) enlace a la pared celular y a exudados radicales, b) quelación de los metales por diversos ligandos en el citosol (fitoquelatinas, metalotioneinas y aminoácidos), c) presencia de proteínas de estrés térmico, y d) acumulación en las vacuolas.

Diversos estudios han demostrado que los exudados radicales están formados principalmente por ácidos orgánicos de bajo peso molecular, cuya importancia en la tolerancia a metales en el sistema radical se debe a que estos ácidos pueden influir directamente en la solubilidad de elementos esenciales y no esenciales mediante acidificación, quelación, precipitación y procesos de oxido-reducción en la rizósfera; asimismo, pueden influir de manera indirecta a través de efectos en la actividad microbiana, en las propiedades físicas de la rizósfera y en la dinámica de crecimiento de la raíz (Marschner, 1995). Por ejemplo, Zheng et al. (1998) reportaron una mayor producción de ácido oxálico en plantas de *Fagopyrum esculentum* expuestas a aluminio, lo que evitó la entrada del metal a la célula. De igual forma, Yang et al. (2005) observaron un incremento del flujo de ácido oxálico al sistema radical de *Spinacia oleracea* L. cv. Quanneng cuando las plantas fueron tratadas con aluminio, en comparación con plantas expuestas a una deficiencia de fósforo y un exceso de lantano (La).

Mecanismos de tolerancia a metales en microorganismos

Con respecto al uso de células vivas, estudios previos han reportado que la biomasa muerta o inactivada tiene ventajas debido a que no es necesario adicionar nutrientes, resulta inmune a la toxicidad del medio y a condiciones de operación adversas, además de permitir la recuperación de los metales con mayor facilidad utilizando tratamientos que favorecen la regeneración de la biomasa. La propia biomasa puede obtenerse de manera económica, en particular la que se genera como desecho o subproducto a partir de un producto industrial. Por el contrario, cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir en el proceso; estos sistemas son complejos y se ha reportado que pueden involucrar otros procesos además de la biosorción, como la precipitación o bien el atrapamiento de partículas; en conjunto, estos mecanismos permiten concentrar metales en el sedimento reduciendo significativamente la movilidad y disponibilidad biológica del contaminante (Cañizares, 2000).

Con base a lo anterior, otra definición del proceso de biosorción es la captación de contaminantes presentes en una solución acuosa por medio de un material biológico o biomasa, a través de mecanismos fisicoquímicos o metabólicos. Debido a que los metales pueden ocasionar estrés e incluso llegar a tener efectos letales en la biomasa viva, los microorganismos han desarrollado la capacidad de activar y poner en funcionamiento mecanismos específicos que les permiten contrarrestar los efectos tóxicos. De acuerdo con Gadd y White (1993) (citado por Cañizares, 2000), existen dos mecanismos diferenciados para la captación de los metales utilizando biomasa:

- Bioacumulación: basada en la absorción del metal mediante mecanismos de acumulación al interior de las células vivas.
- Bioadsorción: basada en la adsorción de los iones metálicos en la superficie de la célula, que puede ocurrir por intercambio iónico, precipitación, complejación o atracción electrostática.

A diferencia de los compuestos orgánicos tóxicos, los metales no pueden ser degradados cuando cambia su estado de oxidación. Al respecto, se ha reportado que los sistemas

biológicos pueden adquirir o conferir resistencia a metales a través de tres mecanismos: 1) disminución de la acumulación de un determinado ión mediante su transporte activo fuera de la célula, 2) segregación de los cationes por moléculas que contienen grupos tioles, y 3) reducción de algunos iones metálicos a un estado de oxidación menos tóxico. Los mecanismos 1 y 2 no pueden funcionar como mecanismos de detoxificación únicos en una célula microbiana; por consiguiente, el metabolismo de los metales se lleva a cabo fundamentalmente por un metabolismo de transporte o, en última instancia, por una combinación de los mecanismos antes descritos (Marrero et al., 2009).

Los mecanismos implicados en el proceso de biosorción incluyen quimiosorción, complejación, adsorción-complejación en la superficie y los poros, intercambio iónico, microprecipitación, condensación del hidróxido del metal y adsorción en la superficie (Figura 7). Se sabe que los microorganismos poseen varios mecanismos y cada uno funciona de manera independiente, contribuyendo a la adsorción o absorción global del metal (Brown y Markich., 2000).

En particular, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales, los cuales involucran tres aspectos principales: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) transportadores de membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Silver y Phung, 2005; citado por Cervantes *et al.*, 2006).

El pH es un factor que afecta la selectividad de la biomasa para captar o unirse a una variedad de metales. Los sitios de unión en la célula varían dependiendo del pH del medio, por lo cual es importante identificar qué grupos funcionales son los que participan en la captación del metal, a fin de comprender los mecanismos implicados. La mayoría de estos grupos se han encontrado en la pared celular (Javanbakht y Zilouei, 2014).

La modificación química y los estudios espectroscópicos han demostrado que los componentes celulares de la biomasa, que incluyen los grupos carboxilo o carboxilato, hidroxilo, sulfato o sulfonato, sulfhidrilo (tiol), fosfato, amino, amido, imino, tioéter, fenol, carbonilo (cetona), imidazol, fenólico, fosfato o fosfonato y fosfodiéster, actúan como los grupos funcionales que se encargan de la atracción y secuestro de contaminantes (Figura 8) (Gupta et al., 2000).

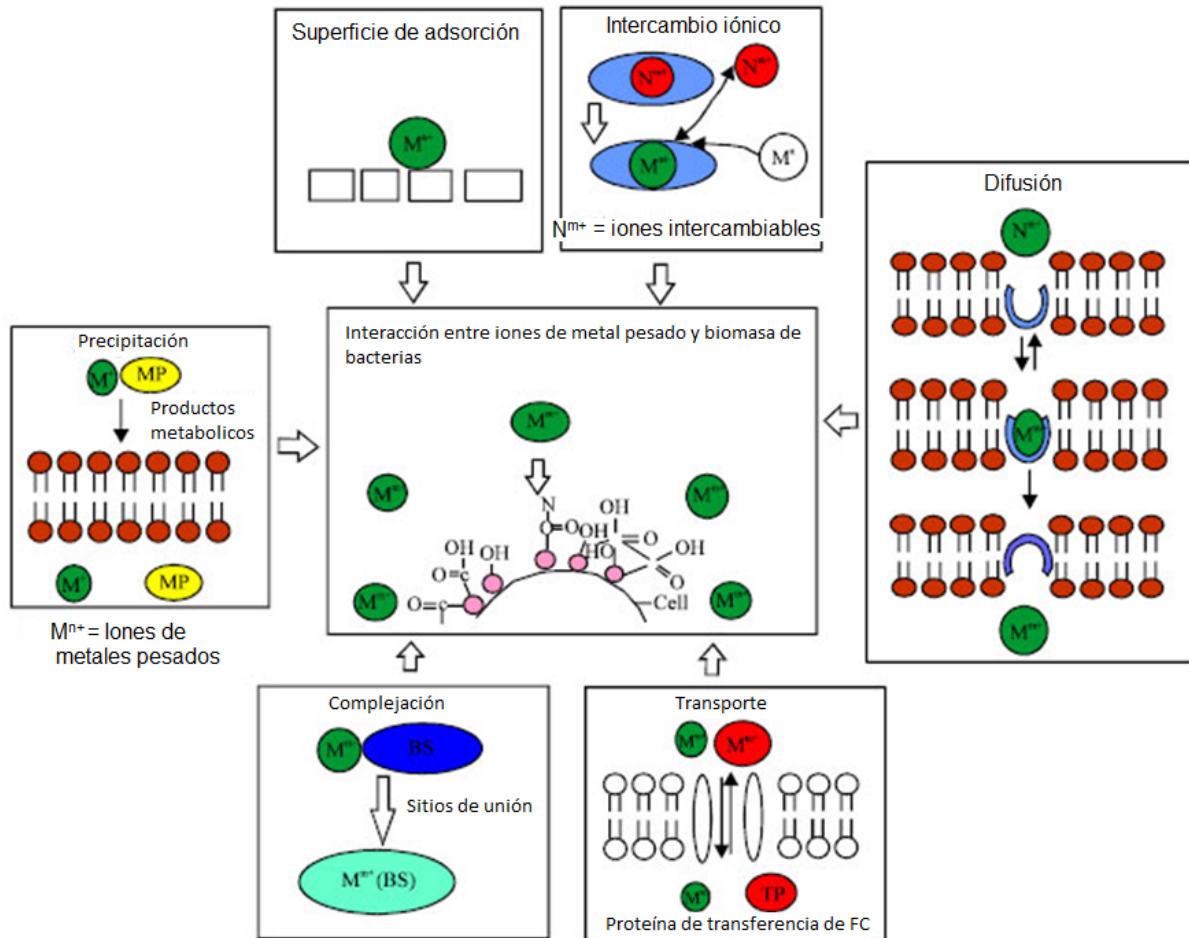


Ilustración 7. Mecanismos propuestos para llevar a cabo el proceso de biosorción de metales utilizando biomasa microbiana (Sud et al., 2008; He y Chen, 2014).

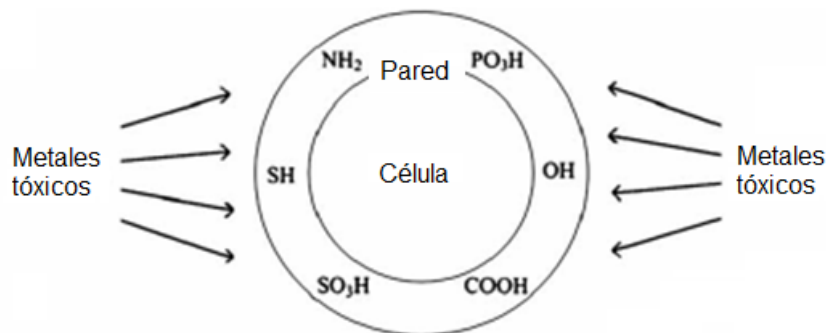


Ilustración 8. Esquema general de unión de metales por grupos funcionales presentes en la pared celular de la biomasa de bacterias, mohos, levaduras, virus y/o parásitos (Vijavaraghavan y Yun, 2008).

Se sabe que la mayoría de las superficies microbianas están cargadas negativamente debido a la ionización de los grupos funcionales, lo que contribuye a la unión de metales (Javanbakht y Zilouei, 2014).

En términos prácticos, la biosorción de metales es un proceso complejo que se puede ver afectado por factores como el estado de la biomasa (viva o muerta, composición de la pared celular), tipo de biomaterial, propiedades químicas de la solución del metal y las condiciones ambientales o medioambientales, por ejemplo, pH, temperatura, dosificación del biosorbente, entre otros (Das et al., 2008).

La microencapsulación ha permitido inmovilizar bacterias probióticas en una matriz de alginato debido a la simplicidad del proceso de preparación de las microcápsulas, su biocompatibilidad y alta retención de microorganismos como consecuencia del tamaño de poro mostrado por la matriz estimado en 17 nm, mientras que el tamaño promedio de las bacterias oscila entre 1-3 μm . Por estas razones, la microencapsulación de probióticos ha sido investigada con la finalidad de proteger y mejorar la biodisponibilidad de los microorganismos tanto en los productos alimentarios como en el tracto intestinal (Krasaekoop et al., 2003; 2004).

Por otra parte, se han encontrado trabajos donde el objetivo ha sido producir mayor cantidad de biomasa para mejorar el proceso de fermentación, así como la obtención de metabolitos secundarios de interés industrial, tal como la vitamina B12 (Gardner y Champagne, 2005). A pesar del éxito alcanzado en diferentes investigaciones, se han realizado estudios orientados a elevar la eficiencia de encapsulación. Entre ellos, el uso de sistemas combinados de alginato-almidón aplicando la técnica por extrusión y la incorporación de bacterias del grupo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, resultando en un aumento importante de supervivencia para los *Lactobacillus* en ambientes ácidos, aunque no significativa para los *Bifidobacterium* (Jayalalitha et al., 2012).

Asimismo, se ha logrado incrementar la producción de bacterias ácido-lácticas (*L. acidophilus*) con la misma técnica y combinación de biopolímeros para la formación de la matriz. Esto representó una alternativa para la preparación de concentrados de bacterias, evitando así la etapa de centrifugación o filtración durante el proceso productivo de fermentación láctica a escala industrial (Dembczyński y Jankowski, 2000).

En un estudio similar se sintetizaron microcápsulas empleando un sistema alginato-péptido con prebióticos como matriz, cuyos resultados mostraron gran cantidad de bacterias inmovilizadas, biodisponibles aún luego de ser adicionadas en leches, después de una semana de almacenamiento; además, resultaron ser altamente resistentes a las condiciones gástricas simuladas (Chen et al., 2006).

La microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* en una matriz de alginato y tejido del tallo de la planta de maíz también ha mostrado buenos resultados en la producción de etanol a partir de la fermentación de melazas de caña, al evidenciarse un incremento importante en la formación del metabolito primario y una disminución considerable de los secundarios (Razmovski y Vučurović, 2011).

HIPÓTESIS

Los biocompositos de quitosano-alginato con biomasa de la levadura metalotolerante *Rhodotorula mucilaginosa*, aislada a partir de sedimentos contaminados con metales, constituyen un sistema biológico que además de presentar nula o baja toxicidad en ensayos in vitro e in vivo, es efectivo para la remoción de cobre en aguas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Sintetizar y caracterizar biocompositos de quitosano-alginato con la levadura metalotolerante *Rhodorotula mucilaginosa* y evaluar su eficacia para la bioeliminación de Cu^{2+} presentes en aguas sintéticas.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar levaduras tolerantes a cobre, a partir de sedimentos contaminados recolectados en la región del río San Pedro, Cananea, Sonora.
- Realizar pruebas de tolerancia a cobre y a quitosano a diferentes pesos moleculares, de la levadura aislada.
- Elaborar biocompositos a base de mezclas de quitosano-alginato y caracterizarlos en cuanto a tamaño y análisis de FT-IR.
- Inmovilizar biomasa de la levadura metalotolerante aislada en el biocomposito de quitosano-alginato.
- Evaluar la toxicidad aguda del biocomposito y de los efluentes utilizando ensayos con *Artemia salina*, *Lactuca sativa* y *Capsicum annuum*.
- Evaluar la capacidad de los biocompositos para bioeliminar Cu^{2+} en aguas residuales sintéticas, utilizando cinéticas en cultivos Batch.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras comerciales de quitosano (Sigma, USA) de peso molecular medio (200-800 cP, 448877 Aldrich, USA), bajo y alto. Se utilizó alginato de sodio comercial obtenido de algas rojas (viscosidad 5-40 cP, W201502 Aldrich, USA). Los ensayos microbiológicos se realizaron utilizando cultivo Agar Saboraud dextrosa (B.D. Bioxon, USA) para el aislamiento, caldo Czapeck (Difco, USA) y extracto de levadura (Difco, USA). El cobre se adicionó en forma de solución de CuSO_4 utilizando una muestra comercial grado analítico (J.T. Baker, USA).

Aislamiento y cultivo de levadura metalotolerante

Se realizaron tres muestreos en el cual se obtuvo sedimento y agua superficial, dichas muestras fueron tomadas en diferentes zonas del cauce del río San Pedro en Cananea, Sonora ($30^{\circ}59'35''\text{N}$ $110^{\circ}18'02''\text{O}$). Las muestras fueron almacenadas en botes de polietileno y se mantuvieron en refrigeración a 4°C , hasta el aislamiento del microorganismo deseado. El aislamiento se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), de la siguiente forma: 10 gramos de sedimento se agregaron a 90 mL de solución salina (stock), después se realizaron diluciones seriadas en tubos (hasta 1×10^{-5}), agregando 1 mL del stock a 9 mL de solución salina contenidos en tubos 15x150. Cuando se obtuvieron todas las diluciones, se tomó 1 mL de cada tubo y se agregó a placas con medios de cultivo agar nutritivo, con y sin cobre (50 ppm). Por último, las placas se incubaron a 30°C , durante 72 h.

Para la técnica de morfometría (diámetro y longitud) de las células observadas se llevó a cabo mediante análisis de imágenes, utilizando un microscopio Olympus CX-311/Japón conectado a una cámara infinity 1. Mínimamente se realizaron 10 capturas de diferentes campos de visualización y se procesaron utilizando el programa Image Pro-Plus versión 6.3 Media Cybernetics Inc., USA.

Soluciones de polímeros

Solución de quitosano

La preparación de la solución de quitosano de medio peso molecular se realizó primeramente secando 5 g de quitosano en un horno de secado a 40 °C durante 24 h; siguiente, la muestra se disolvió en 100 mL de agua desionizada, agregando un volumen de 2.5 mL de ácido acético glacial (J.T. Baker). La solución se mantuvo en agitación magnética constante de 48-72 h a temperatura ambiente.

Solución de alginato

La solución de alginato se preparó de acuerdo con el método de Fiol *et al.*, (citado por Sillerova *et al.*, 2015). Se preparó una solución viscosa (gel) de alginato de sodio al 1% (p/v) pesando 1 g de reactivo y disolviendo en 100 mL de agua destilada a una temperatura a 65 °C. La solución se mantuvo bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente, hasta disolverse.

Producción de biomasa microbiana

Utilizando matraces Erlenmeyer de 500 mL con caldo Czapek enriquecido con extracto de levadura al 5% (P/V). El medio se inoculó adicionando 60 µL de una suspensión de *Rhodotorula mucilaginosa*, incubando en agitación (CVP-500 Shaker incubator, USA) a 30 °C a 150 rpm por 120 h. Una vez obtenida la biomasa, esta se inactivó mediante esterilización en autoclave (a 121 °C, 15 lb por 15 min); la biomasa inactivada se separó mediante centrifugación a 10,000 rpm por 10 min, realizando dos lavados con agua deionizada estéril. Una vez separada la biomasa, se secó en un horno a 60 °C por 24 h, se pulverizó en mortero y se mantuvo en resguardo en un desecador previamente sellado con parafilm, a temperatura ambiente.

La suspensión de *R. mucilaginosa* se preparó utilizando caldo Czapek enriquecido con extracto de levadura al 5% (p/v), el cual fue inoculado con una asada del aislamiento

obtenido en agar Saboraud dextrosa. La suspensión del inóculo se incubó a 30 °C durante 72 h.

Pruebas de Tolerancia

Tolerancia a cobre

Para evaluar la tolerancia a cobre de *Rhodotorula mucilaginosa*, se utilizó caldo Czapek adicionado con diferentes concentraciones de Cu (50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm), disolviendo con agua deionizada estéril (Pandey y Mirsha, 2011). Los tubos con los medios de cultivo se inocularon mediante adición de 40 µL de la suspensión de levadura conteniendo carga 1.5×10^9 células/mL, incubando por 5 días a 30 °C. La concentración de la biomasa producida en presencia del metal se determinó a partir de los valores de absorbancia, obtenidos utilizando un espectrofotómetro a 625 nm.

Tolerancia al quitosano

De cada muestra de quitosano se preparó una solución madre con concentración de 1 g/L (p/v) en solución de ácido acético al 0.05 % (v/v). Estas soluciones se esterilizaron por separado y se adicionaron, en diferentes volúmenes y por separado, al medio de cultivo estéril Czapek. Para las pruebas de tolerancia, en un tubo de ensaye se mezclaron 5 mL del medio de cultivo + 4 mL de cada disolución de quitosano. Cada tubo se inoculó con 40 µL de la suspensión de la levadura con una carga microbiana de 8×10^{13} células/mL, incubando a 30°C por 5 días. La concentración de la biomasa producida en presencia del metal se determinó a partir de los valores de absorbancia, obtenidos utilizando un espectrofotómetro a 625 nm.

Con base a los resultados obtenidos en las pruebas de tolerancia a los diferentes quitosanos, se seleccionó el biopolímero que ocasionó un menor efecto adverso sobre el crecimiento de la levadura.

Síntesis de las Perlas Biopoliméricas

Perlas de quitosano

Del quitosano de medio peso molecular se preparó solución con concentración de 20 g/L (p/v), disolviendo las hojuelas en ácido acético al 2.5% (v/v); una vez obtenida la solución, se prepararon las perlas de quitosano siguiendo la metodología reportada por Caetano *et al.* (2016). Para ello, empleando una bomba peristáltica (Econo Pump, BIORAD, USA) se adicionaron gota a gota 20 mL de la solución de quitosano en un vaso previamente adicionado con 250 mL de NaOH 0.5 M. La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Una vez precipitadas las perlas de quitosano, se retiró el excedente de NaOH y el material obtenido se lavó con agua desionizada (Wan *et al.*, 2002).

Perlas de alginato

Para elaborar las perlas de alginato, la solución de alginato de sodio (preparada al 1% p/v en agua caliente) se adicionó gota a gota, con ayuda de una bomba peristáltica (Econo Pump, BIORAD, USA), en un vaso conteniendo 200 mL de una solución de CaCl₂ 0.1 M. La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética constante y las perlas recién formadas se dejaron reposar aproximadamente 15 min en la solución de CaCl₂, manteniéndolas en agitación magnética suave a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el exceso de la solución de CaCl₂ y las perlas se lavaron con agua desionizada (Sillerova *et al.*, 2015).

Perlas de biocomposito quitosano-alginato (Q-A)

De acuerdo con la literatura, para la inmovilización de biomasa microbiana se ha empleado agar, celulosa, alginatos, poliacrilamidas, sílica gel y glutaraldehído. La biomasa generalmente se mezcla con los agentes de inmovilización en densidades de 4

a 6% de biomasa por 1% (p/p) del soporte, reduciéndose por lo tanto la cantidad requerida del inmovilizador (Cañizares, 2000).

En el presente estudio, para obtener las perlas del biocomposito quitosano-alginato (Q-A) se utilizaron las soluciones con concentración de 20 g/l (p/v) y 1% (p/v) de quitosano y alginato, respectivamente.

Perlas del biocomposito quitosano-alginato-biomasa (Q-A-B)

La síntesis del biocomposito Q-A con la biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* (Q-A-B) se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos para la síntesis de las perlas de Q-A.

Caracterización fisicoquímica de los biocompositos

Morfología

El tamaño y forma que tiende el material sintetizado se determinó mediante observación visual, utilizando una escala graduada en cm y un estereomicroscopio. El tamaño que se reportó como el promedio de al menos tres mediciones del diámetro de cada perla. En total se midieron aproximadamente 15 perlas.

Análisis de Infrarrojo (FT-IR)

Los espectros de FT-IR se producen por los cuerpos calientes ya que se deben a cambios en los estados de energía de electrones orbitales en los átomos o en los estados vibracionales y rotacionales de los enlaces moleculares. Todos los objetos a temperatura superior al cero absoluto (-273 °C) emiten radiación IR y la cantidad y la longitud de onda de la radiación emitida dependen de la temperatura y la composición del objeto considerado. La radiación infrarroja (IR) es una radiación electromagnética cuya longitud de onda comprende desde los 760-780 nm, limitando con el color rojo en la zona visible

del espectro, hasta los 10,000 o 15,000 nm (según autores), limitando con las microondas (Mormillo *et al.*, 1998).

En este estudio se llevó a cabo la caracterización por FT-IR de las perlas sintetizadas de quitosano y alginato, la biomasa seca y pulverizada de *Rhodotorula mucilaginosa* y los biocompositos de quitosano-alginato y quitosano-alginato-biomasa, con el fin de observar las posibles interacciones entre los diferentes componentes de los materiales. Se obtuvieron espectros de diferentes materiales utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer a un rango de 4000 a 400 cm^{-1} en modo absorbancia.

Análisis toxicológicos de los biocompositos

Toxicidad aguda utilizando nauplios de *Artemia salina*

La prueba mas usada para ensayos de toxicidad aguda es el método de *Artemia salina* para la cual su uso se ha extendido en las investigaciones de toxicología debido a su disponibilidad comercial de quistes secos, los cuales pueden eclosionar en condiciones estandarizadas de un laboratorio de bioensayos de toxicidad (Chávez, 2016). Previamente, huevecillos de *A. salina* fueron incubados para su eclosión durante 24 h a temperatura ambiente con aereación mediante una bomba de aire para peceras bajo iluminación artificial en un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 250 mL de agua marina previamente esterilizada en autoclave.

Después de su eclosión, los nauplios de *A. salina* fueron separados en grupos de 10-15 especímenes transfiriéndolos con una pipeta Pasteur del matraz de eclosión a tubos de ensayo de 18 mm x 150 mm conteniendo igualmente agua marina estéril y el extracto de prueba en la cantidad adecuada para obtener, después de alcanzar el volumen final, las concentraciones a ensayar. El volumen final se llevó a 5 mL con agua marina estéril. Todos los tubos se mantuvieron bajo iluminación y se agregó 1 g de perlas por tratamiento a cada tubo. Después de 24 h, los nauplios sobrevivientes se contabilizaron macroscópicamente con la ayuda de una lupa y se determinó el porcentaje de mortalidad a las distintas dosis utilizadas en el ensayo, así como en los controles (Chávez, 2016).

Una vez concluida la prueba, los nauplios fueron sacrificados mediante la adición de 100 μ L de una solución de fenol al 5% (p/v) (Chávez, 2016).

Fitotoxicidad utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (proceso de 168 h de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determinó la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo (Castillo, 2004).

Para llevar a cabo el bioensayo se realizaron los siguientes pasos para el control: se colocó en caja Petri un disco de papel filtro, posteriormente ese se saturó con 5 mL de agua desionizada evitando que se formaran bolsas de aire y, con la ayuda de una pinza se colocaron cuidadosamente 20 semillas, dejando espacio suficiente en las semillas para permitir la elongación de las raíces. Se cubrieron con otro papel filtro y se taparon las cajas (Castillo, 2004; citado por Sobrero y Ronco, 2004).

Para evaluar la fitotoxicidad de los materiales sintetizados, en vez de colocar el papel filtro se colocaron 4 g de perlas de los distintos materiales o tratamientos (perlas de QBPM, de alginato, de Q-A y de Q-A-B) y se distribuyeron uniformemente en toda la placa. Las semillas de lechuga se colocaron directamente sobre las perlas. Cabe mencionar que no se agregó agua a los tratamientos. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri se cubrieron con papel aluminio después de haber colocado las semillas en su interior y durante el periodo de ensayo. Finalmente se incubaron por 168 h, a 22 ± 2 °C. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Toxicidad *in vivo* utilizando plántulas de chile (*capsicum annuum*)

Los ensayos de toxicidad para las plántulas de chile (*Capsicum annuum*) se llevaron a cabo de la misma forma que las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), siguiendo la

metodología propuesta por Castillo (2004) con modificaciones. Se agregaron 5 g de perlas (Q, Q-A, Q-A-B y A), por separado, las cuales se distribuyeron uniformemente por toda la placa Petri. Las semillas de chile se colocaron directamente sobre el material y se taparon con un papel filtro previamente humedecido con agua deionizada. Las placas se cubrieron con papel aluminio para evitar la exposición a la luz y se incubaron en cámara de incubación a 20 °C, durante 2 semanas. Una vez terminado el lapso, se midieron las radículas de las semillas germinadas utilizando una regla y se calculó el porcentaje de germinación. El diseño experimental fue completamente al azar.

Eficiencia de remoción de cobre

La cuantificación de cobre se realizó mediante absorción atómica, que consiste en una técnica para determinar la concentración de un elemento metálico determinado en una muestra y puede utilizarse para analizar la concentración de más de 62 metales diferentes en una solución. La técnica se basa en gran medida en la Ley de Beer-Lambert. En resumen, los electrones de los átomos en el atomizador pueden ser promovidos a orbitales más altos por un instante mediante la absorción de una cantidad de energía (es decir, luz de una determinada longitud de onda). Esta cantidad de energía (o longitud de onda) se refiere específicamente a una transición de electrones en un elemento particular, y en general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento. Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida, y la cantidad restante en el otro lado (el detector) se puede medir, es posible, a partir de la ley de Beer-Lambert, calcular cuántas de estas transiciones tiene lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide (Idaly, 2013)

Para la cuantificación de cobre, se preparó una solución de agua sintética adicionada con 20 ppm de cobre. A esta solución se le agregaron 0-15 g de las perlas liofilizadas del biocomposito QAB, dejando estos reposando a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 80, 100 y 140 min). El agua con concentración conocida de cobre (control) y el sobrenadante de la muestra de agua con cobre (20 ppm) tratada con el biocomposito QAB fueron analizados en el espectrofotómetro de absorción atómica (*Analyst 400*, Perkin Elmer) y

los datos se procesaron en el programa WinLab32 (AA flmae). Se calculó el porcentaje del metal absorbido y el resultado se expresó con eficiencia de remoción de cobre.

Análisis estadístico

La información obtenida se analizó estadísticamente para detectar las diferencias significativas entre los valores de los parámetros analizados, por medio de una comparación de medias con Tukey ($P > 0.05$) entre los distintos tratamientos (biocompositos de quitosano, quitosano-alginato, quitosano-alginato-biomasa y alginato). Se comparó la elongación del tallo y el porcentaje de germinación de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y semillas de chile (*Capsicum annuum*). Asimismo, se comparó el porcentaje de supervivencia de *Artemia salina*. El análisis se realizó utilizando el Programa JMP 5.0.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e Identificación de la levadura metalotolerante

De las muestras que fueron tomadas de agua y sedimento en el Río San Pedro en Cananea, Sonora (30°59'35"N 110°18'02"O), se llevó a cabo un aislamiento de bacterias en agar Sabraud Dextrosa (Bioxoid) adicionado con 50 ppm de Cu, utilizando diluciones seriadas. Posteriormente, se realizaron dos resiembras adicionales a fin de aislar las colonias que presentaron mayor crecimiento. La primera resiembra se llevó a cabo tomando una asada en donde se encontraba una mayor proliferación de la levadura y a su vez éste medio adicionado con cobre. Al observar las células se determinaron que tenían una forma ovoide de gran tamaño (Figura 9); asimismo se observaron blastoconidias, que son estructuras de reproducción asexual que se originan por gemación en los hongos blastomicetales, también llamados levadoras no esporógenas, que no presentan formas sexuales ni balistosporas.

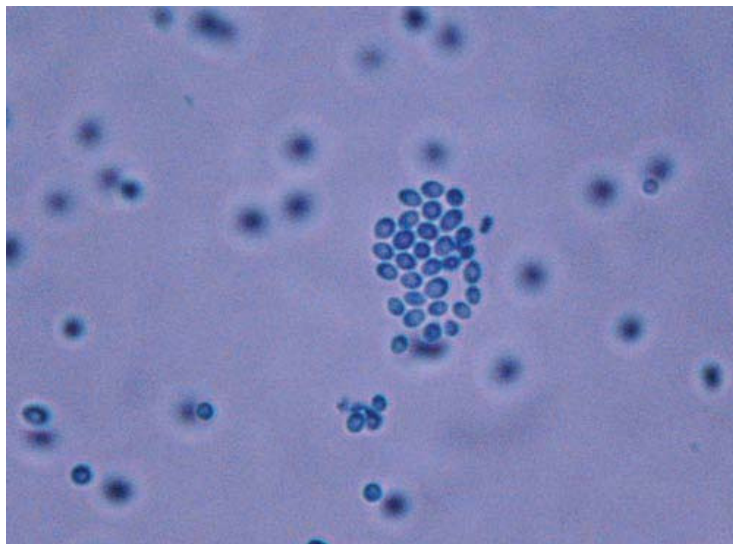


Ilustración 9. Tinción con azul de algodón lactofenol, a 40X, de las levaduras aisladas a partir de sedimentos. Se observan células (blastoconidios) de *Rhodotorula mucilaginosa*, ovales y elongadas.

La levadura produce gemaciones de manera repetida, formando cadenas y separadas por septos. Suelen producirse en gran cantidad durante los periodos favorables para el crecimiento del hongo levaduriforme y sirven para dispersarlo y aumentar su población en corto periodo de tiempo. *Rhodotorula mucilaginosa* es de distribución universal, se aísla de la naturaleza, la piel y las mucosas del ser humano y de animales (Arenas, 2008). Macroscópicamente, las colonias son de crecimiento rápido (desarrollo en 4 días), con un tamaño de 2 a 3 cm, de diámetro, con color rosa, aunque pueden llegar a ser rojas o naranjas debido a la presencia de β -carotenos, suaves, lisas, húmedas y algunas veces de aspecto mucoide (Bonifaz, 2012; Larone, 2011). Microscópicamente, las células levaduriformes muestran blastoconidios de 2 a 4 μm de diámetro, ovoides o ligeramente alargados; estas estructuras son monogemantes de base estrecha y solo en ocasiones excepcionales forman pseudohifas (Bonifaz, 2012).

En este trabajo se realizó una segunda siembra en el mismo agar y en medio líquido (caldo Czapeck + 5 g/L de extracto de levadura). En agar se observaron colonias de color naranja rosáceo, brillantes, mucosas y lisas (Figura 10).



Ilustración 10. Colonias de la levadura aislada, desarrolladas en agar Saboraud dextrosa + extracto de levadura al 5%, a las 72 h de incubación a 28 °C.

Una vez aislada la levadura metalotolerante, ésta misma fue identificada y caracterizada en el centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, la levadura aislada del resguardo del que se contaba se identificó como *Rhodotorula mucilaginosa* con un 99% de identidad. Esta identificación se realizó por medio del alineamiento de secuencia según la página electrónica <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, utilizando el método de secuenciación de los espaciadores internos transcritos y/o dominios 26sF/26sR, una característica es que este tipo de levadura acumula metales en la pared celular, se ha encontrado en suelos o ambientes que pueden estar directa e indirectamente contaminados por diversos metales pesados o en ambientes e hipersalinos (De Vos *et al.*, 2009).

Se realizó un análisis morfométrico de la levadura, encontrando que las células de *Rhodotorula mucilaginosa* presentaron un diámetro de 4 a 6 μm en promedio. El enriquecimiento del medio utilizado para la propagación fue favorable para el crecimiento del microorganismo, encontrando una mayor absorbancia en los medios enriquecidos con extracto de levadura al 5% y adicionados con 50 ppm de cobre, e incubados a $28 \pm 2^\circ \text{C}$, a 150 rpm.

La adición del extracto de levadura contribuyó a un mejor crecimiento, obteniendo una población de células de 8×10^{16} células a las 120 h, mientras que en ausencia del extracto de levadura se alcanzó la misma densidad celular hasta las 192 h. El extracto contiene proteínas, aminoácidos, además de vitaminas del complejo B, que contribuyen a una mejor asimilación y/o aprovechamiento de los nutrientes.

Producción de biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa*

En relación a la producción de biomasa empleando fermentación líquida, después del proceso de inactivación, centrifugación y liofilización, se obtuvo un rendimiento de la biomasa de 2.7 g/L en peso seco, por cada 500 mL de medio Czapeck + extracto de levadura al 5% (p/v) + 50 ppm de cobre.

Tolerancia a Cobre

Se encontró que *Rhodotorula mucilaginosa* presentó un mayor ($p < 0.05$) crecimiento en el medio adicionado con 50 ppm de Cu^{2+} . Sin embargo, la levadura fue capaz de crecer a concentraciones de 100 y 200 ppm del metal, observándose una disminución de la densidad celular al aumentarse la concentración de cobre (Figura 11).

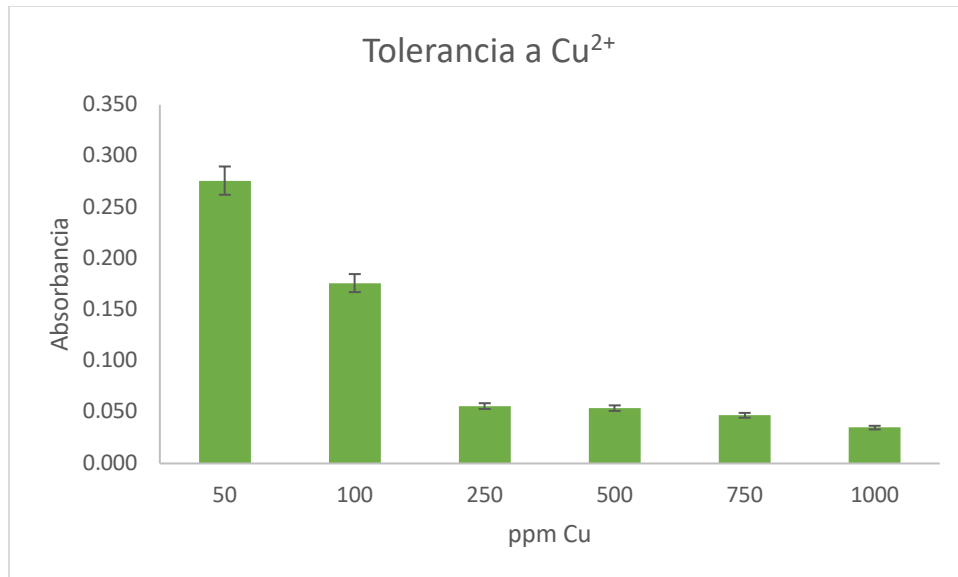


Ilustración 11. Crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio Czapeck enriquecido con extracto de levadura al 5%, adicionado a diferentes concentraciones de Cu^{2+} .

Estudios similares han reportado que *Rhodotorula mucilaginosa* presenta tolerancia a otros metales como Mg, Mn, Zn, Fe, Au, Ag, entre otros, en suelos, siendo una levadura capaz de utilizarse en procesos de biorremediación para la remoción de materiales inorgánicos en cuerpos de agua de contacto, como lo es las aguas crudas, residuales, superficiales y/o pluviales e inclusive en aguas utilizadas para riego en cultivos.

Tolerancia a Quitosano

Diversos estudios han demostrado el potencial del quitosano para fines de biorremediación, específicamente para el secuestro de metales en diferentes matrices. No obstante, tomando en cuenta la actividad antimicrobiana que el biopolímero ejerce sobre una gran cantidad de especies de bacterias y hongos, en este estudio se evaluó la tolerancia de la levadura a quitosanos comerciales (Sigma-Aldrich, USA) de peso molecular bajo, medio y alto. Se encontró que *Rhodotorula mucilaginosa* fue capaz de crecer en medios adicionados con diferentes concentraciones de los quitosanos evaluados, encontrando un mayor ($p < 0.05$) crecimiento en el medio con concentración de 1% (Figura 12). Sin embargo, se observó una mayor significancia de crecimiento en el medio formulado con quitosano de medio peso molecular a concentraciones de 20 g/L, en comparación con los otros dos quitosanos. Los resultados indican que a bajo y medio peso molecular de quitosano, la levadura es capaz de utilizar el biopolímero como fuente de carbono y nitrógeno. Con base a estos resultados, se seleccionó el quitosano de medio peso molecular para la síntesis de los materiales poliméricos.

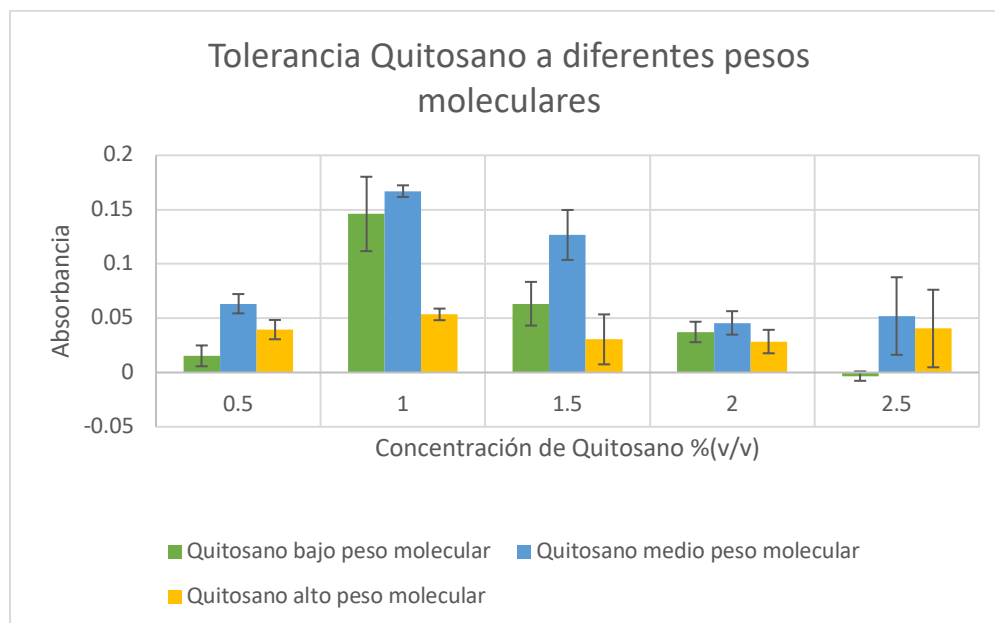


Ilustración 12. Crecimiento de Rhodotorula mucilaginosa en medio Czapeck enriquecido con extracto de levadura al 5%, adicionado con diferentes concentraciones de quitosanos comerciales de bajo, medio y alto peso molecular.

Elaboración de los Materiales Biopoliméricos

Con el fin de comparar las propiedades de los materiales de quitosano-alginato, con y sin biomasa levaduriforme, se sintetizaron además materiales de control consistentes en perlas de sólo quitosano y perlas de sólo alginato. Los biocompositos de quitosano-alginato, con y sin biomasa, se sintetizaron utilizando una mezcla de ambas soluciones poliméricas: solución de alginato al 1% (p/v) + solución de quitosano de medio peso molecular a concentración de 2% (p/v).

Perlas de quitosano

Para sintetizar las perlas de quitosano se siguió el método reportado por Wan *et al.* (2001). De acuerdo con los autores, es posible sintetizar perlas del biopolímero a partir de una disolución de quitosano elaborada disolviendo 2 gramos de hojuelas en 50 mL de solución de ácido acético al 5% (v/v); una vez homogenizada, esta disolución se adiciona por goteo en un vaso conteniendo 250 mL de solución de NaOH 0.5 M.

En este estudio, al reproducir la metodología antes descrita se obtuvo un material diferente al reportado por los autores (Wan *et al.*, 2001), ya que en lugar de obtener las perlas, se obtuvo un pre-gel antes de realizar la precipitación en la solución de NaOH. Por tal motivo, se llevó a cabo una modificación de la técnica, disminuyendo la cantidad de la solución de ácido acético al 2.5% (v/v) y aumentando la cantidad de quitosano a 3 g (p/v); es decir, por cada 100 mL de agua deionizada se adicionaron 2.5 mL de ácido acético concentrado y 3 g de las hojuelas del biopolímero de medio peso molecular (QMPPM). Después de homogenizar la solución, esta se precipitó gota a gota en un vaso previamente adicionado con un volumen de 250 mL de NaOH 0.5 M y se mantuvo bajo agitación magnética. La formación de las perlas de quitosano ocurrió por la precipitación del ácido acético que se encuentra presente en la solución de QMPPM al entrar en contacto con el NaOH, el cual neutraliza el ácido acético dentro del pre-gel de quitosano y por lo tanto termina de coagular el gel de quitosano en forma de esferas (Figura 13) (Wan *et al.* 2001)



Ilustración 13. Perlas de quitosano de medio peso molecular, sintetizadas utilizando la técnica reportada por Wang et al. (2001), con modificaciones.

Perlas de alginato

Las perlas de alginato se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Sillerová *et al.* (2015), a partir de la solución de alginato de sodio al 1% (p/v) en agua deionizada caliente. Esta solución se adicionó por goteo en un vaso previamente con 200 mL de una solución de CaCl_2 0.1 M y se mantuvo bajo agitación magnética. Una vez obtenidas, las perlas de alginato presentaron una consistencia con buena firmeza, con color ligeramente blanco-cristalino, con un diámetro promedio variable entre 0.1-0.3 cm \pm 0.032 (Figura 14) y pH de 6.7 ± 1 . Estas características son similares a las reportadas por los autores, quienes obtuvieron perlas de alginato de alrededor de 0.1-0.2 cm (Sillerová *et al.*, 2015). Por cada 10 mL de la solución de alginato adicionados a 100 mL de la solución de CaCl_2 0.1 M se obtuvieron aproximadamente 10 g de perlas.



Ilustración 14. Perlas de alginato sintetizadas utilizando la técnica reportada por Sillerová et al. 2015.

Biocompositos quitosano-alginato

Para la elaboración de los biocompositos de quitosano-alginato se realizaron mezclas de quitosano-alginato en proporción de 50-50, 60-40, 70-30, 75-25, 80-20 y 90-10%; para ello, se añadió directamente la solución de alginato al 1% (p/v) a la solución de quitosano al 2% (p/v), encontrando que la mezcla más adecuada fue la de 75-25%. Durante la síntesis de las perlas se adicionó tripolifosfato de sodio (TPP) a una concentración de 1 g/L, como agente entrecruzante. El TPP tiene la función de unir los grupos funcionales involucrados de el sistema, con el fin de mantener partículas o perlas de mayor firmeza y evitar que se deshagan con el tiempo, formando un precipitado en el sobrenadante del entrecruzante. Una vez obtenidas y lavadas con agua deionizada, las perlas del biocomposito de quitosano-alginato obtenidas presentaron consistencia firme, con una coloración ligeramente amarillenta, un tamaño promedio de $0.1-0.2 \pm 0.075$ cm (Figura 15) y un pH de 6.2 ± 1 . Se obtuvieron aproximadamente 10 g de biocomposito por cada 10 mL de solución de quitosano + alginato.



Ilustración 15. Perlas del biocomposito de quitosano-alginato, obtenido mediante precipitación con tripolifosfato.

Biocompositos de quitosano-alginato con biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa*

Para elaborar los compositos con la biomasa de la levadura, se pesaron 0.06 g de la biomasa inactivada (seca y pulverizada) y se disolvieron en la solución de quitosano al 2% (p/v) en ácido acético al 2.5% (v/v), manteniendo la mezcla bajo agitación magnética por 3 h. La solución de quitosano con la biomasa se adicionó a la solución de alginato al 1% (p/v) en agua tibia, manteniendo en agitación vigorosa por 48 h, hasta obtener una mezcla homogénea de los tres componentes. Posteriormente, esta mezcla se precipitó adicionando TPP para obtener el biocomposito de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa*. Las perlas sintetizadas se lavaron con agua deionizada y se escurrieron. El material obtenido presentó una consistencia firme y de color amarillento, con un tamaño promedio de $0.2 - 0.3 \pm 0.055$ cm y pH de 7.0 ± 1 (Figura 16). Por cada 10 mL de mezcla de quitosano-alginato-biomasa se obtuvieron 13 g de perlas.



Ilustración 16. Biocomposito de quitosano-alginato con biomasa inactivada de *Rhodotorula mucilaginosa*.

Caracterización de los Materiales Poliméricos

Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

De acuerdo con los espectros FT-IR obtenidos (Figura 17), se encontró que las perlas elaboradas a partir de la solución de quitosano de medio peso molecular presentaron bandas con características correspondientes a las señales del grupo amino primario (NH_2) a 1650 cm^{-1} , así como los grupos ($-\text{OH}$ y $-\text{NH}$) a 3000 cm^{-1} respectivamente. El espectro de las perlas de alginato (Figura 18) mostró un alargamiento del grupo ($-\text{COOH}$) característico entre los 1500 y 1600 cm^{-1} . En el caso del espectro de quitosano-alginato (Figura 19), se muestra el mapeo de bandas de grupos carboxílicos entre los 1400 y 1600 de cm^{-1} y 1650 cm^{-1} del grupo amino principal (NH_2), a una proporción de quitosano:alginato de 75-25%. Además, se realizó la lectura de solamente biomasa en presencia y ausencia de cobre (Figura 20), en donde se observó que ambos espectros son similares en cuanto a la localización de las bandas de los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$ a 3000 cm^{-1} , así como de los grupos carboxílicos en el rango de 1600 a 1700 cm^{-1} . En relación

al espectro del biocomposito QMPM-alginato-biomasa (Figura 21), se realizaron tres determinaciones en donde se observaron bandas a longitudes de onda similares a las encontradas en los componentes individuales, lo que permite concluir que la muestra coincide con la formulación y/o proporción de componentes.

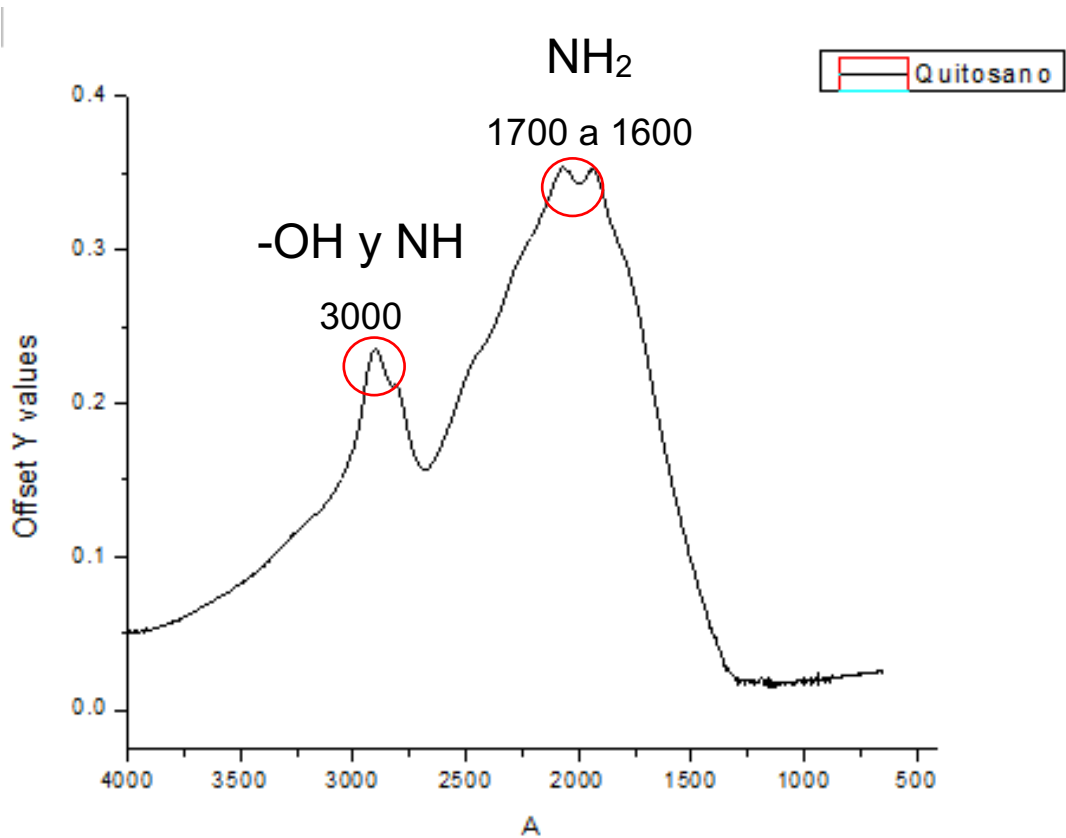


Ilustración 17. Espectro de perlas elaboradas a partir de quitosano de medio peso molecular.

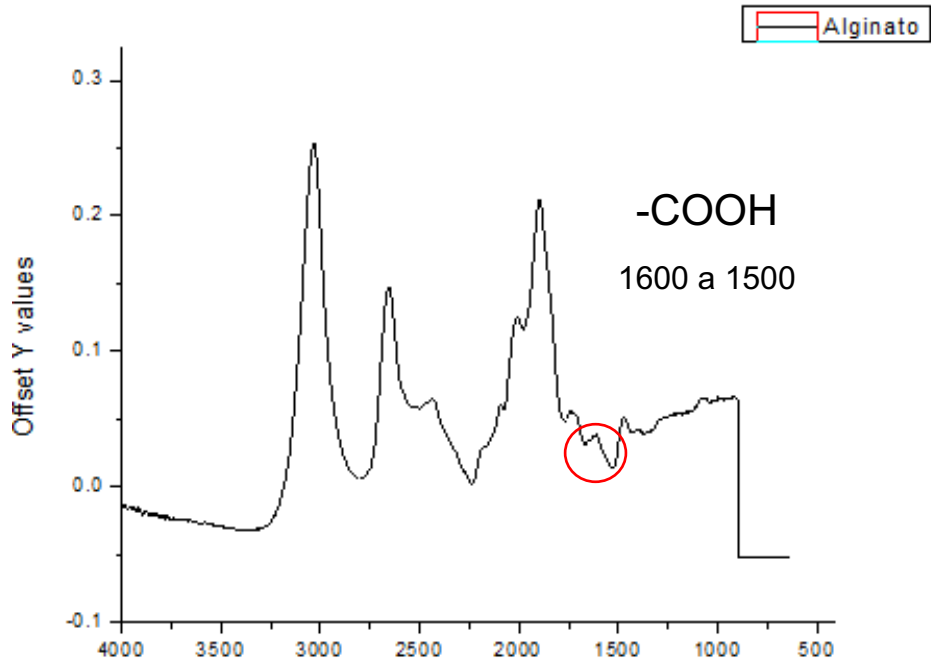


Ilustración 18. Espectro de perlas elaboradas a partir de alginato de sodio.

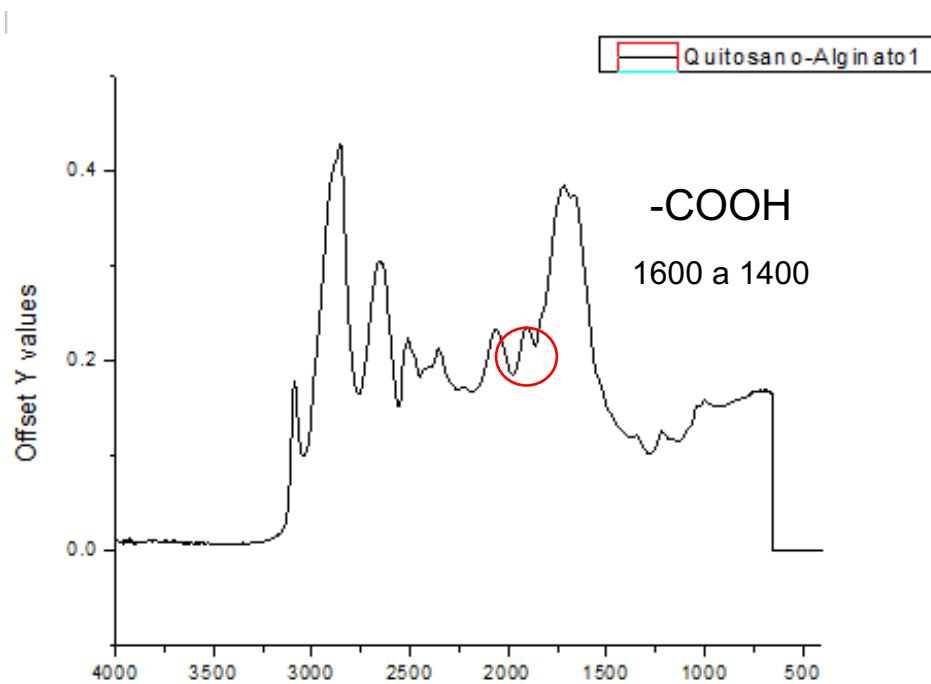


Ilustración 19. Espectro de perlas elaboradas a partir de una mezcla de quitosano y alginato en proporción 75-25%.

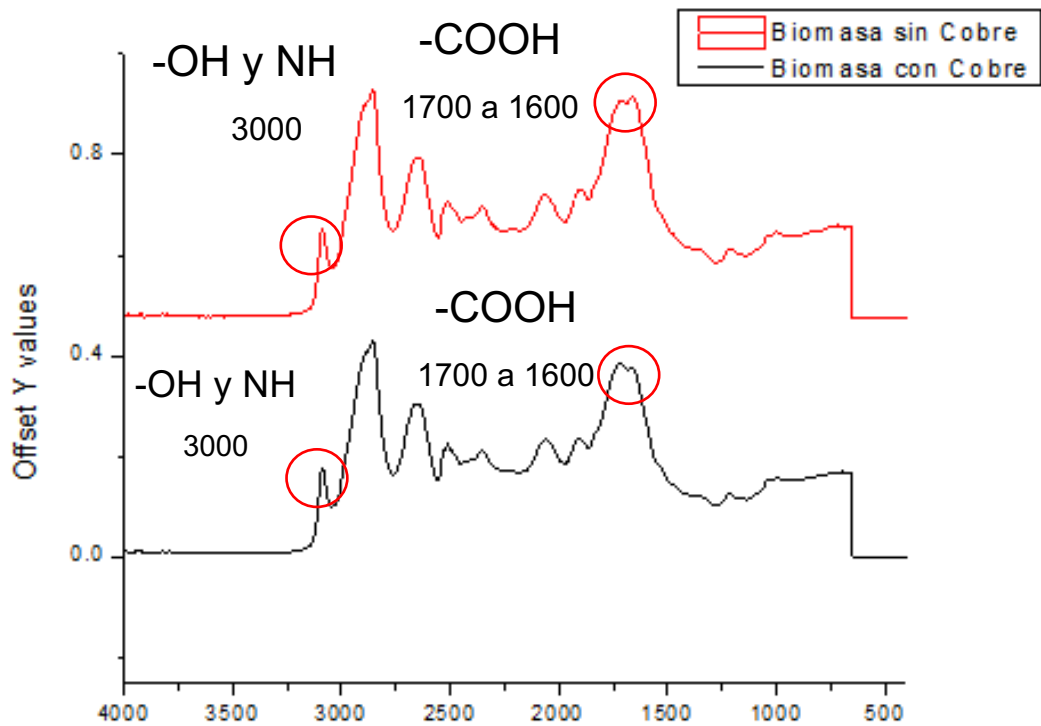


Ilustración 20. Espectro de la biomasa *Rhodotorula mucilaginosa*, desarrollada en medio de cultivo adicionado con y sin 50 ppm de cobre.

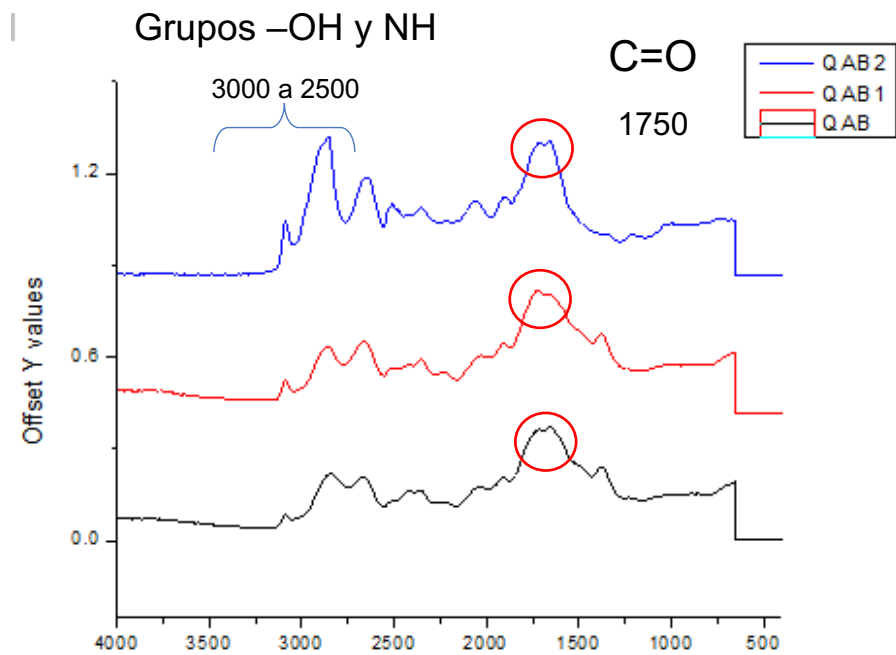


Ilustración 21. Espectros de biocompositos de perlas elaboradas a partir de la mezcla de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* (QAB).

Análisis Toxicológico

El análisis toxicológico de los materiales diseñados para las aplicaciones prácticas tales como la biorremediación, es un factor de gran importancia ya que permite asegurar la inocuidad y/o seguridad de los materiales, independientemente de la escala a la que fue formulado (películas, perlas, partículas micro o nanométricas, etc.). Esto es de vital importancia a fin de evitar un potencial impacto ambiental asociado al uso de materiales basados en polímeros antimicrobianos como el quitosano, lo que podría afectar al crecimiento de microorganismos (nativos, benéficos o patógenos) de una manera positiva o negativa.

En esta investigación se llevó a cabo un análisis toxicológico de los materiales sintetizados mediante la determinación de la toxicidad aguda utilizando nauplios de *Artemia salina* y la fitotoxicidad utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Además, se llevó a cabo un análisis para evaluar la toxicidad *in vivo* utilizando plántulas de chile (*Capsicum annuum*).

Toxicidad aguda utilizando *Artemia salina*

El análisis de toxicidad aguda en nauplios de *Artemia salina* se llevó a cabo de acuerdo con la técnica reportada por Molina-Salina y Said-Fernández (2006). Los ensayos se realizaron por sextuplicado, determinando el porcentaje de supervivencia de los nauplios después de haber sido expuestos a las perlas de los diferentes materiales sintetizados. Se encontró que las perlas de quitosano, alginato y quitosano-alginato-biomasa no afectaron la supervivencia de *Artemia salina* con respecto al control de agua, observando > 93.3% de nauplios vivos (Figura 22, Tabla 6) al final del ensayo.

Los resultados obtenidos sugieren que los materiales elaborados a base de alginato y quitosano (puros) presentan una toxicidad nula; sin embargo, el biocomposito de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* presentó una baja toxicidad (alrededor del 10%). Esto puede atribuirse a las interacciones existentes tanto entre los componentes que conforman el biocomposito como entre el biocomposito y el agua salina, limitando la disponibilidad de nutrientes.

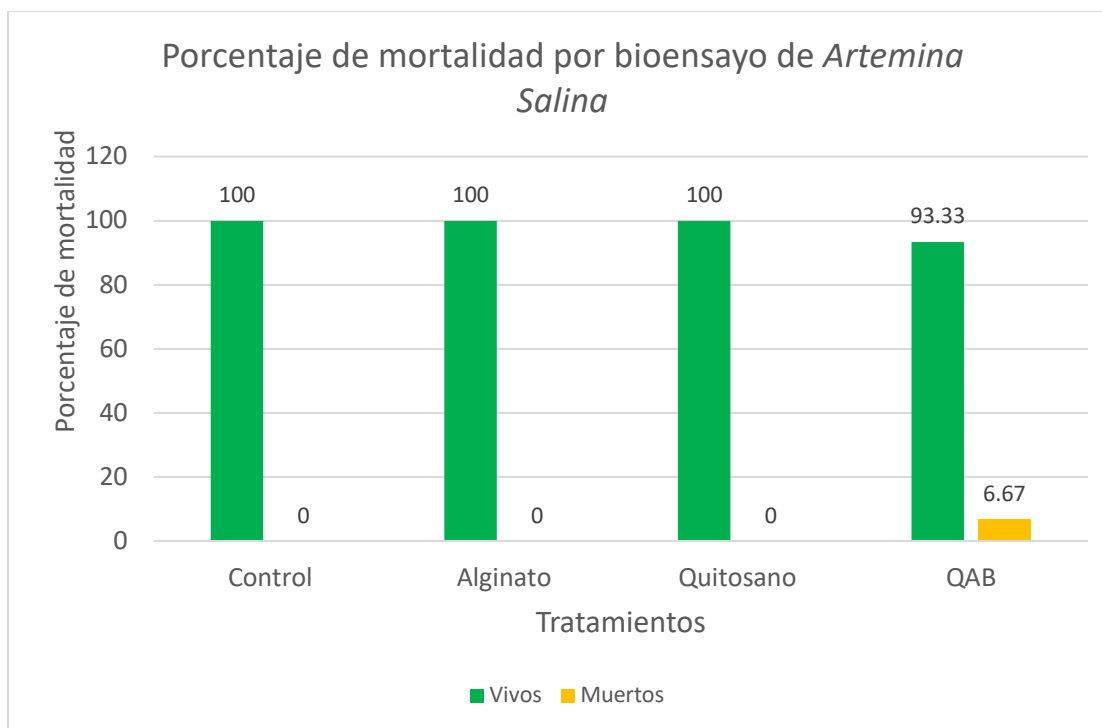


Ilustración 22. Porcentaje de supervivencia de nauplios de *Artemia salina* expuestos a las perlas de alginato, perlas de quitosano, perlas de quitosano-alginato con biomasa y el control de agua a las 24 h.

Tabla 6. Número de nauplios de *Artemia salina* vivos después de 24 h de exposición a los materiales elaborados.

| Tratamiento | Número de nauplios vivos |
|----------------------------|--------------------------|
| Control (agua salina) | 10.0 ± 0.23 |
| Alginato | 10.0 ± 0.23 |
| Quitosano (QMPM) | 10.0 ± 0.23 |
| Quitosano-Alginato-Biomasa | 9 ± 0.23 |

Valores reportados con el promedio ± error estándar.

Está reportado en la bibliografía que el pH óptimo para el crecimiento de *Artemia salina* es de 7.0 a 8.5 (Villamar, 2000). Algunos estudios han demostrado que el tracto digestivo

de *A. salina* contiene desde algas y detritus hasta granos de arena, demostrando que este organismo es un filtrador no selectivo, por lo que puede ingerir materiales contaminados y partículas de 1.2 – 50 μm . *A. salina* no regula su nutrición y se alimenta las 24 h que duró el estudio (FAO); así mismo, se sabe que se puede alimentar de materia orgánica, por lo que es posible que el crustáceo haya sido capaz de utilizar la biomasa inactivada de *Rhodotorula mucilaginosa* presente en el biocomposito de Q-A-B, como nutriente.

Fitotoxicidad utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Para conocer la fitotoxicidad aguda de los materiales elaborados se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) tipo “iceberg” adquiridas en comercio local, determinando los parámetros de porcentaje de germinación de semillas y elongación del tallo de la plántula desarrollada al estar en contacto directo con los diferentes materiales, de acuerdo a la técnica desarrollada por Sobrero y Ronco (2004), con algunas modificaciones. De acuerdo con los resultados obtenidos, las perlas sintetizadas a partir de soluciones de quitosano de medio peso molecular (QMPM) y quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* afectaron negativamente la germinación de las semillas (Figuras 23 y 24).

Lo anterior puede atribuirse a la acidez que presentan estos materiales, ya que el pH óptimo para la germinación de las semillas de lechuga debe ser ligeramente ácido o neutro (rango de 6.5 a 7.5) (Valderrama *et al.*, 2016), mientras que el pH de las perlas de QMPM estaba aproximadamente a 5.5. Además, se sabe que valores de pH igual o menores a 5.5 pueden originar un pobre desarrollo de la planta, mientras que valores de pH por arriba de 7.5 es considerado como límite para un buen crecimiento (Alzate y Loaiza, 2008; citado por Valderrama *et al.*, 2016).

Por su parte, los tratamientos con las perlas de alginato (Figura 25) y quitosano-alginato-biomasa *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 26) afectaron la germinación de las semillas, encontrando porcentajes de germinación entre el 70 y 75%, respectivamente. Estos resultados son menores ($p < 0.05$) a los obtenidos en el tratamiento control (semillas regadas con agua), en donde se observó una germinación del 85% (Figura 27).

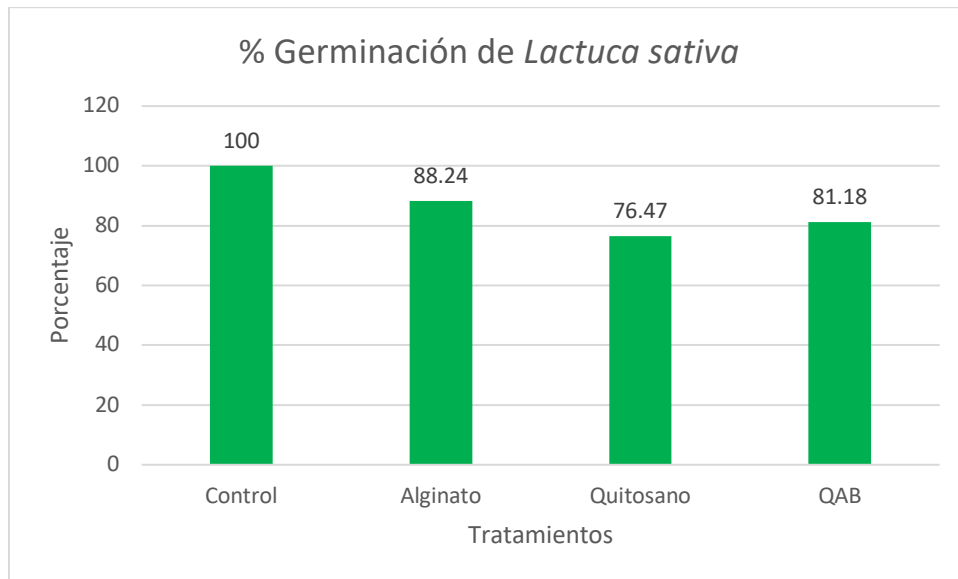


Ilustración 23. Porcentaje de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) germinadas durante el contacto directo con los materiales elaborados: perlas de alginato, quitosano y quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa*.



Ilustración 24. Semillas no germinadas de lechuga (*Lactuca sativa*) inoculadas sobre perlas de quitosano de bajo peso molecular, incubadas a 25 °C por 24 h.



Ilustración 25. Semillas germinadas de lechuga (*Lactuca sativa*) inoculadas sobre perlas de alginato, incubadas a 25 °C a las 24 h.



Ilustración 26. Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) inoculadas sobre perlas de biocomposito de quitosano-alginato-biomasa *Rhodotorula mucilaginosa* (inactivada), incubadas a 25 °C a las 24 h.

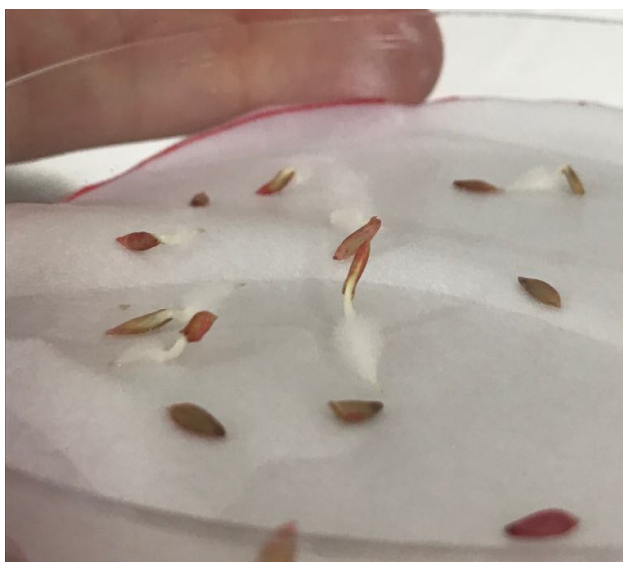


Ilustración 27. Semillas germinadas de lechuga (*Lactuca sativa*) inoculadas con agua destilada (control), incubadas a 25 °C a las 24 h.

En relación a la elongación del tallo y de la raíz de las plántulas de lechuga, en el tratamiento con las perlas de alginato se encontró una mayor ($p < 0.05$) longitud tanto del tal como de la raíz (Tabla 7), lo que sugiere que las perlas de alginato favorecen el desarrollo de la plántula una vez que la semilla logra germinar. Estos resultados se pueden atribuir a la capacidad de retención de agua o capacidad adsorbente de este tipo de material, propiciando la formación de retículos poliméricos tridimensionales que poseen grupos hidrófilos capaces de absorber grandes volúmenes de agua (desde diez hasta miles de veces su propio peso) y retenerlos aún bajo presión, al mismo tiempo por las características que posee el alginato, que es considerado un polisacárido aniónico. De este modo, la ya conocida capacidad absorbente de los hidrogeles o perlas de alginato puede ayudar a la retención del agua por un mayor tiempo (Avedaño *et al.*, 2013), proporcionando una mejor distribución y abastecimiento a las semillas de lechuga. Contrario a lo que se esperaba, en todos los tratamientos se encontraron muy similares las longitudes promedio del tallo. Los tallos de las plántulas de lechuga desarrolladas al estar en contacto directo con las perlas de alginato, el biocomposito y el control no demostraron diferencia significativa ($p < 0.05$), por lo que el tratamiento diferente fue el de perlas de quitosano de medio peso molecular (QMPM). Cabe mencionar que en el

tratamiento control y en el tratamiento con perlas de alginato se encontró una mayor ($p < 0.05$) cantidad de semillas germinadas.

Tabla 7. Diferencias en el tamaño de la raíz y del tallo de *Lactuca sativa*. Comparación de medias con Tukey ($p < 0.05$).

| Tratamiento | Elongación del tallo (cm) |
|----------------------------|---------------------------|
| Control | 3.7 ± 0.11^a |
| Alginato | 3.1 ± 0.18^a |
| Quitosano | 2.2 ± 0.08^b |
| Quitosano-Alginato-Biomasa | 2.7 ± 0.14^a |

Valores promedio de todas las mediciones \pm error estándar.

Toxicidad *in vivo* utilizando plántulas de chile (*Capsicum annuum*)

Además de estudiar del bioensayo de *Artemia salina* y semillas de lechuga, el análisis toxicológico se llevó a cabo utilizando semillas de plántula de chile (*Capsicum annuum*) adquiridas en un comercio local. Las pruebas de germinación de las semillas de chile se realizaron siguiendo el procedimiento descrito para las semillas de lechuga, incrementando al doble el tiempo de incubación.

Chirinos (2013) reportaron que el tratamiento con recubrimientos de quitosano es benéfico para semillas de calabaza. De acuerdo a los autores, el quitosano tiene propiedades benéficas para aplicaciones como recubrimiento de semillas, conservación de frutas y hortalizas, fungicida, bioestimulante en plantas y agente inductor de resistencia a patógenos. Ello basado en previos donde se ha reportado la eficacia de soluciones de quitosano como estimulante en plantas para la germinación de semillas de algodón, maíz, trigo, pepino y chile, entre otros (Chirinos, 2013). Sin embargo, bajo las condiciones de análisis utilizadas en este estudio, no se observó un efecto estimulante por parte de los materiales sintetizados con respecto al control y solamente logró brotar la raíz de las semillas de chile (*Capsicum annuum*) (Figuras 28 y 29).



Ilustración 28. Semillas de chile (*Capsicum annuum*) inoculados sobre perlas de quitosano (QMPM), incubadas a 22 °C, a las dos semanas de germinación.

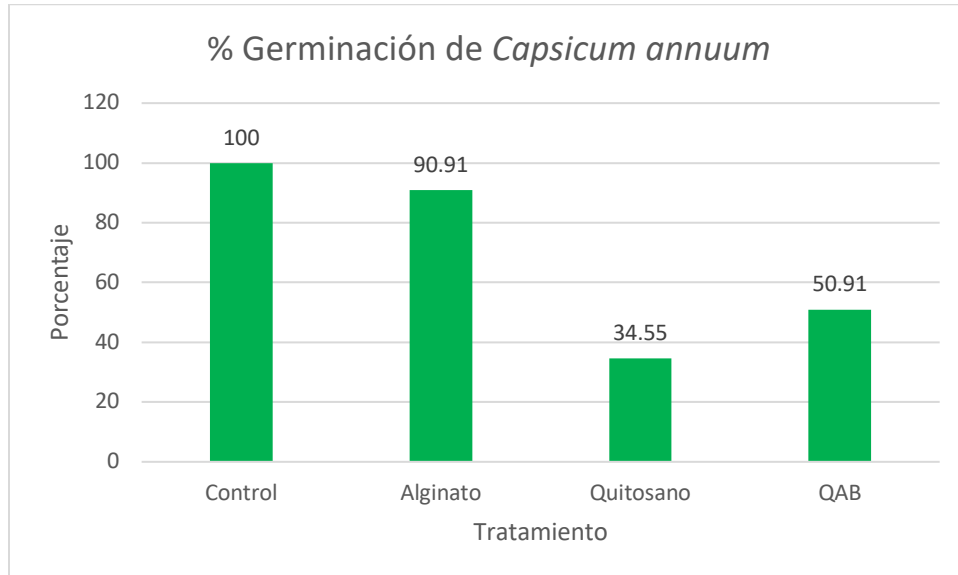


Ilustración 29. Porcentaje de semillas de chile (*Capsicum annuum*) germinadas durante el contacto directo con los materiales elaborados: control con agua destilada, perlas de alginato, perlas de quitosano y biocomposito de quitosano-alginato-biomasa *Rhodotorula mucilaginosa* (inactivada)

Contrario a lo que se esperaba, los materiales sintetizados afectaron de manera importante la germinación de las semillas de chile, encontrando que en las perlas de quitosano puro sólo germinaron alrededor del 20% de las semillas, en comparación con el control. Por su parte, en las perlas de alginato se encontró una germinación del 50% (Figura 30). La incorporación de la biomasa en el biocomposito de quitosano-alginato no presentó un efecto benéfico, observando una germinación de semillas alrededor del 30%. Estos resultados sugieren que el uso de materiales elaborados a base de quitosano puede resultar perjudicial para el desarrollo de plántulas de chile.

Una vez finalizado el ensayo de germinación de las semillas, al medir la longitud de las raíces se encontró que las plántulas desarrolladas en contacto directo con las perlas quitosano de medio peso molecular y con las perlas del biocomposito Q-A-B, presentaron un menor ($p < 0.05$) tamaño con respecto al control (Tabla 8).

Tabla 8. Diferencias en el tamaño de la raíz y del tallo de *Capsicum annuum*. Comparación de medias con Tukey ($p < 0.05$).

| Tratamientos | Elongación del tallo (cm) |
|--------------|---------------------------|
| Control | 3.14 ± 0.15^a |
| Alginato | 2.82 ± 0.20^b |
| Quitosano | 1.0 ± 0.17^c |
| QAB | 1.5 ± 0.15^c |

Valores promedio de todas las mediciones \pm error estándar.

Índice de toxicidad de los materiales biopoliméricos sobre *Lactuca sativa* y *Capsicum annuum*

A partir de los valores experimentales obtenidos en los bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y chile (*Capsicum annuum*), se calculó el índice del porcentaje de germinación residual normalizado (IGN) y la elongación radical residual normalizada (IER), mediante las siguientes formulas:



Ilustración 30. Semillas de chile (*Capsicum annuum*) inoculadas sobre perlas de alginato, incubadas a 22 °C a un periodo de 2 semanas.

$$IGN = \frac{Germ\ x - Germ\ testigo}{Germ\ testigo}$$

$$IER = \frac{Elong\ x - Elong\ testigo}{Elong\ testigo}$$

Donde Germ x es el porcentaje promedio de semillas germinadas en el tratamiento utilizado, Germ testigo es el porcentaje de semillas germinadas en el control, Elong x es la longitud promedio de semillas germinadas en el tratamiento utilizado y Elong testigo es la longitud promedio de la radícula de las semillas germinadas en el control. La categorización del índice de toxicidad y de elongación son los siguientes:

| Índice de toxicidad | |
|---------------------|----------|
| 0 a -0.25 | Baja |
| -0.25 a -0.5 | Moderada |
| -0.5 a -0.75 | Alta |
| -0.75 a -1 | Muy alta |

Al analizar los resultados obtenidos, se encontró un menor efecto en la germinación de las semillas de lechuga, en las cuales la toxicidad de todos los materiales sintetizados fue baja (Figura 31); no obstante, los materiales de alginato y Q-A-B mostraron una toxicidad moderada, inhibiendo la elongación de las raíces (Figura 32).

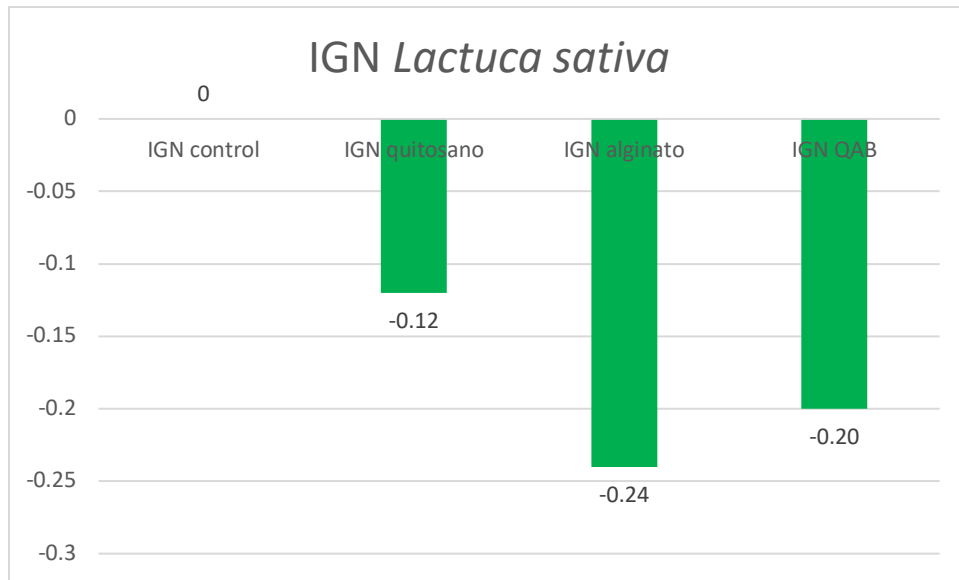


Ilustración 31. Índice del porcentaje de germinación residual normalizado para los materiales sintetizados, en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

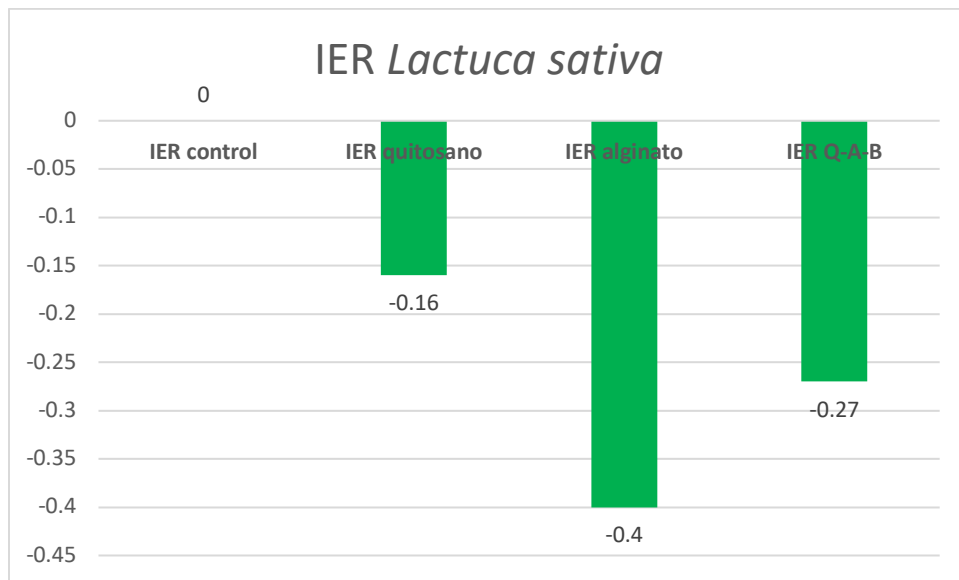


Ilustración 32. Elongación radical residual normalizado para los materiales sintetizados, en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

De manera similar, las perlas de alginato y las perlas del biocomposito Q-A-B presentaron una toxicidad de moderada a alta sobre las semillas de chile, observando un mayor efecto adverso en la germinación de las semillas de chile (Figura 33) y en la elongación de las raíces (Figura 34).

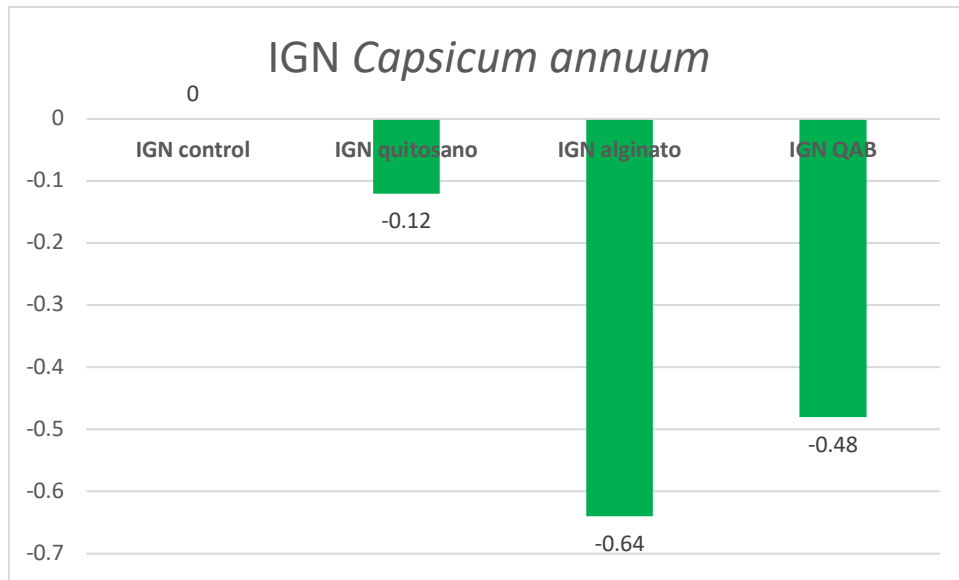


Ilustración 33. Índice del porcentaje de germinación residual normalizado para los materiales sintetizados, en semillas de chile (*Capsicum annuum*).

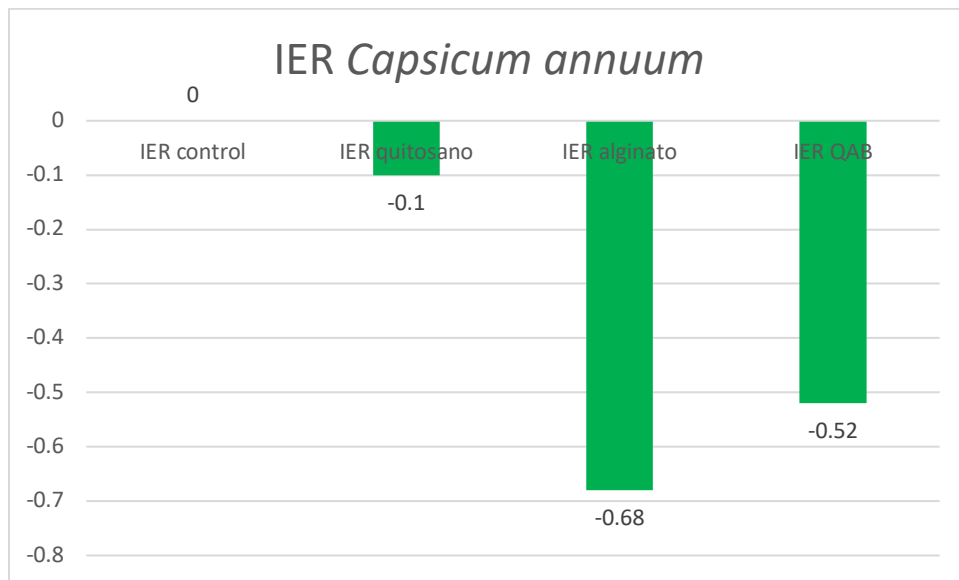


Ilustración 34. Elongación radical residual normalizado para los materiales sintetizados, en semillas de chile (*Capsicum annuum*).

Eficiencia de Remoción de Cobre

Para evaluar la eficacia del biocomposito sintetizado a partir de la mezcla de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* se llevó a cabo una cinética en donde se cuantificó la cantidad de cobre removido, a diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30, 45, 60, 80, 100 min y a las 24 h), a 35 °C y pH 5.5. Para la cuantificación del metal se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica (Aanalyst 400, Perkin Elmer).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el biocomposito de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* mostró una alta eficiencia de remoción de cobre (Tabla 9), observando una máxima remoción del metal a las 24 h.

Tabla 9. Eficiencia de remoción de Cu^{+2} del biocomposito formulado a base de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* a pH 5.5, a 30 °C.

| Tiempo (min) | Cantidad de Cu^{+2} (ppm) en el sobrenadante | Eficiencia de remoción de Cu^{+2} (%) |
|--------------|--|---|
| Control | 17.23 ± 0.00 | 0 |
| 0 | 16.281 ± 0.07 | 0.949 ± 0.069 |
| 15 | 7.953 ± 0.108 | 9.277 ± 0.108 |
| 30 | 5.841 ± 0.716 | 11.389 ± 0.716 |
| 45 | 5.235 ± 0.122 | 11.995 ± 0.122 |
| 60 | 4.705 ± 0.057 | 12.525 ± 0.056 |
| 80 | 4.813 ± 0.190 | 12.417 ± 0.189 |
| 100 | 4.889 ± 0.284 | 12.341 ± 0.284 |
| 24 (h) | 3.97 ± 0.243 | 13.26 ± 0.243 |

Valores promedio de todas las mediciones ± error estándar.

Se encontró que la cantidad de cobre removido o captado por el biocomposito fue rápida desde los 0 hasta los 15-30 min, logrando remover más de la mitad de la concentración inicial. A las 24 h, el material alcanzó una captación máxima ($p < 0.05$) de 13.26 ± 0.243 de Cu^{+2} por gramo de perlas de Q-A-B (en peso seco), con respecto a la cantidad inicial del metal (17.23 ± 0.00 mg Cu^{+2}) presente en agua sintética (Figura 35).

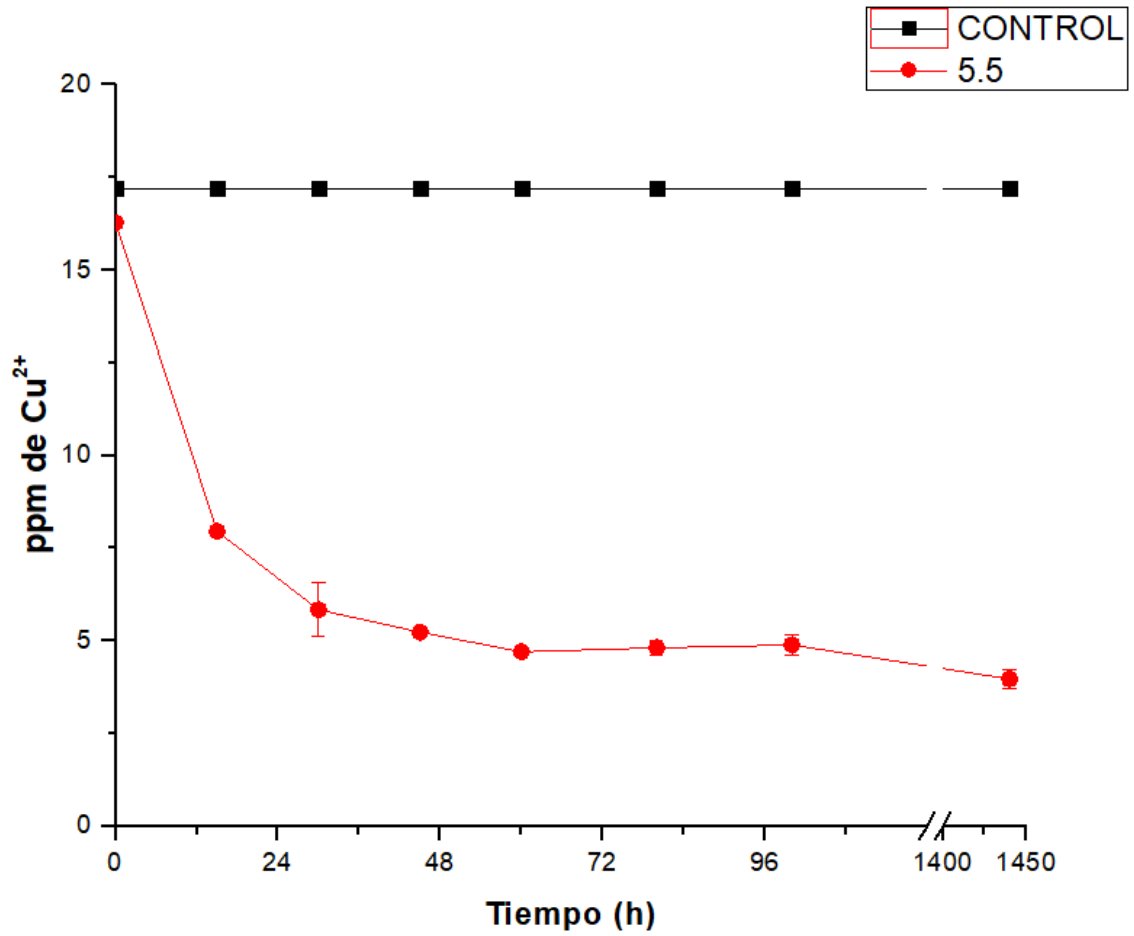


Ilustración 35. Remoción de Cu^{2+} por el biocomposito de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa*, a pH de 5.5.

CONCLUSIONES

- Se logró aislar una levadura capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de cobre y de quitosano, la cual fue indentificada como *Rhodotorula mucilaginosa*.
- Se logró producir biomasa de la levadura aislada mediante fermentación en medio líquido, y obtener biocompositos a partir de mezclas de quitosano, alginato y biomasa levaduriforme inactivada.
- Se logró determinar y comparar la toxicidad de los materiales sintetizados, mediante ensayos con nauplios de *Artemia salina* y semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y chile (*Capsicum annuum*), encontrando que las perlas de alginato y las perlas del biocomposito Q-A-B presentan índices normalizados de toxicidad entre moderados y altos, en comparación de las perlas de solo quitosano de medio peso molecular (QMPM).
- El biocomposito de QAB presentó una alta eficiencia para bioeliminar cobre en aguas, logrando remover 13.26 mg de metal por cada gramo de biocomposito.
- El procedimiento utilizado para sintetizar perlas de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* es adecuado para la producción de un material que constituye una alternativa que puede ser considerada como viable y al mismo tiempo sustentable para propósitos de biorremediación. No obstante, de acuerdo a los resultados toxicológicos, es posible deducir que el uso de estos materiales en sistemas biológicos es limitado debido a su potencial fitotoxicidad en plántulas de chile.

RECOMENDACIONES

- De suma importancia el uso de un microscopio de fuerza atómica (AFM) para observar a mayor escala la estructura de los biocompositos y así tener noción de la superficie que dicho material posee.
- Se recomienda utilizar agua contaminada con cobre (*in vivo*) con el biocomposito de quitosano-alginato-biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa*, y a su vez evaluar la remoción de otros metales.
- Elaborar biocompositos con biomasa viva de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* y comparar los resultados con el biocomposito formulado con la biomasa inactivada.
- Con base en la pigmentación que se observó en el biocomposito de Q-A-B al realizar la remoción de cobre durante la cuantificación del metal, se recomienda realizar un estudio para analizar el mecanismo de captación.
- Se recomienda evaluar la eficacia de las perlas Q-A-B (viva o inactivada) utilizando reactores en continuo, que permitan tratar grandes volúmenes de efluentes contaminados.
- Con base a los bioensayos empleados, se recomienda, utilizar otro tipo de semillas para comparar las diferentes condiciones que pueden ser sometidas una vez ya germinadas las plántulas.
- Utilizar las perlas de Q-A-B o biocomposito liofilizado y una vez en contacto con la solución con el metal presente, observar el comportamiento del biomaterial liofilizado y posteriormente determinar los cálculos que sean pertinentes.
- Es necesario realizar estudios *in vivo* y/o *in situ* que permitan tanto conocer la bioseguridad asociada al uso de estos materiales en los ecosistemas, como establecer estrategias para su aplicación.

REFERENCIAS

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2004. Reseña Toxicológica del Cobre (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Abener, W, H Holub, R Strohal, R Slavicek. 1993. Palladium in dental alloys—The dermatologists' responsibility to warn? *Contact Dermat* 28 (3):163–165.
- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. and Barberis, R. 2002. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. *Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. Environmental Pollution*, 119: 177.
- Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation* 2nd ed. Academic Press, London.
- Alsharari, S., Tayel, A. & Moussa, S. (2018). Soil emendation with nano-fungal chitosan for heavy metals biosorption. *International Journal of Biological Macromolecules xxx*, p. 1.
- Angelova V., Ivanova, R., Delibaltova, V. and Ivanov, K. 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 19: 197–205.
- Amitabha D, Sang-Hwal Y, Sook-Hee Lee, Jae-Yean K, Deok-Kun O, Seon-Won K. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007; 77:505-512.
- Arenas, R. (2008) *MICOLOGÍA MÉDICA ILUSTRADA*, Capítulo 31: Hialohifomicosis y feohifomicosis, McGrawHill: México, DF. Pag 316, 403 p.
- Argüelles, W., Heras, A., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, a., Miralles, B., Peniche, C. & Román, J. (2004). Caracterización de quitina y quitosano. En: quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. *Ed. Fondo Editorial Pontifica Universidad Católica de Perú*, p. 312.
- Arnous O.M, Hassan A.A.M. (2015). Heavy metals risk assessment in water and bottom sediments of the eastern part of Lake Manzala, Egypt, based on remote

sensing and GIS. *Arabian Journal of Geosciences*, 8, (10), pp. 7899-7918. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12517-014-1763-6>

- Atkinson, B. W., F. Bux y H. C. Kassan. 1998. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water SA*. 24:129-135.
- Atlas R.M. y Unterman, R. (1999). Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2nd ed (pp 666-681), ASM Press, Washington D.C
- Avedaño, G., López, A. & Palou, E. (2016). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, pp. 88 y 89
- Baker A.M. 1981. Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3:643-654.
- Baker A.J.M. y Walker P.L. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. En Shaw A.J. Ed. *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. pp.155-177, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Banat, K. M., Howari, F. and Al-Hamad, A. A. 2005. Heavy Metals in Urban Soils of Central Jordan: Should we Worry about Their Environmental Risks. *Environmental Research*, 97: 258-273.
- Bandaranayake W. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Natural Product Reports* 1998; 15:159-172.
- Bansal, V. Garg, D. Singh, V. K. Garg, J. *Haz. Mat.* 2009, 162, 312–320.
- Baran, E. Biçak, S. H. Baysal, S. Önal; *Biortech.* 2006, 98, 661–665.
- Baur. M.E. 2004. Pollution, *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 3rd Edition, Elsevier, Environmental Science Chapter. Environmental, University of California, Los Angeles.
- Bautista S, Hernández A, Velázquez M, Bozquez E. Sánchez D, *Rev. Iber. Tec. Postcos.*, 7,1 (2005)
- BILANDŽIĆ, N., DOVIĆ, M. et al and SEDAK, M. Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia. *Food Chemistry*, 4(2), 2012, p. 63–66.
- Brierley, C. L. 1990 a. Bioremediation of metalcontaminated surface and groundwater. *Geomicrobiol. J.* 8:201-223.

- Brierley, J. A. 1990 b. En: Biosorption of Heavy Metals. B. Volesky (ed.), CRC Press. Boca Raton, Fl. pp. 305-311.
- Bondada B. y Ma L.Q. 2002. Tolerance of heavy metals in vascular plants: arsenic hyperaccumulation by Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). En: Chandra S. y Srivastava M. Eds. *Pteridology in the New Millennium*, pp. 397-420, Kluwer, Dordrecht.
- Bonifaz, A. (2012) *Micología Médica Básica*, Capítulo 5: Hongos Contaminantes, 4 edición, McGrawHill: México. pag 65, 600p.
- Burgain, J.; Gaiani, C.; Linder, M. and Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104(4):467-483
- Buzzini P, Innocenti M, Turchetti B, Libkind D, Van Broock M, Molinacci N. Carotenoid profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Canadian Journal of Microbiology* 2007; 53:1024-1031.
- Cai Y. y Ma L.Q. 2002. Metal tolerance, accumulation and detoxification in plants with emphasis on arsenic in terrestrial plants. En: Cai Y. y Braids O. Eds. *Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Elements*, pp. 95-114, Oxford University Press, Oxford.
- Castro, G. (2013). *La minería y consecuencias en México*. Otros Mundos, AC/Red Mexicana de afectados por la minería (REMA)/M4.
- Chen, Kun Nan; Chen, Ming Ju and Lin, Chin Wen. 2006. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *Journal of Food Engineering*. 76(3):313-320.
- Chen, Lingyun and Subirade, Muriel. 2006. Alginate–whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*. 27(26):4646-4654.
- Chen, Y. et al., 2013. Accumulation and health risk of heavy metals in vegetables from harmless and organic vegetable production systems of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.037>.
- Combariza, B.D.A. 2009. Contaminación por Metales Pesados en el embalse del Muña y su relación con los niveles en sangre de Plomo, Mercurio y Cadmio y

alteración de salud en los habitantes del municipio de Sibaté (Cundinamarca) pp.1–115. Trabajo de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.

- Corinne P. Rooney, Fang-Jie Zhao, Steve P. McGrath. 2006. Phytotoxicity of nickel in a range of European soils: Influence of soil properties, Ni solubility and speciation, *Environmental Pollution* 145: 596-605.
- Cuizano, N. & Navarro, A. (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Química y Medio Ambiente*, p. 121.
- Davoodbasha, M., Sang, Y. & Jung, W. (2018). Solution plasma mediated formation of low molecular weight chitosan and its application as a biomaterial. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 3.
- De Rome, L. y G. M. Gadd, 1991. Use of pelleted and immobilized yeast and fungal biomass for heavy metal and radionuclide recovery. *J. Ind. Microbiol.* 7:97-104.
- Dembczyński, R. and Jankowski, T. 2000. Growth of lactic acid bacteria in alginate/starch capsules. In *Food Biotechnology. Progress in Biotechnology. Vol. 17.* (pp. 291-294). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B. V.
- DHIR, B. and KUMAR, R. “Adsorption of Heavy Metals by *Salvinia* Biomass and Agricultural Residues”. *Journal of Environmental*, 4(3), 2012, 427 p.
- Díaz, C., Jacinto, C., Medina, R. & Navarro, A. (2013). Estudio de la biosorción de cromo (vi) con quitosano cuaternario reticulado para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas. Perú: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería Lima.
- Domard A, *Adv, chitin science*, 3, 24 (1989).
- Domenech, X; Peral, J; 2008. *Química Ambiental de Sistemas Terrestres*. Editorial Reverté. Barcelona, España. 239 pp.
- Domínguez, F. & Jiménez, T. (2012). Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 6-2, p.116.
- Ehrlich, H. L. y C. L. Brierley (eds.) .1990. *Microbial Mineral Recovery*, McGraw-Hill.
- European Food Safety Authority (efsa).2015. Recuperado de: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/ topic/metals>

- Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D.P.V. y Schroeder, E.D. (1999). Principios de biorrecuperación. McGrawHill, Madrid.
- Fransisca, Y. et al., 2015. Assessment of arsenic in Australian grown and imported rice varieties on sale in Australia and potential links with irrigation practises and soil geochemistry. *Chemosphere*, 138, pp.1008–1013. Available at: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.048>.
- Freitas, H., Prasad, M.N.V. and Pratas, J. 2004. Heavy Metals in the Plant Community of Sao Domingo an Abandoned Mine in SE Portugal: Possible Applications in Mine Remediation. *Environmental International*, 30: 65-72.
- Gadd, G. M. 1988. Accumulation of metals by microorganisms and algae. En: *Biotechnology – A Comprehensive Treatise Special Microbial Processes*. H. J. Rehm (ed.). VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim. Volume 6 b, pp. 401-433.
- Gadd, G. M. y C. White. 1989. Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungal and yeasts. En: *Metal-Microbe Interactions*. R. K. Poole y G. M. Gadd (eds.), IRL Press, Oxford. pp. 19-38.
- Gallegos, M. (2015). Utilización de alginato de sodio para la encapsulación de complejo B. *Universidad Autónoma de Nuevo León*, p. 3.
- García, I. and Dorronsoro, C. 2005. Contaminación por Metales Pesados. En *Tecnología de Suelos*. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola. <http://edafologia.ugr.es>.
- Gardner, N. and Champagne, C.P. 2005. Production of *Propionibacterium shermanii* biomass and vitamin B12 on spent media. *Journal of Applied Microbiology*. 99(5):1236-1245.
- Giraldo, J. (2013). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *University of Concepción*, p. 2.-84
- Glazer, A.N. y Nikaido, H. (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. W. H. Freeman and Company, New York
- Gokila, S., Gomathi, T., Sudha, P. & Anil, S. Removal of the heavy metal ion chromium(vi) using chitosan and alginate nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules* 104, p. 1465.

- Greene, G. Bedell en *An Introduction to Applied Phycology* (Ed.: I. Akatsuka), SPB Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1990, pp. 137–149.
- Greenpeace. (2016). Consecuencias de la contaminación de nuestros ríos. Sitio web: <http://www.greenpeace.org/mexico/es/Campanas/Toxicos/Contaminacion-de-nuestros-rios/>
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53:1-11.
- Han, F.X., Banin, A., Kingery, W.L., Triplett, G.B., Zhou, L.X., Zheng, S. J. and Ding, W.X. 2003. New Approach to Studies of Heavy Metal Redistribution in Soil. *Advances in Environmental Research*, 8: 113-120.
- Harvey, P.J., Campanella, B.F., Castro, P.M.L., Harms, H., Lichtfouse, E., Schöffner, A.R, Smrcek, S. and Werck-Reichhart, D. 2002. Phytoremediation of Polyaromatic Hydrocarbons, Anilines and Phenols. *Environmental Science and Pollution Research* 9: 29-47.
- Heider, J.; Spormann, A.M.; Beller, H.R. y Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 459-473
- Hettiarachchi, G.M. and Pierzynski, G.M. 2002. In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: Influence of plant growth. *Journal Environmental Quality*, 31:564-573.
- Hierro N, González A, Mas A, Guillamón J. New PCRbased methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 97:792–801.
- Huang, Y., Wu, H., Shao, T., Zhao, X., Peng, H., Gong, Y. & Wan, H. (2018). Enhanced copper adsorption by DTPA-chitosan/alginate composite beads: mechanism and application in simulated electroplating wastewater. *Chemical Engineering Journal*, p. 2.
- Huang, Z. et al., (2014). Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. *Food Control*, 36(1), pp.248–252. Available at: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.036>.
- INTERNATIONAL CADMIUM ASSOCIATION [online]. 2011. Disponible: <http://www.cadmium.org> [Citado 14 de Octubre de 2014].

- Jayalalitha, V.; Balasundaram, B. and Palanidorai, R. 2012. In vitro assessment of microencapsulated probiotics beads. *International Journal of Agriculture: Research and Review*. 2(1):1-6.
- Kabata-Pendias, A. 2000. Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton. USA. pp. 365, 413.
- King R.B.; Long, G.M. y Sheldon, J.K. (1997). *Practical environmental bioremediation, the field guide*. Lewis publishers, NY.
- Krasaekoopt, Wunwisa; Bhandari, Bhesh and Deeth, Hilton. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13(1):3-13.
- Krasaekoopt, Wunwisa; Bhandari, Bhesh and Deeth, Hilton. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14(8):737- 743.
- Kratochvil, B. Volesky en *Biominet Proceedings* (Eds.: L. Lortie, C. Bedard, W. C. Gould, CANMET, Natural Resources Canada, Ottawa, ON, Canada, 1997, pp. 41–60
- LAGREGA, M.D.; BUCKINGHAM, P.L.; EVANS, J.C. 2001. *Environmental Resources Management. Hazardous waste management*. Mc Graw-Hill. pp. 7-23
- Laperche, V., Logan, T.J., Gaddam, P., Traina, S.J. 1997. Effect of apatite amendment on plant uptake of Pb from contaminated soil. *Environmental Science Technology*, 31:2745-2753.
- Larone, D. (2011) *Medically Important Fungi: A Guide To Identification*, *Capitulo Yeast and Yeastlike Organisms*, ASM Press: Washington, Dc. pag 140 – 141, 485p.
- Li, N. et al., (2015). Concentration and transportation of heavy metals in vegetables and risk assessment of human exposure to bioaccessible heavy metals in soil near a waste-incinerator site, South China. *Science of the Total Environment*, 521-522, pp.144–151. Available at: DOI: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.081](http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.081).
- Li, Y. Tang, X. cao, D. Lu, F. Luo, W. Shao, *Colloids and Surface A*. 2008, 317, 512–521.
- Libkind D, Moliné M, Van Broock M. Posibles mecanismos de fotoprotección en levaduras. *Revista electrónica de Radiobiología* 2004; 4:84-88.

- Libkind D. Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. *Revista Argentina de Microbiología* 2007; 39:133-137.
- Libkind D, Diéguez M, Moline M, Pérez P, Zagarese H, Van Broock M. Occurrence of Photoprotective Compounds in Yeasts from Freshwater Ecosystems of Northwestern Patagonia (Argentina). *Photochemistry and Photobiology* 2006; 82:972–980
- Linhart Y.B. y Grant M.C. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:237-277.
- Liu, Q., Dong, M., Zhou, W., Ayub, M., Zhang, Y., Huang, S. 2004. Improved oil recovery by adsorption–desorption in chemical flooding. *J Petrol Sci Eng* 43:75–86
- Lu, Y. y E. Wilkins. 1995. Heavy metal removal by caustic-treated yeasts immobilised in alginate. En: *Bioremediation of inorganics*. R. E. Hinchee, J. L. Means y D. R. Burris (eds.). Battelle Press, Ohio. pp. 117-124.
- Lucho, C.A., Álvarez, M., Beltrán, R.I., Prieto, F. and Poggi, H. 2005a. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environmental International*, On Line: 0160-4120-D 2004 doi:10.1016/j.envint.2004.08.002.
- Lucho, C.A., Prieto, F., Del Razo, L.M., Rodríguez, R. and Poggi, H. (2005b). Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 108: 57–71.
- Macaskie, L. E. y A. D. R. Dean. 1989. Biological Waste Treatment. En : *Advances in Biotechnological processes*. Vol. 12. A. Mizrahi (ed.), Alan R. Liss, New York. pp. 159-201.
- Macaskie, L. E. 1990. An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 49:357-379
- Mahler, R.L. 2003. General overview of Nutrition for field and container crops. In: Riley, L. E.; Dumroese, R. K.; Landis, T. D. *Tech Coords. National Proceeding: Forest and Conservation Nursery Associations*. 2003 June 9-12; Coeur d`Alene, ID; and 2003 July 14-17; Springfield, IL. Proc. RMRS-P-33.

- Mallaupoma, D., Valderrama, A. & Luyo., C. (2011). Estudio de biosorción de Pb (II) y Cd (II) utilizando cápsulas de Quitosano-Alginato. *Revista de la Facultad de Ciencias de la UNI*.
- Martin, C.W. 2000. Heavy Metals Trends in Floodplain Sediments and Valley Fill. *Catena* 39, 53-68.
- Matsumoto, K.S., Guerrero, I. y Hall, G.M. 1996. La quitina:ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia* 47:317
- Matus, I., Paniagua, L. & Benavente, M. (2011). Estudio de la cinética de adsorción de Cu y Hg a partir de soluciones binarias usando quitosano. *Revista Científica Nexo*, vol. 24, p. 21.
- Nava-Ruíz, C. & Méndez-Armenta, M., (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias*, 16(3), pp.140–147.
- Nieto, C. & Orellana, V. (2011). Aplicación del quitosano como promotor de floculación para disminuir la carga contaminante. *Universidad Politécnica Salesiana*, p. 31.
- Norris, P., & Kelley, D. (1979). Accumulation of metals by bacteria and yeasts. *Dev Ind Microbiol* 20:299–308.
- Orberá T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología* 2004; 21(1):15-19.
- Pagnanelli, F., Moscardini, E., Giuliano, V. and Toro, L. 2004. Sequential Extraction of Heavy Metals in River Sediments of an Abandoned Pyrite Mining Area: Pollution Detection and Affinity Series. *Environmental Pollution*, 132:189-201.
- Park, Y-S. Yun, H. W. Lee, J. N. Park, *Biotech.* 2008, 42, 276–289.
- Peso, P., Frontela, C., González, C., Ros, G. & Martínez, C. (2012). Polysaccharides from seaweed as ingredients in marine aquaculture feeding: alginate, carrageenan and ulvan. *Revista de biología marina y oceanografía*, vol. 47.
- Pillai, C., Paul, W. & Sharma, C. (2009). Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34, p. 643.
- Pineda, H.R. 2004. Presencia de Hongos Micorrízicos Arbusculares y Contribución de Glomus Intraradices en la Absorción y Translocación de Cinc y Cobre en Girasol (*Helianthus Annuus L.*) Crecido en un Suelo Contaminado con Residuos de Mina.

Tesis para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias Universidad de Colima. Tecoman, Colima.

- Plaza, J. (2012). Remoción de metales pesados empleando algas marinas.
- Pollard A.J. 2000. Metal hyperaccumulation: a model system for coevolutionary studies. *New Phytologist* 146:179-181.
- PROMIX (2018): La función del cobre en el cultivo de plantas. Recuperado de <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/la-funcion-del-cobre-en-el-cultivo-de-plantas/>
- RAMAKRITINAN, C.M., CHANDURVELAN, R. and KUMARAGURU, A.D. Acute toxicity of metals: Cu, Pb, Cd, Hg and Zn on marine mollusks. *Cerithedia cingulata* G, and *Modiolus philippinarum* H. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 2(1), 2012, p. 141-145.
- Raafat, D. & Georg, H. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, p. 185.
- Razmovski, R. and Vučurović, V. 2011. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix. *Enzyme and Microbial Technology*. 48(4- 5):378-385
- Robinson, B.H., Chiarucci, A., Brooks, R.R., Petit, D., Kirkman, J.H. and Gregg, P.E.H. 1997. The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal Geochemical Exploration*, 59, 75-86.
- Rodríguez, F. (2016). Efecto de bionanocompositos de quitosano/lisozima sobre la producción de glucanasas y estructuras subcelulares de *Aspergillus parasiticus*. *Tesis, Universidad de Sonora*, p. 17 & 18.
- Rooney, C.P., Zhao, F.J. and McGrath, S.P. 2006. Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 726-732.
- Rosenberg, E. y Ron, E.Z. (1996). Bioremediation of petroleum contamination. In: Crawford RL & Crawford DL (Eds) *Bioremediation. Principles and Applications* (pp 100-124). *Biotechnology Research Series 6*. University Press, Cambridge.

- Sala, L.F., García S.I., González J.C., Frascaroli M.I. (2010). Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho. *Química y medio ambiente*.
- Sánchez A, Flores L, Langley E, Martín R, Maldonado G, Sánchez S. Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 1999; 41:175-191.
- Santacruz, I. Nieto, I. & Moreno, R. (2005). Nuevas aplicaciones de los alginatos en el conformado cerámico. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, p. 47.
- Sauquillo, A., Rigol, A. and Rauret, G. 2003. Overview of the use of Leaching Extraction Tests for Risk Assessment of Trace Metals in Contaminated Soils and Sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 152-159.
- Sauve, S., Henderson, W. and Allen, H.E. 2000. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environmental Science Technology*, 34:1125–1131.
- Sax, NI, RJ Lewis, Sr. (dirs.). 1989. *Dangerous Properties of Industrial Materials*, 7^a ed. Nueva York: Van Nostrand Reinhold.
- Schiewer, B. Volesky en *Remediation*; (Ed.: J. J. Valdes), Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp. 139–169.
- Sharma, P. Kumari, M. M. Sirvastava, S. Srivastava, *Biortech*. 2007, 98, 474–477.
- Singh, A. et al., (2010). Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from waste water irrigated area of Varanasi, India. *Tropical Ecology*, 51(2 SUPPL.), pp.375–387. Available at: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.041>.
- Spain, A. 2003. Implications Of Microbial Heavy Metals Tolerance in the Environment. *Reviews In Undergraduate Research*, 2:1-6.
- Sun, J. & Tan, H. (2013). Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials* 6(14).
- Stevens, D.P., McLaughlin, M.J., Heinrich, T., 2003. Determining toxicity of lead and zinc run off in soils: salinity effects on metal partitioning and on phytotoxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 3017-3024.
- Terbojevich M, Carraco C, Cosani A, *Carbohydr, Research* (1988).
- Tobin, J., Cooper, D., & Neufeld, R. (1984). Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl Environ Microbiol* 47:821–824.

- Tobin, J. M. D. G. Cooper y R. J. Neufeld. 1988. The effects of cation competition on metal adsorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Biotechnol. Bioeng.*
- Tsezos, M. y B. Volesky. 1981a. Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnol. Bioeng.* 23:583-604.
- Tsezos, M. y B. Volesky. 1981b. The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* 24:385-401.
- V. J. P. Vilar, S. C. R. Santos, R. J. E. Martins, C. M. S. Botelho, R. A. R. Boaventura; *Biochem. Eng. J.* 2008, 42, 276–289.
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M. y Regvar M. 2006. Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environmental Pollution* 139:362-371.
- Volesky, B. 1990. Removal and recovery of heavy metals by biosorption. En: *Biosorption of Heavy Metals*. B. Volesky (ed.). CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 7-44
- Volesky, B., May, H., & Holan, Z. (1993). Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 41: 826–829.
- Wang, Y. P., and Chao, C.C. 1992. Effects of Vesicular- Arbuscular Mycorrhizae and Heavy Metals on the Growth of Soybean and Phosphate and Heavy Metal Uptake by Soybean in Major Soil Groups of Taiwan. *Journal Agricultural Association China New Series* 157: 6-20.
- White, C. y G. M. Gadd. 1990. Biosorption of radionuclides by fungal biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 49: 331-343.
- X. S. Wang, Z. Z. Li, C. Sun, *J. Haz. Mat.* 2008, 153, 1176–1184.
- Yang, J. P. Chen, *Biortech.* 2008, 99, 297–307.
- Yuan G. L., Sun T.H., Han P., Li J., Lang X.X. (2014). Source identification and ecological risk assessment of heavy metals in topsoil using environmental geochemical mapping: Typical urban renewal area in Beijing, China. *Journal of Geochemical Exploration*, 136, pp 40-47. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.10.002>
- Zhang, L., Zeng, Y. & Cheng, Z. (2016). Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review. *Journal of Molecular Liquids* 214, p. 186.

- Zhao, F.J., Rooney, C.P., Zhang, H., McGrath, S.P., 2006. Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 733-742.